

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BIOPOLÍMEROS EM  
SOLUÇÃO UTILIZANDO SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL

**Eduardo de Faria Franca**

Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
DOUTOR EM CIÊNCIAS (área de  
concentração FÍSICO-QUÍMICA)

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Gomide Freitas

Co-orientador: Dr. Roberto Dias Lins Neto

\*Bolsista CNPq/CAPES

São Carlos – SP

2009

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

F814cm

Franca, Eduardo de Faria.

Caracterização molecular de biopolímeros em solução  
utilizando simulação computacional / Eduardo de Faria  
Franca. -- São Carlos : UFSCar, 2009.  
163 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,  
2009.

1. Estrutura molecular. 2. Quitina e quitosana. 3. Dinâmica  
molecular. 4. QM/MM sequencial. I. Título.

CDD: 541.22 (20<sup>a</sup>)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
*Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia*  
*Departamento de Química*  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**Curso de Doutorado**

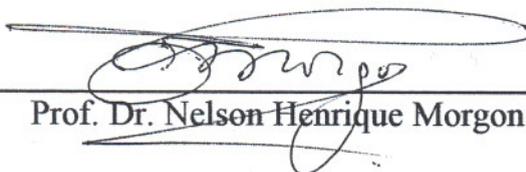
---

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado do candidato **Eduardo de Faria Franca**, realizada em 17 de fevereiro de 2009:*



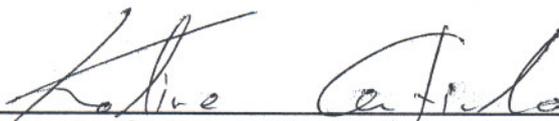
---

Prof. Dr. Luiz Carlos Gomide Freitas



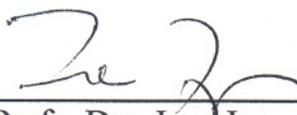
---

Prof. Dr. Nelson Henrique Morgon



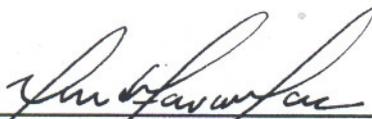
---

Profa. Dra. Kaline Rabelo Coutinho



---

Profa. Dra. Ione Iga



---

Prof. Dr. André Farias de Moura

À minha família  
Aos meus pais: Sinval e Raimunda *(in memoriam)*  
À minha esposa e amor da minha vida: Luciana  
Aos meus irmãos, sobrinhos e cunhados.

*A busca do conhecimento é igual a uma longa jornada que possui infinitos caminhos. Esta jornada pode nunca ter um fim, mas o que importa é ajudar a humanidade a caminhar (Eduardo de Faria Franca).*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Gomide Freitas pela orientação, incentivo, e amizade. Agradeço pelas inúmeras discussões e idéias inovadoras que contribuíram para minha formação.

Ao Dr. Roberto Dias Lins Neto pela orientação, incentivo e constante disponibilidade. Agradeço ao incentivo e à valorização do trabalho realizado, me motivando e me dando força para continuar minha carreira científica.

À minha amiga Profa. Dra. Silvana Guilardi, pelos conselhos, atenção, apoio e amizade durante todos esses anos, acompanhando a minha vida acadêmica e crescimento profissional.

À Profa. Cheryl pelo convite e oportunidade de participar como professor voluntário no Columbia Basin College (CBC). Agradeço pela amizade e ajuda na minha inserção ao ambiente escolar.

Ao Prof. Dr. Tjerk Straatsma pela cooperação nos trabalhos realizados e oportunidade de expor meu trabalho ao grupo de biologia computacional e bioinformática do Pacific Northwest National Laboratory.

Aos colegas de escritório Sun e Yi pela amizade e companheirismo.

A Roberto e Thereza pela recepção, ajuda e apoio em todos os momentos durante o tempo nos Estados Unidos. Agradeço também pela amizade e ajuda que foram essenciais na minha adaptação ao ambiente de trabalho.

Ao meu amigo Corinthiano Severo, pela sua constante disposição em ajudar e compartilhar os momentos de alegria. Agradeço pela ajuda na minha mudança, acolhida em sua casa antes do retorno ao Brasil, além da confiança e companheirismo em todos os momentos durante o tempo em Richland - USA.

Aos meus amigos Nitinha e Louis pela amizade e convivência. Agradeço pela ajuda na mudança e empréstimos da mobília.

Aos meus amigos Molly e Rob pela amizade e oportunidade de conhecer um pouco mais sobre a cultura americana. Agradeço a Profa. Molly pelas dicas de passeio e correções na minha dicção da língua Inglesa.

Aos meus amigos José e Sônia Beatriz; Blanca e Rodrigo; Nelly e Xerife Rubens pela amizade, ajuda, momentos de descontração e apreciação das culinárias peruana, mexicana e el-salvadorenha.

Aos meus amigos monges budistas: Paruhas e Bureang pela amizade e momentos de

alegrias. Agradeço a oportunidade de ter conhecido um pouco da cultura budista e Tailandesa.

A todos os meus amigos nos Estados Unidos: Marco e Jeane; Gilmar (e família); Paulo e Adriana; Ally e Ivanir, e seu filhos Jacó e Isac; Alexandre e Cristina, e seus filhos Samuel e Sarah; Júlio, Giulio e Vanessa; Tony e Tina pela amizade, reuniões de confraternização, e momentos de descontração.

À CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado.

À CAPES, pela concessão da bolsa PDEE em Richland – USA.

À FAPESP, pelo financiamento dos recursos computacionais utilizados no LQT.

Ao Pacific Northwest National Laboratory, Richland – USA, pela infra-estrutura para a realização de parte do meu trabalho.

Às secretárias do PPGQ, Cristina, Ariane e Luciane, pela competência e disponibilidade de cuidar dos meus assuntos acadêmicos.

Aos amigos do LQT: André, Osmair, Eduardo Lopes, Marcello, Raphael e Renata, pelo companheiro, discussões, ajuda e momentos de descontração.

À minha amiga Fernanda pela amizade, ajuda e momentos de alegria compartilhados

Aos meus tios Valdir e Vilda pela ajuda e compreensão nos momentos que mais precisei.

A meu sogro Valdemar e minha sogra Donizete, e meus cunhados Wender e Luciene e a minha querida afilhada Sara, pelo apoio, paciência e compreensão durante a minha jornada.

Aos meus irmãos Sérgio e Valéria; cunhados Roberto e Eliane; e sobrinha Júlia pelo carinho e atenção.

Ao meu sobrinho Rafael pelas discussões filosóficas e científicas.

Ao meu pai Sinval, pelo constante apoio e compreensão à jornada que escolhi seguir.

À minha esposa Luciana, pelo companheirismo, carinho, compreensão e apoio constante em toda etapa da realização de meu trabalho de Doutorado.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM1 = Modelo Austin 1

GA = grau de acetilação

HOMO = Orbital Molecular de energia mais alta ocupado

LUMO = Orbital Molecular de energia mais baixa desocupado

ns = nanossegundos ( $10^{-9}$  s)

PM3 = Método Paramétrico 3

ps = picossegundos ( $10^{-12}$  s)

QM/MM = Mecânica Quântica/Mecânica Molecular

SCF = Campo autoconsistente

single-point = Um único cálculo SCF

## LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 – Descrição dos filamentos quitina e quitosana solvatados à diferentes percentagens e distribuição de grupos acetil. ....	58
TABELA 3.2 – Descrição das nanopartículas de quitina e quitosana simuladas à diferentes percentagens e distribuição de grupos acetil. ....	59
TABELA 3.3 – Parâmetros diedrais original e modificado. ....	60
TABELA 3.4 – Parâmetro de comprimento, ângulos de ligação e ângulos diedros próprios e de deformação imprópria obtidos do campo de força G53a6 do GROMOS. ....	61
TABELA 3.5 – Cargas atômicas parciais para o campo de força G53a6 do GROMOS para carboidratos, descritos em função do resíduo. ....	62
TABELA 3.6 – Tendência helicoidal da cadeia principal do filamento de quitina e quitosana solvatado. ....	69
TABELA 3.7 – Número e tempo de vida médio das ligações de hidrogênio, de toda trajetória da Dinâmica Molecular, para os filamentos de quitina e quitosana solvatados. ....	71
TABELA 3.8 – Número e característica dos agregados de quitina e quitosana. ....	74
TABELA 3.9 – Número total e tempo de vida para as ligações de hidrogênio mais persistentes entre os filamentos das nanopartículas de quitina e quitosana, durante toda a simulação. ....	80
TABELA 3.10 – Contribuição eletrostática e apolar por resíduo para a energia livre de solvatação (kcal/mol) para as cadeias solvatadas de quitina e quitosana. ....	82
TABELA 4.1. Descrição dos sistemas simulados. ....	92
TABELA 4.2 – Número e tempo de vida média das ligações de hidrogênio na quitina e quitosana para a toda a trajetória. ....	99
TABELA 4.3 – Contribuição média por resíduo (kcal/mol) da energia livre de solvatação das cadeias de quitina e quitosana. ....	104
TABELA 5.1 – Descrição detalhada dos sistemas simulados. ....	110
TABELA 5.2 – Preferência conformacional de aminoácidos (Pace e Scholtz, 1998). ....	118
TABELA 5.3 – Contribuição da energia livre na estabilização da estrutura inicial em $\alpha$ -hélice, e preferência relativa de cada aminoácido em formar $\alpha$ -hélice. ....	126
TABELA 5.4 – Contribuição energética do calor de formação, energia livre de solvatação e energia livre total na formação da $\alpha$ -hélice. ....	134

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Formação das duas estruturas cíclicas das D-glicose.....	4
FIGURA 1.2 – Fórmulas conformacionais das piranoses. (a) Duas formas em cadeia do anel piranosídico. (b) Uma conformação em cadeia da $\beta$ -D-glicopiranosose. ....	5
Figura 1.3 – Dois derivados das hexoses. ....	6
FIGURA 1.5 – Conformação das ligações glicosídicas da celulose.....	8
FIGURA 1.6 – Representação esquemática da estrutura da quitina.....	9
FIGURA 1.7 – Esquema da estrutura polimérica da cadeia quitina e quitosana.....	10
FIGURA 1.8 – Estrutura geral de um aminoácido.....	13
FIGURA 1.9 – Os 20 aminoácidos mais comuns encontrados nas proteínas....	14
Figura 1.10 – Formação de uma ligação peptídica. ....	15
FIGURA 1.11 – Definições de ângulos diedros em um peptídeo.....	16
FIGURA 1.12 – Diagrama de Ramachandran para resíduos.....	17
FIGURA 1.13 – Modelo de $\alpha$ -hélice para polipeptídeos.....	18
FIGURA 1.14 – Conformação em folha- $\beta$ para cadeias de polipeptídeos. ....	19
FIGURA 2.1 – Representação geométrica do ângulo de torção.....	25
FIGURA 2.2 – Condições periódicas de contorno em duas dimensões. ....	32
FIGURA 2.3 – Representação do raio de corte esférico para um sistema periódico em duas dimensões.....	33
FIGURA 2.4 – Representação da construção de um arranjo de células periódicas no método <i>soma de Ewald</i> . Figura adaptada de (Leach, 2001).....	34
FIGURA 2.4 – Representação esquemática do método campo de reação (reaction field). ....	36
FIGURA 3.1 – Definição dos ângulos diedros $\phi$ e $\psi$ ao redor da ligação glicosídica.....	57
FIGURA 3.2 – Descrição do ângulo diedro próprio que define a conformação do anel piranosídico. R = $-\text{NH}_2$ , $-\text{NH}_3^+$ ou $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ .....	60
Figura 3.3 – Numeração dos átomos no campo de força.....	61
FIGURA 3.4 – Mapa de distribuição dos ângulos diedros $\phi$ e $\psi$ para os últimos 5ns de simulação para os filamentos de polissacarídeos com a) 0%, b) 40% (distribuição randômica), c) 40% (distribuição em blocos), d) 60% (distribuição randômica), e) 60% (distribuição em blocos), f) 100%, de grupos acetil. ....	66
FIGURA 3.5 – Orientação do solvente (água) ao redor do átomo de oxigênio O3 das cadeias de quitina e quitosana.....	72
FIGURA 3.6 – Evolução temporal dos desvios quadrático médio (RMSD) de todos os átomos, com relação à sua estrutura inicial. ....	76
FIGURA 3.7 – Representação molecular da nanopartícula totalmente deacetilada após 20 ns de simulação.....	77

FIGURA 3.8 – Representação molecular após 20ns de simulação de nanopartículas de quitosana com 40% GA e distribuição a) randômica, e b) em blocos, de grupos acetil. ....	78
Figure 3.9 – Representação molecular de nanopartículas de quitina após 20ns de simulação com 60% GA e distribuição a) randômica e b) em blocos de grupos acetil.....	79
FIGURA 3.10 – Orientação do solvente (água) ao redor do átomo de oxigênio O3 das nanopartículas de quitina e quitosana. ....	84
FIGURA 3.11 – Estrutura representativa da matriz de quitina nos últimos 5ns de simulação, descrevendo a rede de ligações de hidrogênio formado entre moléculas de água orientadas e as cadeias do polissacarídeo.....	85
FIGURA 4.1 – Definição dos átomos em um filamento de quitina.....	90
FIGURA 4.2 – Ângulos de torção $\phi$ e $\varphi$ para a quitina em diferentes forças iônicas: a) e b) em função do tempo de simulação e c-e) mapa de distribuição de $\phi$ e $\varphi$ para os últimos 5ns dos sistemas a c) 0,0M, d) 0,4M, e e) 1,1 M de força iônica. ....	94
FIGURA 4.3 – Padrão estrutural para cadeias de a-c) quitina e d-f) quitosana em solução aquosa em função do tempo: a) quitina 0,0 M; b) quitina 0,4 M; c) quitina 1,1 M; d) quitosana em pH elevado; e) quitosana em pH neutro; e f) quitosana em baixo pH. ....	96
FIGURA 4.4 – A orientação do solvente (água) ao redor do átomo de oxigênio O3 das cadeias de quitina e quitosana.....	101
FIGURA 4.5 - Potencial eletrostático plotado na superfície molecular para a) quitina e b-d) quitosana; b) quitosana em pH básico; c) quitosana em pH neutro; e d) quitosana em pH ácido. Os potenciais positivos (azul) e negativo (vermelho) correspondem à faixa de $-50K_B T/e$ a $+50 K_B T/e$ . ....	103
FIGURA 5.1 – Aminoácidos componentes dos homo-peptídeos.....	109
FIGURA 5.2 – Energia livre de solvatação calculada versus valor experimental para diferentes compostos utilizando o modelo de solvatação SM5.42R, e o hamiltoniano AM1.....	115
FIGURA 5.3 – Gráfico do RMSD entre a estrutura de partida ( $\alpha$ -hélice) e as demais conformações encontradas ao longo da dinâmica dos homeopeptídeos. Os valores são mostrados como médias num intervalo de 50-ps.....	116
FIGURA 5.4 – Estrutura dos peptídeos (A) antes e (B) depois da simulação computacional. ....	117
FIGURA 5.5 – Calor de formação da conformação das estruturas de homeopeptídeos obtidas ao longo da trajetória realizada por Dinâmica Molecular. Os valores são mostrados como médias num intervalo de 50-ps..	120
FIGURA 5.6 – Representação da interação entre os grupos N-terminal e C-terminal da hexaglicina. ....	121
FIGURA 5.7 – Energia livre de solvatação das estruturas obtidas a cada ps de simulação dos homeopeptídeos compostos por 6 resíduos de aminoácidos de (A) glicina, (B) alanina, (C) leucina, (D) isoleucina e (E) valina. ....	122

FIGURA 5.8 – Energia livre total média do sistema ( $\Delta G_{\text{total}} = \Delta H_f + \Delta G_{\text{solv.}}$ ) em função das estruturas de homopeptídeos encontrada ao longo da trajetória de simulação por Dinâmica Molecular. As médias foram obtidas num intervalo de 80 ps. ....	125
FIGURA 5.9 – Relação entre energia livre de solvatação e hidrofobicidade por resíduo (monômero) de aminoácido. ....	128
FIGURA 5.10 – RMSD dos homopeptídeos (A) 12Ala e (B) 16Ala com relação a estrutura inicial ( $\alpha$ -hélice). ....	130
FIGURA 5.11 – Gráficos do (A) Calor de formação da (B) energia livre de hidratação para os peptídeos (1) 12 Ala e (2) 16 Ala.....	131
FIGURA 5.12 – Superfícies de energia em função da média dos ângulos diedros $\phi$ e $\psi$ para (A) Calor de formação e (B) Energia livre de hidratação para o peptídeo com 12 resíduos de alanina.....	132
FIGURA 5.13 – Variação do momento dipolar calculado pelo modelo de cargas CM2 classe IV, ao longo da trajetória. ....	133
FIGURA 5.14 – Variação da energia livre total do sistema em função da média dos ângulos diedros $\phi$ e $\psi$ para o (A) peptídeo com 12 resíduos de alanina e para o (B) peptídeo com 16 resíduos de alanina.....	135
FIGURA 5.15 – RMSD máximo das cargas: a) Cargas obtidas quanticamente com relação às cargas do campo de força; b) cargas quânticas da estrutura inicial em $\alpha$ -hélice em relação carga quântica da estrutura ao longo da simulação. Os átomos estão numerados a partir do N-terminal em direção ao C-terminal. ....	138
FIGURA 5.16 – Variação das energias de HOMO e LUMO para a hexaalanina no vácuo e em solução ao longo da trajetória simulada. ....	139

## RESUMO

### **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BIOPOLÍMEROS EM SOLUÇÃO UTILIZANDO SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL.**

Neste trabalho, métodos de simulação computacional foram usados para caracterizar a estrutura e propriedades moleculares de biopolímeros naturais e sintéticos em solução aquosa. Os polissacarídeos quitina e quitosana, e polipeptídeos alifáticos foram os biopolímeros estudados. O interesse nos biopolímeros quitina e quitosana é devido à suas biodegradabilidade, biocompatibilidade e potencial uso como produto farmacêutico ou tecnológico. No presente trabalho, simulações por Dinâmica Molecular foram utilizadas para caracterizar a estrutura e a solubilidade de quitinas e quitosanas em solução aquosa. Os sistemas modelados eram compostos por cadeias solvatadas e nanopartículas formadas por cadeias empacotadas paralelamente e de forma antiparalela, com diferentes percentagens e distribuição de grupos acetil. A quitina 100% acetilada, tanto na forma isolada ou na forma de  $\alpha/\beta$ -quitina adota a conformação de hélice 2, com valores de  $\phi$  e  $\psi$  similares aos da sua estrutura cristalina. A força iônica afeta a cinética, mas não o equilíbrio conformacional. Em solução, as ligações de hidrogênio intramolecular  $\text{HO3}_{(n)} \cdots \text{O5}_{(n+1)}$ , responsável por estabilizar o motivo helicoidal hélice 2, são estabilizadas por ligações de hidrogênio com moléculas de água em orientações bem definidas. Por outro lado, a quitosana com pequena percentagem e distribuição randômica de grupos acetil pode adotar cinco motivos estruturais e seu equilíbrio conformacional é altamente dependente do pH. O padrão de ligação de hidrogênio e a solvatação ao redor do átomo O3 da quitina insolúvel (pH básico) é quase idêntico ao observado para a quitina. As nanopartículas de quitina e quitosana com distribuição em blocos de grupos acetil favorece a formação de ligações de hidrogênio intermolecular e interações hidrofóbicas, resultando em agregados mais estáveis. A mobilidade e a orientação das moléculas de água ao

redor da cadeia de polissacarídeo (altamente afetada por forças eletrostáticas) é responsável pela agregação e solubilidade dos biopolímeros quitina e quitosana. Além disso, a metodologia QM/MM sequencial foi utilizada para estudar a estabilidade da  $\alpha$ -hélice de polipeptídeos alifáticos em solução. Sabe-se que o entendimento do processo de enovelamento é um dos grandes desafios da biofísica, e o primeiro passo consiste em entender a formação e a estabilização da estrutura de polipeptídeos. Os valores de calor de formação e energia livre de solvatação mostraram que o tamanho da cadeia lateral é diretamente proporcional à estabilidade da  $\alpha$ -hélice. Os resultados sugerem que o processo de enovelamento-desenovelamento de polipeptídeos é governado pelo equilíbrio entre a energia utilizada para enovelar o peptídeo e a energia liberada pelo processo de solvatação, mostrando o efeito do solvente na estabilização da  $\alpha$ -hélice. A validação da metodologia QM/MM sequencial utilizada mostrou ser adequada para o estudo do processo de enovelamento–desenovelamento de polipeptídeos em solução, e útil no estudo da estrutura eletrônica e do efeito do solvente em compostos que possuam elevado grau de liberdade conformacional.

## ABSTRACT

### **MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BIOPOLYMERS IN SOLUTION BY COMPUTATIONAL SIMULATION.**

Computer simulation methods were used to characterize the structure and molecular properties of natural and synthetic biopolymers in aqueous solution. The polysaccharides chitin and chitosan, and aliphatic polypeptides were studied. The interest on the chitin and chitosan biopolymers is because of their biodegradability, biocompatibility and potential use as pharmaceutical and technological product. Molecular dynamics simulations have been used to characterize the structure and the solubility of the chitins and chitosans in aqueous solution. The simulated systems were composed by solvated chains, and nanoparticles composed by chains packed in a parallel and anti-parallel fashion, with different percentage and distribution of acetyl groups. The 100% acetylated chitin, whether isolated or in the form of  $\alpha/\beta$ -chitin, adopt the 2-fold helix conformation with  $\phi$  and  $\psi$  values similar to those on crystalline state. The ionic strength affects the kinetics, but not the conformational equilibrium. In solution, the intramolecular hydrogen bond  $\text{HO3}_{(n)} \cdots \text{O5}_{(n+1)}$  responsible for the 2-fold helical motif is stabilized by hydrogen bonding to water molecules in a well-defined orientation. On the other hand, chitosan with small percentage and random distribution of acetil groups can adopt five distinct helical motifs and its conformational equilibrium is highly dependent on pH. The hydrogen bond pattern and solvation around the O3 atom of insoluble chitosan (basic pH) are nearly identical to those quantities in chitin. Chitin and chitosan nanoparticles with block distribution of acetyl groups favor the formation of intermolecular hydrogen bonds and hydrophobic interactions, resulting in more stable aggregates. The water mobility and orientation around polysaccharide chain (highly affected by electrostatic forces) is responsible for the aggregation and solubility of the chitin and chitosan biopolymers. Moreover, a sequential

QM/MM methodology is used to study the  $\alpha$ -helix stability of aliphatic polypeptides in water solution. The understanding of the folding process is one of the greatest challenges of biophysics, and the first step is the understanding of the formation and stabilization of the secondary structure of a polypeptide. The calculated heat of formation and free energy of solvation showed that the size of side chain is directly related to the  $\alpha$ -helix stability. The results suggest that the helix-coil transition of a polypeptide is governed by the equilibrium between the energy used in the folding process and the energy released in the solvation process, showing the solvent effect on  $\alpha$ -helix stabilization. The validation of the sequential QM/MM methodology showed that this method is suitable to study the helix-coil transition of polypeptides in solution. The methodology is therefore useful to study solvation effects on the properties of compounds with many conformational degrees of freedom.

# SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	1
INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – BIOPOLÍMEROS .....	1
1.2 – CARBOIDRATOS.....	2
1.2.1 – Quitina e quitosana.....	9
1.3 - AMINOÁCIDOS E PEPTÍDEOS.....	13
1.3.1 – Aminoácidos.....	13
1.3.2 – Peptídeos.....	15
1.4 – OBJETIVOS.....	20
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	21
FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	21
2.1 – MECÂNICA MOLECULAR (MM).....	23
2.1.1 – Potencial harmônico de ligação (ou linear).....	24
2.1.2 – Potencial Harmônico Angular.....	24
2.1.3 – Potencial Torsional (ou diedral).....	25
2.1.4 – Potencial de Lennard-Jones (ou van der Waals).....	25
2.1.5 – Potencial de Coulomb .....	26
2.2 – MÉTODOS DE SIMULAÇÃO MOLECULAR.....	26
2.2.1 – Dinâmica Molecular .....	28
2.2.1.1 – Métodos de Integração por Diferença Finita.....	29
2.2.1.2 – Algoritmo Leap-Frog .....	30
2.2.1.3 – Condições Periódicas de Contorno .....	31
2.2.1.4 – Raio de Corte.....	32
2.2.1.5 – Interações de longo alcance e Soma de Ewald .....	33
2.2.2.6 – Interações coulômbicas com o campo de reação .....	35
2.3 – POTENCIAL ELETROSTÁTICO E SOLVATAÇÃO IMPLÍCITA .....	36
2.3.1 – Cálculo do potencial eletrostático resolvendo numericamente o método de diferença finita de Poisson-Boltzmann.....	36
2.3.2 – Modelos de solvatação implícita.....	41
2.4 – MÉTODO HÍBRIDO QM/MM (QUANTUM MECHANICS / MOLECULAR MECHANICS).....	47
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	55
CONFORMAÇÃO E SOLUBILIDADE DE QUITINAS E QUITOSANAS À DIFERENTES GRAUS DE ACETILAÇÃO .....	55
3.1– INTRODUÇÃO.....	55
3. 2 – METODOLOGIA .....	56
3.2.1 – Sistemas simulados.....	56

3.2.2 – Modificações e reparametrizações do campo de força para carboidratos .....	59
3.2.3 – Simulações por Dinâmica Molecular .....	63
3.2.4 – Cálculo da energia livre de solvatação .....	64
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	64
3.4 – CONCLUSÃO .....	87
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>89</b>
AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FORÇA IÔNICA E PH EM FILAMENTOS DE QUITINA E QUITOSANA .....	89
4.1 – INTRODUÇÃO .....	89
4.2 METODOLOGIA .....	91
4.2.1 – Sistemas simulados .....	91
4.2.2 – Simulações por Dinâmica Molecular .....	92
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	93
4.4 – CONCLUSÃO .....	105
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>107</b>
DINÂMICA ESTRUTURAL DE POLIPEPTÍDEOS EM SOLUÇÃO .....	107
5.1 – INTRODUÇÃO .....	107
5.2 – METODOLOGIA .....	109
5.2.1 – Sistemas simulados .....	109
5.2.2 – Descrição da metodologia QM/MM sequencial .....	110
5.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	116
5.3.1 – Dinâmica estrutural de homopeptídeos contendo 6 resíduos de aminoácidos .....	116
5.3.2 – Dinâmica estrutural de homopeptídeos de alanina contendo 12 e 16 resíduos de aminoácidos .....	128
5.3.2 – Outras aplicabilidades do método QM/MM sequencial. ....	137
5.6 – CONCLUSÃO .....	140
<b>CAPÍTULO 6</b> .....	<b>143</b>
CONCLUSÕES .....	143
<b>CAPÍTULO 7</b> .....	<b>147</b>
SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS .....	147
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS .....	149

# Capítulo 1

## INTRODUÇÃO

### 1.1 – BIOPOLÍMEROS

Os biopolímeros são polímeros sintetizados por organismos vivos, e seus derivados são diversos, abundantes e importantes para a vida, exibindo importantes propriedades e aplicações. Os biopolímeros podem ser divididos em oito grandes classes, de acordo com suas estruturas: (1) ácidos nucleicos como ácidos ribonucleicos e deoxirribonucleicos, (2) poliamidas como proteínas e peptídeos, (3) polissacarídeos como a celulose, amido e quitina, (4) polioxoésteres orgânicos como os ácidos poli-hidroxicarboxílicos e poli-málico, (5) poli-tioésteres, (6) poliésteres inorgânicos como único exemplo, o polifosfato, (7) poliisoprenóides como as borrachas naturais e (8) polifenóis como a lignina e os ácidos húmicos (Stryer, 2002).

Os biopolímeros possuem uma ampla faixa de funções essenciais para os organismos como: conservação e expressão de informação genética, reações catalíticas, reservatório de carbono, nitrogênio, fósforo, outros nutrientes e energia; além disso, eles exercem defesa e proteção contra o ataque de outras células ou do meio, comunicação com o meio ambiente e com os outros organismos, mediador de adesão de superfícies de outros organismos e de matéria não viva. Além disso, muitos biopolímeros são componentes estruturais de células, tecidos e de organismos inteiros.

Para exercer todas essas diferentes funções, os biopolímeros devem exibir diversas propriedades. Eles devem interagir especificamente com uma grande variedade de substâncias e materiais, e devem possuir alta afinidade a eles.

Os biopolímeros mais conhecidos são: polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, os quais são produzidos pela polimerização de compostos

relativamente pequenos com massas molares de 500 g/mol ou menos. O número de unidades poliméricas pode variar de dezenas a milhões (Lehninger, 2006).

Os polissacarídeos (carboidratos), polímeros de açúcares simples como a glicose, possuem duas funções principais: como armazenamento de energia e como elementos estruturais extracelulares com sítios de ligação específicos para proteínas particulares. Polímeros curtos de açúcares (oligossacarídeos) que se ligam a proteínas ou lipídios na superfície celular funcionam como sinais celulares específicos.

Os peptídeos e proteínas são polímeros de aminoácidos e são as macromoléculas mais abundantes da célula. Eles desempenham uma variedade de funções essenciais, incluindo catálise em reações celulares, armazenamento e transporte, movimento celular, defesa, regulação da atividade celular, e também como componentes de materiais estruturais (Rappé e Casewit, 1997).

Os ácidos nucleicos, DNA e RNA, são polímeros de nucleotídeos. Eles armazenam e transmitem a informação genética, e algumas moléculas de RNA possuem papéis estruturais e catalíticos em complexos supramoleculares.

O presente trabalho está focado no estudo de carboidratos e peptídeos, e estes serão descritos com maior detalhe nos itens 1.2 e 1.3, respectivamente.

## **1.2 – CARBOIDRATOS**

Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na face da terra. Certos carboidratos são a base da dieta na maior parte do mundo e a oxidação dos carboidratos é a principal via metabólica fornecedora de energia na maioria das células não-fotossintéticas. Polímeros insolúveis de carboidratos funcionam tanto como elementos estruturais, quanto de proteção nas paredes celulares bacterianas e vegetais, e em alguns tecidos conjuntivos de animais (Lehninger, 2006). Os carboidratos são poliidroxiáldeídos (aldoses) ou poliidroxicetonas (cetoses) ou substâncias que liberam estes compostos por hidrólise e que

possuem a forma empírica geral  $(\text{CH}_2\text{O})_n$ ; alguns também contêm nitrogênio, fósforo ou enxofre. Os estereoisômeros podem ser divididos em dois grupos que diferem na configuração ao redor do centro quiral mais distante do carbono da carbonila (Robyt, 1998). Aqueles nos quais a configuração deste átomo de carbono de referência é a mesma configuração do D-gliceraldeído são designados de D-isômeros, e aqueles com a configuração de L-gliceraldeído são os L-isômeros. A maioria dos açúcares encontrados nos organismos vivos são D-isômeros.

Os monossacarídeos, ou açúcares simples consistem de uma única unidade de poliidroxialdeído ou cetona. O monossacarídeo mais abundante na natureza é um açúcar com seis átomos de carbono na molécula, a D-glicose, também chamado de dextrose. Os monossacarídeos com mais de quatro carbonos tendem a ter estruturas cíclicas devido à presença dos reativos grupos aldeído e cetona. A ciclização interna ocorre com a reação do grupo carbonila com um dos grupos hidroxila de outra extremidade da molécula e pode levar à formação de anéis de cinco ou seis átomos, dependendo do ponto de reação. O fechamento da cadeia dá origem a um novo carbono assimétrico, denominado carbono anomérico, que define as configurações  $\alpha$  e  $\beta$  dos monossacarídeos cíclicos (Figura 1.1). Estes anéis de seis membros são conhecidos por piranoses, porque eles se assemelham ao anel de seis átomos do pirano.

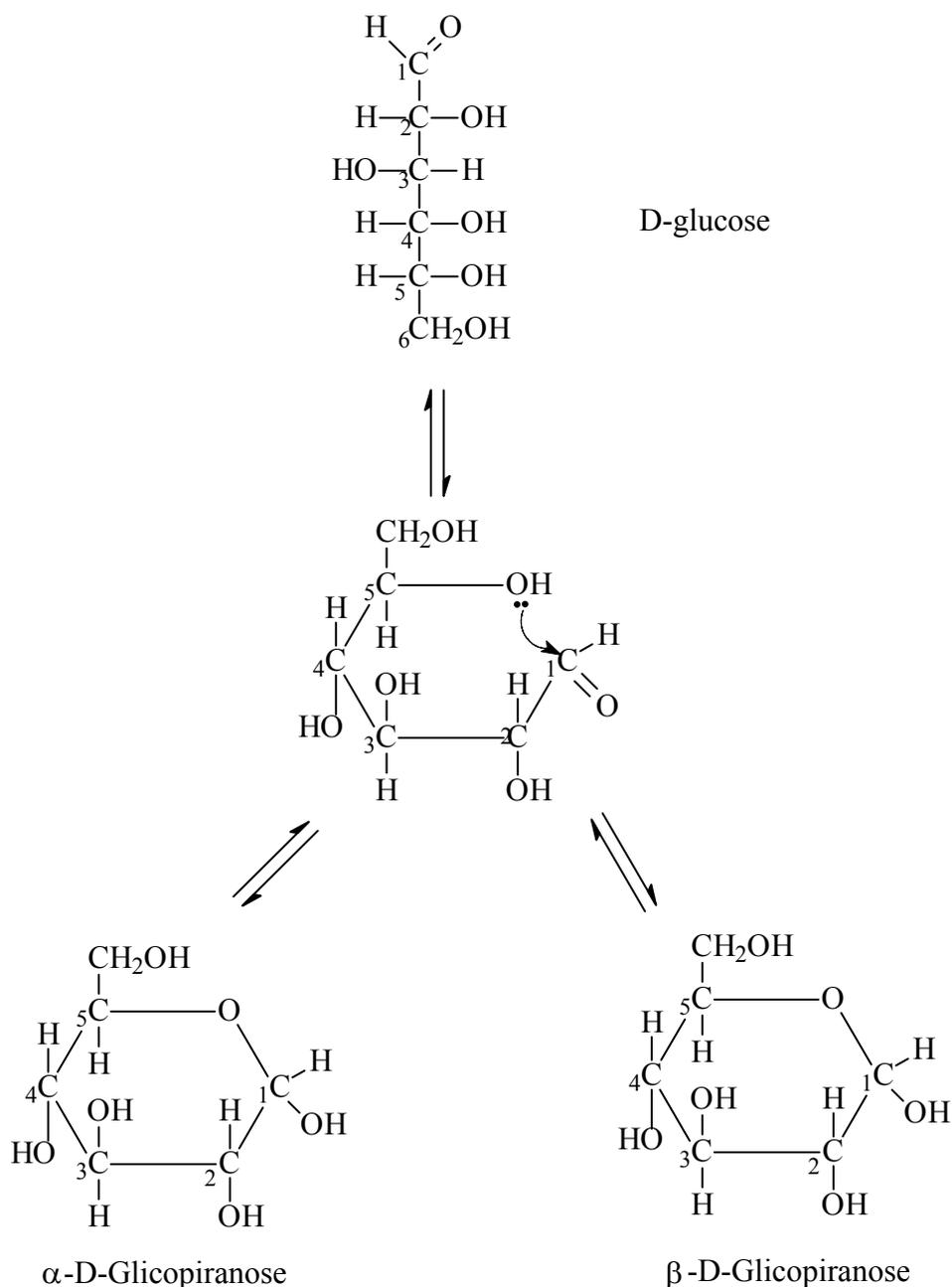


FIGURA 1.1 – Formação das duas estruturas cíclicas das D-glicose.

Os anômeros  $\alpha$  e  $\beta$  da D-glicose interconvertem-se, quando em solução aquosa, através de um processo chamado mutarrotação. As aldexoses também existem em formas cíclicas com anéis de cinco átomos e são chamados furanoses. Entretanto, o anel de seis átomos aldopiranosídico é muito mais estável que o anel aldo furanosídico e predomina nas soluções de aldexoses (Lehninger, 2006).

O anel piranosídico com seis átomos pode assumir duas conformações em cadeia (Figura 1.2). Os substituintes nos carbonos do anel podem ser axiais (ax), projetando-se paralelos com o eixo vertical em relação ao plano do anel ou, então, equatoriais (eq), projetando-se de maneira quase perpendicular ao mesmo eixo. Os dois confôrmeros são interconvertidos por uma barreira de  $46 \text{ kJmol}^{-1}$ . Geralmente, os substituintes nas posições equatoriais sofrem menos impedimento estérico por substituintes vizinhos, portanto as conformações com substituintes volumosos na posição equatorial são favorecidas.

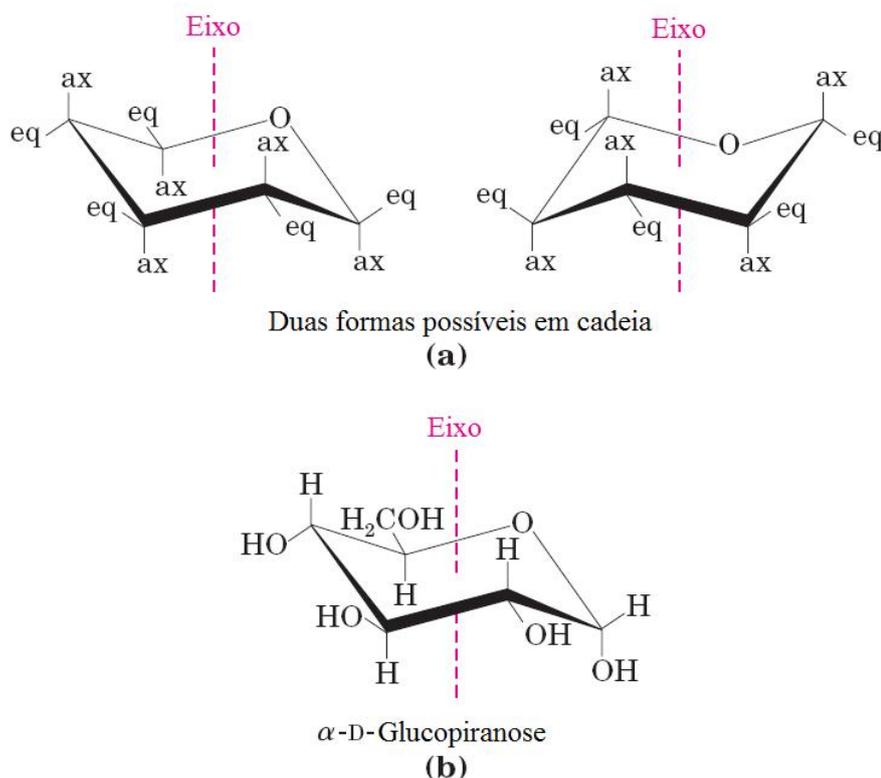


FIGURA 1.2 – Fórmulas conformacionais das piranoses. (a) Duas formas em cadeia do anel piranosídico. (b) Uma conformação em cadeia da  $\beta$ -D-glicopirranose (Lehninger, 2006).

Em adição às hexoses simples como a glicose, existe um grande número de seus derivados, nos quais um grupo hidroxila no composto original é trocado por um outro grupo substituinte (Figura 1.3). Na glicosamina, a hidroxila em C2 do açúcar original é substituída por um grupo amino. O grupo amino quase

sempre está condensado com o ácido acético, como na *N*-acetilglicosamina. Este derivado da glicosamina é parte de muitos polímeros estruturais, incluindo aqueles das paredes celulares de bactérias.

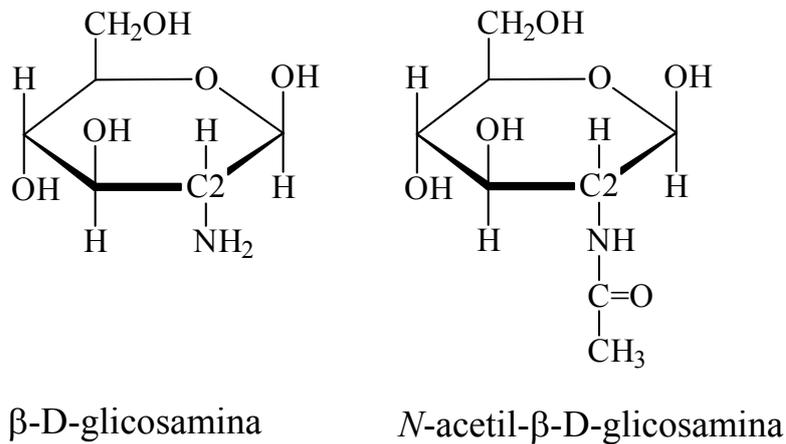


Figura 1.3 – Dois derivados das hexoses.

Os monossacarídeos podem combinar-se através da formação de ligações glicosídicas, produzindo estruturas oligoméricas ou poliméricas. Em uma ligação glicosídica, uma molécula de água é eliminada na reação entre a hidroxila do carbono anomérico e qualquer outra hidroxila (OH) do segundo monossacarídeo ou oligossacarídeo. A Figura 1.4 mostra um exemplo da formação da maltose.

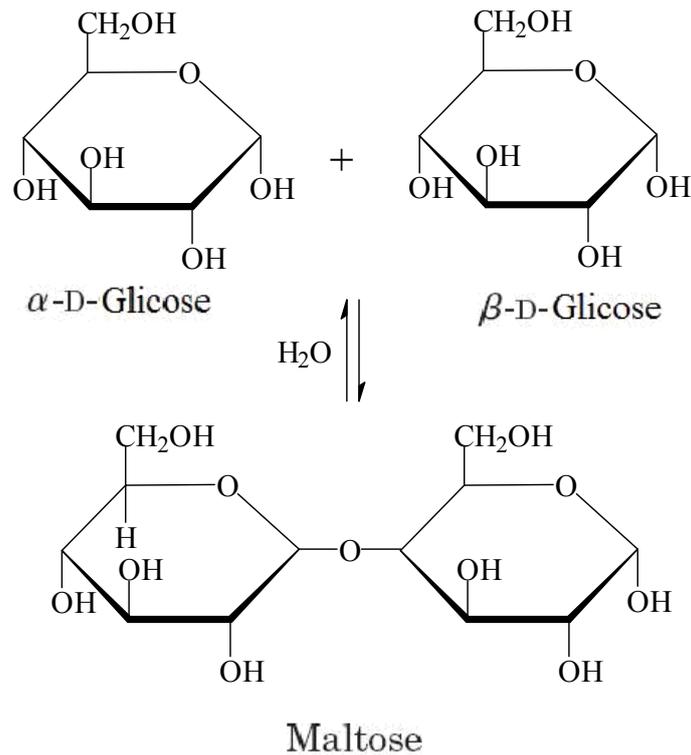


FIGURA 1.4 – Formação da ligação glicosídica  $\alpha$ -(1→4) entre dois resíduos de glicose para a formação do dissacarídeo maltose.

A maltose contém duas unidades de D-glicose unidas por uma ligação glicosídica entre C-1 (o carbono anomérico) de uma unidade de glicose e C-4 da outra. A configuração do átomo de carbono anomérico envolvido na ligação glicosídica é  $\alpha$ . A unidade de glicose com o carbono anomérico livre é capaz de existir nas formas  $\alpha$  e  $\beta$ -piranosídicas. As ligações glicosídicas são facilmente hidrolisadas por ácido, mas resistem à clivagem por base. Assim, os dissacarídeos podem ser hidrolisados para liberar seus componentes monossacarídicos livres por aquecimento com ácido diluído.

Considerando-se a grande variedade de unidades monoméricas e as múltiplas possibilidades para formação de ligações glicosídicas, o número de oligo - ou polissacarídeos que podem ser formados é enorme. Como existem múltiplos sítios para a formação de ligações glicosídicas em um resíduo monomérico, cadeias ramificadas são comuns em polissacarídeos (Laine, 1994).

As estruturas tridimensionais das macromoléculas dos carboidratos são estabilizadas por interações intramoleculares fracas como ligações de

hidrogênio, interações hidrofóbicas ou de van der Waals e outras interações eletrostáticas. Como os polissacarídeos possuem muitos grupos hidroxila, as ligações de hidrogênio exercem uma influência especialmente importante em suas estruturas. A livre rotação dos polissacarídeos ocorre ao redor das ligações C–O que unem os dois resíduos (ligação glicosídica). A rotação ao redor de cada uma das ligações é limitada por obstáculos estéricos provocados por grupos substituintes. As estruturas tridimensionais dessas moléculas podem ser descritas em termos dos ângulos diedros,  $\phi$  e  $\psi$ , formados pelas ligações glicosídicas (Figura 1.5). Devido ao grande volume do anel piranosídico e seus substituintes, sua forma e tamanho limitam os ângulos  $\phi$  e  $\psi$  e algumas conformações são muito mais estáveis que outras.

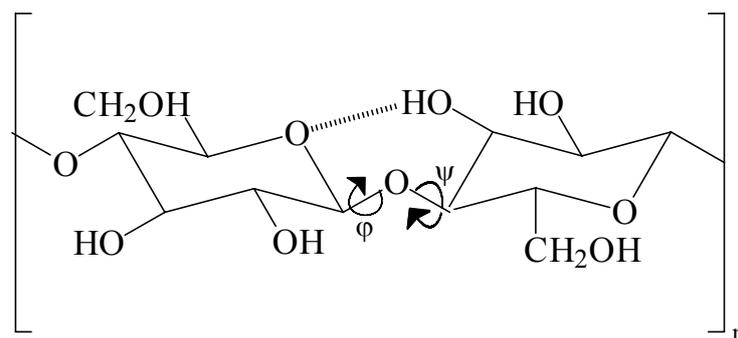


FIGURA 1.5 – Conformação das ligações glicosídicas da celulose.

A conformação mais estável para a celulose é aquela na qual cada resíduo em “cadeia” está girando  $180^\circ$  em relação às subunidades vizinhas, formando uma cadeia reta e estendida, as quais são estabilizadas por ligações de hidrogênio intramoleculares como mostrado na Figura 1.5.

A maioria dos carboidratos encontrados na natureza ocorre como polissacarídeos, polímeros de média até alta massa molecular. Os polissacarídeos podem formar estruturas lineares ou ramificadas; e são classificados como homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos. Os homopolissacarídeos contêm apenas um único tipo de unidade monomérica; os heteropolissacarídeos contêm dois ou mais tipos diferentes de unidades

monoméricas. Alguns homopolissacarídeos servem como forma de armazenamento de monossacarídeos, os quais são utilizados como combustíveis pelas células, como o amido e o glicogênio. Outros homopolissacarídeos, como a celulose e a quitina, por exemplo, são utilizados como elementos estruturais das paredes celulares e exoesqueletos de animais, respectivamente.

O interesse do presente trabalho está nas potencialidades do uso da quitina e de seus derivados no design de novos materiais. As descrições detalhadas desses biopolímeros serão realizadas como se segue.

### 1.2.1 – Quitina e quitosana

A quitina é o segundo material orgânico mais abundante na natureza depois da celulose, sendo biodegradável e não tóxico. Ela é um homopolissacarídeo linear composto por resíduos de *N*-acetilglicosamina em ligação ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) como observado na Figura 1.6. Sua única diferença química com a celulose é a substituição de um grupo hidroxil em C2 por um grupo amino acetilado. A quitina é um dos principais componentes das paredes celulares em fungos, artrópodes e algumas algas (Popuri *et al.*, 2007).

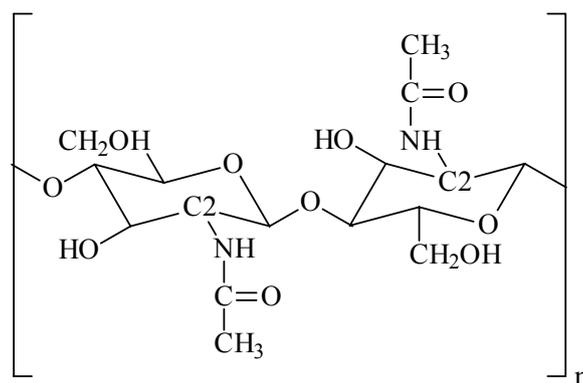


FIGURA 1.6 – Representação esquemática da estrutura da quitina.

A quitosana é um derivado *N*-deacetilado da quitina (Figura 1.7). Um biopolímero é considerado uma quitosana quando a quitina é *N*-deacetilada a

ponto de se tornar solúvel em uma solução diluída de ácido, que geralmente ocorre na proporção da ordem de 40-60% (Sannan *et al.*, 1976). A proporção de resíduos glicosamina e *N*-acetilglicosamina na quitina e quitosana é chamado de grau de acetilação GA, e este possui significativa influência na propriedades desses biopolímeros (Cho *et al.*, 2007).

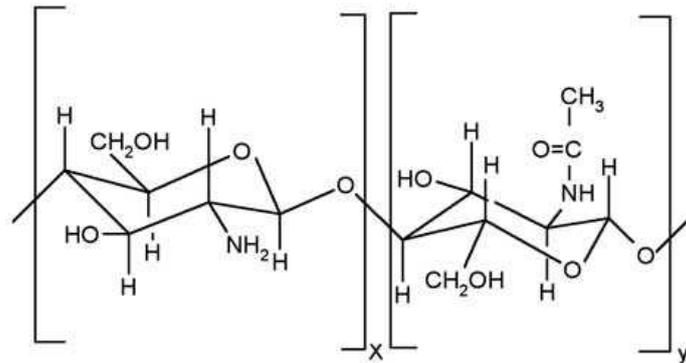


FIGURA 1.7 – Esquema da estrutura polimérica da cadeia quitina (y) - quitosana (x). A Quitina é a acetilglicosamina (1-4)-ligada 2-acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glican e a quitosana é a glicosamina (1-4)-ligada 2-amino-2-deoxi- $\beta$ -D-glican. Quitosanas são tipicamente formadas por várias razões y:x, onde  $y \leq x$  (por exemplo, 20:80).

Os grupos amino das unidades glicosamina ( $pK_a \sim 6,3-6,5$ ) da quitosana são importantes sítios de quelação para íons metálicos em condições neutras ou alcalinas, e formam complexos estáveis com ânions através de interações eletrostáticas em meio ácido (Knorr, 1983; Uragami *et al.*, 1983; Maghami e Roberts, 1988; Gibbs *et al.*, 2003). A quitosana, ao contrário da quitina, é positivamente carregada em condições ácidas e neutras, e portanto, a capacidade de adsorção é dependente do pH e do grau de acetilação (Zhou *et al.*, 2005; Li e Bai, 2006; Vieira e Beppu, 2006a; b). A capacidade desses biopolímeros em se ligarem a metais e ânions pode ser resultado da relação entre grau de acetilação, peso molecular, área superficial e cristalinidade. Devido à grande disponibilidade da quitina e da quitosana e da grande afinidade das mesmas com íons, moléculas, macromoléculas e até com microorganismos, uma grande

variedade de nanopartículas de quitosana são modificadas para realizar variados tipos de aplicações: na remoção de metais pesados, na recuperação de metais preciosos, na fertilização agrícola, na remoção de pesticidas, como floculante no tratamento de águas, como células a combustível alcalinas, na produção de tecidos ou fibras, na estabilização de biomaterial, como suporte para catalisadores, como emulsificante de alimentos, na prevenção de doenças causadas por fungos e bactérias, como carregador de fármacos, cápsulas de medicamentos, e como regulador de colesterol no plasma sanguíneo e triglicérides intestinais no corpo humano (Ravi Kumar, 2000; Dutta *et al.*, 2004; Revoredo *et al.*, 2006; Rinaudo, 2006; Ruel-Gariepy e Leroux, 2006; Smitha *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008).

A quitina no seu estado nativo possui três formas cristalinas, designadas por  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -quitina, as quais são encontradas na estrutura esquelética de crustáceos, insetos, cogumelos, e na parede celular de fungos (Rudall e Kenching, 1973). As estruturas das formas  $\alpha$  e  $\beta$  se diferem somente na forma em que as cadeias são arrançadas, sendo alternativamente anti-paralelas na  $\alpha$ -quitina e paralela na  $\beta$ -quitina (Sugiyama *et al.*, 1999). A  $\gamma$ -quitina possui a característica das formas  $\alpha$  e  $\beta$ , possuindo cadeias paralelas e antiparalelas. Entretanto, esta última é considerada somente como uma variação da família  $\alpha$ , por apresentar as mesmas propriedades da  $\alpha$ -quitina (Atkins, 1985). A  $\alpha$ -quitina é a forma mais abundante e também a mais estável termodinamicamente (Jang *et al.*, 2004; Kameda *et al.*, 2005), e as formas  $\beta$  e  $\gamma$ -quitina podem ser irreversivelmente convertidas na forma de  $\alpha$ -quitina (Rudall e Kenching, 1973).

No estado sólido, a quitosana é caracterizada por uma estrutura de fibras com alto grau de cristalinidade e polimorfismo (Mogilevskaya *et al.*, 2006; Rinaudo, 2006). De acordo com experimentos de cristalografia de raios-x, a quitosana possui as formas anidra e hidratada com cadeias anti-paralelas (Yui *et al.*, 1994; Okuyama *et al.*, 1997; Lertworasirikul *et al.*, 2003; Ogawa *et al.*, 2004). Este polissacarídeo linear, similarmente à quitina, possui uma

conformação de hélice 2 estendida com um padrão de repetição a cada 1,0 nm (Yui *et al.*, 1994; Lertworasirikul *et al.*, 2003), apesar de seis ácidos favorecerem diferentes arranjos estruturais (Ogawa *et al.*, 2004). Três tipos de estruturas complexas foram observados para a quitina e estas podem ser classificadas de acordo com suas unidades de repetição. O primeiro tipo, chamado de Tipo I, é a forma anidra do polissacarídeo, a qual mantém as suas cadeias na forma de uma hélice 2 (hélice formada por um resíduo segundo um eixo helicoidal de ordem 2). O Tipo II é o cristal hidratado com uma repetição de aproximadamente 4,08 nm e unidade assimétrica (unidade de repetição) consistindo de quatro resíduos de glicosamina (hélice formada por quatro resíduos segundo um eixo helicoidal de ordem 2). Como dois tetrassacarídeos completam a unidade de repetição, esse tipo de motivo estrutural também pode ser considerado uma hélice 2, mesmo que sua conformação seja completamente diferente do Tipo I, no qual a unidade assimétrica é um resíduo de glicosamina. A forma do Tipo II é também conhecido como hélice 2 relaxada, devido ao fato deste ser quase quatro vezes mais longo que a quitosana em hélice 2 (Okuyama *et al.*, 2000a; Okuyama *et al.*, 2000b; Lertworasirikul *et al.*, 2003). Uma variação do Tipo II, chamada de Tipo IIa, possui repetição similar de cadeias (4,05 nm), mas a conformação molecular é uma hélice 4/1, com uma unidade assimétrica consistindo de dímeros de glicosaminas (hélice formada por dois resíduos segundo um eixo helicoidal de ordem 4). Esta hélice de mão direita corresponde a quatro unidade assimétrica (Li *et al.*, 2006). Uma descoberta mais recente revelou a existência do Tipo III, cujo padrão de repetição da fibra é de 2,55 nm, que consiste de uma hélice 5 (hélice composta por 5 resíduos) com a unidade assimétrica formada por um resíduo de glicosamina (Kawahara *et al.*, 2003).

Devido ao grande aumento no número de produtos à base de quitosana com diferentes composições, estruturas e propriedades, uma investigação de seu transporte e possíveis destinos e transformações químicas no meio ambiente é de

crucial importância. Apesar do progresso alcançado nas últimas décadas por vários pesquisadores, muito do comportamento da quitosana em solução não foi compreendido (Berth e Dautzenberg, 2002) e ainda existem muitas contradições encontradas na literatura (Pedroni *et al.*, 2003). Berth e Dautzenberg (Berth e Dautzenberg, 2002), atribuíram essas questões não resolvidas à dificuldades na caracterização físico-química usando técnicas experimentais. Por esse motivo é estratégico investigar as diferentes características intrínsecas da quitosana utilizando métodos de simulação molecular, em especial, em análises por modelagem com dinâmica molecular (Mazeau e Rinaudo, 2004).

## 1.3 - AMINOÁCIDOS E PEPTÍDEOS

### 1.3.1 – Aminoácidos

Aminoácidos são as unidades principais que compõe as proteínas. Os aminoácidos contêm um grupo carboxila e um grupo amina ligado ao mesmo carbono (o carbono  $\alpha$ ) (Figura 1.8). Eles diferem entre si em suas cadeias laterais, ou grupos R, os quais variam em estrutura, tamanho e carga elétrica (Solomons, 2005).

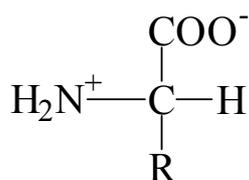


FIGURA 1.8 – Estrutura geral de um aminoácido.

Existe um total de 22 aminoácidos diferentes e apenas 20 são usados pelas células na síntese de proteínas (Figura 1.9). Estes últimos são conhecidos como  $\alpha$ -aminoácidos.

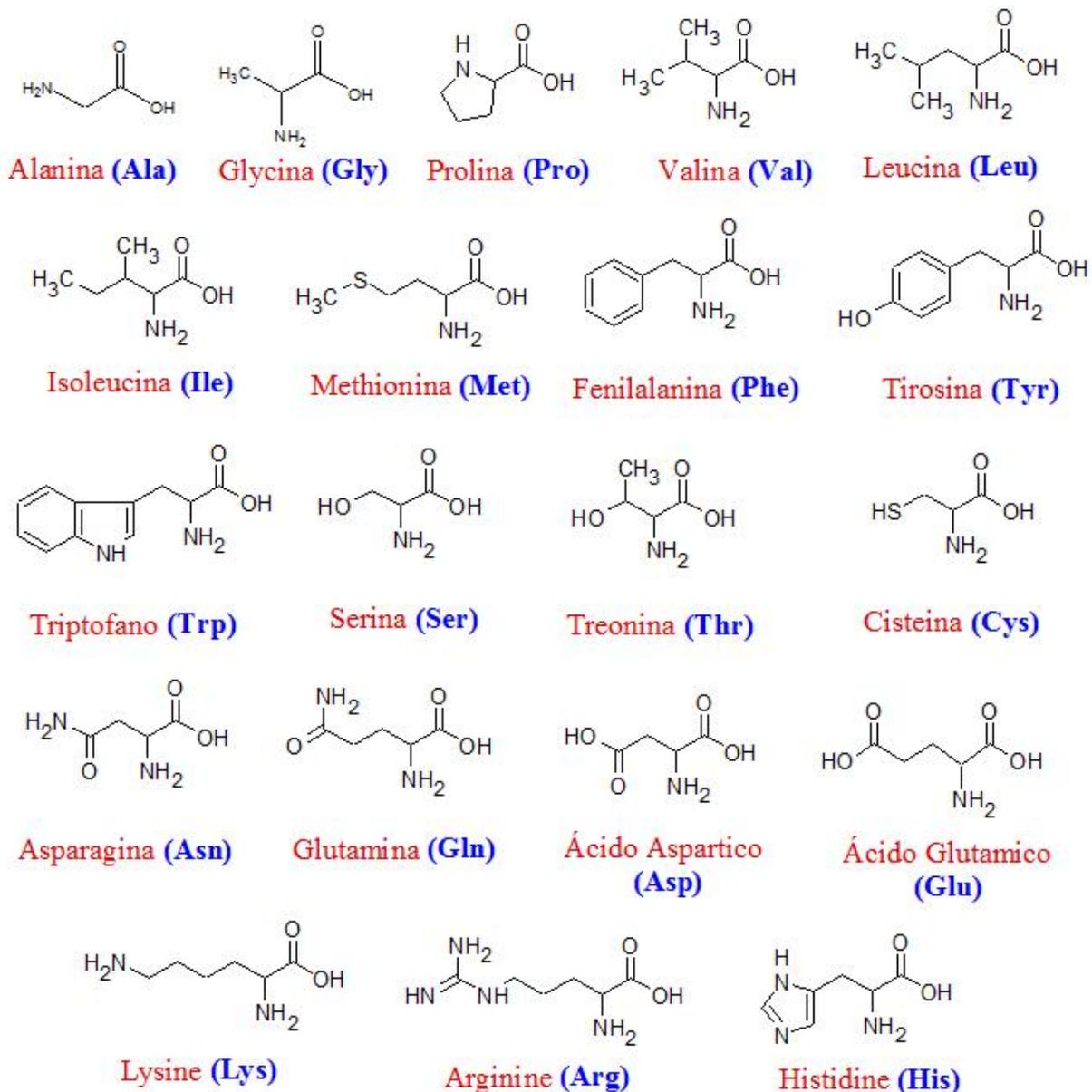
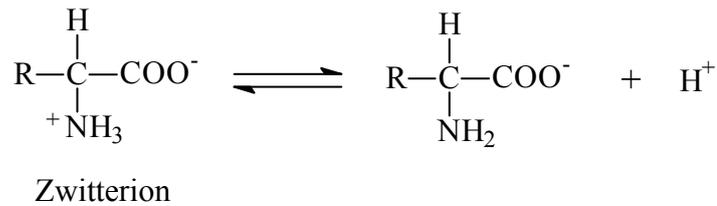


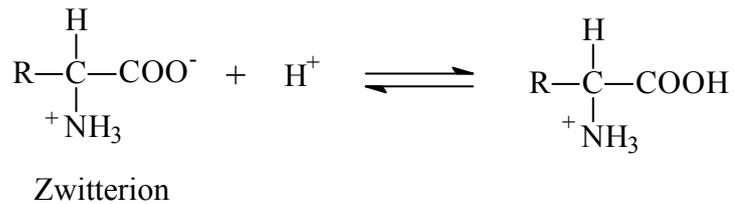
FIGURA 1.9 – Os 20 aminoácidos mais comuns encontrados nas proteínas.

Com exceção da glicina, todos os aminoácidos naturais são quirais.

Quando um aminoácido é dissolvido em água, ele existe em solução com estrutura dipolar, zwitterion. Um zwitterion pode reagir como um ácido (doador de próton):



ou como uma base (receptor de prótons):



### 1.3.2 – Peptídeos

Peptídeos são moléculas constituídas de duas ou mais unidades de aminoácidos, ligados por ligações peptídicas, como mostrado na Figura 1.10 (Stryer, 2002). Esta ligação é formada pela remoção de H<sub>2</sub>O.

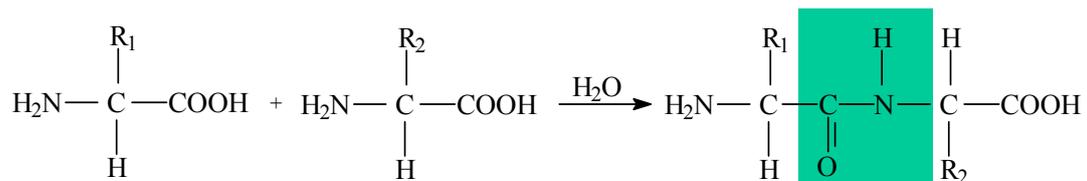


FIGURA 1.10 – Formação de uma ligação peptídica.

Depois de formada a ligação peptídica, o resíduo de aminoácido no fim do peptídeo que possui um grupo α-amino livre é chamado N-terminal ou resíduo amino-terminal. Por outro lado, o resíduo com o grupo carboxílico livre no final do lado oposto é chamado carboxil-terminal ou resíduo C-terminal.

A seqüência de aminoácidos, chamada de estrutura primária, determina as propriedades físicas e químicas de uma proteína e peptídeo, bem como sua forma e funções biológicas (Lehninger, 2006).

Peptídeos de tamanhos pequenos a médio possuem pequena tendência de formar estruturas regulares em solução aquosa diluída. Estes pequenos peptídeos adotam inúmeras conformações em equilíbrio dinâmico.

A ligação peptídica C–N possui caráter de dupla ligação devido a efeitos de ressonância e por esse motivo ela é rígida. Portanto, a rotação do peptídeo só é permitida sobre as ligações N–C<sub>α</sub> e C<sub>α</sub>–C, definidos pelos ângulos diedros  $\phi$  e  $\psi$ , respectivamente (Figura 1.11).

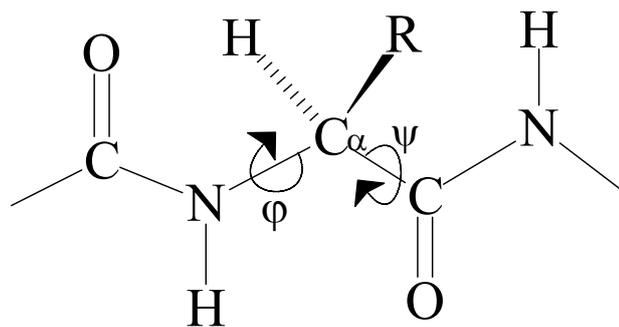


FIGURA 1.11 – Definições de ângulos diedros em um peptídeo.

Os valores permitidos para  $\phi$  e  $\psi$  são graficamente revelados quando  $\psi$  é representado contra  $\phi$  em um diagrama de Ramachandran (Figura 1.12), introduzido por G.N. Ramachandran (Ramachandran *et al.*, 1963). As conformações julgadas possíveis são aquelas que envolvem pouca ou nenhuma interferência estérica, com base em cálculos usando raio de van der Waals conhecidos e os ângulos das ligações. As áreas sombreadas em azul refletem as conformações que não envolvem superposição estérica e, portanto, são inteiramente permitidas; as em verde indicam conformações permitidas em limites extremos de contatos atômicos desfavoráveis. A assimetria do diagrama resulta da L estereoquímica dos resíduos de aminoácidos. Os diagramas para

outros resíduos de L-aminoácidos com cadeias laterais não ramificadas são quase idênticos. As variações permitidas para aminoácidos ramificados como Valina, Isoleucina e Triptofano são algo menores que para Alanina. O resíduo de Glicina, que possui menor repulsão estérica, exibe uma variação mais ampla das conformações permitidas (Lehninger, 2006).

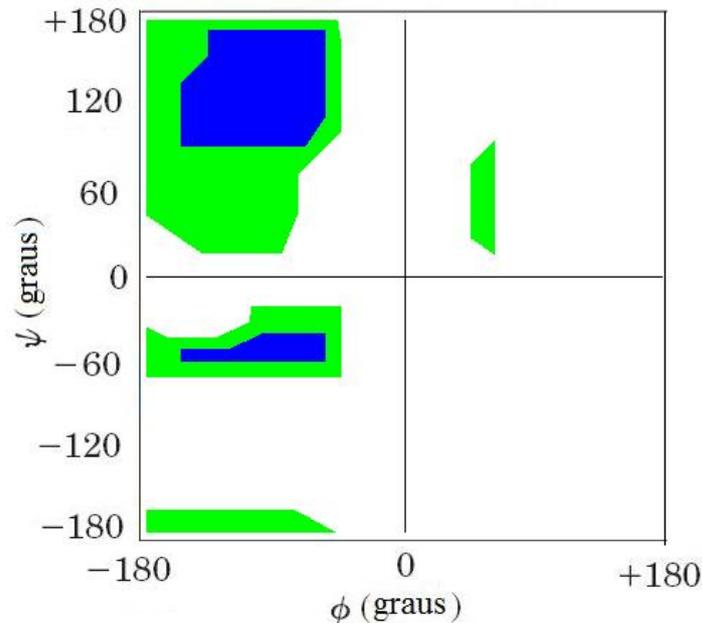


FIGURA 1.12 – Diagrama de Ramachandran para resíduos.

A conformação de seções contínuas de um polipeptídeo é chamada de estrutura secundária. Estas configurações são amplamente afetadas por interações de curto alcance, como ligações de hidrogênio, as quais são amplamente afetadas pela sequência de aminoácidos. Os dois tipos de estrutura secundária comumente observadas em proteínas são as  $\alpha$ -hélices e a conformação  $\beta$  (ou folhas  $\beta$ ).

O tipo de hélice mais estável é  $\alpha$ -hélice de mão direita, que possui aproximadamente 3,7 resíduos por volta, envolvendo interações de ligação de hidrogênio entre o resíduo  $i$  e o resíduo  $i + 4$  (Figura 1.13).

Nas conformações  $\beta$ , o esqueleto da cadeia polipeptídica é estendido em zigue-zague em vez de uma estrutura helicoidal. As cadeias polipeptídicas em

zigue-zague podem ser arranjadas lado a lado para formar uma estrutura que se assemelha a uma série de folhas (Figura 1.14).

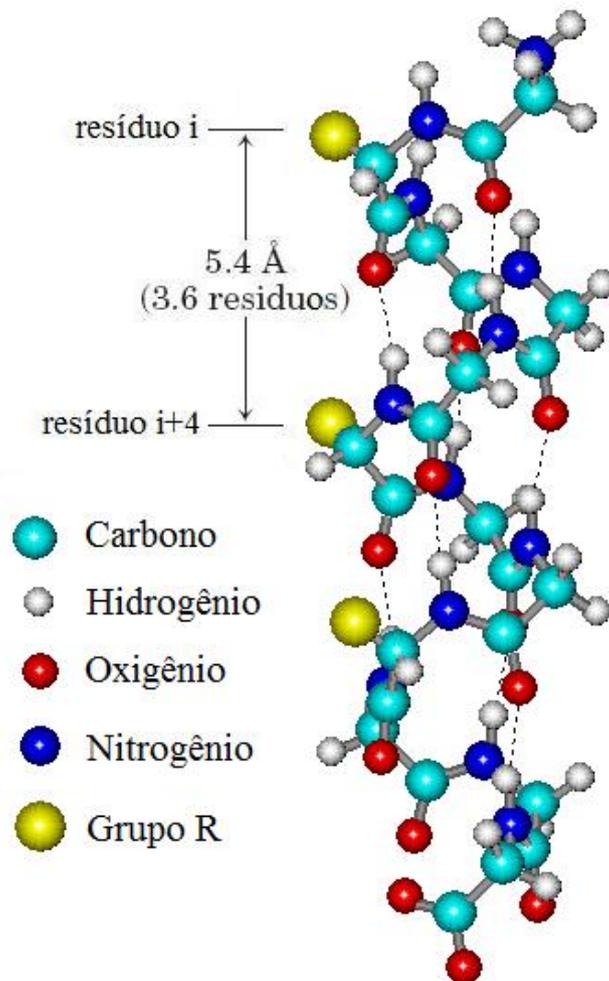


FIGURA 1.13 – Modelo de  $\alpha$ -hélice para polipeptídeos (Hypercube, 2002).

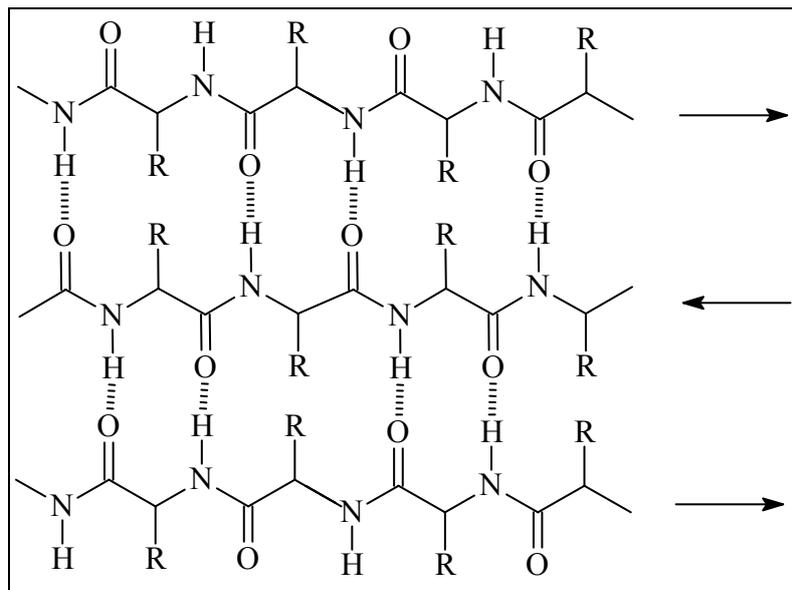


FIGURA 1.14 – Conformação em folha- $\beta$  para cadeias de polipeptídeos.

A  $\alpha$ -hélice é a estrutura secundária mais encontrada em proteínas e o estudo da estabilidade destas estruturas em solução aquosa é importante para o entendimento dos mecanismos de processos biológicos, como por exemplo o enovelamento de proteínas, cujo entendimento é ainda um desafio para a Biofísica. Portanto, o entendimento de como os peptídeos se enovelam é considerado o primeiro passo para a compreensão do processo de enovelamento de proteínas. Além disso, o conhecimento tridimensional de peptídeos é de grande ajuda para entender como esses interagem com outras moléculas, bem como o comportamento dos mesmos. Como a determinação da estrutura tridimensional de peptídeos em solução não é uma tarefa fácil, o uso de simulação computacional pode ser utilizado como uma ferramenta alternativa para prever a estrutura de peptídeos e o desenho de novos peptídeos com atividade biológica.

## 1.4 – Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é elucidar a estrutura tridimensional e possíveis interações de biopolímeros em solução; em particular, os polissacarídeos quitina e quitosana, e polipeptídeos compostos por somente um tipo de aminoácido.

As investigações sobre os polissacarídeos quitina e quitosana (descritas nos Capítulos 3 e 4) objetivam elucidar as propriedades físico-químicas desses compostos em solução aquosa, avaliando a influência do grau de acetilação, a variação de pH e força iônica na conformação e na solubilidade desses biopolímeros.

O estudo sobre polipeptídeos (descritos no Capítulo 5) visa entender quais os fatores que contribuem na estabilidade de  $\alpha$ -hélices, de peptídeos, em solução. Para isso, foi utilizada a simulação por Dinâmica Molecular e cálculos Quânticos, segundo uma nova metodologia QM/MM sequencial. A nova metodologia QM/MM será validada segundo as propriedades gerais dos polipeptídeos e seus respectivos aminoácidos.

As metodologias utilizadas para elucidar a estrutura de polissacarídeos e polipeptídeos em solução aquosa são apresentadas no capítulo 2; e no capítulo 6 são apresentadas as conclusões gerais dos sistemas estudados.

## Capítulo 2

### Fundamentos Teóricos

A modelagem molecular se preocupa em encontrar meios de reproduzir e prever o comportamento de moléculas e sistemas moleculares (Leach, 2001). Neste contexto, a base da Modelagem Molecular está na criação de modelos teóricos, em escala atômica, visando relacionar propriedades moleculares importantes com propriedades macroscópicas de um determinado sistema. Certos modelos teóricos utilizam métodos de Mecânica Quântica para caracterizar propriedades eletrônicas do sistema, e certos modelos utilizam métodos de Mecânica Estatística clássica (Mecânica Molecular), para a descrição física de sistemas moleculares complexos em fase condensada.

Métodos teóricos tanto de mecânica molecular como da mecânica quântica (semi-empíricos, *ab initio* e híbridos) tem se tornado cada vez mais seguros quanto à previsão de estruturas e propriedades moleculares. A boa concordância com dados experimentais tem estimulado o aprimoramento dos métodos teóricos e conseqüente desenvolvimento e implementação de novas técnicas computacionais. O uso de métodos de Química Computacional para resolver problemas diversos de interesse em química, constitui a essência da Modelagem Molecular (Levine, 1991).

O método da Mecânica Molecular (MM) (Burket e Allinger, 1982) baseia-se na visão clássica de estrutura molecular como um conjunto de esferas unidas por molas com constantes de força características. O campo de forças neste caso é constituído pelo somatório de termos de energia relacionados às posições de equilíbrio do sistema (distâncias de ligação, ângulos de ligação, ângulos diedros, distâncias de van de Waals, ligações hidrogênio, interações eletrostáticas, etc.) às quais podem ser associadas penalidades energéticas para seu afastamento, isto é, as constantes de força das “molas”. Em geral, estas constantes de força são avaliadas por meio de dados espectroscópicos. A

principal vantagem da mecânica molecular é a rapidez na avaliação de sistemas complexos.

Os métodos de Mecânica Quântica, por outro lado, permitem maior precisão nos resultados, além de fornecerem dados sobre a estrutura eletrônica, que não é considerada na mecânica molecular. Isto leva a um tempo de computação e capacidade de memória necessária maior. Os pacotes de programas de métodos quânticos *ab initio* e semi-empíricos são baseados no formalismo de orbitais moleculares com diferentes abordagens (Levine, 1991).

Nos métodos *ab initio*, um modelo para uma função de onda particular é selecionado e os cálculos necessários são realizados sem simplificação. Em tais abordagens o erro está associado ao conjunto de bases selecionado e ao nível de tratamento da correlação eletrônica (Levine, 1991).

Os métodos semi-empíricos são baseados no mesmo formalismo dos métodos *ab initio*, mas parte significativa das integrais são substituídas por parâmetros ajustados a dados experimentais. A parametrização dos métodos semi-empíricos com dados experimentais aumentou significativamente a precisão e a velocidade de obtenção das propriedades eletrônicas de um determinado sistema (Morgon e Coutinho, 2007).

Algumas técnicas quânticas mais usadas são: a teoria do funcional da densidade (DFT), método Hartree-Fock; e diversas aproximações semi-empíricas destas técnicas, tais como as aproximações AM1 (Dewar *et al.*, 1985) e PM3 (Stewart, 1989).

Além disso, os métodos de simulação computacional, baseados na mecânica clássica, têm permitido o entendimento das interações intermoleculares e o comportamento de moléculas orgânicas e de macromoléculas em solução. Técnicas de mecânicas estatísticas como Monte Carlo (MC) e Dinâmica Molecular (DM) tem sido altamente usadas para estudar estruturas e propriedades de líquidos puros, fenômenos de solvatação(efeito do

solvente) termodinâmica e propriedades espectroscópica de moléculas em solução (Allen e Tildesley, 1993).

O presente trabalho de tese utiliza principalmente métodos clássicos, e por esse motivo a Mecânica Molecular (MM) será descrita com maior detalhe.

## 2.1 – Mecânica Molecular (MM)

A mecânica molecular, ao contrário da mecânica quântica, ignora os movimentos eletrônicos e calcula a energia do sistema somente em função das posições nucleares. Este modelo é extremamente adequado para a descrição de sistemas com elevado número de átomos, cuja caracterização por mecânica quântica seria extremamente dispendioso computacionalmente.

Este método usa como modelo de moléculas a idéia de átomos unidos por ligações químicas. A utilização de parâmetros como potenciais harmônicos linear e angular, aliado à interações entre átomos não ligados, o método constrói uma expressão de energia potencial que depende somente das posições atômicas (Levine, 1991). Isto implica, que toda a dinâmica dos átomos é tratada através da mecânica clássica, utilizando as leis de Newton. Com base nessas aproximações, o problema se reduz em descrevermos os diversos tipos de interações presentes na molécula por funções matemáticas clássicas, cujos parâmetros descrevem tais tipos de interações. O conjunto de parâmetros utilizados para a representação total da superfície de energia potencial é conhecido como campo de força do sistema.

Os campos de força utilizados na descrição de um sistema molecular possuem basicamente quatro componentes que são capazes de descrever as interações intra e intermoleculares do sistema em questão (Leach, 2001). Assim, o campo de força pode assumir uma forma funcional descrita pelo potencial total ( $V_{total}$ ), que inclui as interações ligadas, descritas pelos os potenciais de ligação ( $V_d$ ), angular ( $V_\theta$ ), e torcional ( $V_\phi$ ), e as interações não ligadas como o potencial de Lennard-Jones ou de van der Waals ( $V_{LJ}$ ) e potencial de coulomb ( $V_C$ ):

$$V_{total} = V_d + V_\theta + V_\varphi + V_{LJ} + V_C \quad (1)$$

As expressões explícitas de cada termo de energia potencial que define o campo de força são apresentadas a seguir.

### 2.1.1 – Potencial harmônico de ligação (ou linear)

O estiramento entre dois átomos covalentemente ligados é descrito pelo Potencial Harmônico Linear ou potencial da ligação química,  $V_d$ , o qual descreve a energia associada ao desvio da distância de equilíbrio  $d_0$ :

$$V_d = \frac{1}{2} k_d (d - d_0)^2 \quad (2)$$

sendo  $d$  o comprimento da ligação entre dois átomos  $i$  e  $j$ ,  $d_0$  é o comprimento de equilíbrio e  $k_d$  é a constante elástica da força.

A distância  $d_0$  e a constante de força são os parâmetros do campo de força (Rappé e Casewit, 1997).

### 2.1.2 – Potencial Harmônico Angular

O desvio de ângulos de seu valor de referência ou equilíbrio  $\theta_0$  formado entre três átomos covalentemente ligados é descrito pelo potencial Harmônico Angular,  $V_\theta$ , dado por:

$$V_\theta = \frac{1}{2} k_\theta (\theta_n - \theta_0)^2 \quad (3)$$

sendo  $\theta$  o ângulo definido pela ligação,  $\theta_0$  é o ângulo de equilíbrio e  $k_\theta$  é a constante elástica da força.

### 2.1.3 – Potencial Torsional (ou diedral)

Considerando o ângulo diedro  $\varphi$ , para um conjunto de átomos ligados i, j, k, l (Figura 2.1).

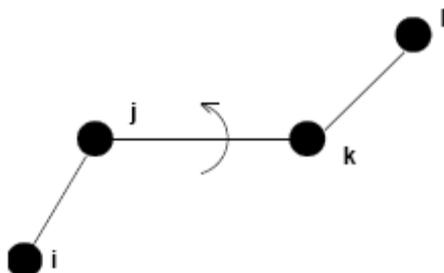


FIGURA 2.1 – Representação geométrica do ângulo de torção.

O potencial torsional  $V_\varphi$  representa explicitamente a torção própria de ligações covalentes entre dois átomos (i e l) ao redor da ligação j-k, sendo o mesmo definido por:

$$V_\varphi = k_\varphi [1 + \cos(n\varphi + \delta)] \quad (4)$$

sendo  $k_\varphi$  a constante que define a altura da barreira de rotação,  $n$  o número de mínimos para a torção de uma ligação química específica,  $\varphi$  o ângulo diedral para a ligação central em uma seqüência de quatro átomos e  $\delta$  a diferença de fase do ângulo diedral  $\varphi$ , que pode ser  $0^\circ$  e  $180^\circ$ , dependendo deste valor ser um ponto máximo ou de mínimo (Vangunsteren e Berendsen, 1977).

### 2.1.4 – Potencial de Lennard-Jones (ou van der Waals)

A interação de van der Waals de átomos não ligados quimicamente é descrito pelo potencial de Lennard-Jones. Este potencial para dois átomos i e j não ligados é dado por:

$$V_{LJ} = 4\epsilon \left[ \frac{\sigma^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma^6}{r_{ij}^6} \right] \quad (5)$$

sendo  $r_{ij}$  a distância entre os átomos  $i$  e  $j$ ,  $\epsilon$  a profundidade do poço de energia potencial e  $\sigma$  o diâmetro de Lennard-Jones, o qual depende dos tipos de pares de átomos. Cabe salientar que este potencial é geralmente utilizado para descrever a interação de átomos separados por três ou mais ligações covalentes, bem como para interações intermoleculares.

### 2.1.5 – Potencial de Coulomb

A interação eletrostática entre dois átomos  $i$  e  $j$  é representada pelo potencial de Coulomb, dado por:

$$V_C = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon r_{ij}} \quad (6)$$

sendo  $r_{ij}$  a distância entre os átomos  $i$  e  $j$ ,  $q_i$  e  $q_j$  são suas cargas parciais,  $\epsilon_0$  a permissividade no vácuo e  $\epsilon$  a constante dielétrica do meio.

Usualmente, os parâmetros empregados na definição de cada termo do potencial são determinados a partir de resultados de cálculos de mecânica quântica e/ou por ajustes a dados experimentais (cristalografia de raios-X, espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear, etc).

## 2.2 – Métodos de Simulação Molecular

A caracterização molecular de qualquer sistema significa tratar um conjunto de átomos ou moléculas com detalhes. Este tratamento é dificultado quando um número elevado de átomos em um estado condensado é considerado. Entretanto, é possível calcular a superfície de energia potencial para um

conjunto relativamente pequeno de moléculas ou conjuntos moleculares em fase gasosa (Leach, 2001; Hinchliffe, 2003). A superfície de potencial obtida para um pequeno conjunto de átomo pode ser extrapolada convenientemente para tratar um conjunto maior. Propriedades termodinâmicas lidam com características da matéria que envolve aproximadamente  $10^{23}$  número de partículas, cuja configuração inicial e equações de movimento seriam impossíveis de serem determinadas. Reconhecendo este problema, Boltmann e Gibbs desenvolveram a Termodinâmica Estatística, a qual faz a ligação entre as propriedades microscópicas e as macroscópicas da matéria (Atkins e Paula, 2008).

A modelagem molecular procura entender e prever as propriedades de líquidos, soluções e sólidos, para estudar processos complexos, como a adsorção de moléculas na superfície e no interior de sólidos, e na investigação do comportamento de macromoléculas. Como foi discutido anteriormente, em tais experimentos, as medidas experimentais são realizadas em amostras macroscópicas que possuem um grande número de átomos e moléculas, os quais possuem um enorme número de mínimos em sua superfície de energia potencial. Neste contexto, os métodos de simulação computacional são capazes de estudar tais sistemas e prever suas propriedades através do uso de técnicas que consideram pequenas réplicas do sistema macroscópico, que possuem uma quantidade manuseável de átomos e moléculas. Um grande número de réplicas do sistema que são consideradas simultaneamente é chamado de *ensemble*. Assim, a simulação pode gerar configurações representativas dessas pequenas réplicas, de tal forma que valores precisos de propriedades estruturais e termodinâmicos podem ser obtidos com pequena quantidade de cálculos computacionais (Leach, 2001).

As técnicas de simulação computacional também fornecem o comportamento dependente do tempo de sistemas atômicos e moleculares, fornecendo detalhes visuais de como um sistema muda de uma configuração

para outra. Os diferentes métodos de simulação molecular representam formas diferentes de se realizar a amostragem das configurações do sistema. Os métodos de Monte Carlo e de Dinâmica Molecular são as principais técnicas de simulação computacional utilizadas para obter médias termodinâmicas a partir de modelos moleculares. Como o presente trabalho somente empregou a metodologia de Dinâmica Molecular, o mesmo será descrito com maiores detalhes.

### 2.2.1 – Dinâmica Molecular

Na Dinâmica Molecular, configurações sucessivas do sistema são geradas integrando as leis de movimento de Newton. O resultado é uma trajetória que especifica como as posições e as velocidades das partículas do sistema variam com o tempo (Leach, 2001).

A trajetória é obtida resolvendo a equação diferencial, de acordo com a segunda lei de Newton ( $F=m.a$ ):

$$\frac{d^2 x_i}{dt^2} = \frac{F_{x_i}}{m_i} \quad (7)$$

A equação (7) descreve o movimento da partícula de massa  $m_i$  ao longo da coordenada ( $x_i$ ), sendo  $F_{x_i}$ , a força da partícula nesta direção.

Em um sistema contendo  $N$  moléculas, a interação entre elas é descrita pelo potencial total:  $V_{\text{total}}$ . Assim, a força  $F_{x_i}$  depende da posição de todos os átomos do sistema através do gradiente de potencial.

$$F_{x_i} = -\frac{dV_x}{dx_i} \quad \text{ou} \quad F_i = -\frac{dV}{dr_i} \quad (8)$$

O cálculo do gradiente de potencial permite obter a força  $F_i$ . Assim, integrando numericamente a equação de Newton para a partícula  $i$  em pequenos

intervalos de tempo  $\Delta t$ , na ordem de femtosegundos ( $1\text{fs} = 10^{-15}$  segundos), pode-se obter um conjunto de trajetórias para as partículas. Após as alterações iniciais, o sistema vai atingir o estado de equilíbrio. Assim, com o conjunto de trajetórias em equilíbrio poderá ser extraído as propriedades macroscópicas do sistema (Vandervoort *et al.*, 2005).

Descrições mais detalhadas sobre o método de simulação por Dinâmica Molecular podem ser encontradas em (Allen e Tildesley, 1993; Leach, 2001; Van Gunsteren *et al.*, 2001; Hincliffe, 2003; Morgon e Coutinho, 2007).

### **2.2.1.1 – Métodos de Integração por Diferença Finita**

Em modelos atomísticos, devido à descrição detalhada das interações intermoleculares, qualquer mudança de posição de um átomo, resulta na mudança da força exercida sobre ele. Dessa forma, essa mesma força pode também ser alterada com a mudança de posição dos átomos em que o primeiro realiza interação. Isto implica que as coordenadas dos átomos estão acopladas, resultando em um problema de inúmeros corpos que não pode ser resolvida analiticamente. Por essas circunstâncias, as equações de movimento devem ser integradas numericamente (Leach, 2001).

Dos métodos de integração numérica, pode-se destacar o método de diferença finita (Morton e Mayers, 2005). A idéia básica é que a integração seja realizada em pequenas etapas, separadas no tempo por um intervalo fixo  $\delta t$ . A força total em cada partícula, numa determinada configuração, no tempo  $t$ , é calculada como o vetor soma de suas interações com as demais partículas. Obtida a força, determina-se a aceleração resultante em cada uma das partículas. Estas são então combinadas com as posições e velocidades no tempo  $t$  para calcular as posições e velocidades no tempo  $t + \delta t$ . Assumindo-se que a força é constante durante o intervalo de tempo, as forças sobre as partículas (nas novas

posições) é então determinada levando às novas posições e velocidades no tempo  $t + 2\delta t$ , e assim consecutivamente.

Existem muitos algoritmos para a integração das equações de movimento utilizando o método de diferenciação finita nas simulações por Dinâmica Molecular. Todos assumem que a posição e as propriedades dinâmicas (velocidades, acelerações, etc.) podem ser aproximadas segundo expansões das séries de Taylor (Leach, 2001).

Os métodos mais utilizados para a integração das equações de movimento em simulações de Dinâmica Molecular são os algoritmos de Verlet (Verlet, 1967) e o algoritmo preditor-corretor de Gear (Gear, 1971). O método de integração utilizado neste trabalho é o algoritmo de *Leap-Frog*, baseado nos algoritmos de Verlet. O mesmo será detalhado a seguir.

### 2.2.1.2 – Algoritmo Leap-Frog

O algoritmo *Leap-Frog* é método simplificado para integrar numericamente as equações de movimento. Este algoritmo calcula as velocidades na metade do intervalo de integração e usa estas velocidades para calcular as novas posições (Hockney, 1970):

$$\begin{aligned} v(t + \frac{1}{2} \delta t) &= v(t - \frac{1}{2} \delta t) + \delta t a(t) \\ r(t + \delta t) &= r(t) + \delta t v(t + \frac{1}{2} \delta t) \end{aligned} \quad (9)$$

Em outras palavras, as velocidades  $v(t+1/2\delta)$  são primeiramente calculadas das velocidades  $v(t-1/2\delta)$  e a aceleração no tempo  $t$ . As posições  $r(t+\delta t)$  são deduzidas das velocidades que foram calculadas ao mesmo tempo que as posições no tempo  $r(t)$  usando a equação (9). As velocidades no tempo  $t$  podem ser calculadas por meio de uma expressão em série de Taylor:

$$v(t) = \frac{1}{2} \left[ v(t + \frac{1}{2} \delta t) + v(t - \frac{1}{2} \delta t) \right] \quad (10)$$

O método *leap-frog* inclui explicitamente a velocidade em seus cálculos. Entretanto, uma desvantagem desta metodologia é que as posições e as velocidades não são sincronizadas, ou seja, não são calculadas ao mesmo tempo. Isto implica que não é possível calcular a contribuição da energia cinética para a energia total ao mesmo tempo em que as posições são definidas (energia potencial).

### **2.2.1.3 – Condições Periódicas de Contorno**

Na Dinâmica Molecular, a simulação de um sistema molecular é realizada em uma caixa virtual, o qual resulta em dois problemas básicos. O primeiro, deve-se ao fato dos átomos na borda da caixa presenciarem forças diferentes dos átomos no centro da caixa, criando-se efeitos de superfície (Hinchliffe, 2003). Segundo, o número de partículas é relativamente pequeno se comparado com um sistema físico real, que possui átomos da ordem de Avogadro. Assim, para minimizar esses efeitos, aplica-se a condição periódica de contorno, permitindo realizar simulações com um número relativamente pequeno de partículas, e permitir que as partículas consideradas sofram efeito dessas forças como se estivessem no interior da caixa de simulação (Leach, 2001).

A aplicação das condições periódicas de contorno implica em realizar cópias da caixa de simulação em todas as direções, resultando em um arranjo periódico tridimensional infinito. Um exemplo de condições periódicas de contorno em uma caixa bidimensional é mostrado na Figura 2.2, onde cada caixa é recoberta por oito vizinhas, de forma que em uma situação tridimensional, cada caixa é recoberta por 26 vizinhas. As coordenadas das partículas nas caixas replicadas é computada simplesmente somando e subtraindo o comprimento das caixas nas integrais. Assim, durante a simulação, o movimento dos átomos na caixa original são reproduzidos nas imagens periódicas. Quando um átomo sai da caixa original, atravessando uma das faces ao seu redor, uma de suas imagens entra pela face oposta, com velocidade idêntica, conservando o número de

átomos e mantendo a densidade constante na caixa de simulação. Isto pode ser visualizado na Figura 2.2.

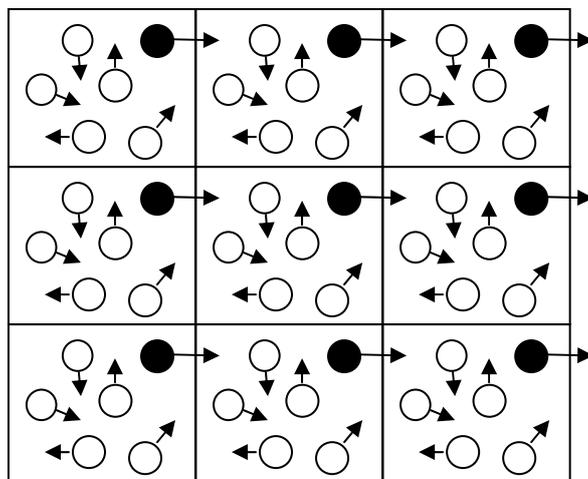


FIGURA 2.2 – Condições periódicas de contorno em duas dimensões.

#### 2.2.1.4 – Raio de Corte

Nas simulações de Monte Carlo ou de Dinâmica Molecular, a caracterização das interações não ligadas são os cálculos que demandam maior tempo computacional. Além disso, com a utilização de condições periódicas de contorno, o número de cálculos das interações não ligadas tende a um número extremamente grande (Leach, 2001; Hinchliffe, 2003). Dessa forma, para evitar que um dado átomo do sistema interaja com sua própria imagem, e para tratar interações de curto alcance (potencial de Lennard-Jones), cujo potencial decai rapidamente com o aumento da distância entre as partículas ( $V \approx r^{-6}$ ), uma região do espaço é delimitada por uma esfera de raio ( $R_c$ ), truncando o potencial em um raio de corte esférico (Figura 2.3).

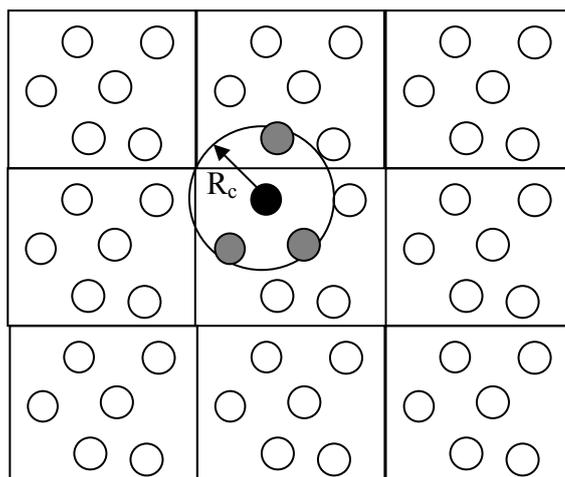


FIGURA 2.3 – Representação do raio de corte esférico para um sistema periódico em duas dimensões.

O raio de corte ( $R_c$ ) deve ser da ordem de  $L/2$  ( $R_c \leq 1/2L$ ), sendo  $L$  o comprimento da célula de simulação (Allen e Tildesley, 1987). Assim cada partícula interage com partículas reais ou imagens, que estão dentro do raio de corte, evitando a interação do soluto (no presente caso, peptídeo e carboidrato) com suas imagens.

### 2.2.1.5 – Interações de longo alcance e Soma de Ewald

As interações de longo alcance, cujo potencial não decaem na ordem de  $r^{-6}$  ou  $r^{-12}$ , podem ser limitadas pela utilização do raio de corte. Este tipo de interação, que ocorre geralmente entre cargas, possui um potencial que decai na ordem de  $r^{-1}$ , cujo alcance normalmente é maior do que metade da célula de simulação. Assim, o truncamento desse potencial eletrostático poderá induzir erros significativos em simulações que apresentam espécies carregadas (Leach, 2001). Os métodos mais utilizados para descrever as interações de longo alcance são a soma de Ewald e o método de campo de reação. Esta última será descrita em detalhes no próximo item (2.2.1.6).

O método soma de Ewald foi inicialmente proposto por Ewald (Ewald, 1921), no estudo energético de cristais. Neste método, uma determinada

partícula interage com todas as outras partículas da caixa de simulação, e com todas as suas imagens em um arranjo infinito de células periódicas que no limite apresenta uma forma esférica (Figura 2.4).

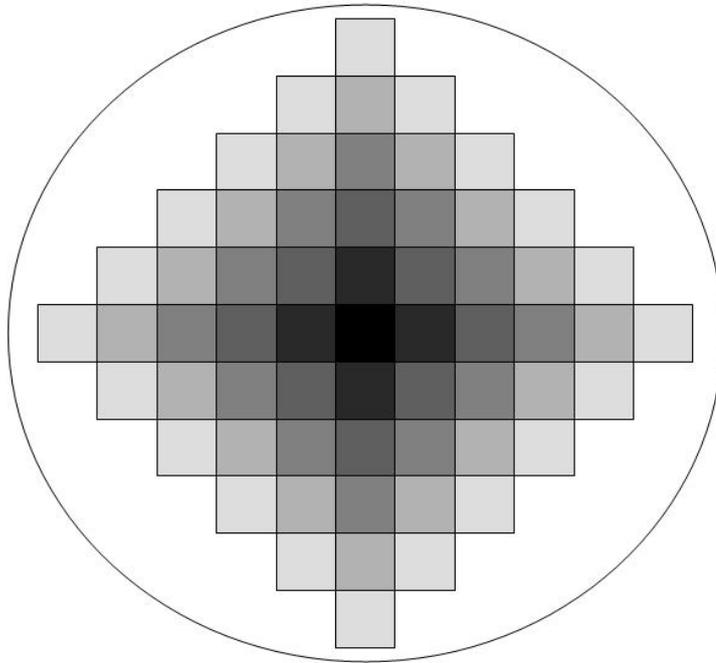


FIGURA 2.4 – Representação da construção de um arranjo de células periódicas no método *soma de Ewald*. Figura adaptada de (Leach, 2001).

A contribuição carga-carga para a função potencial coulômbica definida somente para os pares de cargas na caixa de simulação central pode ser escrita como:

$$V_C = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (11)$$

sendo  $r_{ij}$  a distância mínima entre as cargas  $i$  e  $j$ ; e  $\epsilon_0$  a permissividade no vácuo.

A contribuição da interação carga-carga entre as cargas na caixa central e todas as outras imagens das partículas nas 6 caixas ao redor é dado por:

$$V_C = \frac{1}{2} \sum_{n\_caixa=1}^6 \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 |r_{ij} + r_{caixa}|} \quad (12)$$

Conforme a soma vai sendo realizada, novas células são adicionadas ao arranjo, e a adição é realizada em seqüência a partir das caixas mais próximas da caixa de simulação central. Portanto, a energia potencial eletrostática total inclui a contribuição da caixa central com as interações entre a caixa central e todas as caixas imagens (Leach, 2001).

### 2.2.2.6 – Interações coulômbicas com o campo de reação

A interação coulômbica pode ser modificada para sistemas homogêneos, assumindo uma constante dielétrica além do raio de corte  $r_c$ . O ambiente fora deste raio é modelado como um contínuo dielétrico com constante dielétrica  $\epsilon_{rf}$  (Figura 2.5). O potencial eletrostático ( $V_{crf}$ ) é escrito como:

$$V_{crf} = f \frac{q_i q_j}{\epsilon_r r_{ij}} \left[ 1 + \frac{\epsilon_{rf} - \epsilon_r}{2\epsilon_{rf} + \epsilon_r} \frac{r_{ij}^3}{r_c^3} \right] - f \frac{q_i q_j}{\epsilon_r r_c} \frac{3\epsilon_{rf}}{2\epsilon_{rf} + \epsilon_r} \quad (13)$$

sendo  $r_c$  o raio de corte,  $\epsilon_r$  a constante dielétrica,  $\epsilon_{rf}$  a constante dielétrica fora do raio de corte (Lindahl *et al.*, 2001).

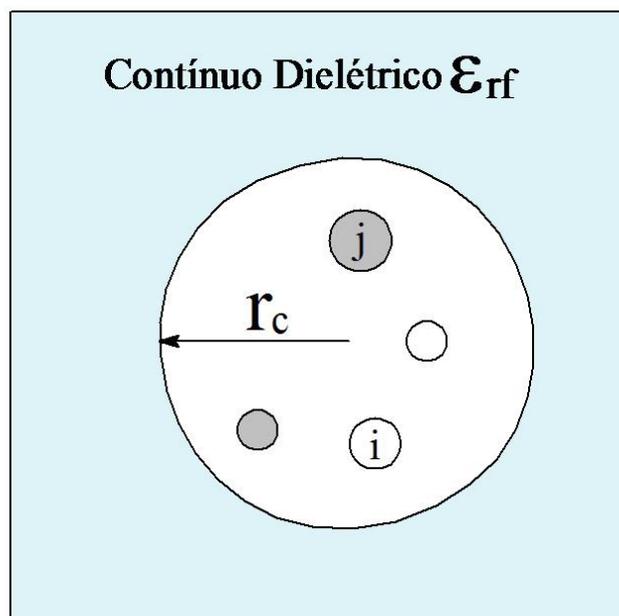


FIGURA 2.5 – Representação esquemática do método campo de reação (reaction field).

A representação do meio fora do raio de corte como um contínuo dielétrico homogêneo é uma aproximação para a simulação de sistemas em fase condensada, como macromoléculas em solução. A constante dielétrica utilizada,  $\epsilon_{rf}$ , é a do solvente empregado, porém a região externa ao raio de corte durante a simulação não necessariamente contém apenas o solvente, podendo também estar presentes átomos ou moléculas do soluto. O método apresenta uma demanda computacional significativamente menor do que métodos baseados em somas de Ewald (Lindahl *et al.*, 2001).

## 2.3 – Potencial eletrostático e solvatação implícita

### 2.3.1 – Cálculo do potencial eletrostático resolvendo numericamente o método de diferença finita de Poisson-Boltzmann.

O potencial eletrostático de um determinado sistema está diretamente associado à distribuição de carga do sistema (Davis e Mccammon, 1990). De

acordo com a descrição clássica, um potencial eletrostático ( $\phi$ ) se relaciona com a densidade de carga ( $\rho$ ) na posição  $r$  de um determinado soluto pela equação de Poisson:

$$\frac{d^2(r\phi)}{dr^2} = r \frac{\rho}{\varepsilon} \quad (14)$$

sendo  $\varepsilon$  a constante dielétrica do meio.

De forma geral, a equação de Poisson pode ser escrita como:

$$\nabla \cdot \varepsilon(r) \nabla \phi(r) = -\rho(r) \quad (15)$$

sendo  $\nabla$  o operador no sistema de cartesianas, cuja forma é  $(\partial/\partial x, \partial/\partial y, \partial/\partial z)$ , e  $\varepsilon$  função do vetor posição  $r$ .

Considerando um sistema imerso em meio aquoso contendo eletrólitos, os íons devem estar distribuídos na solução segundo a distribuição de Boltzmann:

$$\frac{n_{\pm}}{n_0} = e^{-\frac{q_i \phi}{KT}} \quad (16)$$

sendo  $n_{\pm}$  é a densidade de íons positivos e negativos por unidade de volume em uma dada região do espaço;  $n_0$  a densidade de íons por unidade de volume em todo o espaço amostrado;  $q_i$  a carga correspondente a cada íon;  $\phi$  o potencial eletrostático em uma dada região do espaço;  $K$  a constante de Boltzmann e  $T$  a temperatura absoluta.

Assim, introduzindo a equação (16) na equação (15), pode-se obter a chamada equação de Poisson-Boltzmann:

$$\nabla \cdot \varepsilon(r) \nabla \phi(r) = -\left\{ \rho(r) + q_i n_{\pm} \exp\left(\frac{-q_i \phi}{K T}\right) \right\} \quad (17)$$

Para um eletrólito 1:1, adicionando a carga do eletrólito local nas cargas explícitas  $\rho$ , a diferencial se torna:

$$\nabla \cdot \varepsilon(r) \nabla \phi(r) = -\rho(r) + en_+ - en_- \quad (18)$$

sendo  $e$  a unidade de carga elétrica.

Das equações (17) e (18) obtém-se:

$$-\nabla \cdot \varepsilon(r) \nabla \phi(r) = \rho(r) - 2en_0 \sinh\left(\frac{e\phi(r)}{k_B T}\right) \quad (19)$$

ou

$$\varepsilon_0 \nabla \cdot [\varepsilon(r) \nabla \phi(r)] = 2en_0 \sinh\left(\frac{e\phi(r)}{k T}\right) - \rho(r) \quad (20)$$

Para se obter o potencial eletrostático de qualquer composto, pode-se usar o método de diferença finita para resolver a equação de Poisson-Boltzmann. Para fazer isso, a região de interesse deve ser dividida por pontos de rede, formando caixas retangulares infinitesimais de dimensão  $h_x \times h_y \times h_z$ , como descrito na Figura 2.6.

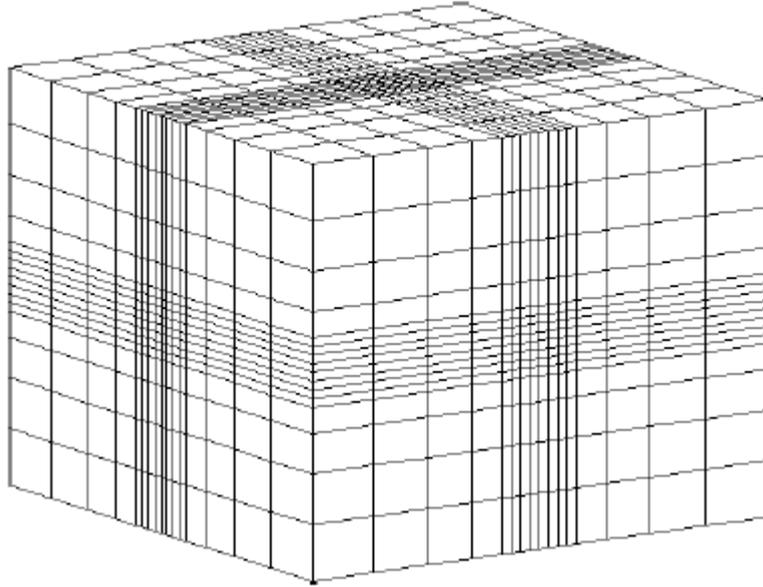


FIGURA 2.6 – Rede tridimensional dividindo o sistema de interesse em inúmeros blocos infinitesimais.

Para obter a equação de Poisson-Boltzmann na forma de diferença finita, a equação (20) deve ser integrada sobre uma caixa retangular de volume  $V = h_x h_y h_z$  ao redor de cada ponto da rede  $i$  na posição  $r_i$ .

$$\int_V \nabla \cdot [\varepsilon(r) \nabla \phi(r)] dV = \int_V \rho_0(r) \sinh[e\phi(r)/kt] dV - \int_V (\rho(r) / \varepsilon_0) dV \quad (21)$$

Usando o teorema de Gauss, o lado esquerdo para equação (21) é convertido em uma integral de superfície, portanto, as derivadas de  $\phi$  são escritas como uma diferença finita:

$$\int_V \nabla \cdot [\varepsilon(r) \nabla \phi(r)] dV = \int_S \varepsilon(r) \nabla \phi(r) \cdot dS$$

$$\int_V \nabla \cdot [\varepsilon(r) \nabla \phi(r)] dV = \sum_{j=1}^6 \varepsilon_j \frac{\phi(r_i + h_j j) - \phi(r_i)}{h_j} \frac{V}{h_j} \quad (22)$$

Aqui a soma sobre as seis superfícies da caixa retangular com  $h_1 = h_4 = h_x$ ,  $h_2 = h_5 = h_y$ ,  $h_3 = h_6 = h_z$ , e  $\hat{J} = \hat{x}, \hat{y}, \hat{x}$  para  $j = 1, 2, 3$ , e  $-\hat{x}, -\hat{y}, -\hat{x}$  para  $j = 4, 5, 6$ . O termo do lado direito da equação 21 pode ser avaliado similarmente substituindo as integrais com seus valores médio nos pontos de rede:

$$\int_V \rho_0(r) \sinh[e\phi(r)/kt] dV = V\rho_0(r_i) \sinh[e\phi(r_i)/kt],$$

$$\int_V (\rho(r) / \epsilon_0) dV = V\rho(r_i) / \epsilon_0 = q(r_i) / \epsilon_0 \quad (23)$$

Substituindo as equações 22 e 23 na equação 21, nos obtemos uma expressão para o potencial no  $i$ ésimo ponto de rede em termos dos valores do potencial, carga, e constante dielétrica no ponto de rede, têm-se:

$$\phi_i = \frac{\sum_j \epsilon_j \phi_j / h_j^2 + q_i / (\epsilon_0 V)}{\sum_j \epsilon_j / h_j^2 + \rho_{0i} \sinh(e\phi_i / kT) / \phi_i}, \quad (24)$$

sendo os subscritos  $i$  e  $j$  em  $\phi$ ,  $q$ , e  $\rho_0$  se referente às posições  $r_i$  e  $r_i + h_j \hat{J}$  dos pontos de rede, respectivamente.

A equação (24) é resolvida usando um esquema de relaxação (Press *et al.*, 1989). Os valores dos potenciais na borda da rede são configurados usando condições periódicas de contorno apropriadas. No processo de relaxação, um valor inicial é escolhido arbitrariamente para o potencial em cada ponto da rede. Este processo é repetido iterativamente até o valor do potencial de todos os pontos da rede convergir para uma solução estável.

Como veremos adiante, com posse do potencial eletrostático, torna-se possível calcular a energia livre de solvatação de um soluto utilizando um modelo de solvente contínuo.

### 2.3.2 – Modelos de solvatação implícita

Na descrição da termodinâmica de solvatação, os modelos de solvente contínuo têm sido os mais utilizados (Tomasi e Persico, 1994; Cramer e Truhlar, 1999; Luque *et al.*, 2003). Inúmeras pesquisas recentes tem desenvolvido novas metodologias computacionais e parâmetros para diferentes tipos de solutos e solventes (Orozco e Luque, 1994; Li *et al.*, 1998b; Li *et al.*, 1999; Pliego e Riveros, 2002).

A medida que melhor descreve a interação soluto-solvente é a energia livre de solvatação, a qual é uma medida da afinidade do soluto com o solvente e pode ser determinada experimentalmente para espécies neutras (Pliego, 2006).

Considerando o equilíbrio de um soluto A com uma concentração  $[A]_g$  na fase gasosa e  $[A]_{sol}$  em solução:



Matematicamente, pode ser escrito como:

$$\frac{[A]_{sol}}{[A]_g} = e^{\frac{-\Delta G_{solv}}{RT}} \quad (26)$$

sendo  $\Delta G_{solv}$  a energia livre de solvatação.

A interação soluto-solvente depende do potencial  $\phi$  gerado pelo dielétrico. Portanto, considerando o processo de transferência reversível do soluto de uma

posição fixa em fase gasosa para uma posição em solução, a variação de energia livre de Gibbs no processo ( $\Delta G$ ) é igual a diferença de potencial químico padrão entre as fases líquida e gasosa, e também é igual ao trabalho ( $W$ ) realizado sobre o sistema para realizarmos a transferência (Pliego, 2006), ou seja:

$$\Delta G_{solv} = \mu_{sol} - \mu_g = W \quad (27)$$

Usando a equação 34, podemos obter o  $\Delta G_{solv}$  através do trabalho para transferir o soluto da fase gasosa para a fase líquida.

Dessa forma, considerando-se apenas as interações eletrostáticas, Pliego (Pliego, 2006) sugeriu que podemos calcular o trabalho para descarregar o soluto em fase gasosa e carregá-lo em solução considerando o processo de carregar o soluto como sendo função de um parâmetro  $\lambda$  que vai de 0 a 1. Neste processo, a densidade de carga do soluto vai de 0 até seu valor final  $\rho(r)$  em cada ponto da cavidade molecular. Por simplicidade, vamos considerar o processo de carga como sendo uma função linear de  $\lambda$ , ou seja:

$$\rho(r, \lambda) = \lambda \rho(r) \quad (28)$$

Como o potencial eletrostático é diretamente proporcional à densidade de cargas, podemos escrever a equação (28) como:

$$\phi(r, \lambda) = \lambda \phi(r) \quad (29)$$

Considerando o processo de carregar o soluto, a variação do parâmetro  $\lambda$ , vai carregar o soluto continuamente. Assim, considerando um pequeno elemento de volume  $dV_r$ , o elemento  $dq$  de carga que o soluto recebe em uma variação  $d\lambda$  será:

$$(30)$$

$$dq = (\rho(r)dv_r)d\lambda$$

Levando em consideração o processo de carregar todos os pontos do espaço ocupado pelo soluto, o trabalho  $dW$  realizado em uma variação  $d\lambda$  da carga será a soma de todos os elementos de carga  $dq$ :

$$dw = \int \phi(r, \lambda)d\lambda\rho(r)dV_r \quad (31)$$

Substituindo a equação (29) na equação (31) e integrando em  $\lambda$  de 0 a 1, temos:

$$dw = \int_0^1 \lambda d\lambda \int \phi(r)\rho(r)dV_r \quad (32)$$

que leva a:

$$dw = \frac{1}{2} \int \phi(r)\rho(r)dV_r \quad (33)$$

A Equação 33 serve tanto para o vácuo como para a fase líquida. Considerando o potencial eletrostático originado pela molécula,  $\phi = \phi_s$ . Na fase líquida, o potencial eletrostático também terá a contribuição do dielétrico:  $\phi = \phi_s + \phi_d$ . Podemos agora calcular a energia livre de solvatação pela relação:

$$\Delta G_{solv} = W_{solução} - W_{gas} \quad (34)$$

usando a Equação 33, teremos:

$$\Delta G_{solv} = \frac{1}{2} \int (\phi_s(r) + \phi_d(r)) \rho(r) dV_r - \frac{1}{2} \int \phi_s(r) \rho(r) dV \quad (35)$$

Resultando em:

$$\Delta G_{solv} = \frac{1}{2} \int \phi_s(r) \rho(r) dV \quad (36)$$

A equação 36 mostra uma forma geral de calcular a energia livre de solvatação. Entretanto, existem várias outras metodologias e aproximações que podem ser utilizadas. A seguir, serão descritas as metodologias utilizadas no presente trabalho:

### **A) Energia livre de solvatação utilizando o procedimento de diferença finita de Poisson-Boltzmann**

A contribuição eletrostática para a energia livre de solvatação é calculada utilizando o tratamento completo da eletrostática contínua no procedimento de diferença finita de Poisson-Boltzmann (DFPB), descrito no item 2.3.1. Os raios de van der Waals e cargas parciais são derivadas dos parâmetros do campo de força CHARM22 (Momany *et al.*, 1992), mas na situação do presente trabalho, será utilizado os parâmetros do campo de força GROMOS (Lins e Hunenberger, 2005), o qual foi utilizado nas simulações por Dinâmica Molecular.

A contribuição eletrostática para a energia livre de solvatação é calculada realizando cálculos DFPB no vácuo (constante dielétrica do solvente = 1) e água (constante dielétrica do solvente  $\approx 78$ ), tomando a diferença:

$$\Delta G^{PB} = G_{water}^{PB} - G_{Vacuum}^{PB} \quad (37)$$

A energia livre de solvatação é calculada como a soma da contribuição eletrostática e da área superficial, dependente do termo de solvatação não polar como:

$$\Delta G^{\text{solvation}} = \Delta G^{\text{PB}} + \gamma \text{ASA}, \quad (38)$$

sendo ASA a área superficial acessível ao solvente, e ( $\gamma$ ) um coeficiente que inclui a tensão superficial do solvente.

## **B) Energia livre de solvatação utilizando o modelo de solvatação universal SM5.42R**

Em todos os modelos de solvatação do tipo SMx (Li *et al.*, 1999) incluindo o modelo SM5.42R (x = 5.42R), a energia livre de solvatação padrão é:

$$\Delta G_S^0 = E - E_0 + G_P + G_{\text{CDS}} \quad (39)$$

sendo, que as geometrias em fase gasosa não são reotimizadas em solução, e o termo ( $E - E_0 + G_P$ ) é também chamado de  $\Delta G_{\text{EP}}$  (a mudança na estrutura eletrônica do soluto e energia livre de polarização pelo solvente), e  $G_{\text{CDS}}$  é a energia livre de dispersão do solvente para formar a cavidade, também chamada de termo da primeira camada de solvatação. A contribuição  $E - E_0$  do Hamiltoniano na fase gasosa é chamado de energia de distorção. A energia livre de solvatação é a energia livre de transferência do soluto da fase gasosa (ar a 1 atm e 298 K) para a solução líquida em um solvente específico à 298 K e sobre pressão externa de 1 atm.

Nos modelos SM5.4,  $G_P$  possui a forma:

$$G_P = -\frac{1}{2} \left(1 - \frac{1}{\epsilon}\right) \sum_{k,k'} q_k q_{k'} (r_{kk'}^2 + \alpha_k \alpha_{k'} \exp[-r_{kk'}^2/d_{kk'} \alpha_k \alpha_{k'}])^{-1/2} \quad (40)$$

sendo  $r_{kk'}$  a distância interatômica entre os átomos  $k$  e  $k'$ ,  $\alpha_k$  o raio atômico para o átomo  $K$  na parte eletrostática do cálculo e é chamado de raio de Coulomb, e  $d_{kk'}$  a constante empírica otimizada igual a 4.0 Å para todos os  $K$  e  $K'$ , exceto quando um  $k$  e  $k'$  é o Hidrogênio e o outro é Carbono, no qual os valores de  $d_{kk'}$  é 4.2 Å.

Em geral,  $G_{CDS}$  é escrito como a soma das tensões superficiais atômicas  $\sigma_K$ , vezes a área superficial acessível ao solvente  $A_k$  para todos os átomos  $k$  no soluto:

$$G_{CDS} = \sum_k \sigma_k A_k \quad (41)$$

cada  $\sigma_K$  é uma função multilinear do coeficiente de tensão semi-empírico  $\tilde{\sigma}_{Km}$ :

$$\sigma_k = \sum_m \tilde{\sigma}_{km} T_m \quad (42)$$

sendo  $T_m$  a função não-linear de distâncias interatômicas, números atômicos, e um pequeno número de propriedades do solvente (chamado de descritores de solvente). Nos modelos SMx anteriores a função  $T_m$  dependia da ordem de ligação (Cramer e Truhlar, 1992), mas essas dependências foram substituídas por dependências nas distâncias interatômicas para  $x = 5$  à 5.42 (Giesen *et al.*, 1997). O  $T_m$  pode também ser chamado de funcionais de primeira camada de solvatação.

Os modelos de solvatação SM5.4 e SM5.42 são modelos SM5 que adotam cargas pontuais de classe IV (Li *et al.*, 1998c) (denotado por .4). Os modelos

SM5.4 adotam o modelo de carga CM1 de classe IV (Storer *et al.*, 1995), e os modelos SM5.42 adotam o modelo de carga CM2 de classe IV (Li *et al.*, 1998c).

No modelo de cargas CM2 classe IV, a carga  $q_k$  no átomo  $k$  é dado por

$$q_k = q_k^L + q_k^M \quad (43)$$

sendo  $q_k^L$  a carga de Löwdin (Mulliken, 1955), e  $q_k^M$  é a modificação CM2. A carga de Löwdin é dado por

$$q_k^L = Z_k - \sum_{\mu\epsilon k} (S^{1/2} P S^{1/2})_{\mu\mu} \quad (44)$$

sendo  $Z$  a carga nuclear,  $\mu$  a função de base,  $S$  a matriz de sobreposição, e  $P$  a matriz de densidade;  $q_k^M$  é dado por

$$q_k^M = \sum_{k' \neq k} B_{kk'} (D_{kk'} + C_{kk'} B_{kk'}) \quad (45)$$

sendo  $B_{kk'}$  a ordem de ligação (o qual é função de  $P$ ), e  $D$  e  $C$  as matrizes dos parâmetros semi-empíricos.

Nos modelos SM5.42R, a geometria na fase gasosa do soluto é tratado rigidamente (denotado por R) durante a determinação dos valores das constantes semi-empíricas  $\tilde{\sigma}_{Km}$ . A parametrização é baseada em cálculos, no qual a geometria não é relaxada pela dissolução.

Todos os modelos de solvatação SM5.42R possuem 2135 energias livres de solvatação para 275 solutos neutros compostos por H, C, N, O, F, P, S, Cl, Br e I em 91 solventes diferentes (Giesen *et al.*, 1997; Hawkins *et al.*, 1997; 1998).

## 2.4 – Método híbrido QM/MM (Quantum Mechanics / Molecular Mechanics)

A metodologia híbrida QM/MM vem datada de 1976, do trabalho de Warshel e Levitt (Warshel e Levitt, 1976), mas só em 1986 uma prescrição prática da metodologia foi desenvolvida por Singh e Kollman (Singh e Kollman, 1985). Os métodos QM/MM somente recentemente (Gao *et al.*, 1996)

receberam uma séria atenção como uma ferramenta prática de modelagem molecular, visando analisar sistemas que são grandes, para uma descrição exclusivamente quântica (Bash *et al.*, 1987; Eichler *et al.*, 1997). A maioria das aplicações vem se concentrando no tratamento da solvatação (Gao *et al.*, 1996; Tunon *et al.*, 1997) e na simulação de proteínas e ácidos nucleicos (Hartsough e Merz, 1995; Liu *et al.*, 1996). Na área de simulação de solventes, o método híbrido QM/MM tem mostrado corretamente a reorganização de cargas de sítios ativos devido ao efeito do solvente, e forneceu corretamente as barreiras de energia livre em fase condensada (Gao e Xia, 1992; Ho *et al.*, 1996). A modelagem QM/MM de proteínas também vem sendo bem sucedida, apesar dos grandes desafios que essas macromoléculas impõe.

O desenvolvimento das aproximações híbridas QM/MM é guiado pela idéia geral, que sistemas químicos grandes podem ser particionados em uma região eletrostática importante, que requer um tratamento quântico, enquanto que a vizinhança, a qual atua como uma perturbação, pode ser descrita classicamente. Esta perturbação clássica deve forçar a região quântica a uma determinada geometria, e para isso pode-se incluir efeitos eletrônicos como o efeito eletrostático e polarização. De acordo com esses conceitos, uma reação química é tratada como uma transformação envolvendo somente os centros reativos (região quântica) que são influenciados pelo meio (região clássica, como um solvente ou uma proteína).

A maioria dos modelos híbridos QM/MM utilizam, na descrição quântica, as metodologias semi-empíricas (Singh *et al.*, 1986; Hartsough e Merz, 1995); funcionais de densidade (Murphy *et al.*, 2000); ligações de Valência (Schmitt e Voth, 1999; Mo e Gao, 2000); ou ab-initio Hartree Fock. A descrição clássica do sistema é realizada utilizando-se os campos de força frequentemente usados como o AMBER (Ponder e Case, 2003), CHARMM (Mackerell *et al.*, 1998) e OPLS-AA (Kaminski *et al.*, 2000).

A principal dificuldade nos métodos QM/MM é a descrição adequada das interações na interface entre a região QM e MM. Segundo Gao *et al.* (1998), os critérios para o tratamento da ligação covalente na interface QM/MM, são:

- Primeiro, sem introduzir graus de liberdade extra, qualquer método que caracterize a fronteira deve reproduzir corretamente a geometria em comparação com a obtida quanticamente para todo o sistema.
- Segundo, a estrutura eletrônica, incluindo distribuição de cargas e potencial eletrostático, de todo sistema mecânico quântico deve ser mantido no fragmento mecânico quântico, e o átomo de fronteira, se tiver, deve ter a mesma eletronegatividade como em uma molécula tratada quanticamente.
- Terceiro, a superfície de energia potencial torcional com relação à ligação que conecta a região mecânica quântica e a região mecânica molecular devem ser consistentes com os resultados de cálculos puramente quânticos e mecânicos moleculares.

Uma aproximação usada para descrever a interface QM/MM é chamada de “link-atom”. Esta metodologia baseia-se na adição de átomos virtuais na região quântica para cada ligação na interface da região mecânica molecular (Singh *et al.*, 1986; Field *et al.*, 1990). Esses “link-atom”, que são tipicamente átomos de hidrogênio, são colocados em distâncias apropriadas ao longo da ligação e podem ser mantidos (*constrained*) na direção do átomo da fronteira mecânica molecular ou são permitidos se moverem livremente. As forças entre esses átomos de ligação (“link-atom”) e os átomos mecânico molecular são virtuais (ou não físicos), assim todas ou algumas forças do subsistema mecânico molecular sobre o subsistema mecânico quântico são algumas vezes omitidas. Quando isso é feito, o fragmento mecânico quântico não evidencia o meio eletrostático real (Alhambra *et al.*, 1998; Reuter *et al.*, 2000).

Outros métodos dispensam ligação com átomos virtuais para aplicar orbitais híbridos. Esta aproximação ainda não está elaborada completamente. Dois formalismos foram aprovados com sucesso para o tratamento da região de

fronteira, que são estritamente orbitais atômicos localizados (They *et al.*, 1994; Assfeld e Rivail, 1996) e orbitais híbridos generalizados (GHOs) (Gao *et al.*, 1998; Amara *et al.*, 2000).

A superfície de energia potencial QM/MM é calculada introduzindo o campo elétrico do solvente nos cálculos mecânico quântico da molécula de soluto, durante a simulação computacional, de forma que a função de onda do soluto será polarizado pela mudança dinâmica das moléculas de solvente ao redor.

De acordo com Gao e colaboradores (Gao *et al.*, 1996), sistemas em solução, cujo soluto é descrito quanticamente e o solvente classicamente, o hamiltoniano efetivo ( $H_{\text{eff}}$ ) pode ser descrito como:

$$\hat{H}_{\text{eff}} = \hat{H}_{QM}^O + \hat{H}_{QM/MM}^{el} + \hat{H}_{QM/MM}^{vdW} + \hat{H}_{MM} \quad (46)$$

sendo  $\hat{H}_{QM}^O$  o hamiltoniano para a molécula de soluto tratado quanticamente,  $\hat{H}_{MM}$  representa a interação solvente-solvente, e  $\hat{H}_{QM/MM}^{el}$  e  $\hat{H}_{QM/MM}^{vdW}$  são os hamiltonianos QM/MM de interação eletrostática e de van der Waals, respectivamente.

Os hamiltonianos QM/MM são descritos como:

$$\hat{H}_{QM/MM}^{el} = -\sum_{s=1}^S \sum_{i=1}^N \frac{eq_s}{r_{is}} + \sum_{s=1}^S \sum_{m=1}^M \frac{q_s Z_m}{R_{ms}} \quad (47)$$

$$\hat{H}_{QM/MM}^{vdW} = \sum_{s=1}^S \sum_{m=1}^M 4\epsilon_{ms} \left[ \left( \frac{\sigma_{ms}}{R_{ms}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ms}}{R_{ms}} \right)^6 \right] \quad (48)$$

sendo  $q_s$  e  $Z_m$  as cargas dos centros do solvente e do soluto, respectivamente.  $N$  é o número total de elétrons no soluto,  $S$  e  $M$  são o número total de átomos de solvente e de soluto, respectivamente;  $r$  é distância entre os elétrons e  $R$  a distância entre os núcleos.

Como as estruturas eletrônicas das moléculas de solvente não são explicitamente representadas, o termo QM/MM de van der Waals é requerido para levar em conta a repulsão eletrônica e a interação de dispersão entre as regiões QM e MM (Field *et al.*, 1990). Os parâmetros de Lennard-Jones  $\sigma_{ms}$  e  $\epsilon_{ms}$  são obtidas pela geometria a partir de parâmetros atômicos das regiões MM ( $\sigma_s$  e  $\epsilon_s$ ) e QM ( $\sigma_m$  e  $\epsilon_m$ ), tal que  $\sigma_{ms} = (\sigma_m \sigma_s)^{1/2}$  e  $\epsilon_{ms} = (\epsilon_m \epsilon_s)^{1/2}$ .  $\sigma_s$  e  $\epsilon_s$  são obtidos diretamente do campo de força mecânico clássico (MM) (Krauss *et al.*, 1994), enquanto que  $\sigma_m$  e  $\epsilon_m$  são novos parâmetros empíricos para átomos descritos quanticamente no potencial QM/MM. Este último pode ser otimizado para uma combinação QM e MM particular para resultar bons resultados para interações soluto-solvente (Gao *et al.*, 1996). Para certos sistemas, uma aproximação geral pode ser feita, onde  $\sigma_{ms}$  e  $\epsilon_{ms}$  podem se obtidos diretamente dos parâmetros de campos de força.

A energia total de um sistema fluídico em uma configuração instantânea durante uma simulação de Monte Carlo (MC) ou de Dinâmica Molecular (MD) é avaliada pelo valor obtido da função de onda e é dado por:

$$E_{tot} = \langle \Phi | \hat{H}_{eff} | \Phi \rangle = E_{QM} + E_{QM/MM}^{el} + E_{QM/MM}^{vdW} + E_{MM} \quad (49)$$

Nesta metodologia acima descrita, a obtenção da energia de um sistema, utilizando-se o hamiltoniano efetivo está limitado em descrever a solução sobre o efeito de somente um tipo de solvente, pois a descrição de um sistema, cujo soluto está inserido numa mistura binária requer a introdução de mais termos no

hamiltoniano, tornando o cálculo bastante complexo e dispendioso, computacionalmente.

De acordo com o que foi descrito até o presente momento, na abordagem convencional de cálculos QM/MM, o tratamento quântico e o tratamento clássico se dão ao mesmo tempo. Entretanto, existe uma outra abordagem de cálculos híbridos denominada QM/MM sequencial, a qual trabalha a parte clássica (MM) e quântica (QM) separadamente. A metodologia QM/MM sequencial foi inicialmente proposta e utilizada por Blair e colaboradores (Blair *et al.*, 1989), no intuito de caracterizar do efeito do solvente no espectro de absorção do formaldeído em água. Esta primeira proposta QM/MM sequencial consistia em gerar configurações soluto-solvente (formaldeído-água) utilizando Dinâmica Molecular, e o conjunto de estruturas com menor energia potencial foram escolhidas para a realização de cálculos ab initio Hartree–Fock no estado fundamental e excitado para a obtenção do espectro eletrônico.

Recentemente, uma nova aproximação QM/MM sequencial foi proposta por Coutinho e Canuto (Coutinho e Canuto, 1997) para estudar o efeito do solvente, em especial o solvatocromismo. Esta metodologia baseia-se em gerar configurações por simulação de Monte Carlo e/ou Dinâmica Molecular, e as configurações estatisticamente descorrelacionadas são escolhidas para um cálculo Mecânico Quântico de estruturas supramoleculares (utilizando-se a camada de solvatação), permitindo avaliar ligações de hidrogênio específicas entre o soluto e o solvente. Esta metodologia reforça a idéia de que configurações correlacionadas geradas por Monte Carlo podem ser excluídas dos cálculos quânticos sem comprometer o resultado da média final (Coutinho *et al.*, 1998). A aplicação desta metodologia permitiu calcular o solvatocromismo do benzeno nos solventes benzeno, água, cicloexano, e tetracloreto de carbono, e apresentou resultados que concordam excelentemente com os resultados experimentais (Coutinho *et al.*, 2000).

Neste contexto, baseando-se nas metodologias QM/MM desenvolvidas, e na necessidade de se descrever o efeito do solvente em solutos com elevado grau de liberdade conformacional (número pequeno de estruturas correlacionadas), como os polipeptídeos, o presente trabalho utilizou uma metodologia QM/MM sequencial, cujo cálculo quântico é realizado a cada intervalo de tempo de uma simulação por Dinâmica Molecular. Dessa forma, como a estabilidade da estrutura em  $\alpha$ -hélice de polipeptídeos (objetivo dessa tese) depende do tempo de vida das ligações de hidrogênio intramoleculares, que são da ordem de ps, os cálculos quânticos foram realizados a nível semi-empírico, incluindo o efeito do solvente implicitamente no intervalo de 1ps da simulação por Dinâmica Molecular. A utilização da metodologia QM/MM sequencial como será descrita neste trabalho permitirá incluir efeitos de temperatura, pressão e solvatação na conformação de compostos que apresentam elevados graus de liberdade estrutural.

Portanto, com base em todos os métodos aqui descritos, a aproximação QM/MM oferece uma ponte prática entre a mecânica clássica e quântica e permite um estudo teórico de sistemas além de seu estado gasoso.



## Capítulo 3

### Conformação e solubilidade de quitinas e quitosanas à diferentes graus de acetilação

#### 3.1– Introdução

As propriedades físico-químicas e biológicas de muitas quitosanas são dependente do grau de acetilação (GA) e da distribuição de grupos acetil ao longo da cadeia do biopolímero. Esta característica é considerada o parâmetro chave para determinar se a quitosana pode ser usada em produtos cosméticos ou farmacêuticos (Berth e Dautzenberg, 2002). Experimentalmente, o grau de acetilação pode ser controlado pelo tempo, temperatura e pH da reação de deacetilação (Struszczyk, 1987). Várias técnicas tem sido propostas para determinar o grau de acetilação e caracterizar o efeito do mesmo na cadeia de quitosanas, como infravermelho (Baxter *et al.*, 1992; Brugnerotto *et al.*, 2001), análises elementais, reações enzimáticas (Pelletier *et al.*, 1990), UV (Muzzarelli e Rocchetti, 1985), RMN de próton (Rinaudo *et al.*, 1992) e RMN de  $^{13}\text{C}$  em estado sólido (Raymond *et al.*, 1993; Heux *et al.*, 2000). O ponto central do debate é se o grau de acetilação pode ou não causar agregação ou qualquer outra mudança conformacional na quitosana (Ottoy *et al.*, 1996). A distribuição de grupos acetil ao longo da cadeia do biopolímero podem influenciar a solubilidade do polímero e as interações entre as cadeias, devido as ligações de hidrogênio e ao caráter hidrofóbico do grupo acetil (Rinaudo, 2006). Sorlier e colaboradores (Sorlier *et al.*, 2001) mostraram que em elevados valores de acetilação (GA), a quitosana apresenta características similares aos grupos amino em pH básico, resultando agregação. Além disso, quitosanas altamente acetiladas e com grupos acetil localizadas em uma região do polímero, formando blocos, possui maior quantidade de regiões cristalinas e se torna menos suscetível ao processo de inchamento por solvente. Além

disso, já foi observado que quitosanas com GA ao redor de 50% são solúveis em água devido à sua distribuição randômica de grupos acetil (Aiba, 1991). O possível efeito do GA na conformação da cadeia de quitina e quitosana já foi discutido anteriormente (Berth *et al.*, 1998); entretanto, ainda existe muitas contradições na literatura (Pedroni *et al.*, 2003). Berth e Dautzenberg (2002) atribuíram essas questões não solucionadas à dificuldades na caracterização físico-química de métodos experimentais. Apesar do progresso atingido na última década por vários pesquisadores, nem tudo a respeito do comportamento da quitosana em solução foi entendido (Berth e Dautzenberg, 2002). Até o presente momento, muitos trabalhos experimentais propuseram uma representação molecular para explicar o efeito do grau de acetilação nas propriedades desses polímeros; entretanto, essas ilustrações são meramente especulativas (Aiba, 1991; Philippova *et al.*, 2001). Por essa razão é importante prever diferentes características intrínsecas da quitosana baseando-se na análise por modelagem molecular (Mazeau e Rinaudo, 2004).

No intuito de compreender as propriedades físico-químicas da quitosana à nível molecular, foi realizado a simulação por Dinâmica Molecular de fibras e nanopartículas de quitina e quitosana em diferentes condições, visando elucidar o efeito do grau de acetilação na conformação e solubilidade desses biopolímeros em solução aquosa.

## **3. 2 – Metodologia**

### **3.2.1 – Sistemas simulados**

Os sistemas estudados nesta etapa do trabalho consistem em filamentos de quitina e quitosana solvatados e de filamentos unidos na forma de nanopartículas. Todos os sistemas foram simulados considerando uma cadeia infinita na direção de z, portanto, as interações ligadas foram definidas através das caixas de simulação.

A estrutura inicial para os filamentos de quitina e quitosana foi composta de 10 monômeros de polissacarídeos com conformação inicial totalmente randômica, apresentando ângulos  $\phi \sim -60^\circ$  e  $\psi \sim +110^\circ$  (sendo  $\phi$  e  $\psi$  definido pelos átomos O5–C1–O1–C4 e C1–O1–C4–C3, respectivamente). A Figura 3.1 mostra graficamente a representação dos ângulos  $\phi$  e  $\psi$ .

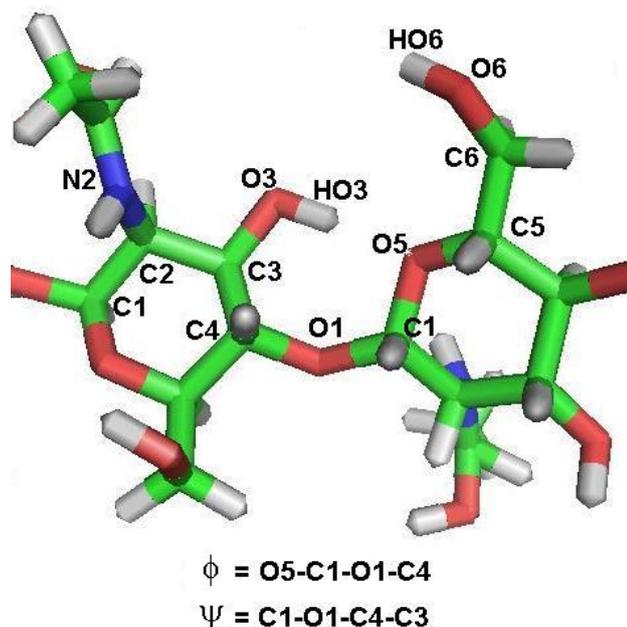


FIGURA 3.1 – Definição dos ângulos diedros  $\phi$  e  $\psi$  ao redor da ligação glicosídica.

Os filamentos simulados individualmente estão descritos na Tabela 3.1. Todos os filamentos modelados foram colocados em uma caixa de simulação de dimensão  $x = 3,0$ ;  $y = 3,0$  e  $z \approx 5,0$  nm.

TABELA 3.1 – Descrição dos filamentos quitina e quitosana solvatados à diferentes percentagens e distribuição de grupos acetil.

Sistema <sup>a</sup>	Nº átomos de soluto	Nº íons	Nº de águas	Grau de acetilação (%)	Sequência <sup>b</sup>
CHS <sub>0%</sub>	155	9	1394	0	d-p-d-p-d-p-d-p-d-p
CHS <sub>40%</sub>	161	9	1388	40	d-c-p-d-c-p-c-d-p-c
CHS <sub>40%B</sub>	161	9	1388	40	c-c-c-c-p-d-p-d-p-d
CHT <sub>60%</sub>	164	10	1385	60	d-c-p-c-c-d-c-p-c-c
CHT <sub>60%B</sub>	164	10	1385	60	c-c-c-c-c-c-c-d-p-d
CHT	170	10	1355	100	c-c-c-c-c-c-c-c-c-c

<sup>a</sup>CHS: quitosana, CHT: quitina; <sup>b</sup>d = glicosamina; p = glicosamina-protonada; c = *N*-acetilglicosamina.

A estrutura inicial das nanopartículas de quitina e quitosana são compostas por 9 filamentos de polissacarídeos em uma conformação de hélice 2, arranjadas em uma configuração antiparalela. Todas as nanopartículas simuladas foram colocadas em uma caixa de simulação cúbica de dimensão  $x = y = z = 6,0$  nm, com uma configuração similar a de um cristal.

Toda e qualquer ligação de hidrogênio, interação hidrofóbica ou contato próximo favorável foi estabelecido realizando-se uma simulação por Dinâmica Molecular no vácuo (ensemble NVT) por um total de 100 ps, e 0.1 fs para o passo de integração. Todas as nanopartículas simuladas estão descritas na Tabela 3.2.

TABELA 3.2 – Descrição das nanopartículas de quitina e quitosana simuladas à diferentes percentagens e distribuição de grupos acetil.

Sistema <sup>a</sup>	Nº átomos de soluto	Nº ions	Nº de águas	Grau de acetilação (%)	Sequência <sup>b</sup>
NanoCHS <sub>0%</sub>	1395	89	6394	0	d-p-d-p-d-p-d-p-d-p
NanoCHS <sub>40%</sub>	1449	89	6392	40	d-c-p-d-c-p-c-d-p-c
NanoCHS <sub>40%B</sub>	1449	89	6392	40	c-c-c-c-p-d-p-d-p-d
NanoCHT <sub>60%</sub>	1476	90	6291	60	d-c-p-c-c-d-c-p-c-c
NanoCHT <sub>60%B</sub>	1476	90	6291	60	c-c-c-c-c-c-c-d-p-d
Nano- $\alpha$ -CHT	1530	90	6188	100	c-c-c-c-c-c-c-c-c-c

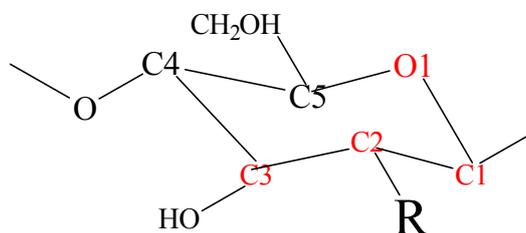
<sup>a</sup>CHS: quitosana CHT: quitina; <sup>b</sup>d = glicosamina; p = glicosamina; c = N-acetilglicosamina.

Todos os sistemas foram solvatados completando a caixa de simulação com moléculas de água utilizando o modelo SPC (Berendsen *et al.*, 1987). Além disso, moléculas de água foram inseridas nos espaços vazios disponíveis no interior das nanopartículas, criando-se cristais hidratados. Íons cloreto e sódio foram utilizados para uniformizar a força iônica de todos os sistemas estudados nessa etapa do trabalho. Além disso, considerando que o pKa dos grupos amino é igual 6,5, para reproduzir a condição em que todos os sistemas estão em pH 6,5, metade dos grupos amino estavam protonados e a outra metade desprotonados.

### 3.2.2 – Modificações e reparametrizações do campo de força para carboidratos

Para a simulação dos biopolímeros quitina e quitosana, foi necessário fazer modificações no campo de força desenvolvido para carboidratos (Lins e Hunenberger, 2005). A primeira modificação realizada foi no ângulo diedro próprio O1-C1-C2-C3 (Figura 3.2), que define a conformação cadeira do anel

piranosídico. Portanto, para evitar a inversão do anel, a constante de força do potencial que define o ângulo diedro foi multiplicado por 3 como mostra a Tabela 3.3.



**FIGURA 3.2 – Descrição do ângulo diedro próprio que define a conformação do anel piranosídico. R = -NH<sub>2</sub>, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> ou -NH(C=O)CH<sub>3</sub>.**

TABELA 3.3 – Parâmetros diedrais original e modificado.

	Ângulo diedro	$k_{\theta}$ (kJ/mol)	$\cos \theta$
Diedro original	O1-C1-C2-C3	0,418	+1
Diedro modificado	O1-C1-C2-C3	1,254	+1

Como os sistemas estudados são filamentos de quitina e quitosana, o grupo R (Figura 3.2) foi definido de acordo com a condição da simulação. Assim, para a simulação da quitina pura, foi parametrizado o grupo N-acetil, enquanto que para a quitosana, a qual é sensível à variação de pH, foram parametrizados os grupos amino (NH<sub>2</sub>) e grupos amino protonados (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). Portanto, para descrever adequadamente esses grupos, foram introduzidos parâmetros de comprimento e ângulos de ligação, bem como de diedro próprios e impróprios no campo de força do GROMOS para açúcares. Para isso, foram utilizados parâmetros genéricos do campo de força GROMOS, capazes de descrever os grupos N-acetil e amino. A Tabela 3.4 mostra esses parâmetros de acordo com a definição de cada átomo. A Figura 3.3 mostra a numeração dos átomos de acordo a definição do campo de força.

TABELA 3.4 – Parâmetro de comprimento, ângulos de ligação e ângulos diedros próprios e de deformação imprópria obtidos do campo de força G53a6 do GROMOS.

Tipo de ligação	$k_b$ ( $10^6$ kJ/mol · nm <sup>4</sup> )	$B_o$ (nm)
C2 – N2	8,7100e+06	0,1470
N2 – H22	1,8700e+07	0,1000
N2 – H23	1,8700e+07	0,1000
N2 – H24	1,8700e+07	0,1000
N2 – C7	1,1800e+07	0,1330
C7 – O7	1,6600e+07	0,1230
C7 – C8	1,0800e+07	0,1390
Ângulos de ligação	$K_\theta$ (KJ/mol)	$\theta_o$ (graus)
C3–C2–N2	530,00	111,00
C1–C2–N2	530,00	111,00
H22–N2–C2	390,00	120,00
H23–N2–C2	390,00	120,00
H22–N2–H23	445,00	120,00
H22–N2–H24	445,00	120,00
H24–N2–H23	445,00	120,00
H22–N2–C7	415,00	123,00
O7–C7–N2	730,00	124,00
C8–C7–N2	610,00	115,00
O7–C7–C8	685,00	121,00
Diedros próprios	$k_\theta$ (kJ/mol)	$\theta$ (graus)
C4–C3–C2–N2	545,00	113,00
O3–C3–C2–N2	50,00	115,00
O5–C1–C2–N2	50,00	115,00
C1–C2–N2–H22	685,00	121,00
N2–C2–C1–O1	50,00	115,00
C1–C2–N2–C7	1,00	180,00
C2–N2–C7–C8	33,50	180,00
Diedros impróprios	$K_\xi$ (KJ/mol · graus <sup>2</sup> )	$\xi_o$ (graus)
C1–C3–N2–C2	167,42	0,00
C1–C3–N2–C2	334,85	35,26
N2–C7–C8–H22	167,42	0,00
C7–C8–N2–O7	167,42	0,00

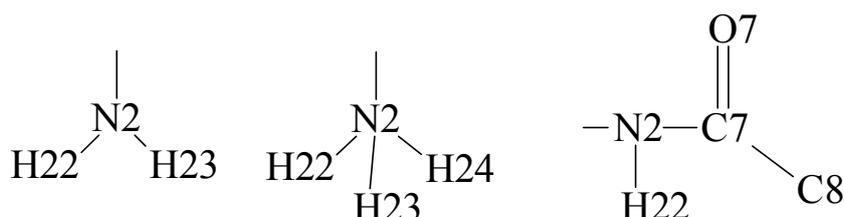


Figura 3.3 – Numeração dos átomos no campo de força.

Para a descrição das interações eletrostáticas foram utilizados as cargas do campo de força GROMOS (Lins e Hunenberger, 2005). A carga do átomo C2 (Figura 3.2) do anel piranosídico foi modificado para adequar a carga total do resíduo à entrada dos grupos amino e N-acetil. A Tabela 3.5 resume a carga parcial de cada átomo em função do tipo de resíduo de carboidrato.

TABELA 3.5 – Cargas atômicas parciais para o campo de força G53a6 do GROMOS para carboidratos, descritos em função do resíduo.

$\alpha$ -D-glicopirranose	$\alpha$ -D-glicosamina	$\alpha$ -D-glicosamina protonada	N-acetil- $\beta$ -D-glicosamina
C4 0,232	C4 0,232	C4 0,232	C4 0,232
C3 0,232	C3 0,232	C3 0,232	C3 0,232
O3 -0,642	O3 -0,642	O3 -0,642	O3 -0,642
HO3 0,410	HO3 0,410	HO3 0,410	HO3 0,410
C2 0,232	C2 0,000	C2 0,127	C2 0,000
O2 -0,642	N2 -0,830	N2 0,129	N2 -0,280
HO2 0,410	H22 0,415	H22 0,248	H22 0,280
C6 0,232	H23 0,415	H23 0,248	C7 0,380
O6 -0,642	C6 0,232	H24 0,248	O7 -0,380
HO6 0,410	O6 -0,642	C6 0,232	C8 0,000
C5 0,376	HO6 0,410	O6 -0,642	C6 0,232
O5 -0,480	C5 0,376	HO6 0,410	O6 -0,642
C1 0,232	O5 -0,480	C5 0,376	HO6 0,410
O1 -0,360	C1 0,232	O5 -0,480	C5 0,376
	O1 -0,360	C1 0,232	O5 -0,480
		O1 -0,360	C1 0,232
			O1 -0,360

De acordo com a definição do GROMOS para átomos unidos, o grupo metila do N-acetil foi considerado como um único átomo. Como a carga resultante do grupo metil é zero, permitindo verificar a existência de uma possível interação hidrofóbica ou de van der Waals, durante a simulação.

### 3.2.3 – Simulações por Dinâmica Molecular

Inicialmente, todos os sistemas modelados tiveram sua energia minimizada realizando 10000 passos utilizando o algoritmo steepest descent. Depois da minimização, o solvente foi equilibrado realizando-se uma simulação por dinâmica molecular por 10 ps à 50, 150, e 300K; durante este processo, a posição dos átomos mais pesados (exceto hidrogênio) foram fixados aplicando-se uma constante de força de  $1,0 \cdot 10^3 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ . Após 30 ps de equilíbrio do solvente, um total de 30 ns e 20 ns de simulação por Dinâmica Molecular foram realizados para os filamentos e nanopartículas, respectivamente. Toda simulação foi realizada em um ensemble isotermico-isobárico (NPT) utilizando o algoritmo leap-frog (Hockney, 1970) com passo de integração de 1 fs. As coordenadas de todos os átomos do sistema foram escritas a cada 1ps para a realização das análises.

Durante a simulação por Dinâmica Molecular, a cada passo de integração, os movimentos translacionais e rotacionais foram removidos do centro de massa dos sistemas. A temperatura foi mantida por 300 K acoplando os solutos e os solventes paralelamente aos termostatos de Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984) com um tempo de relaxação de 0,1 ps. A pressão foi mantida à 1 bar pelo acoplamento do barostato de Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984) com um tratamento semi-isotrópico e tempo de relaxação de 10 ps e compressibilidade de  $4,5 \cdot 10^{-5} \text{ Bar}^{-1}$ . O comprimento de ligação, bem como o movimento de estiramento linear e angular envolvendo o átomo de hidrogênio foram fixados utilizando o algoritmo LINCS (Hess *et al.*, 1997).

Na descrição das interações eletrostáticas e de van der Waals de curto alcance, foi utilizado um raio de corte de 1,4 nm, e as contribuições eletrostáticas de longo alcance foram tratadas por meio da aproximação do campo de reação (Tironi *et al.*, 1995), com  $\epsilon = 66$ .

Todas as simulações foram realizadas utilizando uma extensão do campo de força para carboidratos do GROMOS (Lins e Hunenberger, 2005), descrito no item 3.2.2. Em todas as simulações foi utilizado o programa GROMACS 3.3.2 (Van Der Spoel *et al.*, 2005).

### **3.2.4 – Cálculo da energia livre de solvatação**

Os cálculos da energia livre de solvatação para os biopolímeros quitinas e quitosanas foram obtidos resolvendo numericamente a equação não-linear de Poisson–Boltzmann e aplicando o procedimento de diferença finita (Davis e McCammon, 1990; Nicholls e Honig, 1991; Antosiewicz *et al.*, 1994) o qual foi realizado utilizando o programa APBS (Adaptative Poisson-Boltzmann Solver) (Holst *et al.*, 2001) e os parâmetros do campo de força GROMOS desenvolvidos neste trabalho para caracterizar a quitina e a quitosana. A constante dielétrica utilizada para o solvente implícito foi  $78,54 \text{ C}^2/\text{N.m}^2$ , com raio do solvente de 1,4 nm, tensão superficial de 0,105 N/m, e uma força iônica de 0,4 mM foi utilizada para descrever as estruturas em solução aquosa. A constante dielétrica do soluto usada foi  $1 \text{ C}^2/\text{N.m}^2$ . O cálculo da contribuição apolar para a energia livre de solvatação foi utilizado um  $\gamma$  igual a 0,105 kJ/mol. Os potenciais eletrostáticos tridimensional foram obtidos utilizando 129 pontos de rede nas direções x, y e z.

## **3.3 Resultados e discussões**

O grau de acetilação (GA) tem sido considerado como um dos parâmetros que mais influência na conformação das cadeias de quitina e quitosana. Entretanto, ainda existe uma elevada controvérsia na literatura a respeito do efeito do grau de acetilação na estrutura e nas propriedades da quitosana. Qun e Ajun (Qun e Ajun, 2006), baseados em resultados experimentais, concluíram que o comportamento da quitosana em solução, como a agregação, a transição

conformacional e as interações intermoleculares permanecem em dúvidas e ainda necessitam maiores investigações. De acordo com a configuração da simulação realizada, foi possível isolar a influência do grau de acetilação nos filamentos solvatados e nas nanopartículas. Os sistemas com 40% e 60% de acetilação tiveram seus grupos acetil distribuídos randomicamente e em blocos (grupos acetil localizados somente em uma região do polímero).

Para descrever a possível conformação que as fibras totalmente solvatadas podem assumir em solução, os valores  $\phi \cong -60^\circ$  and  $\psi \cong +110^\circ$  (estrutura sem motivo estrutural) foram utilizados como estrutura inicial. Dessa forma, nos primeiros ns de simulação, todas as cadeias solvatadas apresentaram distribuição  $\phi/\psi$  similar. Entretanto, para os últimos 5ns de simulação, os valores de  $\phi$  e  $\psi$  atingiram valores observados para a estrutura cristalina desses biopolímeros, como ilustrado nos mapas de  $\phi/\psi$  da Figura 3.4a-f. Os valores experimentais disponíveis foram obtidos por difração de raios-X e difração de elétrons para quitosanas cristalizadas sobre diferentes condições experimentais (Figura 3.4a-e).

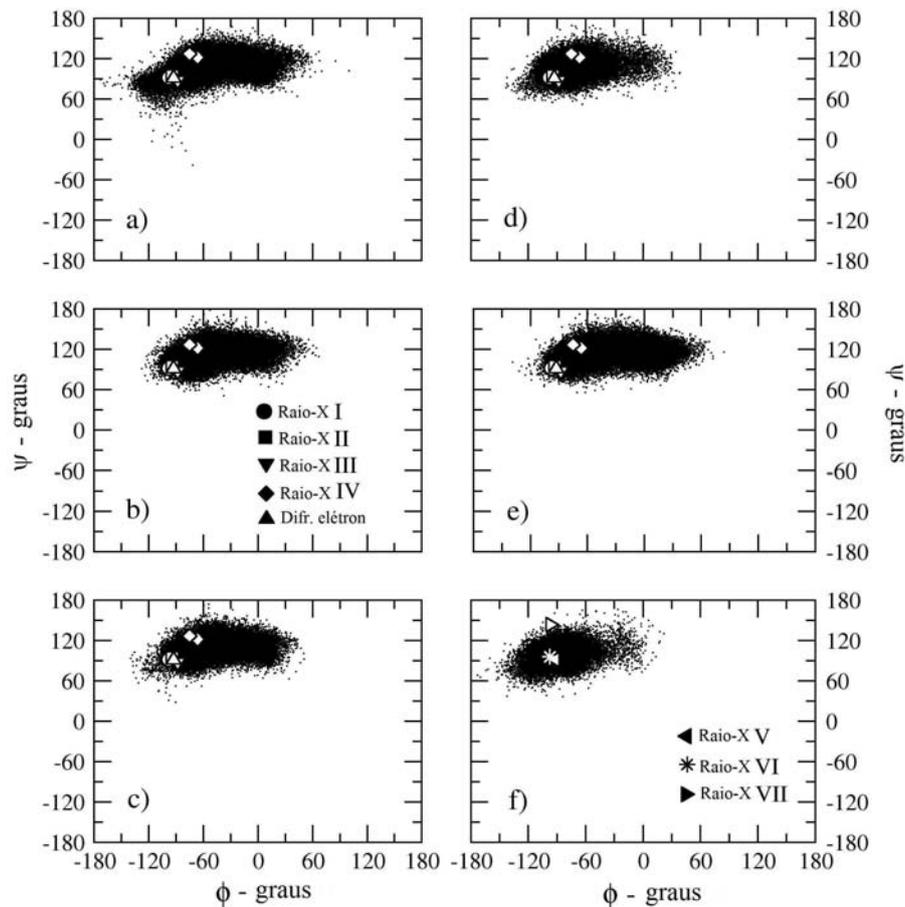


FIGURA 3.4 – Mapa de distribuição dos ângulos diedros  $\phi$  e  $\psi$  para os últimos 5ns de simulação para os filamentos de polissacarídeos com a) 0%, b) 40% (distribuição randômica), c) 40% (distribuição em blocos), d) 60% (distribuição randômica), e) 60% (distribuição em blocos), f) 100%, de grupos acetil.

O mapa de  $\phi/\psi$  da Figura 3.4 mostra claramente que a quitosana com nenhum grau de acetilação (Figura 3.4a) possui o valor  $\phi$  mais amplo, mostrando grande mobilidade do mesmo, se comparado com os outros filamentos. Este comportamento conformacional pode ser explicado pela atração eletrostática entre os grupos amino protonados e desprotonados uniformemente distribuídos ao longo da cadeia polissacarídica. Assim, devido a presença de grupos acetil entre os grupos amino, ocorre uma diminuição da interação eletrostática, resultando em uma menor variação dos ângulos diedros  $\phi$  e  $\psi$ , mostrando uma fibra mais rígida, como observado para as fibras solvatadas com 40% e 60% de acetilação (Figura 3.4 b-e). Estes resultados confirmam o que foi sugerido por Errington (Errington *et al.*, 1993): o grupo acetil restringe a rotação

ao redor da ligação glicosídica, aumentando a rigidez da cadeia. Isto se torna ainda mais óbvio para o filamento de quitina totalmente acetilado, o qual convergiu para ângulos  $\phi$  e  $\psi$  próximos de  $-90^\circ$  e  $+90^\circ$  respectivamente, atingindo uma configuração de hélice 2.

Dessa forma, para caracterizar detalhadamente a conformação de filamentos de quitosana em solução, foi calculado a helicidade de cada fibra. Os valores experimentais de  $\phi$  e  $\psi$  obtidos por difração de raios-X: I, II, III, V, VI, VII e difração de elétrons (Figura 3.4 a-f) correspondem à configuração chamada hélice 2 e os ângulos mostrados pelo dado de raio-X IV, corresponde à configuração em hélice 4.

Sabe-se que a estrutura cristalina da quitina possui bem menos variabilidade conformacional que a quitosana (Ogawa *et al.*, 2004; Rinaudo, 2006), e esse biopolímero mantém sua configuração em hélice 2 com valores de  $\phi$  e  $\psi$  ao redor de  $-90^\circ$  e  $+90^\circ$ , respectivamente. Por outro lado, a quitosana pode assumir quatro tipo principais de conformação: hélice 2, hélice 2 relaxada, hélice 4/1, e hélice 5/3. Os valores  $\phi$  e  $\psi$  para a quitosana em hélice 2 podem variar levemente para  $\phi \cong -98^\circ$  e  $\psi \cong 92^\circ$  (Yui *et al.*, 1994), a hélice 4/1 pode existir em duas formas,  $\phi_1 \cong -66,4^\circ$ ,  $\psi_1 \cong 121,6^\circ$  e  $\phi_2 \cong -75,0^\circ$ ;  $\psi_2 \cong 126,9^\circ$  (Lertworasirikul *et al.*, 2004a) e possui uma unidade de repetição composta de dois resíduos, então pode-se gerar uma hélice 4 completa a partir do grupo espacial  $P4_1$  (2 resíduos que transladam após  $90^\circ$  de rotação). Nenhum valor específico de  $\phi$  e  $\psi$  estão associadas às conformações hélice 5 e hélice 2 relaxada, uma vez que eles podem adotar uma ampla faixa de valores (Kawahara *et al.*, 2003; Lertworasirikul *et al.*, 2004a). Devido à efeitos de solvatação e alta temperatura (300K) no polímero, comparado com a estrutura cristalina, não foram considerados todos os parâmetros cristalinos que definem os padrões de hélice (Ogawa *et al.*, 2004). Ao invés disso, a periodicidade da hélice (helicidade e repetição de cadeia) foi utilizada como critério, permitindo uma variação de  $\pm 15^\circ$  da estrutura cristalográfica. Para isso foi criado um programa em

linguagem FORTRAN, baseado no método desenvolvido por Zugenmaier e Sarko para analisar polímeros fibrosos como polissacarídeos (Zugenmaier e Sarko, 1980). Devido à natureza da configuração dos sistemas simulados (cadeia infinita ao longo da caixa periódica de simulação), as conformações foram descritas de acordo com a classificação de Ogawa para a estrutura cristalina de quitosanas (Ogawa, 1988; Ogawa e Yui, 1993; 1994; Ogawa *et al.*, 2004). De acordo com esta aproximação, cinco motivos estruturais foram propostos: hélice 2 (2 resíduos por volta, formando um padrão de zigue-zague), hélice 3 (hélice de mão direita com 3 resíduos por volta), hélice 4 (hélice de mão direita com 8 resíduos por volta, onde quatro conjuntos de dois resíduos são rotacionados por 90° ao redor do eixo principal para completar uma volta), hélice 2 relaxada (hélice de mão direita com 8 resíduos por volta, onde cada conjunto de quatro resíduos são rotacionados por 180° ao redor do eixo principal para completar uma volta), e hélice 5 (hélice de mão esquerda com 5 resíduos por volta). Se a configuração da cadeia inteira, a qualquer tempo, falhar em cumprir as condições requeridas para cada motivo estrutural, então a cadeia é classificada como conformação randômica. Uma representação gráfica das estruturas de raio-X dos motivos estruturais da quitina e quitosana pode ser encontradas em um review de Ogawa e colaboradores (Ogawa *et al.*, 2004). A Tabela 3.6 mostra que a percentagem que cada motivo estrutural pode adotar durante e nos últimos 5 ns de simulação.

TABELA 3.6 – Tendência helicoidal da cadeia principal do filamento de quitina e quitosana solvatado.

Sistema	Tipo de hélice	Para 30 ns de simulação (%)		Para os últimos 5ns de simulação (%)	
		Randômica	Bloco	Randômica	Bloco
CHS <sub>0%</sub> *	Hélice 2	0,2	-	0,1	-
	Hélice 3	1,6	-	1,4	-
	Hélice 4	0,8	-	0,9	-
	Hélice 2 relaxada	16,2	-	12,7	-
	Hélice 5	17,4	-	16,2	-
	Hélice randômica	63,8	-	68,7	-
CHS <sub>40%</sub>	Hélice 2	0,0	0,7	0,0	0,3
	Hélice 3	0,8	2,9	1,4	1,3
	Hélice 4	1,0	0,6	1,3	0,7
	Hélice 2 relaxada	18,8	10,0	24,2	9,5
	Hélice 5	20,4	13,0	11,6	24,1
	Hélice randômica	59,0	72,7	61,5	64,2
CHT <sub>60%</sub>	Hélice 2	0,1	2,5	0,1	5,2
	Hélice 3	0,3	9,0	0,6	2,3
	Hélice 4	0,4	0,4	2,3	0,5
	Hélice 2 relaxada	19,9	7,3	16,6	2,9
	Hélice 5	24,9	2,4	22,6	3,7
	Hélice randômica	54,5	78,5	57,8	85,4
CHT <sub>100%</sub> *	Hélice 2	6,9	-	12,4	-
	Hélice 3	1,2	-	0,0	-
	Hélice 4	0,4	-	0,0	-
	Hélice 2 relaxada	5,5	-	0,1	-
	Hélice 5	8,1	-	0,0	-
	Hélice randômica	78,0	-	87,6	-

\* Não existe distinção entre distribuição randômica e em blocos para as quitinas e quitosanas com 0 e 100% de acetilação.

A preferência configuracional mostrada na Tabela 3.6 revela que o aumento do número de grupos de acetil favorece a conformação hélice 2. Este comportamento é ainda mais evidente para polissacarídeos que possuem sequência contínua ou distribuição em blocos de grupos acetil. Portanto, existem

dois tipos de tendências helicoidais, de acordo com a distribuição de grupos acetil: i) quitosanas totalmente deacetiladas ou acetiladas randomicamente possuem tendência em formar hélice 2 relaxada e hélice 5 ao invés de formar uma hélice 2; por outro lado, ii) quitosanas ou quitinas totalmente acetiladas e com distribuição de grupos acetil em blocos possuem grande tendência em formar uma hélice 2. Isto sugere que o aumento do grau de acetilação reduz a percentagem de hélice 2 relaxada e hélice 5, favorecendo a conformação em hélice 2. Dessa forma, considerando somente os últimos 5 ns de simulação, estas características se tornam ainda mais pronunciadas, com um leve aumento de motivos estruturais em hélice 4 e hélice randômica. Além disso, levando em consideração que a preferência de todas as fibras é a hélice randômica (efeitos de temperatura e solvatação), a quitina 100% acetilada convergiu somente para o motivo estrutural em hélice 2 (12,34%), apresentando somente uma desprezível percentagem (0,10%) de hélice 2 relaxada, nos últimos 5 ns de simulação. Isto mostra que esta quitina possui baixa troca conformacional. Este comportamento não foi observado na análise dos outros filamentos de polissacarídeos, pois os mesmos não convergiram para uma única conformação helicoidal. Estes resultados mostraram que apesar do efeito da temperatura e da solvatação, os filamentos de quitina e quitosana assumem conformações que são observadas no estado cristalino.

De acordo com os dados experimentais, o grupo acetil é responsável por restringir a rotação do polissacarídeo ao redor da ligação glicosídica (Errington *et al.*, 1993). Além disso, a cadeia de quitina e de algumas quitosanas adotam uma conformação de hélice 2 devido à ligação de hidrogênio intramolecular O3–HO3...O5 (Okuyama *et al.*, 1997; Lertworasirikul *et al.*, 2004b). Portanto, baseando-se nessas duas informações, torna-se possível sugerir que os grupos acetil podem contribuir na formação e estabilização das ligações de hidrogênio O3–HO3...O5. Para provar tal suposição, foram avaliados o número médio e tempo de vida de toda possível ligação de hidrogênio que o grupo hidroxila

O3–HO3 pode realizar em função do grau de acetilação do polissacarídeo. A Tabela 3.7 mostra as ligações de hidrogênio mais observadas para o grupo hidroxila O3–HO3.

TABELA 3.7 – Número e tempo de vida médio das ligações de hidrogênio, de toda trajetória da Dinâmica Molecular, para os filamentos de quitina e quitosana solvatados.

Sistema	HO3 <sub>(n)</sub> ...O5 <sub>(n+1)</sub>		O3–HO3...O <sub>ÁGUA</sub>		H <sub>ÁGUA</sub> ...O3	
	Tempo <sup>a</sup>	Número <sup>b</sup>	Tempo <sup>a</sup>	Número <sup>b</sup>	Tempo <sup>a</sup>	Número <sup>b</sup>
CHS <sub>0%</sub>	4,83	0,48 ± 0,12	2,23	0,29 ± 0,13	2,26	0,72 ± 0,16
CHS <sub>40%</sub>	5,21	0,57±0,13	2,69	0,26±0,11	2,61	0,86±0,16
CHS <sub>40%B</sub>	5,49	0,58±0,12	2,44	0,25±0,12	2,61	0,86±0,16
CHT <sub>60%</sub>	4,96	0,57±0,13	2,94	0,27±0,11	2,72	0,96±0,16
CHT <sub>60%B</sub>	5,28	0,57±0,13	2,67	0,26±0,12	2,74	0,94±0,16
CHT	5,88	0,63 ± 0,15	3,32	0,24 ± 0,12	3,08	1,08 ± 0,16

<sup>a</sup>Tempo dado em ps; <sup>b</sup> número médio por unidade de açúcar.

Como esperado, os resultados mostrados na Tabela 3.7 revelam que o número médio e tempo de vida da ligação de hidrogênio O3–HO3...O5 é diretamente proporcional ao número de grupos acetil presente no composto, o qual favorece a formação e a estabilização de interações intermoleculares, justificando o aumento de estruturas em hélice 2 (Tabela 3.6).

O número médio e tempo de vida das ligações de hidrogênio HO3<sub>(n)</sub>...O5<sub>(n+1)</sub> e O3–HO3...O<sub>ÁGUA</sub> não variam significativamente com o grau de acetilação, mas eles possuem tendências opostas, mostrando a participação de moléculas de água na estabilização da ligação de hidrogênio intramolecular. Além disso, pode-se observar mudanças relevantes no número e tempo de vida das ligações de hidrogênio H<sub>ÁGUA</sub>...O3 em função do grau de acetilação, sugerindo que a estabilidade da ligação de hidrogênio intramolecular O3–

HO3...O5 está relacionada à orientação de moléculas de água (afetada pela presença dos grupos N-acetil) ao redor desse grupo hidroxila.

Para certificar tal hipótese, foi calculado a orientação de todas as moléculas de água dentro um raio de 5 Å de todos os átomos O3. A Figura 3.5 mostra a distribuição de moléculas de água em função do co-seno do ângulo ( $\theta$ ), formado pelo vetor dipolo da molécula de água com o vetor definido pelo átomo O3 e o átomo de oxigênio da água. A distribuição do número médio de moléculas de água orientadas ao redor das cadeias de quitina e quitosana é mostrado à diferentes porcentagens e distribuição de grupos N-acetil. A distribuição de grupos acetil não interferiu no perfil da orientação do solvente, mas esta foi significativamente afetada pelo aumento da porcentagem de grupos acetil ao longo da cadeia polissacarídica.

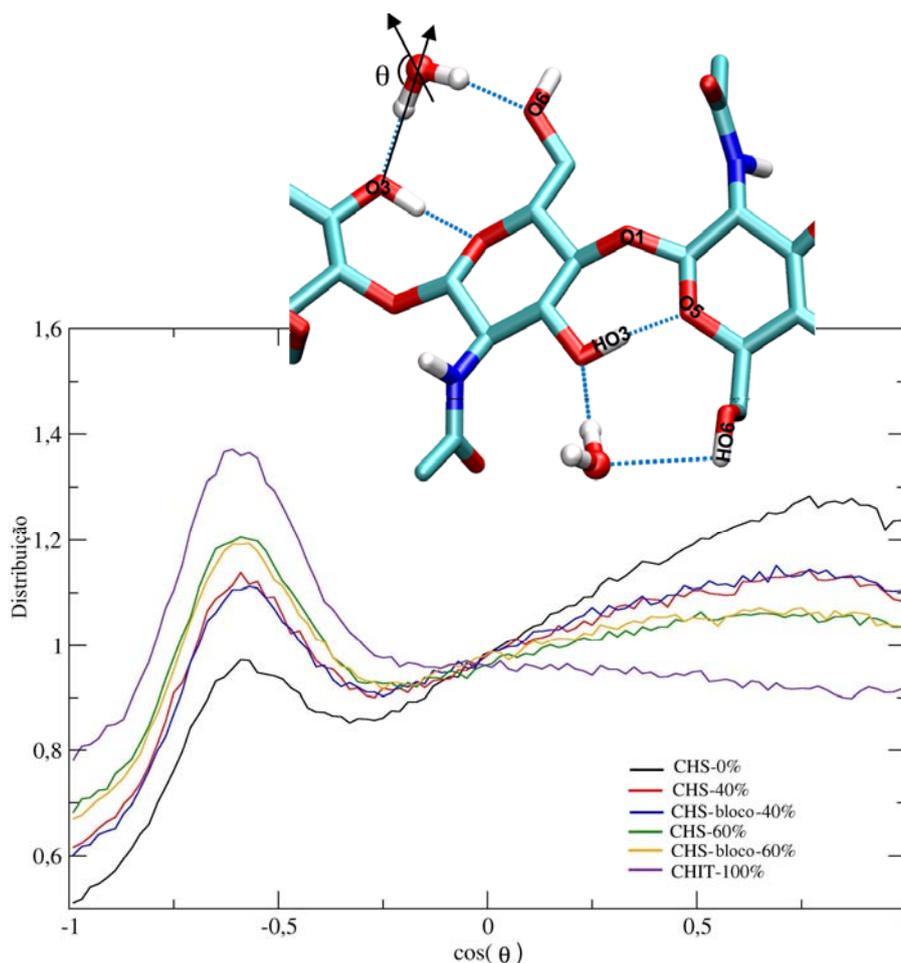


FIGURA 3.5 – Orientação do solvente (água) ao redor do átomo de oxigênio O3 das cadeias de quitina e quitosana. Esta propriedade é mostrada como a média

da orientação ( $\cos \theta$ ) sobre toda a simulação, por um raio de 5-Å ao redor do átomo O3.  $\theta$  é definido pelo ângulo entre o vetor formado por O3 e o átomo de oxigênio da água e o vetor do dipolo da água (como ilustrado pelas setas em preto).

O pico observado ao redor de -0,7 é devido à interação do átomo de hidrogênio da molécula de água com o átomo de oxigênio O3 do anel de açúcar, deixando o HO3 disponível para realizar ligação de hidrogênio com o átomo O5 da próxima unidade de açúcar. A distribuição espacial dos grupos N-acetil e hidroximetil formam uma cavidade, o qual é ocupada por uma molécula de água orientada. Isto é capaz de justificar a influência dos grupos acetil na estabilidade das ligações de hidrogênio intramolecular O3–HO3...O5.

Como observado para polímeros naturais, a quitina e quitosana altamente acetiladas são conhecidas pela tendência das mesmas em se agregarem em solução aquosa neutra. Assim, o perfil de orientação das moléculas de água (Figura 3.5) sugere que não só a conformação em hélice, mas a solubilidade desses biopolímeros pode ser afetada pela entropia criada pelas moléculas de água ao redor da fibra do polissacarídeo.

Para constatar esta sugestão, torna-se necessário verificar todos os fatores que são considerados responsáveis pela solubilidade desses biopolímeros em água. Até o presente momento, têm-se observados inúmeros fatores que contribuem para a insolubilidade da quitina e quitosana, como: ligação de hidrogênio intramolecular, interações hidrofóbicas ou de van der Waals e forças eletrostáticas. Para verificar todas essas possibilidades, seis nanopartículas com características cristalinas (conformação em hélice 2 e empacotadas de forma antiparalela) foram simuladas por 20 ns, em pH 6,5 e com as mesmas características das fibras solvatadas.

A solubilidade dessas nanopartículas foi inicialmente avaliada pela habilidade das mesmas permanecerem agregadas durante a simulação. A estrutura inicial de todas as nanopartículas é composta por um único agregado

contendo 9 cadeias de polissacarídeo. Dessa forma, como critério de seleção, duas cadeias polissacarídicas são consideradas agregadas quando a distância máxima entre as mesmas for menor que 0,35 nm. A Tabela 3.8 resume a característica dos agregados durante a simulação.

TABELA 3.8 – Número e característica dos agregados de quitina e quitosana.

Sistema	Número de agregados	Tamanho do agregado (filamento)	Filamentos por agregado	
			Número	% durante a simulação
NanoCHS <sub>0%</sub>	6,83±2,00	1,65±1,41	1	62,28
NanoCHS <sub>40%</sub>	1,95±0,94	5,97±2,86	9	46,67
NanoCHS <sub>40%B</sub>	1,11±0,31	8,48±1,44	9	88,50
NanoCHT <sub>60%</sub>	1	9	9	100
NanoCHT <sub>60%B</sub>	1	9	9	100
Nano- $\alpha$ -CHT	1	9	9	100

A Tabela 3.8 mostra claramente que o estado de agregação das nanopartículas de quitina e quitosana são significativamente dependentes do grau de acetilação do polissacarídeo. Dentre todas as nanopartículas estudadas, a quitosana totalmente deacetilada mostrou ser completamente solúvel em solução aquosa em pH 6,5. Por outro lado, as nanopartículas com 60% e 100% de acetilação permanecem agregadas similarmente à sua configuração inicial (um agregado com nove filamentos), mostrando ser totalmente insolúvel em solução próxima ao pH neutro. Entretanto, resultados obtidos para a nanopartícula com 40% GA revelaram que a sequência contínua (bloco) de grupos acetil duplicou o tempo de vida da estrutura inicial, resultando em agregados com características próximas à sua estrutura inicial. Este resultados (Tabela 3.8) concordam com a afirmativa de que a solubilidade da quitosana não depende somente do valor

médio do GA, mas também da distribuição de grupos acetil ao longo da cadeia principal desses polissacarídeos (Rinaudo, 2006).

Os resultados mostrados na Tabela 3.8 sugerem que a quitosana com até 40% de grupos acetil são parcialmente solúveis em solução aquosa em pH 6,5. Entretanto, é comum a ocorrência de processos de inchamento em polissacarídeos insolúveis (por exemplo: celulose, amido, quitina e quitosana) (Schott, 1992; Hoover, 1995; Guibal, 2004). A solubilidade e o processo de inchamento na quitosana é influenciado pela cristalinidade, a qual é correlacionada com a porcentagem e distribuição de grupos acetil ao longo da cadeia do biopolímero (Aiba, 1991; Cho *et al.*, 2000). Assim, sabendo-se que a estrutura inicial são nanopartículas com características cristalinas, o cálculo do desvio quadrático médio da distância de cada átomo com relação à sua posição inicial (Figura 3.6) revelou que as fibras de quitosana, em nanopartículas com até 40% de acetilação, se afastam umas das outras e a distância entre elas não é capaz de manter um único agregado. Por outro lado, nanopartículas de quitosana com 60% e 100% de acetilação sofrem somente o processo de inchamento, causado pela absorção de moléculas de água entre as fibras do polissacarídeo.

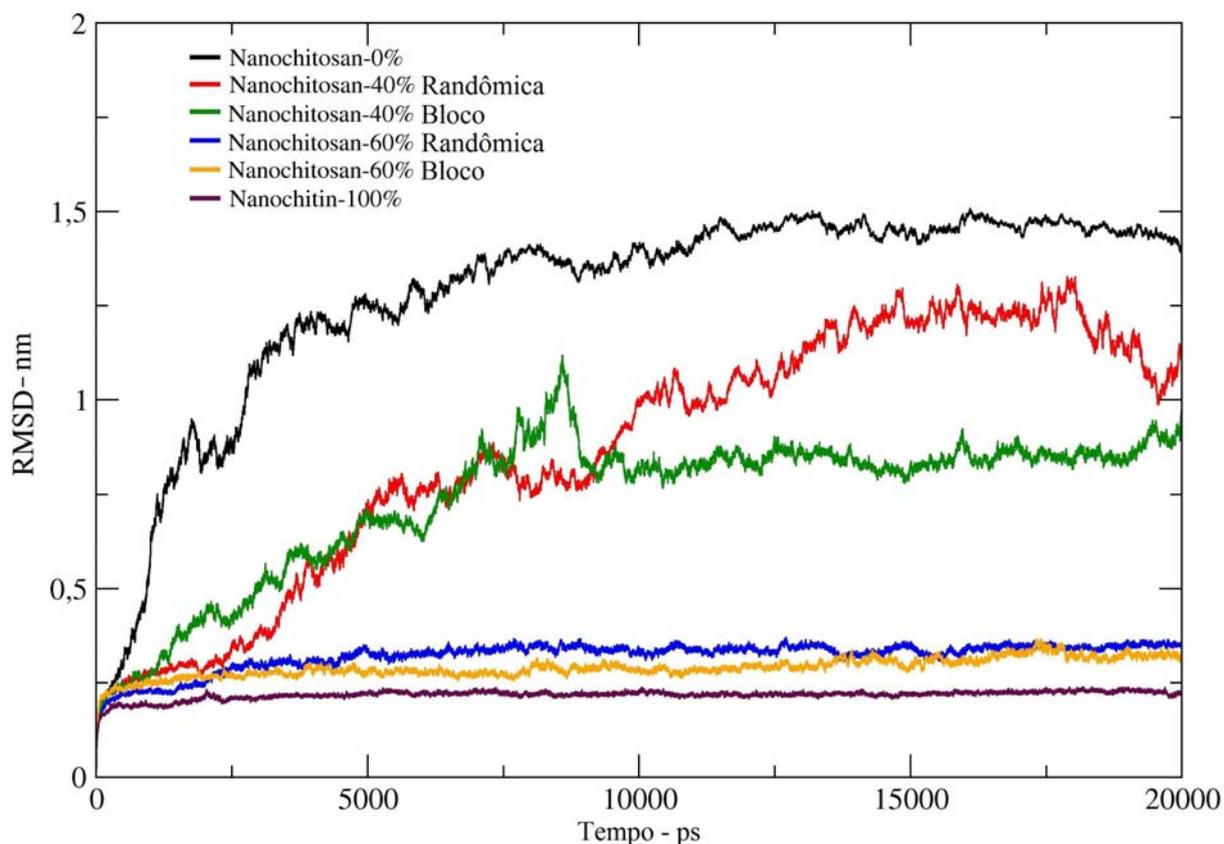


FIGURA 3.6 – Evolução temporal dos desvios quadrático médio (RMSD) de todos os átomos, com relação à sua estrutura inicial.

A Figura 3.6 mostra claramente que a nanopartícula totalmente deacetilada (Nanoquitosana-0%) rapidamente perde sua estrutura inicial, alcançando um RMSD de aproximadamente 1,5 nm, descrevendo uma situação em que todos os filamentos estão afastados uns dos outros, resultando em fibras totalmente solvatadas ou em uma nanopartícula solúvel (Figura 3.7).

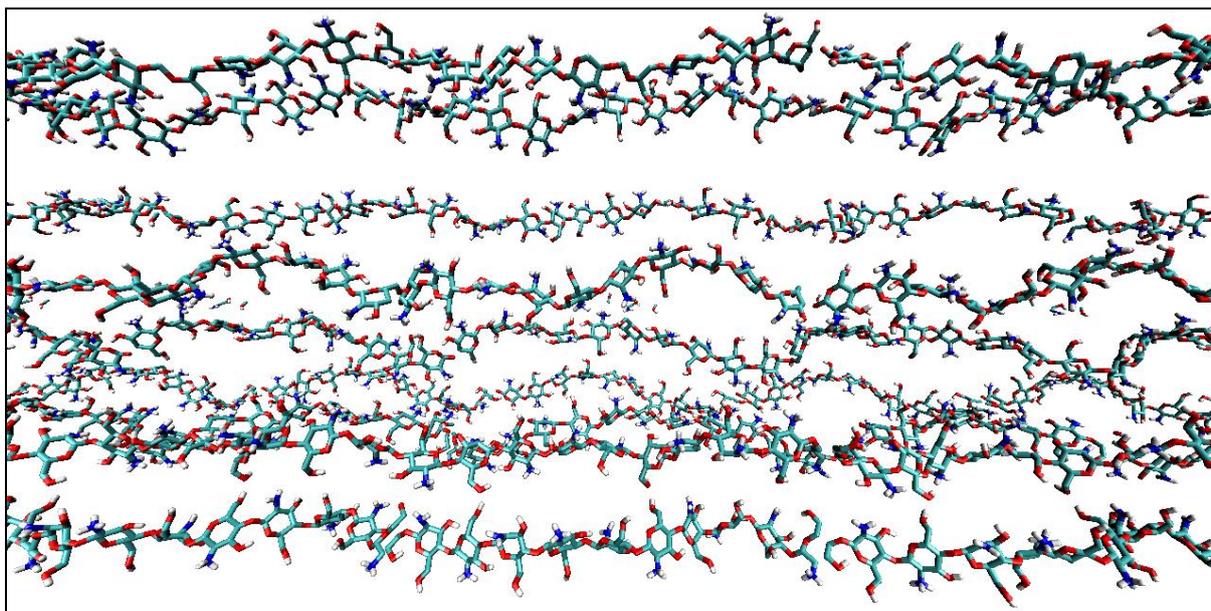


FIGURA 3.7 – Representação molecular da nanopartícula totalmente deacetilada após 20 ns de simulação.

As quitosanas com 40% de acetilação são parcialmente solúveis e perdem gradualmente suas estruturas iniciais, atingindo um RMSD de 0,85 nm e 1,25 nm, para as fibras acetiladas randomicamente e em blocos, respectivamente. Esta diferença de RMSD entre os dois co-polímeros é resultado de forças de interações cooperativa entre os resíduos *N*-acetilglicosamina no polímero em blocos. A Figura 3.8 mostra a representação das nanopartículas com 40% de acetilação.

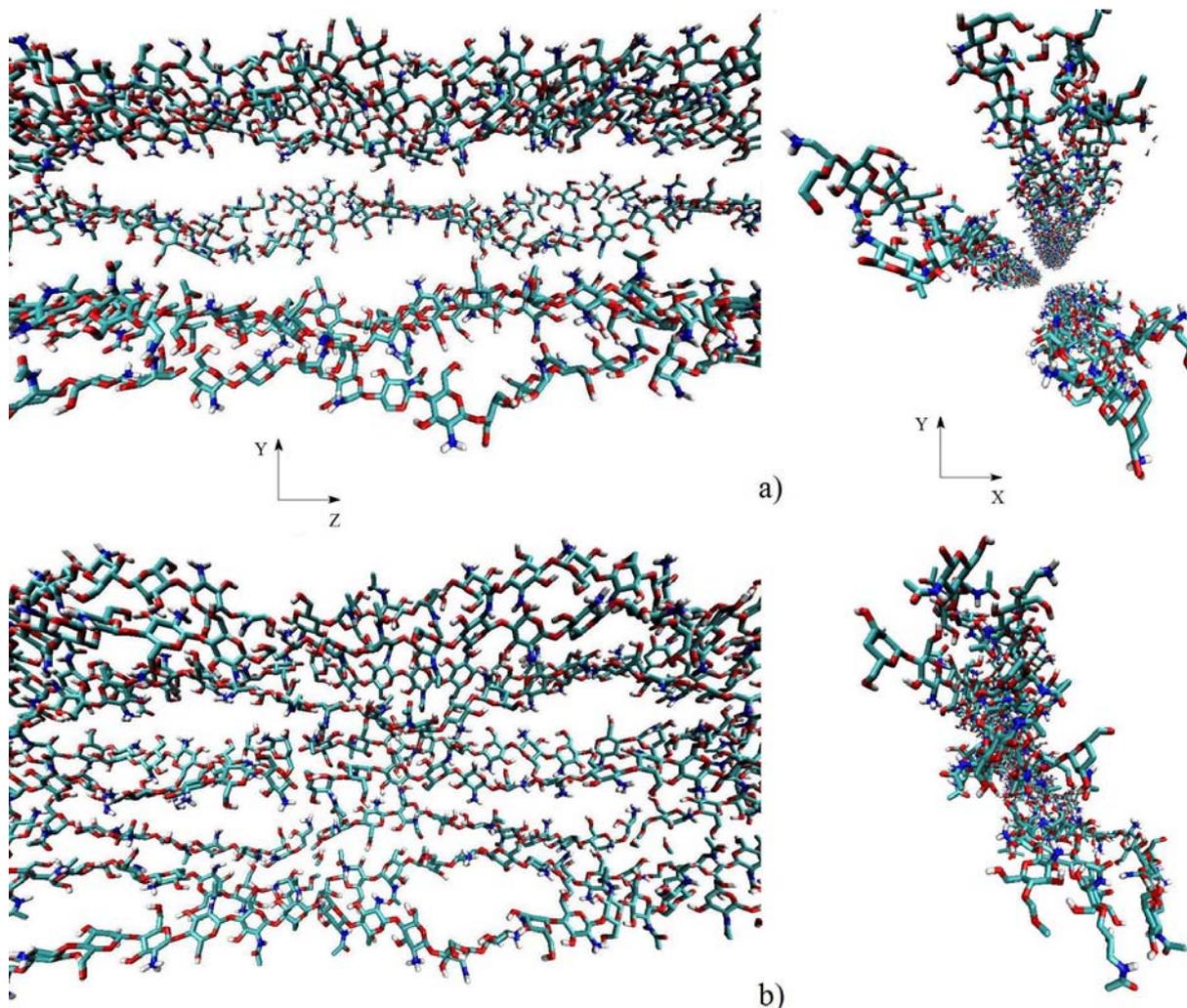


FIGURA 3.8 – Representação molecular após 20ns de simulação de nanopartículas de quitosana com 40% GA e distribuição a) randômica, e b) em blocos, de grupos acetil.

A Figura 3.8 mostra claramente que nanopartícula com 40% de grupos acetil distribuídos randomicamente formou 2 tipos de agregados, sendo um composto por 2 filamentos e os outros dois compostos por 3 filamentos (Figura 3.8a). Por outro lado, apesar de perder totalmente a característica inicial, a nanopartícula com distribuição em blocos de grupos acetil (Figura 3.8b) formou somente um agregado, onde o ponto de contato entre as fibras situa-se na região dos grupos acetil.

Comportamento similar é observado para a quitosana 60% acetilada, a qual mostra um pequeno RMSD de 0,35 e 0,30 nm para os co-polímeros

randômicos e em blocos, respectivamente. Apesar do valor similar do RMSD entre estes dois co-polímeros, a principal diferença entre eles se deve ao fato da quitina acetilada randômicamente sofrer um inchamento uniforme (Figura 3.9a), enquanto que a quitina com distribuição de grupos acetil em blocos apresenta um inchamento localizado, como mostrado na Figura 3.9b. O pequeno valor de RMSD observado para esses co-polímeros confirma que a estabilidade da estrutura inicial é maior com o aumento de grupos acetil. Esta influência dos grupos acetil na estabilidade de agregados se torna ainda mais evidente para a quitina totalmente acetilada, a qual incha somente 0,218 nm, resultando em uma estrutura ainda mais similar à sua configuração inicial.

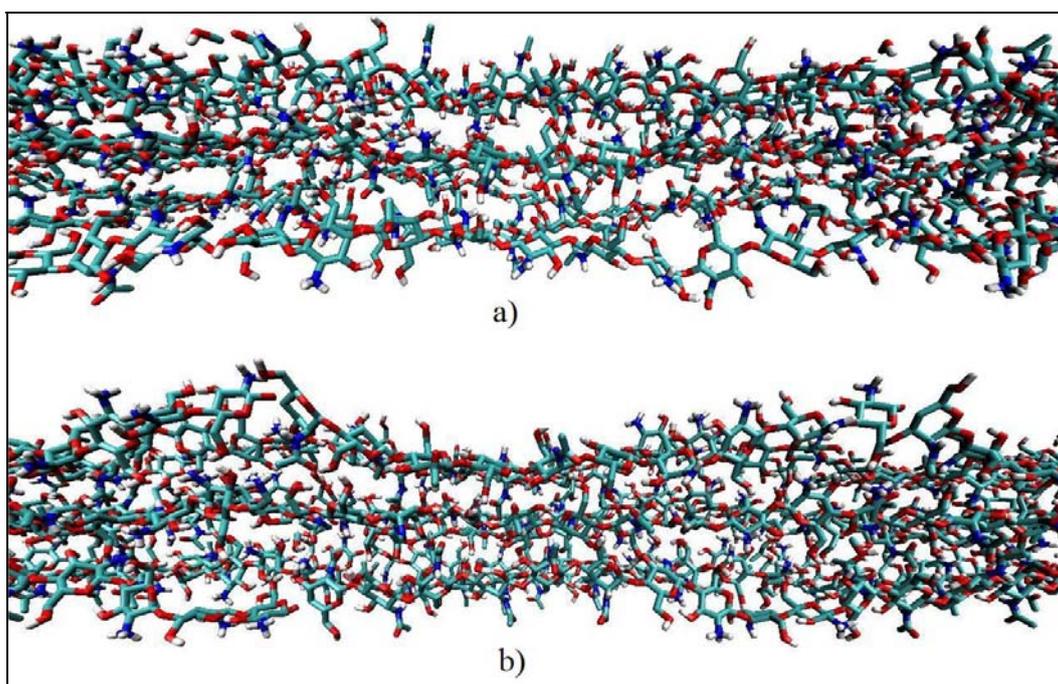


Figure 3.9 – Representação molecular de nanopartículas de quitina após 20ns de simulação com 60% GA e distribuição a) randômica e b) em blocos de grupos acetil.

Dessa forma, a região cristalina criada pela distribuição em blocos de grupos acetil é responsável por manter o agregado mais estável que seu co-polímero com distribuição randômica desses grupos. Muitos autores atribuíram esta estabilidade dos agregados em solução à ligações de hidrogênio e interações

hidrofóbicas entre os resíduos acetilados distribuídos ao longo da cadeia polimérica (Aiba, 1991; Amiji, 1995; Cho *et al.*, 2000; Rinaudo, 2006).

A análise de possíveis ligações de hidrogênio intermolecular entre as fibras do polissacarídeo revelou a existência de três interações persistentes: N–H<sub>(i)</sub>⋯O=C<sub>(j)</sub> entre grupos acetil (NAc), O–H<sub>(i)</sub>⋯O=C<sub>(j)</sub> entre os grupos acetil e hidroximetil (OH<sub>MET</sub>) e O–H<sub>(i)</sub>⋯O<sub>(j)</sub> entre grupos hidroximetil. As descrições dessas interações são mostradas na Tabela 3.9.

TABELA 3.9 – Número total e tempo de vida para as ligações de hidrogênio mais persistentes entre os filamentos das nanopartículas de quitina e quitosana, durante toda a simulação.

Sistema	NAc⋯NAc		NAc⋯OH <sub>MET</sub> / OH <sub>MET</sub> ⋯NAc		OH <sub>MET</sub> ⋯OH <sub>MET</sub>	
	Tempo <sup>a</sup>	Número <sup>b</sup>	Tempo <sup>a</sup>	Número <sup>b</sup>	Tempo <sup>a</sup>	Número <sup>b</sup>
NanoCHS <sub>0%</sub>	-	-	-	-	9,82	1,49±2,05
NanoCHS <sub>40%</sub>	3,77	1,06±1,14	3,88	3,14±1,49	10,94	4,8±2,0
NanoCHS <sub>40%B</sub>	3,78	2,32±1,15	4,34	3,29±1,58	12,24	5,5±1,9
NanoCHT <sub>60%</sub>	3,95	3,57±1,27	3,79	7,17± 2,18	13,64	8,87±2,91
NanoCHT <sub>60%B</sub>	4,11	4,37±1,43	4,67	8,45±2,07	21,52	11,06±2,30
Nano-α-CHT	3,44	4,43±1,69	3,45	11,66±2,98	15,76	12,24±1,84

NAc: grupo N-acetil; OH<sub>MET</sub>: grupo hidroximetil do carboidrato.

Os resultados na Tabela 3.9 mostram claramente que as ligações de hidrogênio envolvendo o grupo hidroximetil representam aproximadamente 80% de todas as ligações de hidrogênio observadas nesses biopolímeros. O tempo de vida dessas interações intermoleculares pode explicar a elevada resistência da quitina totalmente acetilada, ao processo de inchamento como mostrado na Figura 3.6. Entretanto, o número máximo dessas ligações de hidrogênio (14% do total disponível) não é suficiente para explicar a estabilidade dos demais agregados que formam a nanopartícula quitina e

quitosana. Schatz e colaboradores (Schatz *et al.*, 2003) propuseram que a associação desses polímeros ocorre preferencialmente por interações hidrofóbicas do que por ligações de hidrogênio. Isto é confirmado pelo pequeno número e tempo de vida das ligações de hidrogênio entre os grupos acetil (Tabela 3.9).

Entretanto, um trabalho recente (Ortona *et al.*, 2008) mostrou que cadeias alifáticas pequenas, como as observadas na quitosana não são capazes de promover uma interação hidrofóbica eficiente entre as cadeias poliméricas. Portanto, o processo de agregação envolvendo interações hidrofóbicas é cooperativo, o qual envolve a soma de sítios hidrofóbicos. Isto justifica o fato dos agregados de quitina e quitosana com distribuição de grupos acetil em blocos serem mais estáveis e mais resistentes ao processo de inchamento do que seus co-polímeros acetilados randomicamente.

Entretanto, estas interações hidrofóbicas não são capazes de explicar a formação de clusters compostos por 3 filamentos de polissacarídeos, como observado para a quitina com 40% de acetilação (Tabela 3.8 e Figura 3.8), e a relativa estabilidade do agregado de quitina com 60% de grupos acetil distribuídos randomicamente, a qual apresentou um grau inchamento similar ao seu co-polímero. Isto sugere que a presença do grupo acetil possui um papel diferente no processo de agregação, confirmando a conclusão de Philippova e colaboradores (Philippova *et al.*, 2001), os quais afirmaram que nem as ligações de hidrogênio e nem as interações hidrofóbicas são responsáveis pela agregação da quitina, permanecendo ainda não resolvido a natureza desses agregados.

Dessa forma, um recente estudo experimental sugeriu que devido ao comportamento polieletrólítico da quitosana, a solubilidade desses polímeros em solução aquosa é primariamente atribuído à forças eletrostáticas entre o polímero e o meio (Lavertu *et al.*, 2008). Para solucionar este problema, a contribuição eletrostática e apolar para a energia livre de solvatação foi calculado para as quitinas e quitosanas solvatadas, resolvendo numericamente a

equação de Poisson-Boltzmann por meio do procedimento de diferença finita, utilizando o programa APBS (Holst *et al.*, 2001). As estruturas escolhidas para a realização dos cálculos de potencial eletrostático foram aquelas, cuja conformação se repetia com maior frequência durante a simulação. As contribuições para a energia livre de solvatação foram calculadas, para os filamentos à diferentes percentagens e distribuição de grupos acetil, e seus valores são representados na Tabela 3.10 como contribuição média por resíduo.

TABELA 3.10 – Contribuição eletrostática e apolar por resíduo para a energia livre de solvatação (kcal/mol) para as cadeias solvatadas de quitina e quitosana.

Sistema	$\Delta G_{\text{ELETRÓSTÁTICA}}$	$\Delta G_{\text{APOLAR}}$	$\Delta G$
CHS <sub>0%</sub>	-27,4	5,2	-22,2
CHS <sub>40%</sub>	-23,4	5,5	-17,9
CHS <sub>40%B</sub>	-23,2	5,6	-17,6
CHT <sub>60%</sub>	-23,0	5,9	-17,1
CHT <sub>60%B</sub>	-20,6	5,8	-14,8
CHT	-15,0	6,1	-8,9

Apesar da impossibilidade de comparar os valores obtidos com valores experimentais de energia livre de solvatação, os resultados mostrados na Tabela 3.10 concordam com as observações experimentais (Aiba, 1991; Cho *et al.*, 2000; Sorlier *et al.*, 2001; Pedroni *et al.*, 2003), mostrando o que era esperado: a quitosana totalmente deacetilada é a forma mais solúvel em pH 6,5; enquanto que a quitina altamente acetilada é a estrutura menos solúvel.

Dessa forma, a distribuição randômica de grupos acetil e amino em quitinas e quitosanas, mostrou ser responsável pelo leve aumento da solubilidade desse biopolímeros em solução aquosa, se comparado com os seus respectivos co-polímeros, os quais são compostos por resíduos distribuídos em blocos localizados. Isto confirma que a distribuição ou a localização dos grupos

acetil é imperativo na solubilidade da quitina e quitosana, ou na capacidade dos mesmos em suportar um processo de inchamento.

Estes resultados também sugerem que a instabilidade dos agregados de quitosanas totalmente deacetiladas, se deve à repulsão eletrostática entre grupos amino protonados, concordando com a lei geral do comportamento de quitosanas em solução aquosa proposta pelo grupo de pesquisa de Domand (Sorlier *et al.*, 2001; Sorlier *et al.*, 2002; Schatz *et al.*, 2003). Esta lei defende a hipótese de que as quitosanas possuem três domínios definidos pelo grau de acetilação, e os mesmos são correlacionados com o comportamento desses biopolímeros: (i) Para GA menor que 20%, o comportamento é de um polieletrólito; (ii) com GA entre 20 e 50%, ocorre a formação de um domínio intermediário, onde as interações hidrofílicas e hidrofóbicas são contrabalançadas; (iii) para GA acima de 50%, ocorre associação das cadeias do polímero, resultando na formação de agregados estáveis.

Entretanto, apesar da boa correlação entre os dados teóricos e os dados experimentais, ainda não está claro qual é a força motriz da agregação dos biopolímeros quitina e quitosana em solução aquosa. Assim, baseado na idéia de que a solubilidade da quitina e quitosana estão relacionadas à interação entre as cadeias do polissacarídeo com moléculas de água (Tabela 3.10), retoma-se o que foi sugerido anteriormente: a orientação do solvente e a microsolvatação entrópica causada por esta ordem pode ser responsável pela sua agregação em solução aquosa.

Para reforçar esta hipótese, a orientação de todas as moléculas de água dentro do raio de 5 Å de todos os átomos de oxigênio O3 das nanopartículas, foram calculadas como descrito anteriormente para os filamentos solvatados. O perfil da distribuição das moléculas de água orientadas não mostrou diferença significativa com relação ao perfil observado para as cadeias solvatadas (Figura 3.10). Portanto, baseado nos resultados mostrados nas Tabelas 3.8, 3.10 e Figuras 3.6, 3.7, 3.8 e 3.9, é possível sugerir que a orientação da molécula de

água ao redor dos filamentos quitina e quitosana é diretamente relacionado à estabilidade dos agregados desses biopolímeros. Esta suposição pode ser confirmada por Okuyama e colaboradores (Okuyama *et al.*, 1997), os quais observaram que o empacotamento cristalino da estrutura cristalina hidratada da quitosana não é mantido por interações diretas entre as fibras, mas sim por inúmeras ligações de hidrogênio envolvendo moléculas de água. Isto sugere que os agregados de quitina e quitosana não são somente estabilizados por interações entre as fibras, mas também por moléculas de água entre as cadeias polissacarídicas. Portanto, a estabilidade dessas interações intermoleculares envolvendo as moléculas de água pode ser altamente dependente da mobilidade e da orientação das moléculas de água entre as cadeias do polímero.

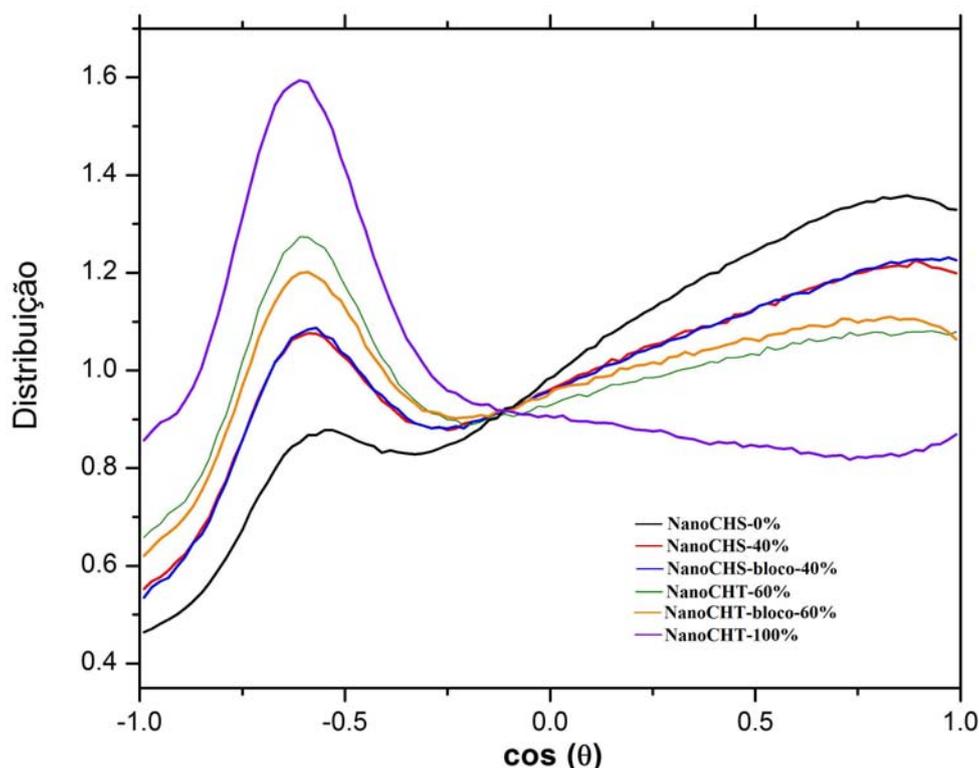


FIGURA 3.10 – Orientação do solvente (água) ao redor do átomo de oxigênio O3 das nanopartículas de quitina e quitosana.

Como discutido anteriormente, o pico ao redor de -0,7 na média da distribuição de moléculas de água (Figura 3.10) implica que o átomo de hidrogênio das moléculas de água estão interagindo com o átomo O3 (Tabela

3.7), estabilizando a ligação de hidrogênio  $\text{HO3}_{(n)} \cdots \text{O5}_{(n+1)}$  e aumentando a rigidez da cadeia polissacarídica que adota a conformação de hélice 2. Esta rigidez aliada à orientação das moléculas de água é responsável por diminuir a mobilidade das mesmas entre as cadeias poliméricas, favorecendo a estabilidade das ligações de hidrogênio entre as moléculas de água no interior da matriz de quitosana e as cadeias do polissacarídeo, formando uma estrutura similar a um cristal hidratado (Okuyama *et al.*, 1997). Isto favorece, a agregação das fibras de quitina e quitosana pela formação de uma rede de ligações de hidrogênio, como observado na Figura 3.11.

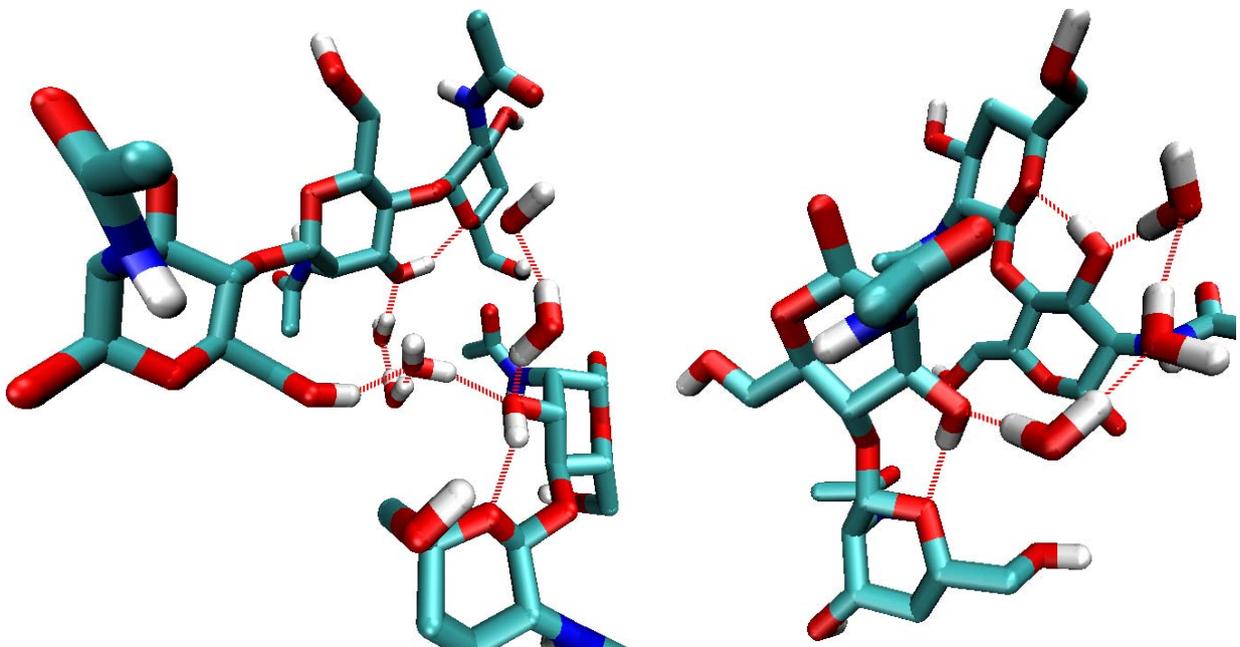


FIGURA 3.11 – Estrutura representativa da matriz de quitina nos últimos 5ns de simulação, descrevendo a rede de ligações de hidrogênio formado entre moléculas de água orientadas e as cadeias do polissacarídeo.

Por outro lado, a quitosana totalmente deacetilada possui uma elevada percentagem de moléculas de água com o vetor momento dipolar apontado para o átomo O3 (distribuição de  $\cos \theta$  ao redor de 1, na Figura 3.10), como consequência da atração eletrostática criada pelos grupos amino protonados ( $\text{NH}_3^+$ ). Esta interação eletrostática é responsável por desestabilizar a ligação de

hidrogênio intramolecular  $\text{HO3}_{(n)}\cdots\text{O5}_{(n+1)}$ , e formar ligação de hidrogênio  $\text{HO3}\cdots\text{Ow}$ , induzindo maior flexibilidade nas cadeias polissacarídicas, como observado para a caracterização das hélices das fibras solvatadas. Além disso, o pequeno tempo de vida observado para as ligações de hidrogênio  $\text{O3-HO3}\cdots\text{Ow}$  e  $\text{H}_{\text{AGUA}}\cdots\text{O3}$  (Tabela 3.7), mostram uma grande mobilidade da água ao redor dos filamentos de quitosanas. Portanto, a elevada flexibilidade da cadeia polissacarídica associado à elevada mobilidade de moléculas de água ao redor do átomo O3, pode ocasionar a dispersão das cadeias poliméricas, desestabilizando os agregados de quitosana, e conseqüente o aumento da solubilidade da nanopartícula (Figura 3.7). Estes resultados sugerem que a solubilidade desses biopolímeros é inversamente proporcional à habilidade dos mesmos em formar a ligação de hidrogênio intramolecular  $\text{HO3}_{(n)}\cdots\text{O5}_{(n+1)}$ .

Estes resultados aqui apresentados concordam com a hipótese de que a solubilidade da quitosana é controlada principalmente por interações eletrostáticas. Entretanto, a solubilidade de quitinas deacetiladas não é totalmente governadas pela repulsão eletrostática entre os grupos amino protonados, como defendido por muito autores (Sorlier *et al.*, 2001; Sorlier *et al.*, 2002; Schatz *et al.*, 2003), mas sim pela orientação das moléculas de água ao redor das cadeias de polissacarídeos, a qual é afetada por essas interações eletrostáticas. Dessa forma, considerando que a maior parte das aplicações da quitina e da quitosana ocorrem em solução aquosa, a orientação das moléculas de água mostrou ser o fator responsável pela agregação desses biopolímeros em solução aquosa. Apesar da orientação do solvente ser somente sensível à variação da percentagem de grupos acetil, as ligações de hidrogênio e as interações hidrofóbicas são efeitos aditivos, quando se compara quitinas e quitosanas com grupos acetil distribuídos randomicamente e em blocos.

### 3.4 – Conclusão

A simulação por Dinâmica Molecular de filamentos de quitina e quitosana totalmente solvatados em solução aquosa mostrou que a flexibilidade das cadeias polissacarídicas é inversamente proporcional ao grau de acetilação. As cadeias mais flexíveis mostram uma conformação helicoidal que varia entre uma hélice 2 relaxada e uma hélice 5. Por outro lado, cadeias polissacarídicas altamente acetiladas e com distribuição de grupos acetil em blocos, possuem a tendência em estabilizar a conformação em hélice 2. Este último motivo helicoidal (hélice 2) é estabilizado por ligações de hidrogênio intramolecular entre o átomo HO3 de uma unidade de açúcar com o átomo O5 da próxima unidade, o qual é responsável por reduzir a variabilidade conformacional do polissacarídeo. A estabilidade desta ligação de hidrogênio  $\text{HO3}_{(n)} \cdots \text{O5}_{(n+1)}$  é altamente afetada pela orientação e tempo de residência de moléculas de água ao redor dos grupos hidroxila O3–HO3. Simulações por Dinâmica Molecular de nanopartículas de quitina e quitosana mostraram que a solubilidade desses biopolímeros decresce com o aumento do grau de acetilação. Este mesmo comportamento foi observado experimentalmente, mostrando que este modelo por Dinâmica Molecular é capaz de reproduzir adequadamente as observações experimentais. O pequeno número de ligações de hidrogênio e a pequena probabilidade de ocorrer interações hidrofóbicas envolvendo os grupos acetil, sugerem que a estabilidade dessas nanopartículas depende da orientação e da mobilidade das moléculas de água ao redor do átomo O3. Esta mobilidade e orientação são responsáveis por criar uma rede de ligações de hidrogênio entre filamentos de açúcar e moléculas de água. Esta situação é altamente afetada pela distribuição espacial dos grupos N-acetil e hidroximetil. Apesar da baixa incidência de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, a simulação realizada neste trabalho sugere que estas interações são fortalecidas quando existe uma sequência contínua de resíduos N-acetilglicosaminas. As energias

livre de solvatação calculadas indicaram que a solubilidade dessas nanopartículas é controlada por interações eletrostáticas entre a cadeia de polissacarídeo e as moléculas de água. A presença de grupos amino carregados ( $\text{NH}_3^+$ ) são responsáveis pela mudança na orientação das moléculas de água, aumentando a mobilidade das mesmas ao redor do átomo O3, e resultando na desestabilização das ligações de hidrogênio intramolecular  $\text{HO3}_{(n)} \cdots \text{O5}_{(n+1)}$  (responsável pela rigidez da cadeia polissacarídica) e da rede de ligações de hidrogênio envolvendo as moléculas de água entre as cadeias de açúcar. A correlação entre conformação da cadeia polissacarídica e a solubilidade da mesma em água remete a hipótese de que a solubilidade desses polímeros é inversamente relacionado à habilidade dos mesmos em formar a ligação de hidrogênio  $\text{HO3}_{(n)} \cdots \text{O5}_{(n+1)}$ .

## Capítulo 4

### Avaliação do efeito da força iônica e pH em filamentos de quitina e quitosana

Este capítulo abordará a caracterização molecular de filamentos ou fibras de quitinas e quitosanas completamente solvatadas em solução aquosa. Neste contexto, serão determinadas quais são as conformações que esses filamentos adquirem em solução a diferentes pH e força iônica.

#### 4.1 – Introdução

A estrutura tridimensional de um biopolímero é altamente dependente de interações intra e intermoleculares. Por exemplo, sabe-se que as ligações de hidrogênio intramoleculares de uma proteína exercem um papel fundamental na estabilização da estrutura secundária de peptídeos e proteínas. Da mesma forma, foi proposto que a estrutura da cadeia de quitina e quitosana são também estabilizadas por duas ligações de hidrogênio, uma intramolecular e outra intermolecular (Carlstrom, 1957). A ligação de hidrogênio intramolecular é formada entre os átomos HO3 e O5 de unidades consecutivas de glicosamina ligadas (Figura 4.1). Esta ligação de hidrogênio intramolecular ( $\text{HO3}_{(n)} \cdots \text{O5}_{(n+1)}$ ) é responsável pelo comprimento e por manter a cadeia de quitina na conformação em hélice 2 (Blackwel, 1969; Ramarkrishnan e Prasad, 1971). No estado sólido, existem duas possibilidades para as ligações de hidrogênio intermoleculares, uma é entre dois grupos N-acetil ( $\text{N-H}_{(i)} \cdots \text{O}=\text{C}_{(j)}$ ) e a outra é entre um grupo N-acetil e um grupo hidroximetil. Na  $\alpha$ -quitina, cada ligação corresponde a 50% das interações intermoleculares (Rinaudo, 2006). Este último padrão estrutural não foi observado na estrutura cristalina da  $\beta$ -quitina e isto justifica a grande suscetibilidade do cristal de  $\beta$ -quitina em inchar (Rinaudo,

2006). A rede de ligação de hidrogênio é responsável por interligar as cadeias de quitina e arranjá-las em camadas (Gardner e Blackwell, 1975; Jang *et al.*, 2004).

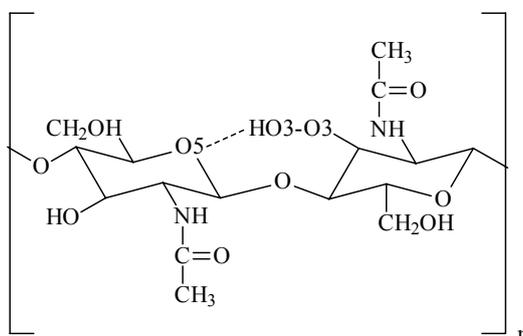


FIGURA 4.1 – Definição dos átomos em um filamento de quitina.

Outros estudos utilizando a cristalografia de Raios-X (Minke e Blackwell, 1978), RMN estado sólido  $^{13}\text{C}$  (Kameda *et al.*, 2005) e simulação por Dinâmica Molecular (Yui *et al.*, 2007) mostraram inúmeras informações a respeito das ligações de hidrogênio e da conformação dos grupos hidroximetil e N-acetil no estado sólido. Entretanto, ainda não existem estudos que descrevem as propriedades dessas ligações de hidrogênio e a possível orientação desses grupos solvatados. O único estudo molecular envolvendo a presença de moléculas de água foi no estudo por difração de Raios-X da estrutura cristalina da forma monohidratada da quitina  $[\text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_5\text{N}(\text{H}_2\text{O})]_m$  (Dweltz, 1961). Este estudo mostrou que as moléculas fazem parte da rede de ligações de hidrogênio estabilizando o sistema. Os grupos hidroxila foram considerados como os participantes das ligações de hidrogênio envolvendo as moléculas de água, a qual possui uma distância típica de 2,8 Å. Como a quitina, a estrutura da quitosana também mostra ligações de hidrogênio entre os átomos de oxigênio  $\text{O3}_{(n)}$  e  $\text{O5}_{(n+1)}$  através da ligação glicosídica, e ligação de hidrogênio intermolecular envolvendo o átomo de oxigênio ( $\text{O6}$ ) do grupo hidroximetil de uma cadeia e o nitrogênio ( $\text{N2}$ ) do grupo amina da unidade D-glicosamina de outra cadeia. O padrão de empacotamento do polímero é altamente dependente do nível de acetilação. Além disso, moléculas de água exercem um papel

importante no empacotamento, conformação, e propriedades mecânicas de materiais compostos de quitina e quitosana (Mazeau e Rinaudo, 2004; Li *et al.*, 2006). Nas formas hidratadas da quitosana, o empacotamento pode ser estabilizado por várias ligações de hidrogênio mediado por moléculas de água sem haver contato direto entre as fibras (Ogawa *et al.*, 2004). Entretanto, a conformação em solução e a influência do solvente nesses polímeros ainda permanecem incertos e sobre debate (Pedroni *et al.*, 2003a; Pedroni *et al.*, 2003b; Li *et al.*, 2006).

Portanto, para um melhor entendimento dessas interações a nível molecular, foi realizado simulações de Dinâmica Molecular de cadeias de quitina e quitosana sobre diferentes condições, objetivando o efeito da solvatação no padrão de ligações de hidrogênio, estrutura, e solubilidade desses polímeros. Neste contexto, a influência da força iônica na conformação da quitina e a influência do pH na conformação da quitosana também será discutido.

## **4.2 Metodologia**

### **4.2.1 – Sistemas simulados**

Todos os filamentos de quitina e quitosana que foram modelados de acordo com os modelos descritos no item 3.2.1. Todos os sistemas simulados estão descritos na Tabela 4.1.

TABELA 4.1. Descrição dos sistemas simulados.

Sistema <sup>a</sup>	Nº átomos do soluto	Nº íons	Nº de águas	Grau de acetilação (%)	Força iônica (mol. Kg <sup>-1</sup> )	pH <sup>b</sup>
CHT	170	0	1365	100	0,0	n/a
CHT <sub>0,4</sub>	170	10	1355	100	0,4	n/a
CHT <sub>1,1</sub>	170	30	1335	100	1,1	n/a
CHS <sub>ÁCIDO</sub>	160	10	1473	0	0,4	Ácido
CHS <sub>NEUTRO</sub>	155	10	1394	0	0,4	Nêutron
CHS <sub>BÁSICO</sub>	150	10	1477	0	0,4	Básico
β-quitina <sup>c</sup>	1530	0	6310	100	0,0	n/a

<sup>a</sup>CHT: quitina; CHS: quitosana; <sup>b</sup> os valores do pH corresponde a: ácido < 4; neutro = 6.5; básico > 10; <sup>c</sup> corresponde a 9 fibras arranjadas em uma matriz 3x3.

As cadeias dos polímeros modelados foram inseridas em uma caixa de simulação retangular com dimensões  $x = 3,0$ ,  $y = 3,0$  e  $z = 5,0$  nm. Todos os sistemas foram simulados considerando uma cadeia infinita na direção de  $z$ , portanto, as interações ligadas foram definidas através das caixas de simulação. As nanopartículas foram formadas por 9 filamentos de quitina arranjadas em uma matriz 3 X 3 com a configuração da β-quitina.

Todos os sistemas foram solvatados completando a caixa de simulação com moléculas de água utilizando o modelo SPC (Berendsen *et al.*, 1987).

#### 4.2.2 – Simulações por Dinâmica Molecular

Inicialmente, todos os sistemas modelados tiveram sua energia minimizada realizando 10000 passos utilizando o algoritmo steepest descent. Depois da minimização, o solvente foi equilibrado realizando-se uma simulação por dinâmica molecular por 10 ps à 50, 150, e 300K; durante este processo, a posição dos átomos mais pesados (exceto hidrogênio) foram fixados aplicando-se uma constante de força de  $1,0 \cdot 10^3$  kJ. Mol<sup>-1</sup>.nm<sup>-2</sup>. Após 30 ps de equilibração do solvente, um total de 30 ns e 20ns de simulação por Dinâmica Molecular foram realizados para os filamentos e nanopartícula, respectivamente. Toda

simulação foi realizada em um ensemble isotermico-isobárico (NPT) utilizando o algoritmo leap-frog (Hockney, 1970) com passo de integração de 1 fs. As coordenadas de todos os átomos do sistema foram escritas a cada 1ps para a realização das análises.

Durante a simulação por Dinâmica Molecular, a cada passo de integração, os movimentos translacionais e rotacionais foram removidos do centro de massa dos sistemas. A temperatura foi mantida por 300K acoplando o sistema ao termostato de Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984) com um tempo de relaxação de 0.1 ps. A pressão foi mantida à 1 bar pelo acoplamento do barostato de Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984) com um tratamento semi-isotrópico e tempo de relaxação de 10 ps e compressibilidade de  $4,5 \cdot 10^{-5} \text{ Bar}^{-1}$ . O comprimento de ligação, bem como o movimento de estiramento linear e angular envolvendo o átomo de hidrogênio foram fixados utilizando o algoritmo LINCS (Hess *et al.*, 1997).

Na descrição das interações eletrostáticas e de van der Waals de curto alcance, foi utilizado um raio de corte de 1,4 nm, e as contribuições eletrostáticas de longo alcance foram tratadas por meio da aproximação do campo de reação (Tironi *et al.*, 1995), com  $\epsilon = 66$ .

Todas as simulações foram realizadas utilizando uma extensão do campo de força para carboidratos do GROMOS (Lins e Hunenberger, 2005), descrito no item 3.2.2. Em todas as simulações foi utilizado o programa GROMACS 3.3.2 (Van Der Spoel *et al.*, 2005).

### **4.3 Resultados e discussão**

A força iônica é bem conhecida por exercer um importante papel na habilidade da quitina e quitosana em formar agregados e diferentes tipos de géis e nanopartículas em solução. Por exemplo, o decréscimo do comprimento de um filamento de quitosana em géis está correlacionado ao aumento da força iônica do meio (Vachoud *et al.*, 2000). Entretanto, este efeito com relação às cadeias

de polissacarídeos permanece ainda questionável. Devido a natureza da simulação feita, foi possível isolar a influência da força iônica sobre uma única cadeia de quitina em solução aquosa. Baseando-se no fato de que os valores de  $\phi = -60^\circ$  e  $\psi = +110^\circ$  foram adotados como os valores iniciais, a análise da evolução temporal dos ângulos diedros  $\phi$  e  $\psi$  da quitina, mostrou a influência da força iônica na convergência estrutural dessas cadeias, com relação à sua estrutura inicial (Figura 4.2 a,b).

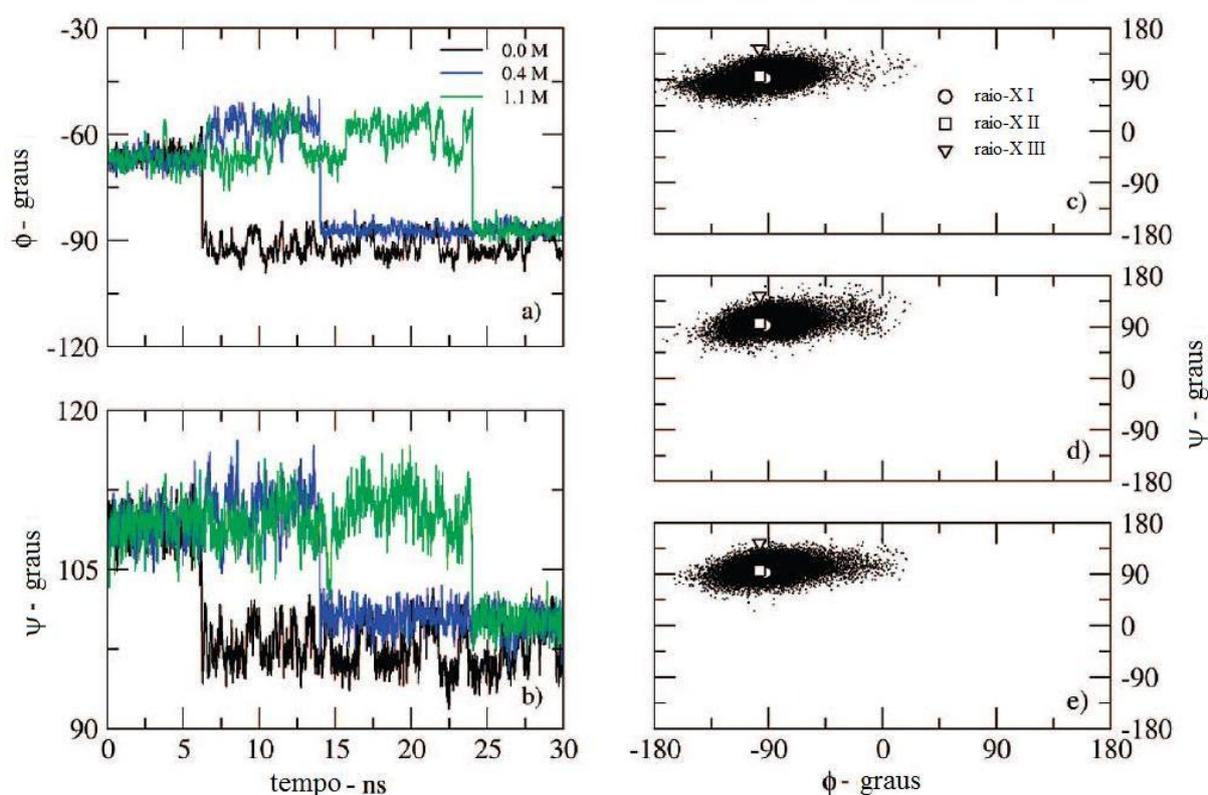


FIGURA 4.2 – Ângulos de torção  $\phi$  e  $\psi$  para a quitina em diferentes forças iônicas: a) e b) em função do tempo de simulação e c-e) mapa de distribuição de  $\phi$  e  $\psi$  para os últimos 5ns dos sistemas a c) 0,0M, d) 0,4M, e e) 1,1 M de força iônica. Três valores de  $\phi$  e  $\psi$  experimentalmente determinados de cristais de  $\alpha$ -[raio-X II (Minke e Blackwell, 1978)] e  $\beta$ -quitina [raio-X I(Yui *et al.*, 2007); raio-X III(Gardner e Blackwell, 1975)], os quais são plotados para referência em c-e). Os valores de a) e b) são mostrados em um intervalo de 20 ps.

De acordo com a Figura 4.2, torna-se bem claro que o aumento da força iônica retarda o equilíbrio estrutural da quitina. Na ausência de sal, a estrutura de equilíbrio da quitina (hélice 2) é atingida após aproximadamente 5 ns de simulação. O sistema com 1,1M de NaCl atinge a mesma configuração somente após 25 ns de simulação. Entretanto, apesar dessa diferença nos tempos de convergência estrutural, todas as simulações dos filamentos solvatados mostraram valores de ângulos diedros  $\phi$  e  $\psi$  similares à da quitina cristalina. Isto é ilustrado nos mapas de  $\phi/\psi$ , amostrados nos últimos 5ns de simulação (Figura 4.2c-e). Para questão de comparação, valores obtidos experimentalmente por difração de raios-X para duas  $\beta$ -quitina e uma  $\alpha$ -quitina foram plotados (Figura 4.2c-e). Estes resultados mostram que as cadeias de quitina totalmente solvatadas possuem a tendência de assumir uma configuração típica da quitina cristalina, indicando que a força iônica até 1,1 M de NaCl não altera o equilíbrio conformacional da quitina em água à temperatura ambiente.

Com o intuito de caracterizar detalhadamente a estrutura das cadeias de quitina em solução aquosa, foi calculado a helicidade de cada filamento em função do tempo de simulação. A descrição de como cada motivo estrutural em hélice é calculado já foi descrito no item 3.3 desta Tese. A evolução temporal das configurações helicoidais são mostradas nos gráficos da Figura 4.3 para as cadeias com força iônica de 0,0; 0,4; e 1,1 M. A conformação classificada como randômica, não foi mostrada no presente gráfico.

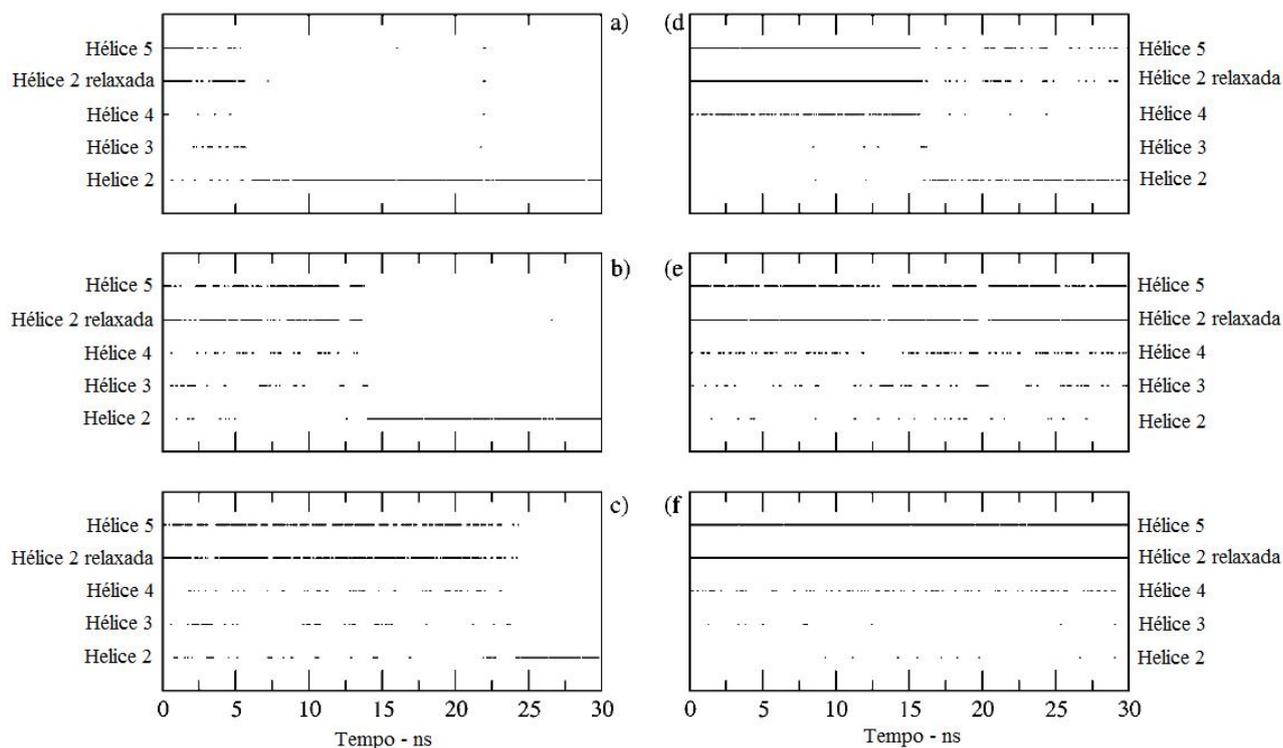


FIGURA 4.3 – Padrão estrutural para cadeias de a-c) quitina e d-f) quitosana em solução aquosa em função do tempo: a) quitina 0,0 M; b) quitina 0,4 M; c) quitina 1,1 M; d) quitosana em pH elevado; e) quitosana em pH neutro; e f) quitosana em baixo pH.

Estes resultados mostram que a dinâmica estrutural das cadeias de quitina é reduzida com o aumento da força iônica, a qual estabiliza a configuração inicial (Figura 4.3). Como esperado, todas as cadeias (quitina) convergem para a hélice 2, e nenhum outro motivo estrutural é observado na distribuição helicoidal nos últimos 5ns de simulação. As diferentes cadeias de quitina visitaram todas as possíveis configurações antes de atingir o equilíbrio conformacional, mostrando que o sistema molecular aqui descrito possui grande preferência pelo motivo estrutural hélice 2. Isto indica que a dinâmica e a conformação da quitina pode ser temporariamente alterada pela interação com as espécies iônicas. Estes resultados são suportados por um recente trabalho experimental, onde uma solução de NaOH/uréia (na proporção em massa de 8/4, respectivamente), mostrou ser capaz de solubilizar a quitina à temperatura ao redor de  $-10^{\circ}\text{C}$  (Hu *et al.*, 2007). No mecanismo proposto, os íons  $\text{Na}^{+}$  são

responsáveis por facilitar a entrada de moléculas de água na estrutura cristalina da quitina e destruí-la pela quebra das ligações de hidrogênio. A presença da uréia foi verificada ser necessária para estabilizar a solução, uma vez que somente pela presença do sal, ocorreria o processo de gelatinização. Na presente simulação, a configuração com maior concentração de sal é equivalente à solução com uma concentração de NaCl de aproximadamente 4% em massa.

As ligações de hidrogênio entre cadeias são conhecidas por serem responsáveis por estabilizar o empacotamento cristalino (Blackwel, 1969; Mazeau *et al.*, 1994; Jang *et al.*, 2004). A *N*-acetilglicosamina também é conhecida por ser levemente solúvel em etanol. Entretanto, os nossos resultados mostram que a cadeia de quitina em solução aquosa apresenta pouca variabilidade estrutural e similar grau de rigidez à estrutura cristalina (baseado na distribuição de  $\phi/\psi$  e conformação helicoidal). Isto não pode ser explicado simplesmente pela elevada barreira rotacional ao redor da ligação glicosídica, uma vez que a quitosana não se comportou de forma similar. A Figura 4.3d-f mostra que a quitosana apresenta maior diversidade conformacional que a quitina, o que se torna mais evidente em solução ácida. Em pH básico, a hélice 2 é evidentemente a configuração dominante, seguida pela conformação hélice 5 e hélice 2 relaxada. A hélice 2 é raramente visitada em pH neutro, e as hélices menos simétricas (2 e 5) são as duas conformações preferenciais em pH ácido. Análises dos padrões das ligações de hidrogênio na quitina revelaram a existência de somente uma ligação de hidrogênio persistente, chamada  $\text{HO3}_{(n)} \cdots \text{O5}_{(n+1)}$ , a qual é a força motriz responsável pela estabilização do motivo estrutural hélice 2 (Figura 4.4). Esta interação restringe os valores que  $\psi$  pode assumir, fixando a cadeia na configuração de hélice 2. Um comportamento similar foi observado para a simulação da nanopartícula de  $\beta$ -quitina (Tabela 4.2). A configuração da  $\beta$ -nanoquitina é composta por 9 cadeias arranjadas em uma matriz 3X3 solvatada por moléculas de água. Portanto, a cadeia central deste sistema é completamente brindada das outras moléculas de água. As

análises das interações da cadeia central com os outros filamentos mostraram a existência de três ligações de hidrogênio persistentes. As ligações de hidrogênio intramoleculares do tipo  $\text{HO3}_{(n)} \cdots \text{O5}_{(n+1)}$  e as ligações de hidrogênio intermoleculares entre os grupos N-acetil de diferentes cadeias, já foram descritas e são consideradas como as responsáveis por manter ligadas as cadeias e as camadas de quitina no cristal anidro (Gardner e Blackwell, 1975; Jang *et al.*, 2004). Além dessas interações, a simulação realizada mostrou que aproximadamente 20% das ligações de hidrogênio intermolecular ocorrem entre o grupo hidroximetil de uma cadeia com o grupo N-acetil de outra cadeia da nanopartícula (Tabela 4.2). Estas últimas interações não foram experimentalmente observadas em cristais de  $\beta$ -quitina. (Estas discrepâncias ocorreram provavelmente devido a i) sua baixa ocorrência (20%) e o fraco caráter dessas ligações de hidrogênio (tempo de vida é a metade das ligações entre dois grupos N-acetil); ii) medidas experimentais obtidas para o cristal, mostraram pouca ou quase nenhuma variabilidade conformacional; ou iii) a combinação de ambos. Para as cadeias internas da nanopartícula, a frequência de ligações de hidrogênio intramolecular do tipo  $\text{HO3}_{(n)} \cdots \text{O5}_{(n+1)}$  alcançam aproximadamente 90%, e seu tempo de vida aumenta em aproximadamente 60% comparado com a cadeia solvatada. Se a ligação de hidrogênio intramolecular  $\text{HO3}_{(n)} \cdots \text{O5}_{(n+1)}$  é responsável por manter a cadeia de quitina no motivo estrutural em hélice 2 e se a ausência de solvatação nessa região fortalece tal interação, é razoável propor que a solubilidade da quitina é inversamente relacionada à estabilidade dessa interação.

TABELA 4.2 – Número e tempo de vida média das ligações de hidrogênio na quitina e quitosana para a toda a trajetória.

Sistema	HO <sub>3(n)</sub> ...O <sub>5(n+1)</sub>		O <sub>3</sub> -HO <sub>3</sub> ...O <sub>ÁGUA</sub>		H <sub>ÁGUA</sub> ...O <sub>3</sub>	
	Tempo <sup>a</sup>	Número <sup>b</sup>	Tempo <sup>a</sup>	Número <sup>b</sup>	Tempo <sup>a</sup>	Número <sup>b</sup>
<b>QUITINA</b>						
CHT	6,13	0,69 ± 0,14	2,73	0,19 ± 0,11	3,10	1,08 ± 0,16
CHT <sub>0.4</sub>	5,88	0,63 ± 0,15	3,32	0,24 ± 0,12	3,08	1,08 ± 0,16
CHT <sub>1.1</sub>	5,34	0,58 ± 0,15	3,25	0,25 ± 0,13	3,02	1,08 ± 0,17
<b>QUITOSANA</b>						
CHS <sub>LOW</sub>	2,71	0,53 ± 0,14	1,69	0,27 ± 0,13	1,10	0,26 ± 0,14
CHS <sub>NEUTRAL</sub>	4,83	0,48 ± 0,12	2,23	0,29 ± 0,13	2,26	0,72 ± 0,16
CHS <sub>HIGH</sub>	5,60	0,59 ± 0,15	1,84	0,19 ± 0,12	2,66	1,25 ± 0,18
<b>NANOPARTÍCULA DE QUITINA</b>						
Nanoquitina (fibra central)	HO <sub>3(n)</sub> ...O <sub>5(n+1)</sub>		NAc...NAc		NAc...OH <sub>MET</sub> /OH <sub>MET</sub> ...NAc	
	Tempo <sup>a</sup>	Número <sup>b</sup>	Tempo <sup>a</sup>	Número <sup>b</sup>	Tempo <sup>a</sup>	Número <sup>b</sup>
	9,77	0,86 ± 0,11	7,61	0,51 ± 0,09	4,23	0,22 ± 0,14

<sup>a</sup>Tempo é dado em ps; <sup>b</sup>número médio por unidade de açúcar; NAc: grupo N-acetil; OH<sub>MET</sub>: grupo hidroximetil.

Portanto, na tentativa de verificar tal hipótese, três simulações de 30 ns de cadeias de quitosana (quitina 100% deacetilada) totalmente solvatadas em água foram realizadas em pH básico, neutro e ácido, sabendo-se que quitosanas são totalmente solúveis em pH abaixo de 6 (Rinaudo, 2006). As tendências helicoidais e os padrões das ligações de hidrogênio foram calculados para as três simulações e estão ilustradas na Figura 4.3 d-f e Tabela 4.2. O número médio de ligações de hidrogênio entre cadeias do tipo HO<sub>3(n)</sub>...O<sub>5(n+1)</sub>, na quitosana, não é significativamente diferente dos valores observados para a quitina, ou em função do pH. Entretanto, mudanças drásticas foram observadas no i) número de moléculas de água realizando ligações de hidrogênio, como doador, para com o

átomo O3 e ii) o tempo de vida das interações  $\text{HO3}_{(n)} \cdots \text{O5}_{(n+1)}$ . Assim, quanto maior o pH, mais próximo o número dessas interações se aproximam dos valores observados para a quitina. Por exemplo, para a quitosana em pH ácido, o tempo de vida da ligação de hidrogênio  $\text{HO3}_{(n)} \cdots \text{O5}_{(n+1)}$  é somente a metade do valor da quitina (3 versus 6 ps, respectivamente), enquanto que os valores médio e o tempo de residência da molécula de água interagindo com o átomo O3, na quitosana em pH ácido, é quase idêntico aos valores observados para a quitina. Estas diferenças nos tempos de residência sugerem que a conformação e a solubilidade são afetadas pela microsolvatação entrópica.

Para provar esta hipótese, a orientação de todas as moléculas de água dentro um raio de 5 Å do átomo O3 foi calculado e foi feito uma média considerando toda a simulação. Este resultado é mostrado na Figura 4.4 como o co-seno do ângulo ( $\theta$ ), formado pelo dipolo do vetor da molécula de água com o vetor definido pelo átomo O3 e o átomo de oxigênio da água. O número médio de moléculas de água no perfil de distribuição da orientação da quitina à 0.4 M é mostrado junto às distribuições das cadeias de quitina com a mesma força iônica, mas em diferentes valores de pH. Nenhuma diferença significativa foi observada em função da força iônica. O pico observado para a quitina ao redor de -0.7 é devido ao número de ligações de hidrogênio que a molécula de água realiza com o átomo de oxigênio O3 do anel do açúcar, deixando o HO3 disponível para a realização da ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio O5 da próxima unidade de açúcar. A distribuição espacial dos grupos N-acetil e hidroximetil definem uma cavidade, a qual é ocupada por moléculas de água. A posição desta molécula de água é estabilizada por ligações de hidrogênio envolvendo tanto o átomo hidrogênio, quanto o átomo de oxigênio do grupo hidroximetil dos açúcares da vizinhança (Figura 4.4). Os grupos NAc não foram observados como parte integrante deste arranjo.

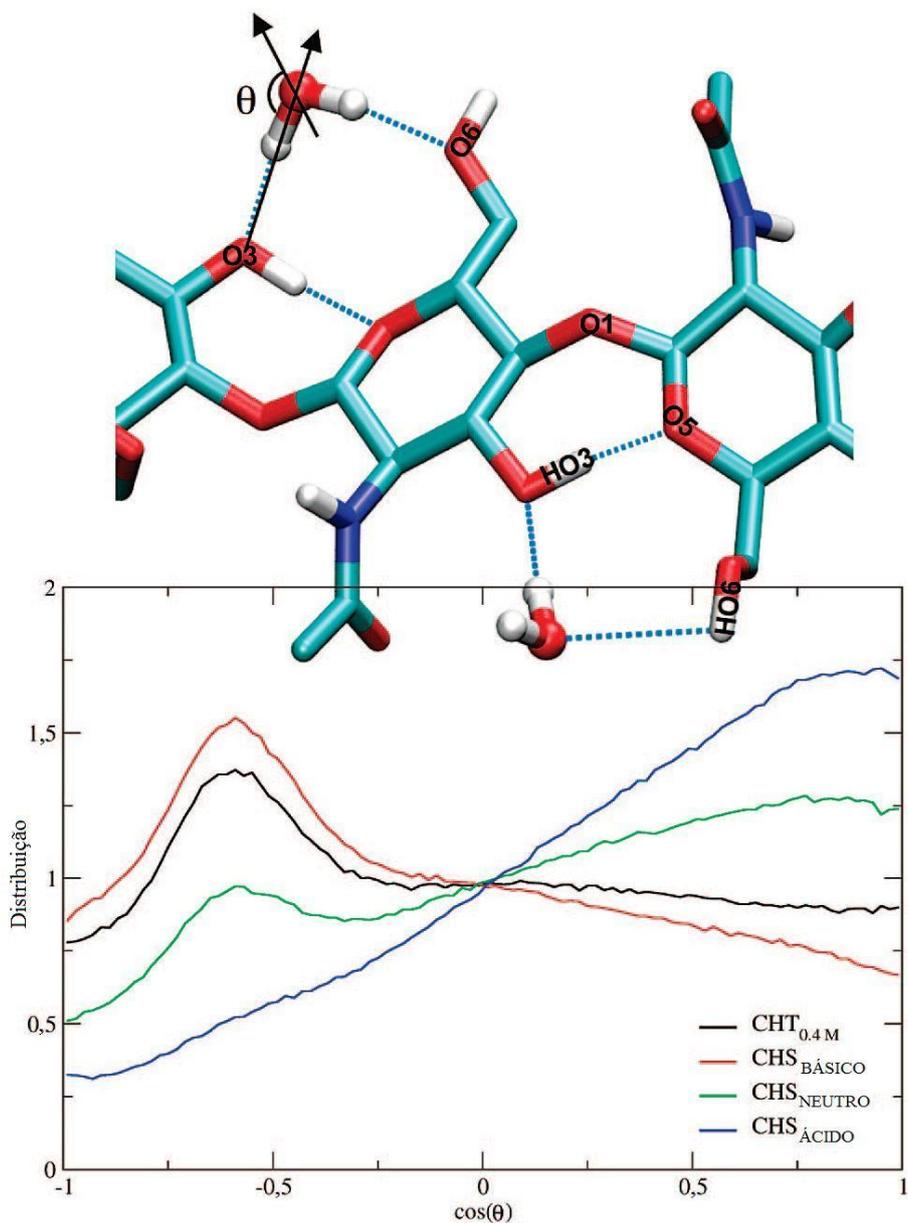


FIGURA 4.4 – A orientação do solvente (água) ao redor do átomo de oxigênio O3 das cadeias de quitina e quitosana. Esta propriedade é mostrada como a média da orientação ( $\cos \theta$ ) sobre toda a simulação, por um raio de 5-Å ao redor do átomo O3.  $\theta$  é definido pelo ângulo formado entre o vetor formado por O3 e o átomo de oxigênio da água e o vetor do dipolo da água (como ilustrado pelas setas em preto). As ligações de hidrogênio são representadas pelas linhas azuis pontilhadas.

Para a quitosana, o perfil de distribuição da orientação do solvente ao redor dos filamentos de açúcar se torna cada vez mais similar ao perfil de distribuição da quitina à medida que o pH aumenta, a qual resulta na diminuição da solubilidade. O perfil de distribuição aparentemente similar para a orientação

e distribuição de moléculas de água ao redor desta região é observada para a quitina e quitosana em pH básico (as duas espécies mais insolúveis). A análise do potencial eletrostático revela um aumento da disponibilidade de sítios negativamente carregados na superfície da quitosana com o aumento do pH (Figura 4.5). Por esse motivo as superfícies moleculares da quitina e da quitosana em pH ácido exibem um mesmo perfil eletrostático (Figura 4.5). A visualização destas propriedades permite-nos entender como a molécula está solvatando o polímero. As moléculas de água na primeira camada de solvatação da quitosana, em pH ácido, interagem com os açúcares principalmente através dos átomos de oxigênio. Em contraste, uma considerável quantidade de moléculas de água realizam ligações de hidrogênio por meio de seus átomos de hidrogênio (como mostrado na Figura 4.4). A variação conformacional das cadeias de quitosana está também em concordância com a hipótese de que a estabilidade da ligação de hidrogênio  $\text{HO3}_{(n)} \cdots \text{O5}_{(n+1)}$  favorece a configuração de hélice 2. A análise conformacional em função do tempo de simulação mostrou que o motivo estrutural em hélice 2 é raramente visitado pela cadeia de quitosana em pH ácido (solúvel). Esta tendência é alterada à medida que o pH aumenta, e o motivo estrutural em hélice 2 se torna a configuração mais representativa da configuração em pH básico (Figura 4.3d-f).

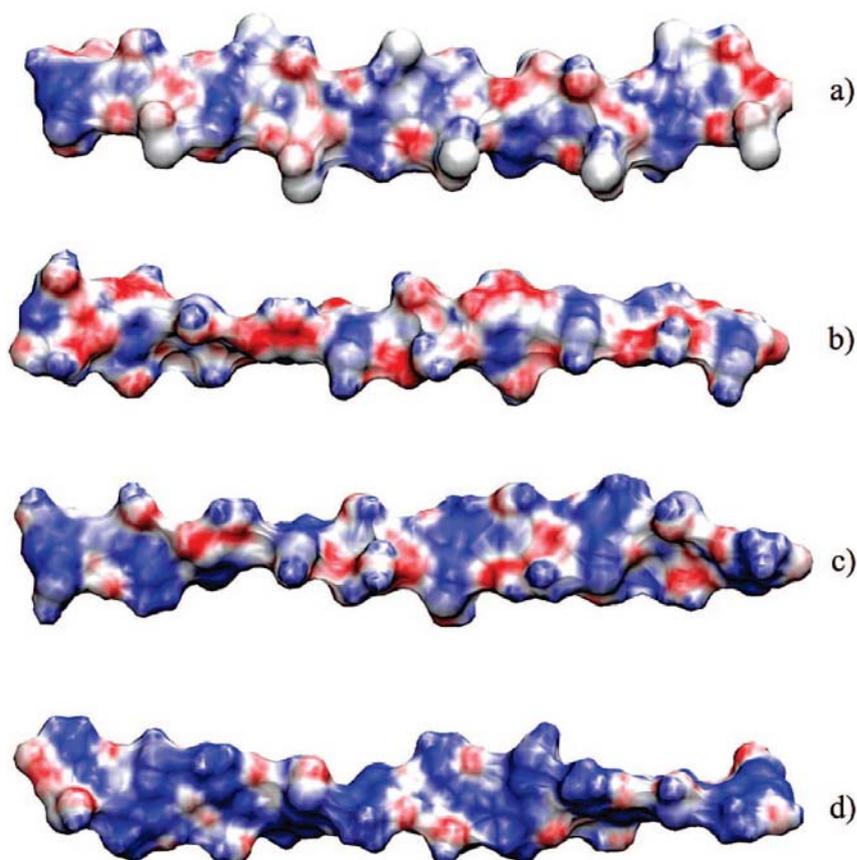


FIGURA 4.5 - Potencial eletrostático plotado na superfície molecular para a) quitina e b-d) quitosana; b) quitosana em pH básico; c) quitosana em pH neutro; e d) quitosana em pH ácido. Os potenciais positivos (azul) e negativo (vermelho) correspondem à faixa de  $-50K_B T/e$  a  $+50 K_B T/e$ .

O número de fatores que contribuem para a solubilidade, como ligações de hidrogênio intermoleculares, forças de van der Waals, e interações hidrofóbicas, tem sido descrito (Amiji, 1995; Nystrom *et al.*, 1999; Philippova *et al.*, 2001). Entretanto, um estudo experimental sugere que a solubilidade da quitosana em solução aquosa é primariamente atribuído às forças eletrostáticas entre o polímero e o meio (Lavertu *et al.*, 2008). Para solucionar esse problema, a contribuição eletrostática e apolar para a energia livre de solvatação da quitina e quitosana foi calculado numericamente a equação não-linear de Poisson–Boltzmann pelo método da diferença finita usando o programa APBS (Holst *et al.*, 2001), como descrito na metodologia. Estruturas representativas que correspondem ao seu equilíbrio conformacional foram selecionadas nos últimos

5ns de simulação com uma mesma força iônica, de forma que o pH seja a única variável entre as cadeias de quitosana. A contribuição para a energia livre de solvatação foi calculada e é representada na Tabela 4.3, mostrando a contribuição para cada resíduo.

TABELA 4.3 – Contribuição média por resíduo (kcal/mol) da energia livre de solvatação das cadeias de quitina e quitosana.

Sistema	$\Delta G_{\text{ELETRÓSTÁTICO}}$	$\Delta G_{\text{APOLAR}}$	$\Delta G$
CHT*	-15,0	6,1	-8,9
CHS <sub>ÁCIDO</sub>	-50,6	5,2	-45,4
CHS <sub>NEUTRO</sub>	-27,4	5,2	-22,2
CHS <sub>BÁSICO</sub>	-15,0	5,3	-9,9

Os valores estimados da energia livre de solvatação não podem se comparados com valores experimentais, devido à ausência de tais medidas na literatura. Entretanto, estes resultados estão de acordo com as observações experimentais com relação à solubilidade da quitina e quitosana. Estes resultados mostram claramente que a quitosana em pH ácido assume a forma mais solúvel, enquanto que a quitina e quitosana em pH básico são as cadeias mais insolúveis. Isto sugere que estes cálculos podem ser potencialmente utilizados na previsão da solubilidade relativa de diferentes formas da quitosana. Portanto, similaridade marcante pode ser vistas para os valores calculados da energia livre de solvatação para a quitina e quitosana em pH básico. Além disso, ficou claro que a solubilidade das cadeias de quitina e quitosana são direcionadas pela contribuição eletrostática. Assim, a contribuição eletrostática para a energia livre de solvatação é inversamente proporcional ao tempo de residência da ligação de hidrogênio intramolecular  $\text{HO3}_{(n)} \cdots \text{O5}_{(n+1)}$  e é altamente correlacionada com a orientação média de moléculas de água ao redor do átomo de oxigênio O3. Cálculos da contribuição eletrostática para a energia livre de

solvatação à diferentes forças iônicas foram realizados, mas a variação de energia ficou restrita a somente algumas unidades percentuais para a concentração do sal variando de 0,15 a 1,10 mM.

#### 4.4 – Conclusão

Mostrou-se a partir de uma série de simulações de Dinâmica Molecular de cadeias de quitina e quitosana, que a flexibilidade de cadeias destes polissacarídeos é inversamente proporcional à estabilidade das ligações de hidrogênio intramolecular entre o átomo HO3 de uma unidade de açúcar e o átomo O5 do próximo monossacarídeo. Como observado experimentalmente, as cadeias de quitina solvatadas também assumem preferencialmente a conformação em hélice 2, e seu equilíbrio não foi afetado pela força iônica até 1,1 M, concordando com estudos reológicos de quitina em solução, os quais retratam a quitina como um polissacarídeo semi-rígido (Rinaudo, 2006). A estabilidade da ligação de hidrogênio intramolecular  $\text{HO3}_{(n)} \cdots \text{O5}_{(n+1)}$  é altamente afetada pela mobilidade e tempo de residência de moléculas de água em suas vizinhanças. Esta característica é bem evidente nas cadeias internas da nanopartícula, onde a presença do solvente foi excluída. Apesar da fraca e baixa ocorrência de ligações de hidrogênio intermolecular entre os grupos hidroximetil e N-acetil, os mesmos também estão presentes em nanopartículas de quitina. O grupo amino ( $\text{NH}_3^+$ ) na vizinhança do átomo C2 da quitosana em pH ácido, pode ser capaz de aumentar a mobilidade ou a troca de moléculas de água na região do átomo O3, desestabilizando a ligação de hidrogênio  $\text{HO3}_{(n)} \cdots \text{O5}_{(n+1)}$ . A interação entre a quitina e quitosana é responsável por segurar o polímero na conformação de hélice 2, reduzindo a variabilidade conformacional. A energia livre de solvatação calculada indica que a solubilidade da quitosana é controlada principalmente por interações eletrostáticas. A alta correlação das contribuições eletrostáticas para a energia livre de solvatação com o padrão de ligações de hidrogênio sugere que a solubilidade desses polímeros é inversamente

proporcional com a habilidade dos mesmos em formar ligações de hidrogênio intramolecular do tipo  $\text{HO3}_{(n)} \cdots \text{O5}_{(n+1)}$ . Os dados apresentados neste trabalho traçam um paralelo entre os padrões de ligações de hidrogênio intramolecular na cadeia de quitinas e quitosanas e suas solubilidades. Estas descobertas podem fornecer subsídios para o desenvolvimento de novos nanomateriais à base de quitosana.

## Capítulo 5

### Dinâmica estrutural de polipeptídeos em solução

Este capítulo consiste basicamente na descrição metodológica, validação e verificação da aplicabilidade da metodologia QM/MM sequencial, para caracterizar a dinâmica estrutural de polipeptídeos em solução, avaliando o efeito do solvente na estabilidade da  $\alpha$ -hélice desses peptídeos.

A escolha de polipeptídeos deve-se ao fato desses polímeros possuírem elevado grau de liberdade e apresentarem tendência a formar estruturas específicas. Portanto, a capacidade de reproduzir as tendências naturais de polipeptídeos é um bom teste para a técnica que será proposta. Uma avaliação positiva será um incentivo à aplicação da mesma para estudar outros sistemas moleculares de interesse que apresentem elevado grau de liberdade.

#### 5.1 – Introdução

Todas as proteínas iniciam sua existência em um ribossomo como uma seqüência linear de resíduos de aminoácidos (Lehninger, 2006). Esse polipeptídeo precisa enovelar-se para tomar sua conformação ativa. A via de enovelamento de uma cadeia polipeptídica é inquestionavelmente complicada, e nem todos os princípios que guiam o processo foram trabalhados.

Um dos modelos descreve o processo de enovelamento como hierárquico. Estruturas locais secundárias formam-se primeiro. Certas seqüências de aminoácidos enovelam-se em  $\alpha$ -hélices ou folhas  $\beta$ , guiadas por restrições descritas pelo diagrama de Ramachandran (Figura 1.11). Assim, como exemplo, duas  $\alpha$ -hélices que se aproximam podem formar estruturas supersecundárias estáveis. Neste contexto, o estudo da estabilidade de polipeptídeos em  $\alpha$ -hélice é de fundamental importância para se compreender o processo de enovelamento de proteínas.

Atualmente, atribui-se a estabilidade de uma  $\alpha$ -hélice a cinco diferentes fatores: (1) a repulsão eletrostática (ou atração) entre resíduos de aminoácidos sucessivos com grupos R carregados, (2) o volume de grupos R adjacentes, (3) as interações entre grupos R espaçados três (ou quatro) resíduos entre si, (4) a ocorrência de resíduos de Prolina e Glicina, e (5) a interação entre resíduos de aminoácidos nas extremidades do segmento helicoidal e o dipolo elétrico inerente a uma  $\alpha$ -hélice.

Apesar de todo argumento estrutural, os efeitos do solvente podem exercer um papel fundamental na formação e estabilidade da  $\alpha$ -hélice. Muitos trabalhos experimentais (Kentsis e Sosnick, 1998; Khandelwal *et al.*, 1999) e teóricos (Daggett e Levitt, 1992; Doruker e Bahar, 1997; Schaefer *et al.*, 1998; Lazaridis e Karplus, 1999; De Oliveira *et al.*, 2007) realizaram análises no processo de formação/destruição de hélices em vários solventes, e foi indicado que a formação e a estabilidade de hélices está diretamente relacionado à interações peptídeo-solvente. Como a fixação de aminoácidos em ângulos compatíveis com a estrutura  $\alpha$ -hélice requer um custo de energia livre (Petukhov *et al.*, 2002), torna-se necessário à caracterização dos fatores que contribuem energeticamente para que esse processo seja espontâneo, e para isso requer a caracterização da estrutura eletrônica do sistema e do efeito do solvente sobre o mesmo.

Assim, a determinação de propriedades que envolvam a estrutura eletrônica de tais compostos em solução requer a determinação simultânea de estruturas termodinamicamente estáveis, bem como a utilização de métodos quânticos para obter as propriedades de interesse (Cramer e Truhlar, 1999). Para isso foi utilizado a metodologia QM/MM sequencial (um método seguido de outro), que permite estudar a termodinâmica da transição estrutural de um peptídeo em  $\alpha$ -hélice para uma estrutura desordenada (desenovelamento) incluindo o efeito da solvatação. Este estudo poderá fornecer subsídios ao entendimento do mecanismo de enovelamento ou desnaturação de proteínas.

## 5.2 – Metodologia

### 5.2.1 – Sistemas simulados

Os peptídeos utilizados para avaliar o efeito do solvente na estabilidade da  $\alpha$ -hélice foram compostos por cinco aminoácidos não polares como descrito na Figura 5.1. O homo-peptídeo de glicina (Gly) foram simulados como referência, uma vez que a mesma não adota nenhuma conformação, de acordo com o gráfico de Ramachandran (Figura 1.11).

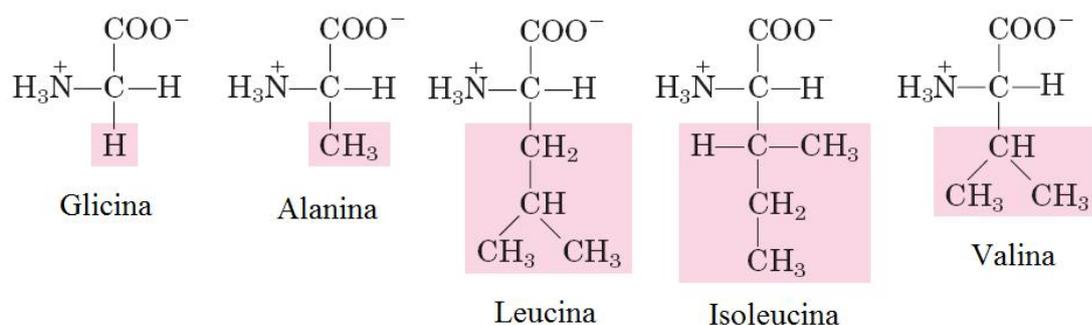


FIGURA 5.1 – Aminoácidos componentes dos homo-peptídeos.

Todos os peptídeos estudados foram modelados com uma estrutura inicial na forma de uma  $\alpha$ -hélice perfeita, com ângulos  $\phi$  e  $\psi$  iguais a  $-58^\circ$  e  $-47^\circ$ , respectivamente. Os sistemas estudados foram distribuídos em duas partes. A primeira corresponde à caracterização estrutural e termodinâmica de cinco homo-peptídeos contendo seis resíduos de cada aminoácido mostrado na Figura 5.1. A segunda etapa, objetiva avaliar a estabilidade de homopeptídeos de alanina com o aumento do número de resíduos na cadeia dos mesmos. Para isso, os peptídeos em  $\alpha$ -hélice foram inseridos em uma caixa de simulação retangular, definida a 1,6 nm de distância de seus átomos. Após isso, todos os sistemas foram solvatados completando a caixa de simulação com moléculas de água

utilizando o modelo SPC (Berendsen *et al.*, 1987). A Tabela 5.1 mostra uma descrição detalhada dos sistemas estudados nesse capítulo.

TABELA 5.1 – Descrição detalhada dos sistemas simulados.

Sistema	Nº de átomos de soluto	Nº de átomos de solvente	Número e tipo de aminoácido
6Gly	45	1981	6 glicinas
6Ala	63	2315	6 alaninas
6Leu	117	2964	6 leucinas
6Ile	117	2902	6 isoleucinas
6Val	99	2494	6 valinas
12Ala	123	3203	12 alaninas
16Ala	163	4096	16 alaninas

A utilização de modelos hipotéticos de homopeptídeos não objetiva somente uma contribuição no esclarecimento do processo de enovelamento de polipeptídeos ou de proteínas; estes modelos também visam validar a presente metodologia QM/MM sequencial.

### 5.2.2 – Descrição da metodologia QM/MM sequencial

A metodologia se baseia em gerar conformações de peptídeos (ou soluto em geral) que sejam mais estáveis em um determinado solvente e a partir dessas configurações espaciais calcular propriedades moleculares considerando também a estrutura eletrônica dos mesmos. Assim, um conjunto de estruturas é obtido a partir de simulações computacionais de Dinâmica Molecular, onde o solvente é incluído explicitamente. Esta etapa caracteriza a parte clássica da

metodologia. A parte quântica consiste em utilizar métodos de Química Quântica para obter informações sobre a energia de todo o sistema ou um subconjunto do sistema modelo. Estas novas informações podem ser utilizadas para efetuar um novo procedimento de análise e encontrar a trajetória mais adequada para as condições de simulação que estão sendo utilizadas. Observamos que modelos de solvatação implícita podem ser utilizados para obter propriedades termodinâmicas como a variação de energia livre de solvatação e a estrutura eletrônica dos peptídeos em solução, entre outras observações.

A metodologia QM/MM sequencial (Semi-empírico/Dinâmica Molecular) utilizada, consiste basicamente de três passos: i) realizar uma amostragem conformacional do sistema de interesse em solvente explícito, utilizando simulações por dinâmica molecular; ii) conversão das informações estruturais obtidas pela dinâmica molecular para um formato de entrada para programas de química quântica (para esta etapa foi desenvolvido um programa em linguagem FORTRAN); iii) realização de cálculos de química quântica extensivos, usando métodos semi-empírico que possuem modelo de solvatação implícita, implementado no programa AMSOL7.1 (Hawkins *et al.*, 2003). Este procedimento permitirá obter a energia livre de solvatação ao longo da trajetória, informação fundamental para analisar a estabilidade do sistema em estudo.

O objetivo de se utilizar a Dinâmica Molecular está na obtenção de conformações representativas de polipeptídeos em solvente explícito, incluindo-se efeitos de temperatura, os quais influenciam significativamente na conformação desses polipeptídeos. Após esta etapa, somente as propriedades eletrônicas dos solutos são avaliadas por métodos de Química Quântica. Na situação do presente trabalho, foram utilizados métodos quânticos de solvatação implícita, visando avaliar quantitativamente a energia livre de solvatação em função da conformação do polipeptídeo. Assim, moléculas de água não foram incluídas nos cálculos mecânico quânticos, pois o presente trabalho não está

interessado na descrição quântica das interações específicas entre o soluto e o solvente, como ligações de hidrogênio, ou da solvatação do sistema peptídeo+água. Portanto, somente o termo de interação soluto-solvente está sendo calculado para avaliar a contribuição energética do solvente sobre a conformação do soluto.

A elevada liberdade conformacional de polipeptídeos (principalmente na transição hélice–randômica) resulta em um pequeno tempo de correlação, o qual está diretamente relacionado à sua ligação de hidrogênio intramolecular, cujo tempo de vida é da ordem de ps. Dessa forma, visando evitar perder informações estruturais e garantir uma amostragem completa das transições conformacionais dos peptídeos obtidas por Dinâmica Molecular, os cálculos quânticos com modelos de solvatação implícita foi realizado em um intervalo de tempo de 1ps.

Assim, a viabilidade de se utilizar a metodologia QM/MM sequencial na descrição do efeito do solvente na transição hélice-randômica permitirá a utilização desta metodologia na determinação do efeito do solvente para qualquer outro composto que possua elevado grau de liberdade.

### **5.2.2.1 – Simulação por Dinâmica Molecular**

Inicialmente, todos os sistemas modelados tiveram sua energia minimizada, realizando 10000 passos utilizando o algoritmo *steepest descent*. Depois da minimização, o solvente foi equilibrado realizando-se uma simulação por dinâmica molecular por 10 ps a 300 K, durante este processo, a posição dos átomos mais pesados foi fixada aplicando-se uma constante de força de  $1,0 \cdot 10^3$  kJ mol<sup>-1</sup>nm<sup>-2</sup>. Após isso, 10 ns de simulação por Dinâmica Molecular foi realizada em um ensemble isotermico-isobárico (NPT) utilizando o algoritmo leap-frog (Hockney, 1970) com passo de integração de 1 fs. A temperatura foi mantida por 300 K acoplando o sistema ao termostato de Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984) com um tempo de relaxação de 0,1 ps. A pressão foi mantida à 1 bar pelo acoplamento do barostato de Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984) com

um tratamento isotrópico e tempo de relaxação de 1 ps e compressibilidade de  $4,5 \cdot 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ . O comprimento de ligação, bem como o movimento de estiramento linear e angular envolvendo o átomo de hidrogênio foram fixados utilizando o algoritmo LINCS (Hess *et al.*, 1997). As interações eletrostáticas de longa distância foram consideradas empregando-se o método PME (Particle Mesh Ewald) (Essman *et al.*, 1995). Um raio de corte de 1,5 nm também foi utilizado para as interações não ligantes de curto alcance.

Todas as simulações foram realizadas utilizando-se o campo de força OPLS-AA (Kaminski *et al.*, 2000), e o programa GROMACS 3.3.2 (van der Spoel *et al.*, 2005).

### **5.2.2.2 – Cálculos quânticos semi-empíricos com modelo de solvatação implícita**

Após realizada a amostragem conformacional dos peptídeos em solução, a cada picossegundo (ps) foi extraído a estrutura tridimensional do peptídeo e um cálculo quântico ao nível HF (SCF), utilizando o método semi-empírico AM1. Durante o cálculo quântico não foi permitida a otimização da estrutura, realizando-se então um cálculo *single-point*. Nos cálculos SCF, as cargas atômicas parciais foram derivadas utilizando o modelo de cargas CM2 classe IV (Li *et al.*, 1998c).

O modelo de cargas CM2 baseia-se em obter as cargas parciais atômicas pela análise da função de onda pelo procedimento de mapeamento parametrizado (Li *et al.*, 1998c). Esta metodologia reproduz a classe de carga IV, que é o mapeamento das cargas de Löwdin obtidas pelos métodos semi-empíricos, ab initio Hartree–Fock e Teoria do Funcional de Densidade (DFT), em particular nos cálculos AM1, PM3, HF/MIDI1, HF/6-31G\*, HF/6-31+G\*, BPW91/MIDI1, BPW91/6-31G\*, B3LYP/MIDI1, e BPW91/DZVP. As cargas parciais CM2 reproduz dipolos experimentais com desvios quadráticos médios que são tipicamente 7 vezes melhores que os momentos de dipolo calculado da

análise de população de Mulliken (Mulliken, 1955) e são 3 vezes melhores que os momentos de dipolo calculados pela análise de Löwdin (Mulliken, 1955). Além disso, o modelo de cargas CM2 classe IV concordam com as cargas ChEIPG (Breneman e Wiberg, 1990), reproduzindo as cargas obtidas pelo método HF/6-31G\*/ChEIPG, o qual é comumente utilizado na obtenção das cargas nos campos de Força. Dessa forma, como a obtenção das cargas baseia-se no mesmo princípio, a metodologia QM/MM sequencial descrita (item 5.2.2) permitirá avaliar a variação das cargas ao longo da simulação.

Após o cálculo da estrutura eletrônica no vácuo para cada estrutura extraída da simulação, foi realizado um outro cálculo *single-point* introduzindo um contínuo dielétrico que corresponde ao solvente água. Neste cálculo as cargas parciais atômicas de cada átomo, segundo o modelo de cargas CM2 classe IV, foram derivadas incluindo o efeito de polarização pelo solvente contínuo. Nesta etapa foi possível obter a energia livre de solvatação de cada estrutura.

Todos os cálculos nesta etapa quântica foram realizados utilizando o programa AMSOL7.1 (Rogers *et al.*, 1999), o qual é uma modificação do programa AMPAC- versão 2.1 (Liotard *et al.*, 1989).

Dentre os modelos de solvatação disponíveis, o método SM5.42R foi o que apresentou melhor correlação entre os resultados calculados e os dados experimentais de energia livre de solvatação, como mostrado na Figura 5.2.

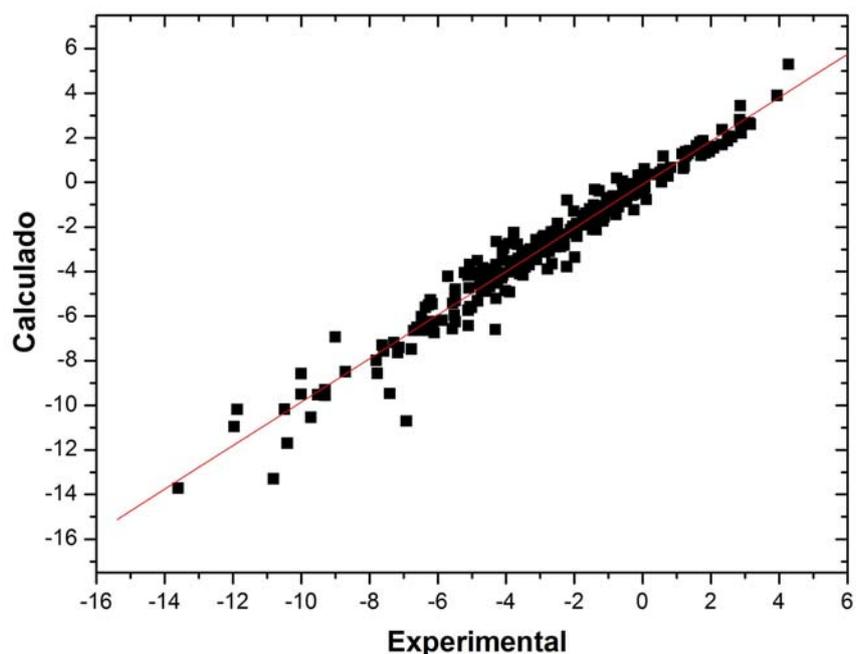


FIGURA 5.2 – Energia livre de solvatação calculada versus valor experimental para diferentes compostos utilizando o modelo de solvatação SM5.42R, e o hamiltoniano AM1. Dados obtidos na referência (Li *et al.*, 1999).

A Figura 5.2 mostra uma correlação de 0,9788 e desvio padrão de 0,6542 kcal/mol entre as energias livre de solvatação calculada e experimental para 260 compostos, incluindo-se compostos polares, apolares, neutros e carregados. No conjunto de compostos descritos na Figura 5.2, estão incluídas as moléculas que representam a cadeia lateral de aminoácidos. Assim, com base nos aminoácidos estudados neste trabalho, o modelo de solvatação SM5.42R está parametrizado para as moléculas: metano, isobutano, butano e propano, que representam a cadeia lateral dos aminoácidos alanina, leucina, isoleucina e valina, respectivamente.

Portanto, com base na correlação do método SM5.42R, o mesmo foi utilizado no cálculo de cada conformação obtida para todos os polipeptídeos simulados.

## 5.3 – Resultados e Discussão

### 5.3.1 – Dinâmica estrutural de homopeptídeos contendo 6 resíduos de aminoácidos

O processo de desnaturação dos homopeptídeos com seis resíduos de aminoácidos em água foi acompanhado realizando-se uma dinâmica molecular por 10 ns. Sabendo-se que a estrutura inicial de todos os peptídeos são estruturas em  $\alpha$ -hélice, foi calculado o desvio quadrático médio (RMSD-Root Mean Square Deviation) de todas as conformações do espaço amostral com relação à estrutura inicial de referência (Figura 5.3).

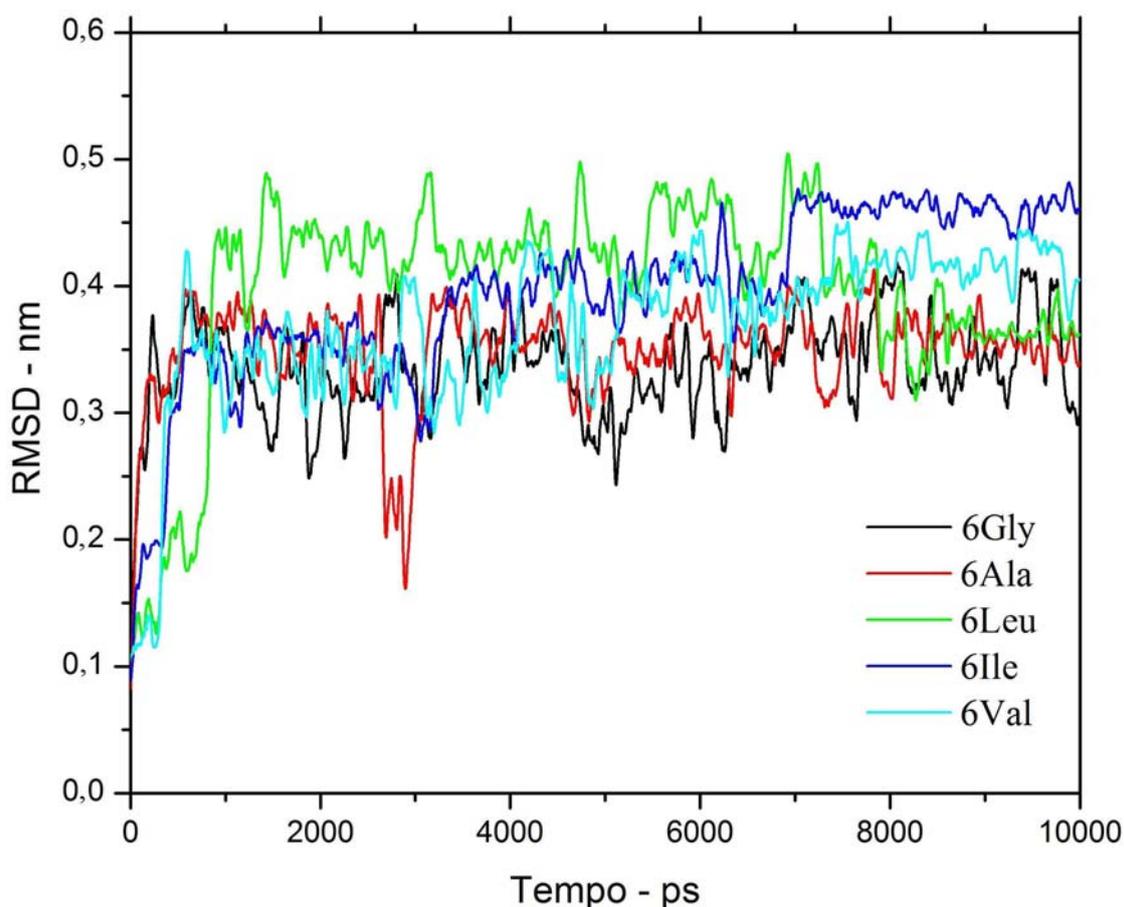


FIGURA 5.3 – Gráfico do RMSD entre a estrutura de partida ( $\alpha$ -hélice) e as demais conformações encontradas ao longo da dinâmica dos homopeptídeos. Os valores são mostrados como médias num intervalo de 50-ps.

A Dinâmica Molecular permite a evolução temporal do processo de desenovelamento de peptídeos; dessa forma, a Figura 5.3 mostra claramente que todos os polipeptídeos perderam suas estruturas iniciais em  $\alpha$ -hélice em menos de 1 ns de simulação, como esperado para peptídeos pequenos, que possuem somente 6 resíduos de aminoácidos (Marqusee *et al.*, 1989). Uma representação esquemática da configuração inicial e final válida para todos os peptídeos simulados, está apresentada na Figura 5.4.

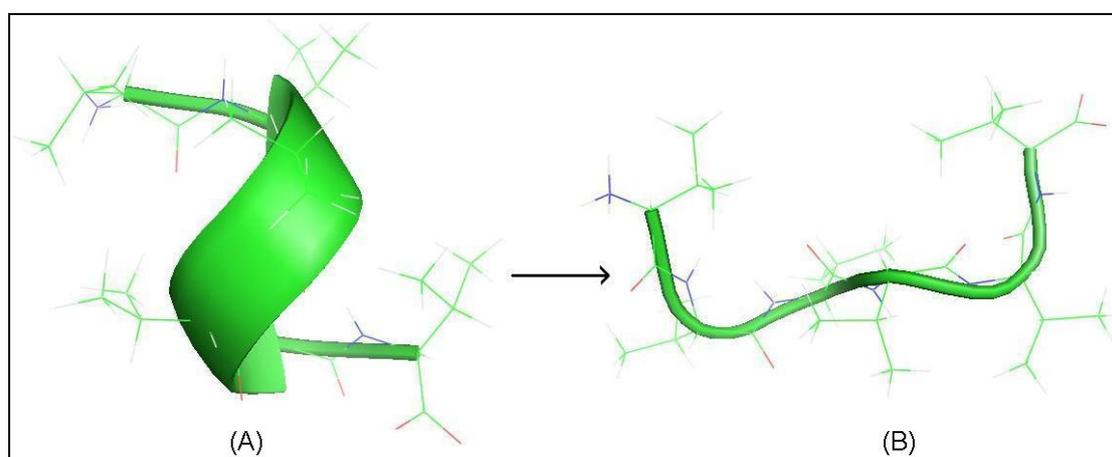


FIGURA 5.4 – Estrutura dos peptídeos (A) antes e (B) depois da simulação computacional.

Dentre todos os peptídeos simulados, a hexaglicina é o polipeptídeo que apresentou a maior flexibilidade e que perdeu a estrutura secundária mais abruptamente. Entretanto, como os sistemas estudados são polipeptídeos compostos por somente um tipo de aminoácido, a característica específica de cada aminoácido é expressa em cada homopolipeptídeo. Alguns aminoácidos são acomodados melhores que outros em diferentes tipos de estruturas secundárias. Um resumo geral está apresentado na Tabela 5.2. Esta característica intrínseca de cada aminoácido é capaz de justificar o fato do peptídeo hexaalanina (6Ala) recuperar parcialmente e temporariamente sua estrutura inicial em  $\alpha$ -hélice ao redor de 2900 ps; e o fato do peptídeo hexaleucina (6Leu) apresentar maior resistência ao processo de desenovelamento.

TABELA 5.2 – Preferência conformacional de aminoácidos (Pace e Scholtz, 1998)

	$\alpha$ -hélice	Folha $\beta$
<b>Glu</b>	<b>1.59</b>	0.52
<b>Ala</b>	<b>1.41</b>	0.72
<b>Leu</b>	<b>1.34</b>	1.22
<b>Met</b>	<b>1.30</b>	1.14
<b>Gln</b>	<b>1.27</b>	0.98
<b>Lys</b>	<b>1.23</b>	0.69
<b>Arg</b>	<b>1.21</b>	0.84
<b>His</b>	<b>1.05</b>	0.80
<b>Val</b>	0.90	<b>1.87</b>
<b>Ile</b>	1.09	<b>1.67</b>
<b>Tyr</b>	0.74	<b>1.45</b>
<b>Cys</b>	0.66	<b>1.40</b>
<b>Trp</b>	1.02	<b>1.35</b>
<b>Phe</b>	1.16	<b>1.33</b>
<b>Thr</b>	0.76	<b>1.17</b>
<b>Gly</b>	0.43	0.58
<b>Asn</b>	0.76	0.48
<b>Pro</b>	0.34	0.31
<b>Ser</b>	0.57	0.96
<b>Asp</b>	0.99	0.39

Os valores descritos na Tabela 5.2 foram obtidos a partir da análise estatística do número de vezes que um determinado aminoácido é observado nas conformações em  $\alpha$ -hélice ou folha  $\beta$ , que estão presentes em inúmeras proteínas ou peptídeos que apresentam estas estruturas secundárias estáveis em solução (Pace e Scholtz, 1998). Isto implica que em proteínas e peptídeos, a estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice é rica no aminoácido glutamina (Glu) ou

alanina (Ala), enquanto que as estruturas em folha  $\beta$  são ricas no aminoácido valina (Val) ou isoleucina (Ile).

Os resultados apresentados até o presente momento, revelaram o comportamento de cada homo-peptídeo em solução, mostrando a característica de cada aminoácido que compõe a sua estrutura primária. Estas informações estruturais obtidas pela simulação clássica por Dinâmica Molecular com solvente explícito mostraram estar de acordo com o parâmetros estruturais esperados para pequenos peptídeos em solução (Daggett e Levitt, 1992; Doruker e Bahar, 1997). Assim, com posse da amostragem conformacional dos homo-peptídeos em água explícita, cálculos quânticos semi-empíricos podem fornecer informações mais precisas com relação à energia conformacional de cada peptídeo, a partir do cálculo do calor de formação. Assim, após a realização dos cálculos quânticos dos peptídeos no vácuo, foi possível obter o calor de formação para cada estrutura extraída da Dinâmica Molecular. A Figura 5.5 mostra o calor de formação para a conformação dos peptídeos observada a cada ps de simulação.

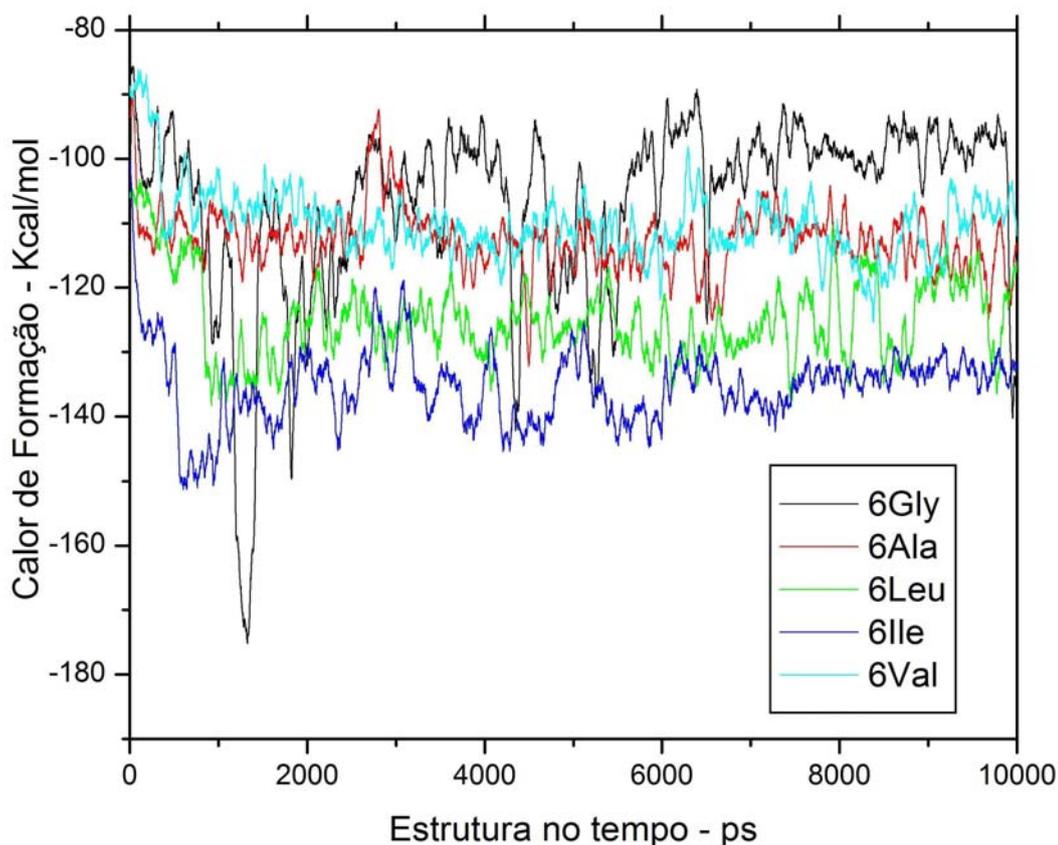


FIGURA 5.5 – Calor de formação da conformação das estruturas de homopeptídeos obtidas ao longo da trajetória realizada por Dinâmica Molecular. Os valores são mostrados como médias num intervalo de 50-ps.

Os resultados da Figura 5.5 mostram claramente que para todos os peptídeos, a conformação em  $\alpha$ -hélice é menos estável que uma conformação totalmente randômica ou desnaturada. As curvas da variação do calor de formação para a hexaglicina mostra duas situações: i) a primeira é uma conformação com um mínimo de energia ao redor de 1331 ps, a qual corresponde à uma conformação em que os grupos N-terminal e C-terminal encontram-se próximos um do outro, causada por interação eletrostática (Figura 5.6) e ii) a variação do calor de formação de -88.2 a -175,2 kcal/mol revela uma elevada flexibilidade da cadeia polipeptídica formada por resíduos de glicina. Isto concorda com os dados da literatura, a qual afirma que a glicina é o único aminoácido encontrado frequentemente em uma conformação fora das regiões

permitidas (gráfico de Ramachandran) para adotar uma conformação em  $\alpha$ -hélice ou em folha  $\beta$  (Ramachandran *et al.*, 1963).

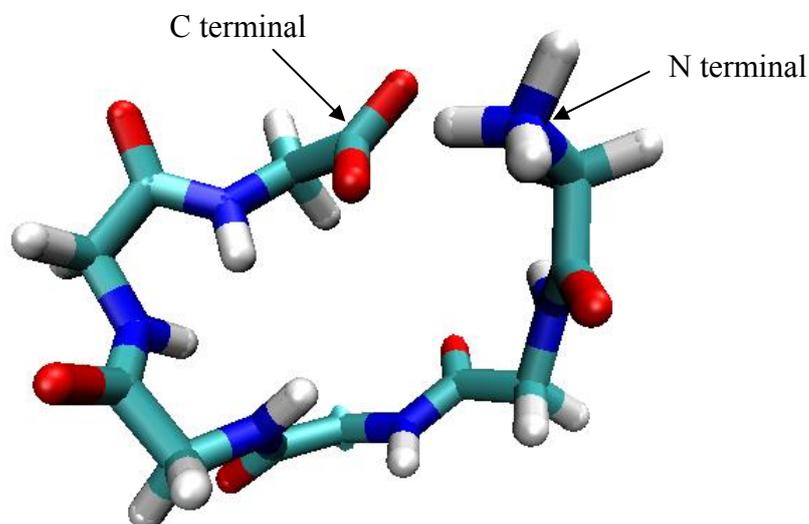


FIGURA 5.6 – Representação da interação entre os grupos N-terminal e C-terminal da hexaglicina.

O pico para o calor de formação da hexaalanina de aproximadamente -92,7 kcal/mol ao redor da estrutura em 2797 ps, concorda com a proposição discutida no gráfico de RMSD da Figura 5.3, a qual sugere que nesse tempo de simulação a hexaalanina retorna temporariamente e parcialmente à sua estrutura inicial em  $\alpha$ -hélice.

Estes resultados do calor de formação confirmam a hipótese de que a formação da estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice requer um gasto de energia para mantê-la. Neste contexto, fica evidente que a solvatação possui um papel fundamental na estabilização dessa estrutura secundária. Portanto, torna-se necessário elucidar a contribuição termodinâmica do efeito do solvente na conformação desses peptídeos.

Para tanto, foram realizados cálculos da energia livre de solvatação utilizando solvente explícito a partir da estrutura eletrônica obtida no vácuo. A Figura 5.7 mostra o valor da energia livre de solvatação para cada estrutura representativa ao longo do tempo de simulação.

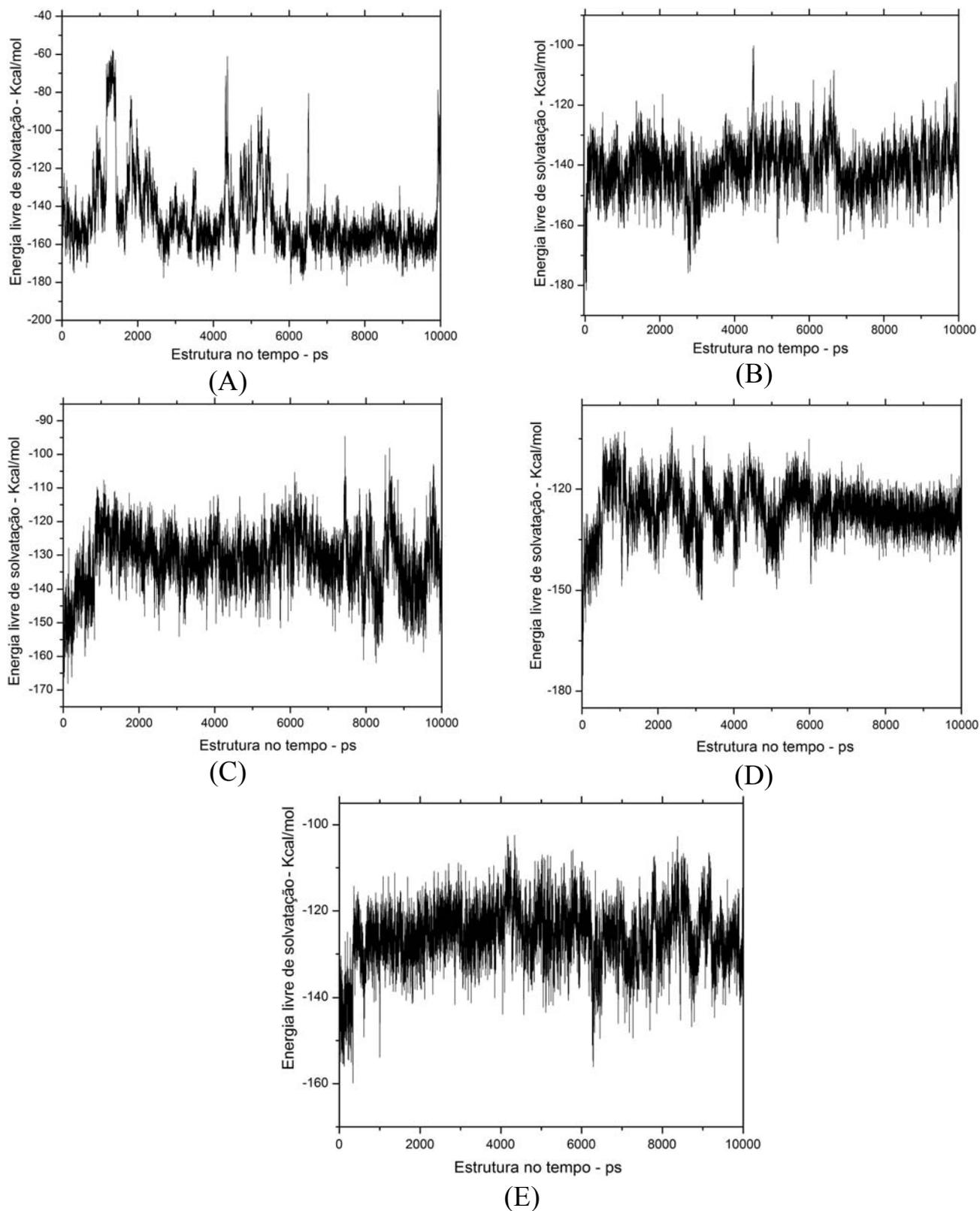


FIGURA 5.7 – Energia livre de solvatação das estruturas obtidas a cada ps de simulação dos homopeptídeos compostos por 6 resíduos de aminoácidos de (A) glicina, (B) alanina, (C) leucina, (D) isoleucina e (E) valina.

Os gráficos da Figura 5.7 mostram que, com exceção da hexaglicina, a solvatação da estrutura inicial dos peptídeos são mais favorecidas que as respectivas estruturas randômicas. Isto sugere que a solvatação do peptídeo por moléculas de água é capaz de estabilizar a estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice, mostrando uma compensação de energia na solvatação, pela perda no processo de formação da estrutura secundária. O perfil oposto dos gráficos de energia livre de solvatação (Figura 5.7) com relação aos gráficos de calor de formação (Figura 5.5) reforça essa hipótese. Entretanto, este comportamento não é observado para a hexaglicina, cuja conformação totalmente randômica apresenta calor de formação e energia livre de solvatação mais favorável que a sua estrutura em  $\alpha$ -hélice. No gráfico de energia livre de solvatação da hexaglicina (Figura 5.7A) é possível verificar um pico ao redor de 1331 ps, o qual está correlacionado ao pico descrito na Figura 5.5 e representa a mesma estrutura fechada descrita na Figura 5.6. Esta conformação possui uma pequena superfície acessível ao solvente o que resulta em uma energia livre de solvatação menos favorável ( $\approx -60$ Kcal/mol).

A elevada flexibilidade da cadeia peptídica da hexaglicina não mostra uma evidente transição naturada-desnaturada, como nos demais peptídeos. Entretanto, os peptídeos formados por alanina, leucina e isoleucina são observados diferentes proporções de estruturas em  $\alpha$ -hélice e em conformação randômica, de acordo com o tamanho da cadeia lateral. Para a hexaalanina, por exemplo, observa-se uma desestabilização rápida da estrutura inicial, na qual se observa um conjunto pequeno de estruturas, até 50 ps de simulação, com uma energia livre de solvatação média de  $-157,07$  kcal/mol, isso se deve à sua pequena cadeia lateral (metila) e conseqüentemente, a estrutura em hélice se desestabiliza alcançando uma conformação randômica com energia livre de solvatação média de  $-140,78$  kcal/mol. Por outro lado, a hexaleucina apresenta uma cadeia lateral maior (butila) e apresenta mais resistência ao processo de

desenovelamento, e possui maior percentagem de resíduos em  $\alpha$ -hélice. Assim, sabendo-se que a estabilização da  $\alpha$ -hélice ocorre pela interação intramolecular do tipo  $N-H\cdots O=C$  entre o resíduo  $i$  e  $i+4$  (Pauling e Corey, 1954). O tamanho da cadeia lateral mostra uma relação direta entre a acessibilidade de moléculas de água à cadeia principal, que ocorre facilmente para peptídeos com pequena cadeia lateral como a alanina e glicina, desestabilizando as ligações de hidrogênio intramolecular.

Portanto, de acordo com o que foi apresentado, duas tendências foram observadas: a primeira foi evidenciada pela variação do calor de formação, o qual mostrou que peptídeos pequenos e isolados não possuem a tendência em permanecer na conformação  $\alpha$ -hélice; a segunda se deve à variação da energia livre de solvatação, a qual mostrou que a solvatação é responsável pela estabilização da  $\alpha$ -hélice, permitindo ao peptídeo permanecer nesta conformação. Assim, como na simulação por Dinâmica Molecular os peptídeos contendo 6 resíduos de aminoácido perderam espontaneamente sua estrutura em  $\alpha$ -hélice; pode-se sugerir que ocorreu uma diminuição da energia livre do sistema quando o mesmo passa de uma conformação  $\alpha$ -hélice para uma conformação randômica. Dessa forma, assumindo-se que a energia livre total do sistema é dado pela soma da contribuição estrutural do peptídeo (calor de formação) e da contribuição do solvente (energia livre de solvatação), torna-se possível verificar a variação da energia livre total do sistema em função das estruturas amostradas ao longo da simulação por Dinâmica Molecular como apresentado na Figura 5.8.

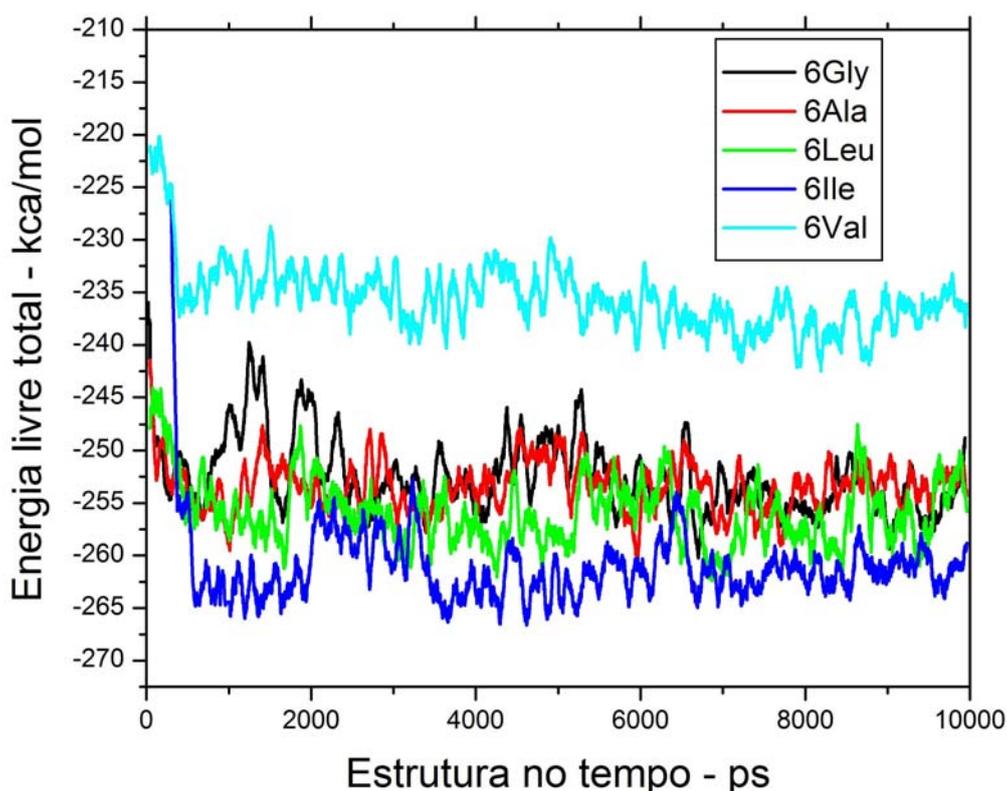


FIGURA 5.8 – Energia livre total média do sistema ( $\Delta G_{\text{total}} = \Delta H_f + \Delta G_{\text{solv.}}$ ) em função das estruturas de homopeptídeos encontrada ao longo da trajetória de simulação por Dinâmica Molecular. As médias foram obtidas num intervalo de 80 ps.

A Figura 5.8 mostra claramente que energia livre total do sistema diminui quando todos os peptídeos perdem sua estrutura em  $\alpha$ -hélice, justificando a relativa instabilidade da estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice para pequenos peptídeos em solução aquosa. Estes resultados de energia livre obtidos utilizando-se cálculos quânticos, incluindo modelos de solvatação implícita, mostraram excelente correlação com os resultados obtidos por simulação por Dinâmica Molecular. Isto releva que cálculos quânticos, segundo a metodologia QM/MM sequencial, podem ser usados para descrever as propriedades de estruturas amostradas por métodos de Dinâmica Molecular.

Além disso, a confiabilidade dos resultados mostrados no presente trabalho podem ser validados comparando-se a diferença da energia dos peptídeos na forma helicoidal e randômica, com a preferência de cada aminoácido em formar uma  $\alpha$ -hélice (Pace e Scholtz, 1998). A Tabela 5.3 compara a preferência helicoidal de cada aminoácido com a contribuição energética do calor de formação, energia livre de solvatação e energia livre total do sistema para a estabilização da  $\alpha$ -hélice de 4 homopeptídeos.

TABELA 5.3 – Contribuição da energia livre na estabilização da estrutura inicial em  $\alpha$ -hélice, e preferência relativa de cada aminoácido em formar  $\alpha$ -hélice.

Homopeptídeo	$\Delta(\Delta H_f)$ entre hélice e randômica (kcal/mol)	$\Delta(\Delta G_{solv.})$ entre hélice e randômica (kcal/mol)	$\Delta(\Delta G_{total})^*$ entre hélice e randômica (kcal/mol)	Preferência em formar $\alpha$ -hélice
6Ala	19,70	-16,30	3,40	1,41
6Leu	18,34	-14,71	3,63	1,34
6Ile	17,79	-14,01	3,78	1,09
6Val	17,76	-13,95	3,81	0,90

$$^* \Delta(\Delta G_{total}) = \Delta(\Delta H_f) + \Delta(\Delta G_{solv.})$$

Os resultados positivos de  $\Delta(\Delta G_{total})$ , na Tabela 5.3, mostram claramente que a formação da estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice é desfavorecida para todos os peptídeos contendo 6 aminoácidos, concordando com o que já foi discutido anteriormente. Entretanto, apesar do desfavorecimento da estrutura helicoidal, a variação de energia livre total entre a  $\alpha$ -hélice e a estrutura randômica concorda com a tendência de cada aminoácido em formar  $\alpha$ -hélice. Assim, os peptídeos formados por leucina, isoleucina e valina são menos estáveis por 0,23; 0,38; e 0,41 kcal/mol com relação que o peptídeo formado somente por alanina, concordando com a preferência de cada aminoácido em formar  $\alpha$ -hélice. Esta tendência também é observada para a diferença de energia livre de solvatação.

Para avaliar corretamente o efeito do solvente na estabilização da  $\alpha$ -hélice, torna-se necessário verificar se a energia livre de solvatação dos peptídeos é capaz de descrever adequadamente a interação do mesmo com o seu meio. Entretanto, como não existe um valor experimental da energia livre de solvatação para esses peptídeos hipotéticos ou para seus respectivos aminoácidos, foi realizada uma comparação entre a hidrofobicidade de cada aminoácido e a contribuição da energia livre de solvatação de cada resíduo. Para isso, deve-se levar em consideração que a energia livre de solvatação depende da conformação do peptídeo, tornando-se necessário atribuir maior importância às conformações que estão mais presentes na solução. Assim, no cálculo da energia de solvatação média foi atribuído um peso estatístico maior para as conformações que possuem energia livre total ( $\Delta H_f + \Delta G_{solv.}$ ) mais favorável. A equação (50) mostra como foi feita a média estatística da energia livre de solvatação:

$$\langle E^{solv.} \rangle = \frac{\sum_{i=1}^N E_i^{solv.} e^{\left(-E_i^{total}/RT\right)}}{\sum_{i=1}^N e^{\left(-E_i^{total}/RT\right)}} \quad (50)$$

sendo  $E_i^{solv.}$  a energia livre de solvatação para cada estrutura,  $E_i^{total}$  a energia livre total para cada estrutura, R a constante universal dos gases e T a temperatura em Kelvin.

Cabe salientar que Equação (50) não é cálculo de termodinâmica estatística, mas sim uma média ponderada, uma vez que o coeficiente de partição de cada estrutura já foi determinado em cada cálculo quântico. A Figura 5.9 mostra os resultados obtidos por essa média, comparando-os com valores de hidrofobicidade de cada aminoácido estudado.

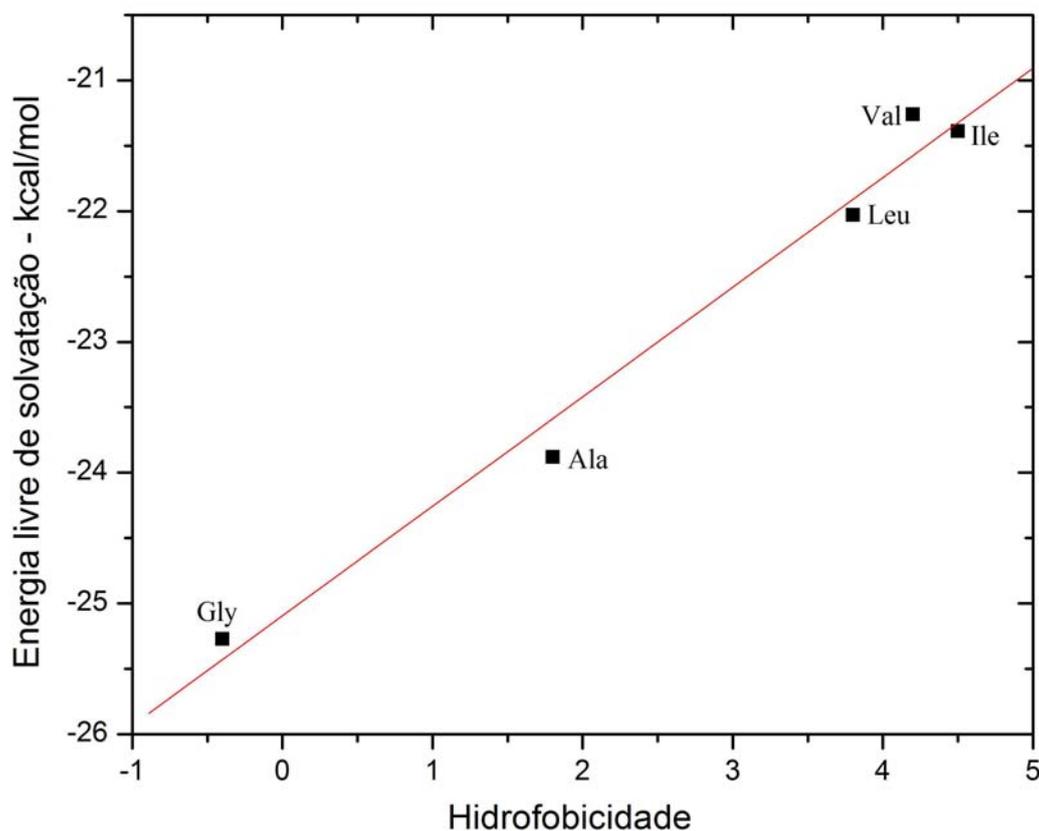


FIGURA 5.9 – Relação entre energia livre de solvatação e hidrofobicidade por resíduo (monômero) de aminoácido.

O gráfico da Figura 5.9 mostrou que energia livre de solvatação obtida a partir da metodologia aqui descrita está de acordo com a característica de interação (hidrofobicidade) dos aminoácidos descritos, com uma correlação de 0,9905 e um desvio padrão de 0,28 kcal/mol.

Portanto, a metodologia QM/MM utilizada, segundo o procedimento deste trabalho, mostrou-se adequada para descrição da estrutura e da termodinâmica de homopeptídeos.

### 5.3.2 – Dinâmica estrutural de homopeptídeos de alanina contendo 12 e 16 resíduos de aminoácidos.

Como a metodologia QM/MM sequencial mostrou-se adequada à caracterização estrutural de peptídeos, esta etapa do trabalho visa descrever quais são os fatores estruturais e termodinâmicos que contribuem para

estabilização da estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice de peptídeos com alta percentagem de resíduos de alanina.

A elevada tendência da alanina em formar  $\alpha$ -hélice (Tabela 5.2), faz da polialanina um excelente modelo de peptídeo para estudar a estabilidade  $\alpha$ -hélice (Ismer *et al.*, 2005). Por esse motivo, foram realizados cálculos QM/MM seqüenciais para o dois tipos de homopeptídeo de alanina contendo 12 e 16 resíduos.

O cálculo do desvio quadrático médio revelou duas características distintas para o peptídeo contendo 12 e 16 resíduos de alanina (Figura 5.9). O homopeptídeo de alanina com 12 resíduos permaneceu em uma estrutura helicoidal até aproximadamente 3,6 ns, e após 5 ns de simulação este peptídeo perde totalmente sua estrutura inicial, atingindo uma estrutura totalmente randômica. Isto demonstra um aumento considerável da estabilidade da  $\alpha$ -hélice quando se duplica o número de resíduos (comparando-se com o de 6 resíduos) de aminoácidos de um homopeptídeo de alanina, a qual resulta simultaneamente na duplicação do número de ligações de hidrogênio intramolecular do tipo N–H...O=C entre o resíduo  $i$  e  $i+4$ , responsável por estabilizar a estrutura helicoidal. Entretanto, para o homopeptídeo com 16 resíduos de alanina, foi observado que o mesmo perde parte de sua estrutura helicoidal após 3 ns de simulação, atingindo um RMSD de 0,65 nm; mas, após 9 ns de simulação esse peptídeo recupera a maior parte de sua estrutura inicial, sugerindo que as ligações de hidrogênio intramolecular da cadeia principal se restabelecem.

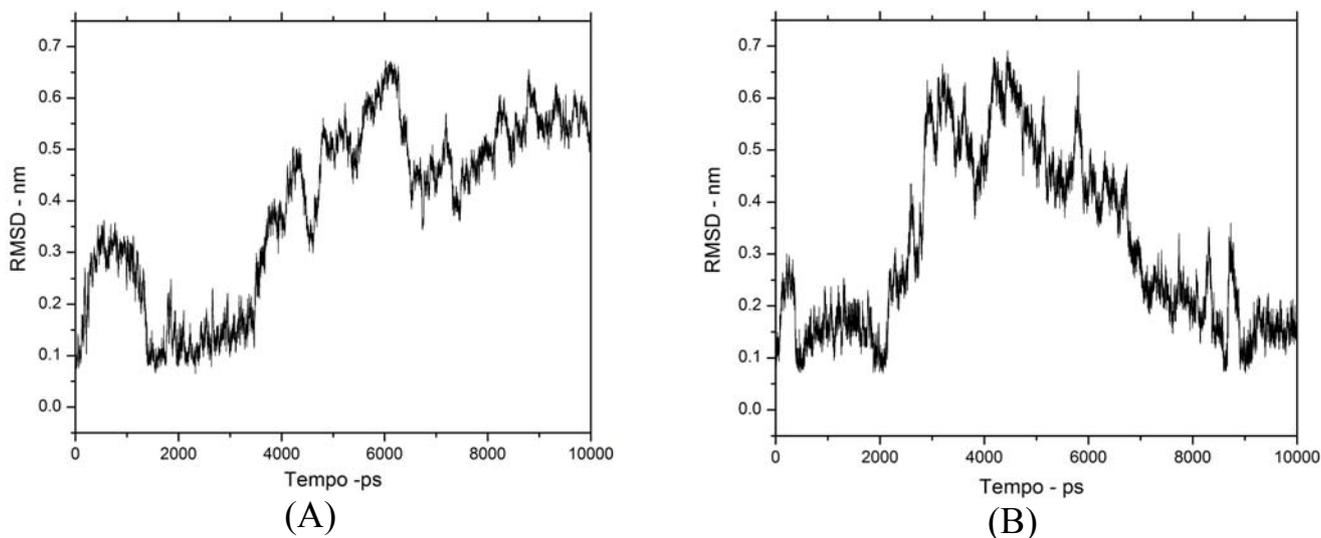


FIGURA 5.10 – RMSD dos homopeptídeos (A) 12Ala e (B) 16Ala com relação à estrutura inicial ( $\alpha$ -hélice).

Os gráficos de RMSD descritos na Figura 5.10 mostram a contribuição das ligações de hidrogênio intramolecular na estabilidade da  $\alpha$ -hélice, sugerindo que cadeias peptídicas mais longas também previnem a entrada de moléculas de água, as quais são capazes de desestabilizar essas interações. Entretanto, para caracterizar mais adequadamente o efeito da hidratação, cálculos de calor de formação e energia livre de solvatação ao longo da trajetória foi realizado e está descrito na Figura 5.11. Cálculos de calor de formação também foram realizados objetivando comparar a contribuição estrutural na estabilidade da estrutura secundária.

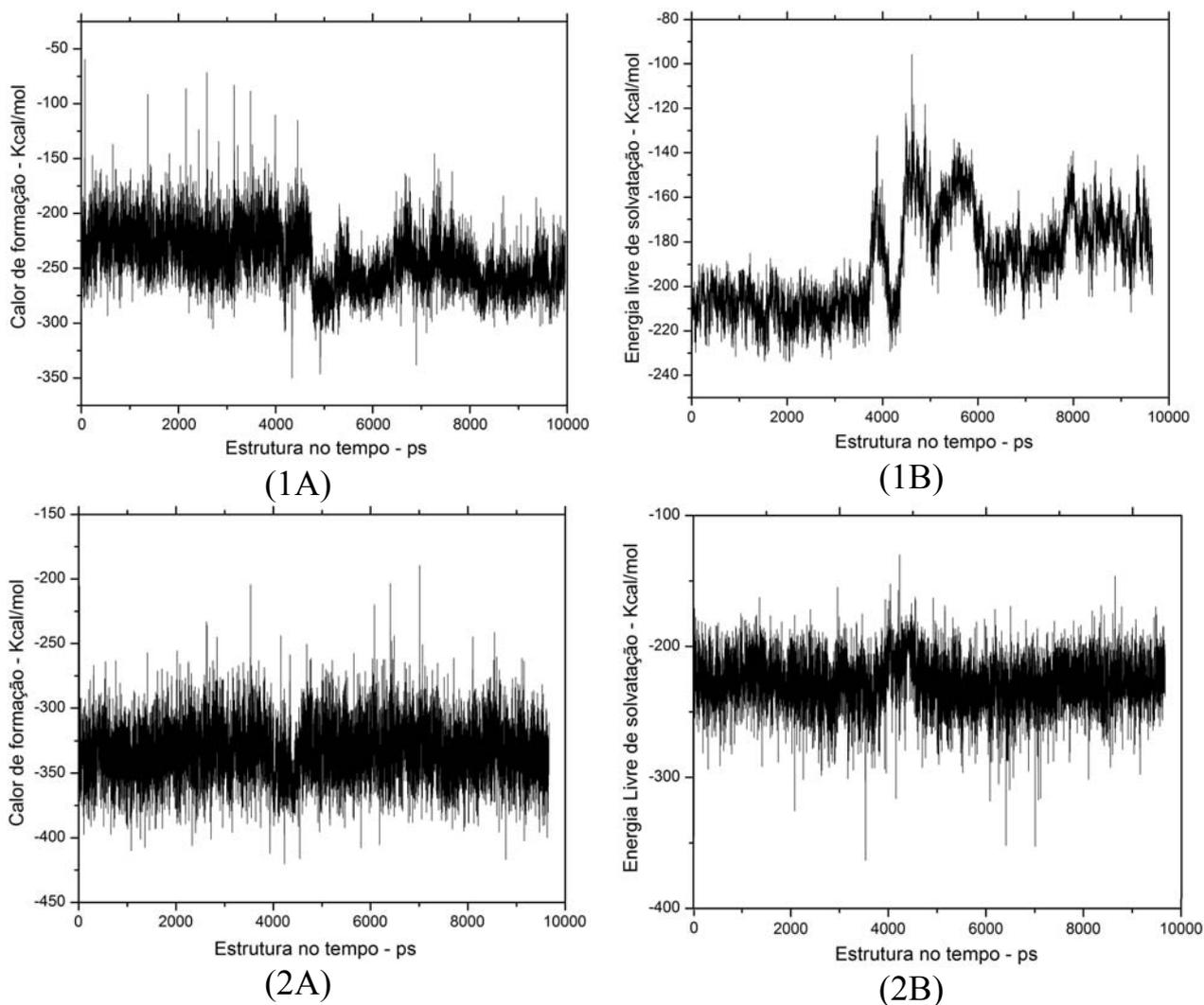


FIGURA 5.11 – Gráficos do (A) Calor de formação da (B) energia livre de solvatação para os peptídeos (1) 12 Ala e (2) 16 Ala.

Os gráficos de calor de formação e energia livre de solvatação descritos na Figura 5.11 concordam com as características estruturais de cada polipeptídeo, descrito pelo gráfico de RMSD na Figura 5.10. Na Figura 5.11-1A, o calor de formação, mostra claramente que a conformação helicoidal do peptídeo com 12 resíduos de aminoácidos é desfavorecida, enquanto que a energia livre de solvatação (Figura 5.11-1B) é responsável por estabilizar a  $\alpha$ -hélice, como observado para os peptídeos com 6 resíduos de aminoácidos. Entretanto, o mesmo comportamento não é observado para o perfil dos gráficos de calor de formação e energia livre de solvatação para o peptídeo com 16 resíduos de alanina, os quais mostram que não existe distinção clara entre o

estado enovelado e desenovelado, justificando a perda e a recuperação da estrutura secundária inicial. Isto concorda com a hipótese de que peptídeos com 16 resíduos de aminoácidos e ricos em alanina estabilizam ou formam hélices estáveis (Marqusee *et al.*, 1989).

Para descrever mais adequadamente a relação entre o efeito da solvatação na estabilização da estrutura secundária dos peptídeos estudados, gráficos do calor de formação e da energia livre de solvatação em função da média dos ângulos  $\phi$  e  $\psi$  são mostrados na Figura 5.12.

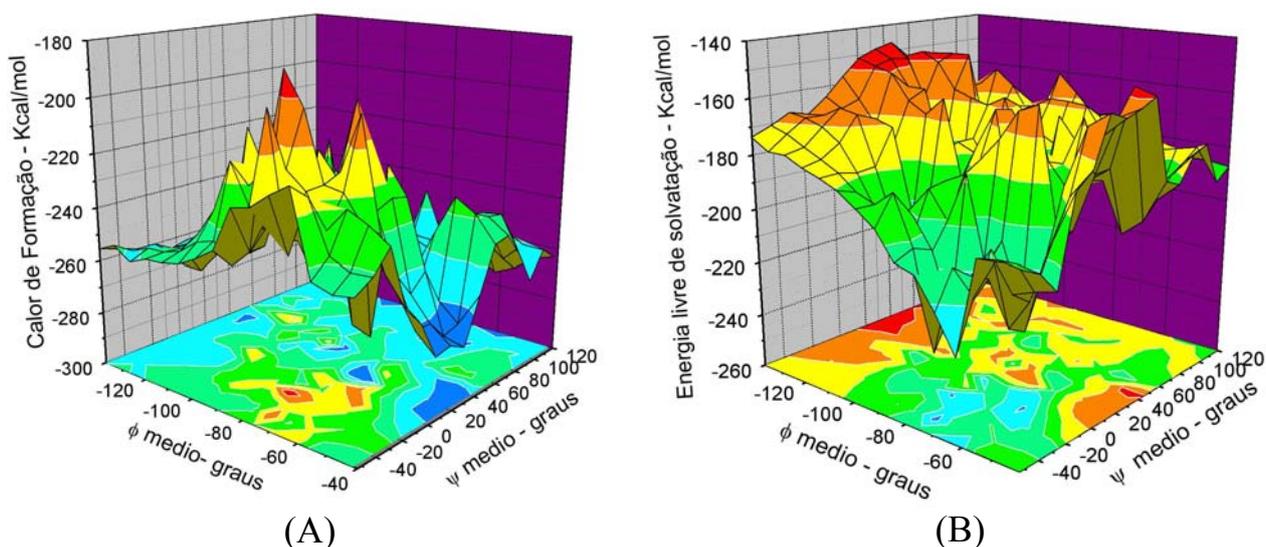


FIGURA 5.12 – Superfícies de energia em função da média dos ângulos diedros  $\phi$  e  $\psi$  para (A) Calor de formação e (B) Energia livre de hidratação para o peptídeo com 12 resíduos de alanina.

As superfícies de energia potenciais do calor de formação e energia livre de solvatação apresentam, como era de se esperar, características opostas, sugerindo que a conformação compreendida como  $\alpha$ -hélice ( $\phi = -60^\circ$  e  $\psi = -45^\circ$ ) é estabilizada pelo solvente. Apesar do gráfico de energia livre de solvatação apresentar um mínimo de energia em torno de  $(-60^\circ$  e  $-45^\circ)$ , foi observado mais dois outros mínimos de energia nos ângulos  $(-80^\circ, -28^\circ)$  e  $(-60^\circ, -12^\circ)$ . Isto sugere que a solvatação também estabiliza outras conformações que possuem características helicoidais. Estas conformações correspondem à situação em que

os dipolos dos grupos amida estão alinhados favorecendo o aumento de dipolo global. Portanto, para verificar a relação do momento dipolar, supostamente maximizado na forma de  $\alpha$ -hélice, com a solvatação do peptídeo, foi verificado o momento dipolar de cada estrutura no intervalo de 1ps ao longo da trajetória de simulação. A Figura 5.13 apresenta a variação do momento dipolar dos homopeptídeos composto por 12 resíduos de alanina.

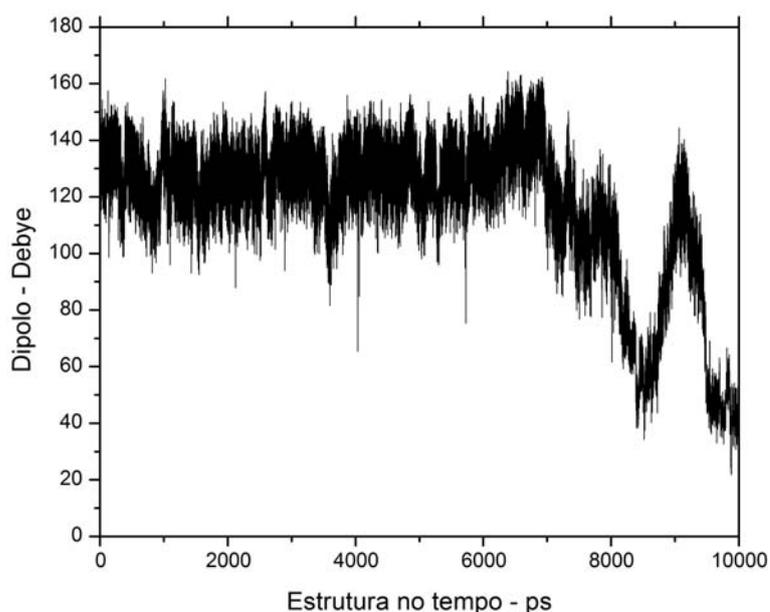


FIGURA 5.13 – Variação do momento dipolar calculado pelo modelo de cargas CM2 classe IV, ao longo da trajetória.

O gráfico da Figura 5.13 mostra que o momento de dipolo da hélice formada pelo peptídeo contribui significativamente para a energia livre de solvatação, favorecendo diretamente a estabilização da estrutura secundária pela solvatação em água. O aumento de resíduos nos peptídeos é capaz de contribuir ainda mais para o aumento do dipolo, devido ao alinhamento dos grupos amida da ligação peptídica. Isto justifica o efeito do solvente na estabilização da  $\alpha$ -hélice com o aumento do número de resíduos.

O perfil oposto entre o calor de formação e a energia livre de solvatação sugere que o processo de enovelamento, ou de formação da estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice envolva um equilíbrio energético entre as energias livre de

solvatação e calor de formação, de forma que a energia mais favorável vai direcionar o enovelamento ou desenovelamento do peptídeo.

De acordo com o modelo que descreve o processo de enovelamento como hierárquico, nos sugere que a solvatação do peptídeo por moléculas de água favoreça a formação da  $\alpha$ -hélice, e após formado a estrutura secundária em hélice, as cadeias hidrofóbicas ficam expostas externamente, favorecendo interações hidrofóbicas entre outras hélices ou qualquer outro arranjo com cadeias hidrofóbicas expostas, resultando no chamado colapso hidrofóbico, o qual é responsável pela formação da estrutura terciária de algumas proteínas.

De acordo com os resultados até o momento apresentado, foi mostrado que quanto maior o tamanho da hélice de um peptídeo, maior será sua estabilidade em solução aquosa. Para reforçar esta hipótese, foi calculada a contribuição energética do calor de formação, da energia livre de solvatação e consequentemente da energia livre total do sistema no estado enovelado ( $\phi \approx -57 \pm 15^\circ$  e  $\psi \approx -47 \pm 15^\circ$ ) e desenovelado ( $\phi$  e  $\psi$  aleatório). Este resultado é mostrado na Tabela 5.4.

TABELA 5.4 – Contribuição energética do calor de formação, energia livre de solvatação e energia livre total na formação da  $\alpha$ -hélice.

Peptídeo	$\Delta(\Delta H_f)$ entre hélice e randômica (kcal/mol)	$\Delta(\Delta G_{solv.})$ entre hélice e randômica (kcal/mol)	$\Delta(\Delta G_{total})$ entre hélice e randômica (kcal/mol)
6Ala	19,70	-16,30	3,40
12Ala	29,84	-33,28	-3,44
16Ala	7,81	-16,05	-8,24

$$*\Delta(\Delta G_{total}) = \Delta(\Delta H_f) + \Delta(\Delta G_{solv.})$$

De acordo com a Tabela 5.4, a variação energia livre total do sistema ( $\Delta\Delta G_{total}$ ) revelou ser diretamente proporcional, ou cada vez mais favorável (negativa) com o aumento do número de resíduos de alanina nos peptídeos. O valor positivo de 3,4 kcal/mol mostra uma maior influência do calor de

formação na estabilidade do peptídeo, justificando a relativa instabilidade da hexaalanina; por outro lado, os valores negativos de -3,44 e -8,24 kcal/mol para os peptídeos de 12 e 16 resíduos, respectivamente, justificam a maior estabilidade da conformação helicoidal desses peptídeos em solução. Entretanto, a estabilidade de -3,44 kcal/mol da estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice em relação à estrutura randômica, para o peptídeo com 12 resíduos de aminoácidos, não é capaz de justificar o fato do homopolipeptídeo não permanecer ou retornar à sua estrutura inicial helicoidal, como observado para o peptídeo com 16 resíduos. Para ilustrar esta questão, a energia livre total do sistema em função da média dos ângulos  $\phi$  e  $\psi$ , para os peptídeos com 12 e 16 resíduos de aminoácidos é apresentada na Figura 5.14.

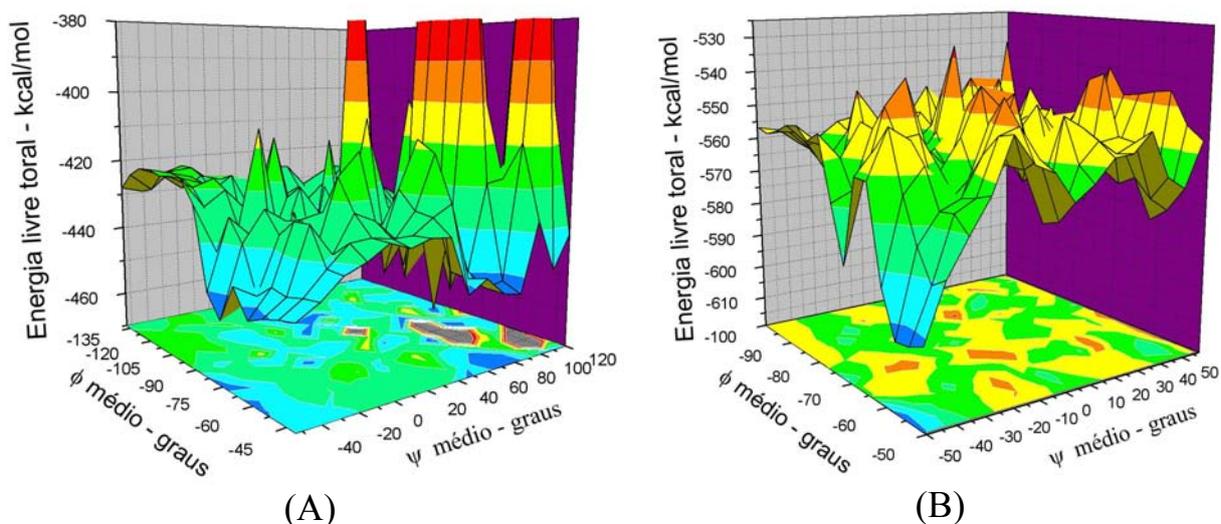


FIGURA 5.14 – Variação da energia livre total do sistema em função da média dos ângulos diedros  $\phi$  e  $\psi$  para o (A) peptídeo com 12 resíduos de alanina e para o (B) peptídeo com 16 resíduos de alanina.

A Figura 5.14 mostra claramente a diferença da superfície de energia potencial para os peptídeos com 12 e 16 resíduos de alanina. Dessa forma, considerando a superfície de energia para o peptídeo com 12 resíduos (Figura 5.14A), pode-se observar a presença de vários mínimos de energia, incluindo a região compreendida pela  $\alpha$ -hélice, cujos ângulos  $\phi$  e  $\psi$  ao redor de  $-60,2^\circ$  e

-45,9°, respectivamente, apresenta um valor de energia livre total de aproximadamente -451,8 kcal/mol. Entretanto, apesar da média de energia das estruturas helicoidais do peptídeo (12Ala) ser mais estável por 3,44 kcal/mol (Tabela 5.4) que a média das estruturas randômicas, existem outras conformações específicas em que o homopolipeptídeo apresenta uma energia livre total 4,9 kcal/mol mais estável do que as estruturas randômicas. Estas estruturas altamente estáveis, que possuem mínimos ao redor de  $\phi \approx -69^\circ$  e  $\psi \approx 75^\circ$  (Figura 5.14A), possuem uma conformação, que além de serem estáveis no vácuo, possuem os grupamentos polares expostos à água, favorecendo a estabilidade das mesmas em solução aquosa. Isto justifica o fato do peptídeo com 12 resíduos de alanina não permanecer ou retornar à sua estrutura em  $\alpha$ -hélice durante a simulação por Dinâmica Molecular.

Por outro lado, se considerarmos a superfície de energia para o peptídeo com 16 resíduos de alanina (Figura 5.14B), pode-se observar claramente que a região ao redor do mínimo global ( $\phi = -57,6^\circ$  e  $\psi = -47,8^\circ$ ), corresponde exatamente à conformação em  $\alpha$ -hélice. A região helicoidal (azul) possui uma estabilização de 8,24 kcal/mol (Tabela 5.4) com relação à região randômica (verde), justificando a elevada estabilidade de sua estrutura secundária. Além disso, devido ao efeito de temperatura (a agitação térmica do peptídeo e das moléculas de água) o peptídeo perdeu parte da estrutura helicoidal e assumiu outras conformações (semi-hélices) situadas nos mínimos de energia local da superfície de energia potencial (Figura 5.14B), os quais são somente 4,9 kcal/mol mais estáveis que as conformações randômicas. Isto favoreceu o retorno do peptídeo à sua conformação inicial em  $\alpha$ -hélice, como observado no gráfico de RMSD na Figura 5.10.

Entretanto, apesar dos dados de energia obtidos por métodos quânticos estarem bem correlacionados com os dados obtidos na simulação por Dinâmica Molecular, uma aplicação mais sistemática dessa metodologia requer uma reparametrização do campo de força. Isto é bastante válido principalmente para

a variação de cargas, que se negligenciada resultará em comportamentos opostos para a energia livre de solvatação, pois será considerada somente a área acessível ao solvente, justificando o processo espontâneo do desenovelamento do peptídeo utilizando-se Dinâmica Molecular clássica.

### **5.3.2 – Outras aplicabilidades do método QM/MM sequencial.**

Nos sistemas moleculares, a maior parte das interações intermoleculares são de caráter eletrostático e uma das grandes limitações da utilização da Mecânica Molecular para a descrição de sistemas físicos reside na utilização de campos de força, cujos parâmetros não variam ao longo da simulação. Dessa forma, a variação na distribuição de cargas e efeitos de polarização não são levados em consideração nas simulações clássicas. Entretanto, com a posse da metodologia QM/MM sequencial, torna-se possível verificar o efeito do solvente na polarização de cargas e na reatividade de moléculas, uma vez que esses sistemas são tratados quanticamente. O modelo de solvatação SM5.42R deriva as cargas parciais dos átomos utilizando o modelo de cargas CM2 classe IV (Li *et al.*, 1998a; Li *et al.*, 1998c).

Para avaliar a variação de cargas ao longo da trajetória, foi calculado o desvio quadrático médio (RMSD) das cargas de cada átomo do peptídeo com relação às suas cargas inicial e com relação às cargas do campo de força. Para tanto, foi utilizado o peptídeo hexaalanina como modelo, devido ao seu pequeno tamanho e facilidade de caracterização dos átomos individualmente. A Figura 5.15 mostra os desvios quadráticos médio (RMSD) máximo das cargas parciais de cada átomo.

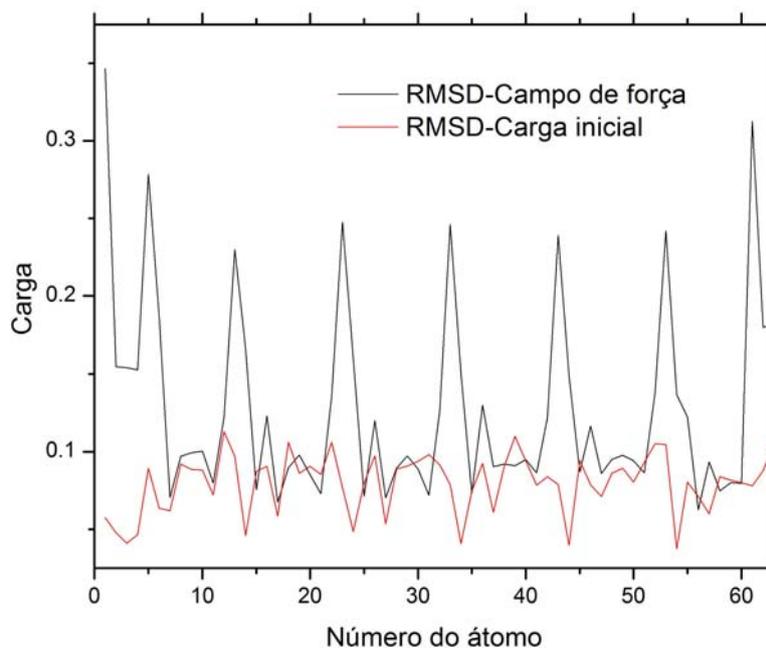


FIGURA 5.15 – RMSD máximo das cargas: a) Cargas obtidas quanticamente com relação às cargas do campo de força; b) cargas quânticas da estrutura inicial em  $\alpha$ -hélice em relação carga quântica da estrutura ao longo da simulação. Os átomos estão numerados a partir do N-terminal em direção ao C-terminal.

Os resultados da Figura 5.15 mostram evidentemente que as cargas dos peptídeos obtidas quanticamente podem variar até 0,3 unidades com relação às cargas parametrizadas no campo de força. Os átomos que apresentaram maior variação de carga com relação ao campo de força são os átomos de nitrogênio e o átomo de carbono do grupo carboxil.

A variação de carga dos átomos com relação à carga inicial, não apresentou grandes variações, chegando ao valor de 0,1 com relação à estrutura inicial. Entretanto, esta variação nos sugere que a variação de carga é estritamente dependente da conformação do peptídeo, ocorrendo uma redistribuição de carga durante o processo de desenovelamento do peptídeo.

Portanto, com base nesses resultados para a variação de carga dos átomos do polipeptídeo é possível propor que essa metodologia QM/MM sequencial poderá ser utilizada para reparametrizar as cargas do campo de força original, visando descrever melhor processos moleculares.

Além disso, a potencialidade de se utilizar a presente metodologia QM/MM sequencial seria importar características estruturais provenientes da Dinâmica Molecular, onde são levados em consideração condições de pressão e temperatura diferentes, e obter informações eletrônicas das conformações amostradas. Dessa forma, pode-se obter informações da estrutura eletrônica como energias dos orbitais HOMO e LUMO, de cada conformação amostrada.

Como peptídeos exclusivamente alifáticos não apresentam significativa reatividade, nenhuma informação como energia de ionização é relevante. Entretanto, visando demonstrar uma possível aplicabilidade da metodologia QM/MM sequencial descrita por esse trabalho, será demonstrado a variação da energia de HOMO e de LUMO no vácuo e em solução do homopeptídeo com 6 resíduos de alanina. A Figura 5.16 mostra a energia desses orbitais em função da estrutura observada em cada tempo de simulação.

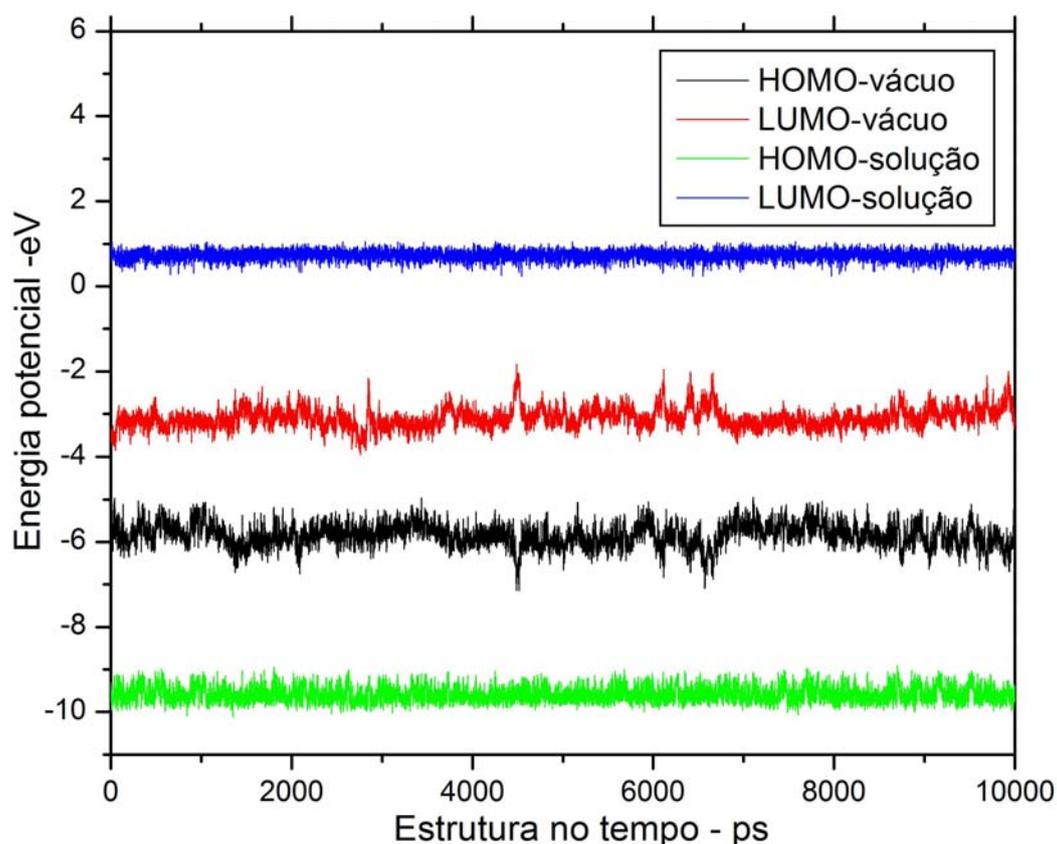


FIGURA 5.16 – Variação das energias de HOMO e LUMO para a hexaalánina no vácuo e em solução ao longo da trajetória simulada.

Como era esperado, a Figura 5.16 mostra que com a inclusão do efeito de polarização pelo contínuo dielétrico da água, ocorre um aumento da diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO. Além disso, considerando as energias dos orbitais de fronteira no vácuo, observa-se uma considerável variação; entretanto, se considerarmos os mesmos orbitais em solução, observa-se negligenciada variação de energia, mostrando o efeito do solvente na reatividade ou estrutura eletrônica do peptídeo em estudo.

Com base nesses resultados aqui apresentados, fica evidente a aplicação da presente metodologia QM/MM sequencial na descrição dos orbitais de fronteira, incluindo efeitos de solvente, de compostos com elevados graus de liberdade, cuja reatividade depende da sua conformação.

## 5.6 – Conclusão

A utilização da metodologia QM/MM sequencial permitiu a caracterização da estrutura eletrônica de várias conformações de polipeptídeos em solução, a partir da amostragem em solvente explícito pelo método de Dinâmica Molecular. A simulação clássica por Dinâmica Molecular de homopeptídeos contendo 6 resíduos de aminoácidos mostrou o processo de desenovelamento instantâneo desses peptídeos em água; e a análise das estruturas desses homopeptídeos, utilizando métodos quânticos, revelou que a estrutura em  $\alpha$ -hélice é energeticamente desfavorável. Os cálculos de energia livre de solvatação utilizando métodos de solvente contínuo mostraram que a água contribui na formação ou estabilização da  $\alpha$ -hélice, exceto para a glicina, a qual não apresenta preferência por  $\alpha$ -hélice ou folha- $\beta$ . De forma geral, os dados termodinâmicos concordam com a hipótese de que o tamanho da cadeia lateral dos aminoácidos e a blindagem que os mesmos exercem ao acesso de moléculas de água na cadeia principal dos peptídeos é diretamente proporcional à estabilidade da  $\alpha$ -hélice dos mesmos em solução aquosa. A metodologia

QM/MM sequencial utilizada mostrou ser adequada na caracterização das propriedades de cada aminoácido na estrutura de homopeptídeos e mostrou ser capaz de prever a tendência de um peptídeo em formar  $\alpha$ -hélice e a característica hidrofóbica ou hidrofílica do mesmo. A utilização da metodologia QM/MM sequencial na descrição da estabilidade da  $\alpha$ -hélice de homopeptídeos contendo 12 e 16 resíduos de aminoácidos revelou que existe um equilíbrio entre a energia estrutural do peptídeo (calor de formação) e o efeito do solvente (energia livre de solvatação) na estabilização da  $\alpha$ -hélice. Dessa forma, a espontaneidade do processo de formação da estrutura secundária é direcionada pela energia total do sistema ( $\Delta H_f + \Delta G_{\text{solv}}$ ). Além da descrição estrutural do desenovelamento de polipeptídeos, a metodologia QM/MM descrita nesse trabalho é capaz de corrigir algumas limitações do campo de força como a variação de cargas em função da estrutura molecular; e nesse contexto, essa metodologia pode ser utilizada na reparametrização de campos de força. Dessa forma, a metodologia QM/MM aqui descrita pode ser utilizada para obter a estrutura eletrônica de conformações que foram amostradas incluindo-se efeitos de temperatura, pressão e interações explícita com o solvente, sendo a presente metodologia de grande valia do estudo termodinâmico de compostos com elevado grau de liberdade conformacional.



## Capítulo 6

# CONCLUSÕES

O presente trabalho contribui para um melhor entendimento da estrutura molecular dos biopolímeros quitina e quitosana em solução e do processo de estabilização da  $\alpha$ -hélice de polipeptídeos em água. A utilização de modelos teóricos simulados por Dinâmica Molecular permitiu a elucidação de situações em que os métodos experimentais não são capazes de descrever em detalhe. A modificação no campo de força original para carboidratos permitiu a caracterização molecular de filamentos e nanopartículas de quitinas e quitosanas, avaliando o efeito do grau de acetilação, pH e força iônica na conformação e solubilidade desses biopolímeros em solução aquosa. As simulações por Dinâmica Molecular mostraram que as cadeias de quitina em solução são relativamente rígidas e assumem a conformação em hélice 2; este seu equilíbrio conformacional não é afetado pela força iônica até 1,1 M. As cadeias de quitosana são mais flexíveis e podem assumir cinco motivos estruturais diferentes: hélices 2,3,4,5 e hélice 2 relaxada. A distribuição de grupos acetil em blocos resulta em maior rigidez à cadeia polissacarídica e favorece a conformação em hélice 2, enquanto que a distribuição randômica de grupos acetil favorece conformações menos simétricas como a hélice 2 relaxada e hélice 5. A rigidez e conformações mais simétricas (hélice 2) adotadas pelas cadeias de quitina e quitosana é diretamente proporcional à estabilidade das ligações de hidrogênio intramolecular entre o átomo HO3 de uma unidade de açúcar e o átomo O5 do próximo monossacarídeo. A estabilidade desta interação intermolecular ( $\text{HO3}_{(n)} \cdots \text{O5}_{(n+1)}$ ) é altamente afetada pela orientação e mobilidade de moléculas de água em suas vizinhanças. A fraca e baixa ocorrência de ligações de hidrogênio intermolecular e interações hidrofóbicas envolvendo os grupos *N*-acetil sugerem que as mesmas não são as responsáveis pela agregação e a insolubilidade de nanopartículas de quitina e quitosana.

Estas interações intermoleculares são forças secundárias no processo de agregação e são mais pronunciadas em nanopartículas que possuem uma sequência contínua de resíduos *N*-acetilglicosamina. Cálculos de energia livre de solvatação indicaram que a solubilidade da quitosana é controlada principalmente por interações eletrostáticas entre a cadeia de polissacarídeo e as moléculas de água. Assim, o grupo amino protonado ( $\text{NH}_3^+$ ) na vizinhança do átomo C2 da quitosana em pH ácido, pode ser capaz de aumentar a mobilidade de moléculas de água na região do átomo O3, desestabilizando a ligação de hidrogênio  $\text{HO3}_{(n)} \cdots \text{O5}_{(n+1)}$ . O grupo amino desprotonado ( $\text{NH}_2$ ) e a presença de grupos *N*-acetil são capazes de orientarem e diminuir a mobilidade de moléculas de água ao redor da cadeia polissacarídica, criando uma rede de ligações de hidrogênio estáveis entre as moléculas de água e as cadeias de polissacarídeos, estabilizando os agregados e tornando as nanopartículas insolúveis. O estudo desses biopolímeros mostra uma correlação entre solubilidade e conformação: a mobilidade e orientação de moléculas de água são responsáveis pela solubilidade e a estabilidade da ligação de hidrogênio intramolecular  $\text{HO3}_{(n)} \cdots \text{O5}_{(n+1)}$ ; esta interação reduz a flexibilidade da cadeia polissacarídica, favorecendo determinadas conformações; esta rigidez ou a flexibilidade também é capaz de influenciar na mobilidade e orientação de moléculas de água. Por esse motivo, a rigidez e a solubilidade desses polímeros é inversamente proporcional à habilidade dos mesmos em formar ligações de hidrogênio intramolecular do tipo  $\text{HO3}_{(n)} \cdots \text{O5}_{(n+1)}$ . Além disso, a utilização da metodologia QM/MM sequencial permitiu uma nova abordagem no estudo da estabilidade da estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice de peptídeos em solução. Os resultados mostraram que a estabilidade da  $\alpha$ -hélice de homopeptídeos compostos por somente 6 resíduos de aminoácidos é diretamente proporcional ao tamanho da cadeia lateral do peptídeo. Os cálculos do calor de formação e energia livre de solvatação mostraram que a estrutura em  $\alpha$ -hélice é instável no vácuo e que a solvatação contribui para a estabilização desta estrutura

secundária. O aumento do número de resíduos em homopeptídeos de alanina contribui no aumento do momento dipolar total dos peptídeos, contribuindo para a solvatação e favorecendo a estabilidade da estrutura secundária helicoidal. Assim, o processo de formação/destruição de  $\alpha$ -hélices é direcionado pelo equilíbrio entre a energia utilizada para formar a  $\alpha$ -hélice ( $\Delta H_f$ ) e a energia liberada pelo processo de solvatação ( $\Delta H_{solv.}$ ), de forma que a energia total do sistema ( $\Delta H_f + \Delta G_{solv.}$ ) é o responsável por direcionar a espontaneidade deste processo. A metodologia QM/MM, da forma como foi utilizada neste trabalho, mostrou-se adequada para descrição da estrutura eletrônica e da termodinâmica de homopeptídeos. Esta mesma metodologia poderá ser utilizada para a caracterização de compostos com elevado grau de liberdade conformacional.

As etapas realizadas neste trabalho sobre a caracterização molecular de quitina e quitosana resultaram em dois artigos na revista *Journal of Chemical Theory and Computation* (JCTC):

FRANCA, E. F., R. D. LINS, L. C. G. FREITAS & T. P. STRAATSMA. Characterization of Chitin and Chitosan Molecular Structure in Aqueous Solution. *Journal of Chemical Theory and Computation*, **4** (12): 2141, 2008.

FRANCA, E. F., R. D. LINS & L. C. G. FREITAS. Conformation and aggregate stability of chitin and chitosan at different degrees of acetylation *Journal of Chemical Theory and Computation*, Submetido.



## Capítulo 7

### SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

A utilização da metodologia QM/MM sequencial favoreceu o entendimento da contribuição da solvatação na estabilização da  $\alpha$ -hélice em homopeptídeos em solução. Entretanto, para a descrição de propriedades específicas de determinados compostos que possuem elevado grau de liberdade, torna-se necessário amostrar conformações no espaço de fase em que esta propriedade está mais presente. Dessa forma, como sugestão para trabalho futuro, será proposto uma nova metodologia QM/MM sequencial, a qual visa atribuir maior peso estatístico às configurações que apresentem as propriedades de interesse.

O procedimento delineado pode ser resumido segundo o algoritmo abaixo:

1 - Uma trajetória convenientemente longa é gerada utilizando as condições contorno adequadas, obtendo-se um conjunto  $\{ P_0 \}$  de configurações do sistema.

2 - Do conjunto total de configurações  $\{ P_0 \}$  separa-se um sub-conjunto  $\{ P_1 \}$  das configurações cujos valores de energia total e/ou potencial estão dentro de uma flutuação, previamente escolhida, com relação à energia média e/ou potencial calculadas em  $\{ P_0 \}$ . Alternativamente, este conjunto  $\{ P_1 \}$  pode ser escolhido retirando de  $\{ P_0 \}$  conformações semelhantes a uma predeterminada.

3 - O conjunto  $\{ P_1 \}$  é o espaço amostral para a realização de um cálculo QM/MM utilizando o método de Monte Carlo Metropolis.

Ou seja, as configurações de  $\{ P_1 \}$  são utilizadas para uma amostragem com o método de Monte Carlo Metropolis. Nessa nova amostragem, a energia do sistema deve ser calculada utilizando um método híbrido QM/MM. Em geral, esta etapa pode ser efetuada com uma metodologia de química quântica menos dispendiosa computacionalmente.

4 - Obtém-se valores para energia média na amostragem realizada na

etapa 3, bem como informações sobre estrutura .

5 - Do conjunto { P1 }, separa-se um sub-conjunto { P2 } das configurações cujos valores de energia & estrutura estão próximos da média calculada em { P1 }, segundo um quesito de proximidade previamente definido.

6- Acrescente-se a este conjunto { P2 } configurações extraídas de { Po } obedecendo ao critério de proximidade definido. Obtém-se o um { P2 } 'estendido'.

7 - O conjunto { P2 } é o espaço amostral para a realização de um novo cálculo QM/MM utilizando nova amostragem com o método de Monte Carlo Metropolis. Nesta nova etapa, pode-se utilizar um método de Química Quântica mais sofisticado para calcular novos valores para a energia total do sistema.

A seqüência de passos descrita acima pode ser repetida sucessivamente. Note-se que em cada novo ciclo o número de configurações amostradas é menor, mas as mesmas são representativas do sub-conjunto das configurações mais prováveis do sistema. Desde que o número de configurações diminui progressivamente, pode-se gradativamente utilizar metodologias de química quântica com maior precisão, sem aumentar drasticamente o tempo computacional. E os cálculos são efetuados em configurações do sistema escolhidas com significância estatística.

No presente trabalho de tese, os cálculos efetuados utilizaram somente o sub-conjunto de configurações { P1 }. Dessa forma, a realização das demais etapas do algoritmo descrito acima, permitirá obter um conjunto de estruturas que são capazes de representar mais adequadamente o processo de formação/destruição da estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIBA, S. "Studies on Chitosan .3. Evidence for the Presence of Random and Block Copolymer Structures in Partially N-Acetylated Chitosans". *International Journal of Biological Macromolecules*, **13**(1):40, 1991.

ALHAMBRA, C.; WU, L.; ZHANG, Z. Y. & GAO, J. L. "Walden-inversion-enforced transition-state stabilization in a protein tyrosine phosphatase". *Journal of the American Chemical Society*, **120**(16):3858, 1998.

ALLEN, M. P. & TILDESLEY, D. J. *Computer Simulation of Liquids*. Oxford, Oxford University Press. 1987

ALLEN, M. P. & TILDESLEY, D. J. *Computer Simulation in Chemical Physics*. The Netherlands, Kluwe Academic Publishers. 1993

AMARA, P.; FIELD, M. J.; ALHAMBRA, C. & GAO, J. L. "The generalized hybrid orbital method for combined quantum mechanical/molecular mechanical calculations: formulation and tests of the analytical derivatives". *Theoretical Chemistry Accounts*, **104**(5):336, 2000.

AMIJI, M. M. "Pyrene fluorescence study of chitosan self-association in aqueous solution". *Carbohydrate Polymers*, **26**:211, 1995.

ANTOSIEWICZ, J.; GILSON, M. K. & MCCAMMON, J. A. "ACETYLCHOLINESTERASE - EFFECTS OF IONIC-STRENGTH AND DIMERIZATION ON THE RATE CONSTANTS". *Israel Journal of Chemistry*, **34**(2):151, 1994.

ASSFELD, X. & RIVAIL, J. L. "Quantum chemical computations on parts of large molecules: The ab initio local self consistent field method". *Chemical Physics Letters*, **263**(1):100, 1996.

ATKINS, E. "CONFORMATIONS IN POLYSACCHARIDES AND COMPLEX CARBOHYDRATES". *Journal of Biosciences*, **8**(1-2):375, 1985.

ATKINS, P. & PAULA, J. D. *Físico-Química*. Rio de Janeiro, LTC, v.2. 2008

BAXTER, A.; DILLON, M.; TAYLOR, K. D. A. & ROBERTS, G. A. F. "Improved Method for Ir Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitosan". *International Journal of Biological Macromolecules*, **14**(3):166, 1992.

BERENDSEN, H. J. C.; GRIGERA, J. R. & STRAATSMA, T. P. "The Missing Term in Effective Pair Potentials". *Journal of Physical Chemistry*, **91**(24):6269, 1987.

BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; VAN GUNSTEREN, W. F.; DINOLA, A. & HAAK, J. R. "Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath". *Journal of Chemical Physics*, **81**(8):3684, 1984.

BERTH, G. & DAUTZENBERG, H. "The degree of acetylation of chitosans and its effect on the chain conformation in aqueous solution". *Carbohydrate Polymers*, **47**(1):39, 2002.

BERTH, G.; DAUTZENBERG, H. & PETER, M. G. "Physico-chemical characterization of chitosans varying in degree of acetylation". *Carbohydrate Polymers*, **36**(2):205, 1998.

BLACKWEL, J. "STRUCTURE OF BETA-CHITIN OR PARALLEL CHAIN SYSTEMS OF POLY-BETA-(1→4)-N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE". *Biopolymers*, **7**(3):281, 1969.

BLAIR, J. T.; KROGHJESPersen, K. & LEVY, R. M. "Solvent Effects on Optical-Absorption Spectra - the  $1a_1-1a_2$  Transition of Formaldehyde in Water". *Journal of the American Chemical Society*, **111**(18):6948, 1989.

BRENEMAN, C. M. & WIBERG, K. B. "Determining Atom-Centered Monopoles from Molecular Electrostatic Potentials - the Need for High Sampling Density in Formamide Conformational-Analysis". *Journal of Computational Chemistry*, **11**(3):361, 1990.

BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F. M.; ARGUELLES-MONAL, W.; DESBRIERES, J. & RINAUDO, M. "An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization". *Polymer*, **42**(8):3569, 2001.

BURKET, U. F. & ALLINGER, N. L. *Molecular Mechanics*. Washington, DC, American Chemical Society. 1982. 177 p.

CARLSTROM, D. "THE CRYSTAL STRUCTURE OF ALPHA-CHITIN (POLY-N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE)". *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, **3**(5):669, 1957.

CHO, Y. W.; JANG, J.; PARK, C. R. & KO, S. W. "Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins". *Biomacromolecules*, **1**(4):609, 2000.

- CHO, Y. W.; PARK, S. A.; HAN, T. H.; SON, D. H.; PARK, J. S.; OH, S. J.; MOON, D. H.; CHO, K. J.; AHN, C. H.; BYUN, Y.; KIM, I. S.; KWON, I. C. & KIM, S. Y. "In vivo tumor targeting and radionuclide imaging with self-assembled nanoparticles: Mechanisms, key factors, and their implications". *Biomaterials*, **28**(6):1236, 2007.
- COUTINHO, K. & CANUTO, S. "Solvent effects from a sequential Monte Carlo - Quantum mechanical approach": Academic Press Inc, 1997. p.89
- COUTINHO, K.; CANUTO, S. & ZERNER, M. C. "A Monte Carlo-quantum mechanics study of the solvatochromic shifts of the lowest transition of benzene". *Journal of Chemical Physics*, **112**(22):9874, 2000.
- COUTINHO, K.; DE OLIVEIRA, M. J. & CANUTO, S. "Sampling configurations in Monte Carlo simulations for quantum mechanical studies of solvent effects". *International Journal of Quantum Chemistry*, **66**(3):249, 1998.
- CRAMER, C. J. & TRUHLAR, D. G. "An Scf Solvation Model for the Hydrophobic Effect and Absolute Free-Energies of Aqueous Solvation". *Science*, **256**(5054):213, 1992.
- CRAMER, C. J. & TRUHLAR, D. G. "Implicit solvation models: Equilibria, structure, spectra, and dynamics". *Chemical Reviews*, **99**(8):2161, 1999.
- DAGGETT, V. & LEVITT, M. "Molecular-Dynamics Simulations of Helix Denaturation". *J. Mol. Biol.*, **223**(4):1121, 1992.
- DAVIS, M. E. & MCCAMMON, J. A. "CALCULATING ELECTROSTATIC FORCES FROM GRID-CALCULATED POTENTIALS". *Journal of Computational Chemistry*, **11**(3):401, 1990.
- DE OLIVEIRA, O. V.; DE MOURA, A. F. & GOMIDE FREITAS, L. C. "A mechanism for the stabilization of the secondary structure of a peptide by liquid ethylene glycol and its aqueous solutions". *Theochem-J. Mol. Struct.*, **808**(1):93, 2007.
- DEWAR, M. J. S.; ZOEBISCH, E. G.; HEALY, E. F. & STEWART, J. J. P. "The Development and Use of Quantum-Mechanical Molecular-Models .76. Am1 - a New General-Purpose Quantum-Mechanical Molecular-Model". *Journal of the American Chemical Society*, **107**(13):3902, 1985.
- DORUKER, P. & BAHAR, I. "Role of water on unfolding kinetics of helical peptides studied by molecular dynamics simulations". *Biophysical Journal*, **72**(6):2445, 1997.

DUTTA, P. K.; DUTTA, J. & TRIPATHI, V. S. "Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications". *J. Sci. Ind. Res.*, **63**(1):20, 2004.

DWELTZ, N. E. "STRUCTURE OF BETA-CHITIN". *Biochimica Et Biophysica Acta*, **51**(2):283, 1961.

ERRINGTON, N.; HARDING, S. E.; VARUM, K. M. & ILLUM, L. "Hydrodynamic Characterization of Chitosans Varying in Degree of Acetylation". *International Journal of Biological Macromolecules*, **15** (2):113, 1993.

ESSMAN, U.; PERERA, L.; BERKOWITZ, M. L.; DARDEN, T.; LEE, H. & PEDERSEN, L. G. "A Smooth Particle Mesh Ewald Method". *J. Chem. Phys.*, **103**(19):8577, 1995.

EWALD, P. "Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale". *Ann. Phys.*, **64**:34, 1921.

FIELD, M. J.; BASH, P. A. & KARPLUS, M. "A Combined Quantum-Mechanical and Molecular Mechanical Potential for Molecular-Dynamics Simulations". *Journal of Computational Chemistry*, **11**(6):700, 1990.

GAO, J. L.; AMARA, P.; ALHAMBRA, C. & FIELD, M. J. "A generalized hybrid orbital (GHO) method for the treatment of boundary atoms in combined QM/MM calculations". *Journal of Physical Chemistry A*, **102**(24):4714, 1998.

GAO, J. L.; LI, N. Q. & FREINDORF, M. "Hybrid QM/MM simulations yield the ground and excited state pK(a) difference: Phenol in aqueous solution". *Journal of the American Chemical Society*, **118**(20):4912, 1996.

GAO, J. L. & XIA, X. F. "A Priori Evaluation of Aqueous Polarization Effects through Monte-Carlo Qm-Mm Simulations". *Science*, **258**(5082):631, 1992.

GARDNER, K. H. & BLACKWELL, J. "REFINEMENT OF STRUCTURE OF BETA-CHITIN". *Biopolymers*, **14**(8):1581, 1975.

GEAR, C. W. *Numerical Initial Value Problems in Ordinary Differential Equations*. New York, Prentice-Hall Englewoodcliffs. 1971

GIBBS, G.; TOBIN, J. M. & GUIBAL, E. "Sorption of Acid Green 25 on chitosan: Influence of experimental parameters on uptake kinetics and sorption isotherms". *Journal of Applied Polymer Science*, **90**(4):1073, 2003.

GIESEN, D. J.; CHAMBERS, C. C.; CRAMER, C. J. & TRUHLAR, D. G. "Solvation model for chloroform based on class IV atomic charges". *Journal of Physical Chemistry B*, **101**(11):2061, 1997.

HAWKINS, G. D.; GIESEN, D. J.; LYNCH, G. C.; CHAMBERS, C. C.; ROSSI, I.; STORER, J. W.; LI, J.; THOMPSON, J. D.; P. WINGET; LYNCH, B. J.; RINALDI, D.; LIOTARD, D. A.; CRAMER, C. J. & TRUHLAR, D. G. *AMSOL-version 7.0*. Minneapolis: University of Minnesota 2003.

HESS, B.; BEKKER, H.; BERENDSEN, H. J. C. & FRAAIJE, J. "LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations". *Journal of Computational Chemistry*, **18**(12):1463, 1997.

HINCHLIFFE, A. *Molecular Modeling for Beginners*. Chichester, John Wiley & Sons Ltd. 2003

HO, L. L.; MACKERELL, A. D. & BASH, P. A. "Proton and hydride transfers in solution: Hybrid QM/MM free energy perturbation study". *Journal of Physical Chemistry*, **100**(11):4466, 1996.

HOCKNEY, R. W. The potential calculation and some applications. In: B. Alder, S. Fernbach, *et al* (Ed.). *Methods in Computational Physics*. New York/London: Academic Press, v.9, 1970. The potential calculation and some applications

HOLST, M.; BAKER, N. & WANG, F. "Adaptive multilevel finite element solution of the Poisson-Boltzmann equation I. Algorithms and examples (vol 21, pg 1319, 2000)". *Journal of Computational Chemistry*, **22**(4):475, 2001.

HU, Y.; DING, Y.; DING, D.; SUN, M. J.; ZHANG, L. Y.; JIANG, X. Q. & YANG, C. Z. "Hollow chitosan/poly(acrylic acid) nanospheres as drug carriers". *Biomacromolecules*, **8**(4):1069, 2007.

HYPERCUBE. *HyperChem, release 7.0, Evaluation copy 2002*.

ISMER, L.; IRETA, J.; BOECK, S. & NEUGEBAUER, J. "Phonon spectra and thermodynamic properties of the infinite polyalanine alpha helix: A density-functional-theory-based harmonic vibrational analysis". *Physical Review E*, **71**(3), 2005.

JANG, M. K.; KONG, B. G.; JEONG, Y. I.; LEE, C. H. & NAH, J. W. "Physicochemical characterization of alpha-chitin, beta-chitin, and gamma-chitin separated from natural resources". *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **42**(14):3423, 2004.

KAMEDA, T.; MIYAZAWA, M.; ONO, H. & YOSHIDA, M. "Hydrogen bonding structure and stability of alpha-chitin studied by C-13 solid-state NMR". *Macromolecular Bioscience*, **5**(2):103, 2005.

KAMINSKI, G. A.; FRIESNER, R. A.; TIRADO-RIVES, J. & JORGENSEN, W. L. "OPLS-AA/L force field for proteins: Using accurate quantum mechanical data." *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **220**:U279, 2000.

KAWAHARA, M.; YUI, T.; OKA, K.; ZUGENMAIER, P.; SUZUKI, S.; KITAMURA, S.; OKUYAMA, K. & OGAWA, K. "Fourth 3D structure of the chitosan molecule: Conformation of chitosan in its salts with medical organic acids having a phenyl group". *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **67**(7):1545, 2003.

KENTSIS, A. & SOSNICK, T. R. "Trifluoroethanol promotes helix formation by destabilizing backbone exposure: Desolvation rather than native hydrogen bonding defines the kinetic pathway of dimeric coiled coil folding". *Biochemistry*, **37**(41):14613, 1998.

KHANDELWAL, P.; SETH, S. & HOSUR, R. V. "CD and NMR investigations on trifluoroethanol-induced step-wise folding of helical segment from scorpion neurotoxin". *European Journal of Biochemistry*, **264**(2):468, 1999.

KIM, I. Y.; SEO, S. J.; MOON, H. S.; YOO, M. K.; PARK, I. Y.; KIM, B. C. & CHO, C. S. "Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications". *Biotechnology Advances*, **26**(1):1, 2008.

KNORR, D. "Dye Binding-Properties of Chitin and Chitosan". *Journal of Food Science*, **48**(1):36, 1983.

KRAUSS, M.; JENSEN, J. O. & HAMEKA, H. F. "Electronic-Structure of the Excited-States and Phenol Fluorescence". *Journal of Physical Chemistry*, **98**(40):9955, 1994.

LAINE, R. A. "A calculation of all possible oligosaccharides isomers both branch and linear yields  $1.05 \times 10^{12}$  structures for a reducing hexasaccharide: The isomer barrier to development of single-methods saccharide sequencing or synthesis systems". *Glycobiology*, **4**:8, 1994.

LAVERTU, M.; FILION, D. & BUSCHMANN, D. "Heat-transfer of protons from chitosan to glycerol phosphate chitosan precipitation and gelation". *Biomacromolecules*, **9**:640, 2008.

- LAZARIDIS, T. & KARPLUS, M. "Effective energy function for proteins in solution". *Proteins-Structure Function and Genetics*, **35**(2):133, 1999.
- LEACH, A. R. *Molecular Modelling. Principles and Applications*, Addison Wesley Longman Limited. 2001
- LEHNINGER, A. L. *Princípios de bioquímica*. São Paulo, Sarvier. 2006
- LERTWORASIRIKUL, A.; NOGUCHI, K.; OGAWA, K. & OKUYAMA, K. "Plausible molecular and crystal structures of chitosan/HI type II salt". *Carbohydrate Research*, **339**(4):835, 2004a.
- LERTWORASIRIKUL, A.; TSUE, S.; NOGUCHI, K.; OKUYAMA, K. & OGAWA, K. "Two different molecular conformations found in chitosan type II salts". *Carbohydrate Research*, **338**(11):1229, 2003.
- LERTWORASIRIKUL, A.; YOKOYAMA, S.; NOGUCHI, K.; OGAWA, K. & OKUYAMA, K. "Molecular and crystal structures of chitosan/HI type I salt determined by X-ray fiber diffraction". *Carbohydrate Research*, **339**(4):825, 2004b.
- LEVINE, I. N. *Quantum Chemistry*. New York, Prentice-Hall. 1991
- LI, J.; WILLIAMS, B. W.; CRAMER, C. J. & TRUHLAR, D. G. "Partial charges, dipole moments, and solvation energies for ground and excited states of molecules by the INDO/S, CM2, and SM5.42R methods." *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **215**:U273, 1998a.
- LI, J. B.; HAWKINS, G. D.; CRAMER, C. J. & TRUHLAR, D. G. "Universal reaction field model based on ab initio Hartree-Fock theory". *Chemical Physics Letters*, **288**(2):293, 1998b.
- LI, J. B.; ZHU, T. H.; CRAMER, C. J. & TRUHLAR, D. G. "New class IV charge model for extracting accurate partial charges from wave functions". *Journal of Physical Chemistry A*, **102**(10):1820, 1998c.
- LI, J. B.; ZHU, T. H.; HAWKINS, G. D.; WINGET, P.; LIOTARD, D. A.; CRAMER, C. J. & TRUHLAR, D. G. "Extension of the platform of applicability of the SM5.42R universal solvation model". *Theoretical Chemistry Accounts*, **103**(1):9, 1999.
- LI, N. & BAI, R. "Development of chitosan-based granular adsorbents for enhanced and selective adsorption performance in heavy metal removal". *Water Science and Technology*, **54**(10):103, 2006.

LI, Q. X.; SONG, B. Z.; YANG, Z. Q. & FAN, H. L. "Electrolytic conductivity behaviors and solution conformations of chitosan in different acid solutions". *Carbohydrate Polymers*, **63**(2):272, 2006.

LINDAHL, E.; HESS, B. & VAN DER SPOEL, D. "GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis". *Journal of Molecular Modeling*, **7**(8):306, 2001.

LINS, R. D. & HUNENBERGER, P. H. "A new GROMOS force field for hexopyranose-based carbohydrates". *Journal of Computational Chemistry*, **26**(13):1400, 2005.

LIOTARD, D. A.; HEALY, E. F.; RUIZ, J. M. & DEWAR, M. J. S. *AMPAC-Version 2.1*: Quantum Chemistry Program Exchange program no. 506, QCPE Bulletin 9, 123 1989.

LUQUE, F. J.; CURUTCHET, C.; MUNOZ-MURIEDAS, J.; BIDON-CHANAL, A.; SOTERAS, I.; MORREALE, A.; GELPI, J. L. & OROZCO, M. "Continuum solvation models: Dissecting the free energy of solvation". *Physical Chemistry Chemical Physics*, **5**(18):3827, 2003.

MACKERELL, A. D.; BASHFORD, D.; BELLOTT, M.; DUNBRACK, R. L.; EVANSECK, J. D.; FIELD, M. J.; FISCHER, S.; GAO, J.; GUO, H.; HA, S.; JOSEPH-MCCARTHY, D.; KUCHNIR, L.; KUCZERA, K.; LAU, F. T. K.; MATTOS, C.; MICHNICK, S.; NGO, T.; NGUYEN, D. T.; PRODHOM, B.; REIHER, W. E.; ROUX, B.; SCHLENKRICH, M.; SMITH, J. C.; STOTE, R.; STRAUB, J.; WATANABE, M.; WIORKIEWICZ-KUCZERA, J.; YIN, D. & KARPLUS, M. "All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins". *Journal of Physical Chemistry B*, **102**(18):3586, 1998.

MAGHAMI, G. G. & ROBERTS, G. A. F. "Studies on the Adsorption of Anionic Dyes on Chitosan". *Makromol. Chem.*, **189**(10):2239, 1988.

MARQUSEE, S.; ROBBINS, V. H. & BALDWIN, R. L. "Unusually Stable Helix Formation in Short Alanine-Based Peptides". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**(14):5286, 1989.

MAZEAU, K. & RINAUDO, M. "The prediction of the characteristics of some polysaccharides from molecular modeling. Comparison with effective behavior". *Food Hydrocolloids*, **18**(6):885, 2004.

- MAZEAU, K.; WINTER, W. T. & CHANZY, H. "Molecular and Crystal Structure of a High-Temperature Polymorph from Chitosan and Electron Diffraction Data". *Macromolecules*, **27**:7606, 1994.
- MINKE, R. & BLACKWELL, J. "STRUCTURE OF ALPHA-CHITIN". *Journal of Molecular Biology*, **120**(2):167, 1978.
- MO, Y. R. & GAO, J. L. "Ab initio QM/MM simulations with a molecular orbital-valence bond (MOVb) method: Application to an S(N)2 reaction in water". *Journal of Computational Chemistry*, **21**(16):1458, 2000.
- MOGILEVSKAYA, E. L.; AKOPOVA, T. A.; ZELENETSKII, A. N. & OZERIN, A. N. "The crystal structure of chitin and chitosan". *Polymer Science Series A*, **48**(2):116, 2006.
- MOMANY, F. A.; RONE, R. & KUNZ, H. "Quanta3.3/Charm22 Parameters". *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **204**:42, 1992.
- MORGON, N. H. & COUTINHO, K. *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*. São Paulo, Editora Livraria da Física. 2007
- MORTON, K. W. & MAYERS, D. F. *Numerical Solution of Partial Differential Equations, An Introduction*, Cambridge University Press. 2005
- MULLIKEN, R. S. "Electronic Population Analysis on Lcao-Mo Molecular Wave Functions .1." *Journal of Chemical Physics*, **23**(10):1833, 1955.
- MURPHY, R. B.; PHILIPP, D. M. & FRIESNER, R. A. "Frozen orbital QM/MM methods for density functional theory". *Chemical Physics Letters*, **321**(1):113, 2000.
- MUZZARELLI, R. A. A. & ROCCHETTI, R. "Determination of the Degree of Acetylation of Chitosans by 1st Derivative Ultraviolet Spectrophotometry". *Carbohydrate Polymers*, **5**(6):461, 1985.
- NICHOLLS, A. & HONIG, B. "A RAPID FINITE-DIFFERENCE ALGORITHM, UTILIZING SUCCESSIVE OVER-RELAXATION TO SOLVE THE POISSON-BOLTZMANN EQUATION". *Journal of Computational Chemistry*, **12**(4):435, 1991.
- NYSTROM, B.; KJONIKSEN, A. L. & IVERSEN, C. "Characterization of association phenomena in aqueous systems of chitosan of different hydrophobicity". *Advances in Colloid and Interface Science*, **79**:81, 1999.

OGAWA, K. "Chain Conformation of Chitin and Chitosan". *Nippon Nogeikagaku Kaishi-Journal of the Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry*, **62**(8):1225, 1988.

OGAWA, K. & YUI, T. "Structure and Function of Chitosan .3. Crystallinity of Partially N-Acetylated Chitosans". *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **57**(9):1466, 1993.

OGAWA, K. & YUI, T. "Structure and Function of Chitosan .4. Effect of Explosion on the Crystalline Polymorphism of Chitin and Chitosan". *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **58**(5):968, 1994.

OGAWA, K.; YUI, T. & OKUYAMA, K. "Three D structures of chitosan". *International Journal of Biological Macromolecules*, **34**(1):1, 2004.

OKUYAMA, K.; NOGUCHI, K.; KANENARI, M.; EGAWA, T.; OSAWA, K. & OGAWA, K. "Structural diversity of chitosan and its complexes". *Carbohydrate Polymers*, **41**(3):237, 2000a.

OKUYAMA, K.; NOGUCHI, K.; MIYAZAWA, T.; YUI, T. & OGAWA, K. "Molecular and crystal structure of hydrated chitosan". *Macromolecules*, **30**(19):5849, 1997.

OKUYAMA, K.; OSAWA, K.; HANAFUSA, Y.; NOGUCHI, K. & OGAWA, K. "Relaxed 2/1-helical conformation of type II chitosan has a tetrasaccharide motif". *Journal of Carbohydrate Chemistry*, **19**(6):789, 2000b.

OROZCO, M. & LUQUE, F. J. "Optimization of the Cavity Size for Ab-Initio Mst-Scrf Calculations of Monovalent Ions". *Chemical Physics*, **182**(2):237, 1994.

ORTONA, O.; D'ERRICO, G.; MANGIAPIA, G. & CICCARELLI, D. "The aggregative behavior of hydrophobically modified chitosans with high substitution degree in aqueous solution". *Carbohydrate Polymers*, **74**(1):16, 2008.

OTTOY, M. H.; VARUM, K. M. & SMIDSROD, O. "Compositional heterogeneity of heterogeneously deacetylated chitosans". *Carbohydrate Polymers*, **29**(1):17, 1996.

PACE, C. N. & SCHOLTZ, J. M. "A helix propensity scale based on experimental studies of peptides and proteins". *Biophysical Journal*, **75**(1):422, 1998.

- PAULING, L. & COREY, R. B. "The Configuration of Polypeptide Chains in Proteins". *Fortschritte Der Chemie Organischer Naturstoffe*, **11**:180, 1954.
- PEDRONI, V. I.; SCHULZ, P. C.; GSCHAIDER, M. E. & ANDREUCETTI, N. "Chitosan structure in aqueous solution". *Colloid and Polymer Science*, **282**(1):100, 2003.
- PELLETIER, A.; LEMIRE, I.; SYGUSCH, J.; CHORNET, E. & OVEREND, R. P. "Chitin Chitosan Transformation by Thermomechanochemical Treatment Including Characterization by Enzymatic Depolymerization". *Biotechnology and Bioengineering*, **36**(3):310, 1990.
- PETUKHOV, M.; UEGAKI, K.; YUMOTO, N. & SERRANO, L. "Amino acid intrinsic alpha-helical propensities III: Positional dependence at several positions of C terminus". *Protein Science*, **11**(4):766, 2002.
- PHILIPPOVA, O. E.; VOLKOV, E. V.; SITNIKOVA, N. L.; KHOKHLOV, A. R.; DESBRIERES, J. & RINAUDO, M. "Two types of hydrophobic aggregates in aqueous solutions of chitosan and its hydrophobic derivative". *Biomacromolecules*, **2**(2):483, 2001.
- PLIEGO, J. R. "Continuum solvation models: Fundamentals." *Quimica Nova*, **29**(3):535, 2006.
- PLIEGO, J. R. & RIVEROS, J. M. "Parametrization of the PCM model for calculating solvation free energy of anions in dimethyl sulfoxide solutions". *Chemical Physics Letters*, **355**(5-6):543, 2002.
- PONDER, J. W. & CASE, D. A. "Force fields for protein simulations". *Protein Simulations*, **66**:27, 2003.
- POPURI, S. R.; KALYANI, S.; KACHIREDDY, S. R. & KRISHNAIAH, A. "Biosorption of hexavalent chromium from aqueous solution by using prawn pond algae (Sphaeroplea)". *Indian Journal of Chemistry Section a-Inorganic Bio-Inorganic Physical Theoretical & Analytical Chemistry*, **46**(2):284, 2007.
- PRESS, W. H.; TEUKOLSKY, B. P. F. S. A. & VETTERLING, W. T. *Numerical Recipes*. Cambridge, Cambridge University Press. 1989
- QUN, G. & AJUN, W. "Effects of molecular weight, degree of acetylation and ionic strength on surface tension of chitosan in dilute solution". *Carbohydrate Polymers*, **64**(1):29, 2006.

RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C. & SASISEKHARAN, V. "Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations". *Journal of Molecular Biology*, **7**(1):95, 1963.

RAMAKRISHNAN, C. & PRASAD, N. "STUDY OF HYDROGEN BONDS IN AMINO ACIDS AND PEPTIDES". *International Journal of Protein Research*, **3**(4):209, 1971.

RAPPÉ, A. K. & CASEWIT, C. J. *Molecular Mechanics Across Chemistry*. Sausalito, University Science books. 1997

RAVI KUMAR, M. N. V. "A review of chitin and chitosan applications". *React. Funct. Polym.*, **46**(1):1, 2000.

REUTER, N.; DEJAEGERE, A.; MAIGRET, B. & KARPLUS, M. "Frontier bonds in QM/MM methods: A comparison of different approaches". *Journal of Physical Chemistry A*, **104**(8):1720, 2000.

REVOREDO, O. B.; NIETO, O. M.; SUAREZ, Y.; GARCIA, V.; FERNANDEZ, M.; IRAIZOZ, A. & HENRIQUES, R. D. "Applications of chitin and chitosan in pharmacy and cosmetology". *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **28**:S7, 2006.

RINAUDO, M. "Chitin and chitosan: Properties and applications". *Progress in Polymer Science*, **31**(7):603, 2006.

RINAUDO, M.; LEDUNG, P.; GEY, C. & MILAS, M. "Substituent Distribution on O, N-Carboxymethylchitosans by H-1-Nmr and C-13 Nmr". *International Journal of Biological Macromolecules*, **14**(3):122, 1992.

ROBYT, J. F. *Essentials of Carbohydrate Chemistry*. New York, Springer Verlag. 1998

ROGERS, R. D.; CARRUTH, A. D.; WILLAUER, H. D.; SPEAR, S. K. & HUDDLESTON, J. G. "Quantum mechanical models (AMSOL) for the prediction of the distribution of organic molecules in aqueous biphasic systems." *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **218**:U680, 1999.

RUDALL, K. M. & KENCHING, W. "CHITIN SYSTEM". *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **48**(4):597, 1973.

RUEL-GARIEPY, E. & LEROUX, J. C. *Chitosan: A natural polycation with multiple applications*. Montreal, American Chemical Society. 2006. 384 p. (Polysaccharides for Drug Delivery and Pharmaceutical Applications)

- SANNAN, T.; KURITA, K. & IWAKURA, Y. "Studies on Chitin .2. Effect of Deacetylation on Solubility". *Makomol. Chem.*, **177**(12):3589, 1976.
- SCHAEFER, M.; BARTELS, C. & KARPLUS, M. "Solution conformations and thermodynamics of structured peptides: Molecular dynamics simulation with an implicit solvation model". *J. Mol. Biol.*, **284**(3):835, 1998.
- SCHATZ, C.; VITON, C.; DELAIR, T.; PICHOT, C. & DOMARD, A. "Typical physicochemical behaviors of chitosan in aqueous solution". *Biomacromolecules*, **4**(3):641, 2003.
- SCHMITT, U. W. & VOTH, G. A. "The computer simulation of proton transport in water". *Journal of Chemical Physics*, **111**(20):9361, 1999.
- SINGH, U. C. & KOLLMAN, P. A. "A Water Dimer Potential Based on Abinitio Calculations Using Morokuma Component Analyses". *Journal of Chemical Physics*, **83**(8):4033, 1985.
- SINGH, U. C.; PATTABIRAMAN, N.; LANGRIDGE, R. & KOLLMAN, P. A. "Molecular Mechanical Studies of D(Cgtacg)<sub>2</sub> - Complex of Triostin-a with the Middle A.T Base-Pairs in Either Hoogsteen or Watson Crick Pairing". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **83**(17):6402, 1986.
- SMITHA, B.; SRIDHAR, S. & KHAN, A. A. "Chitosan-poly(vinyl pyrrolidone) blends as membranes for direct methanol fuel cell applications". *Journal of Power Sources*, **159**(2):846, 2006.
- SOLOMONS, T. W. G. *Química Orgânica*, LTC, v.1. 2005. 766 p.
- SORLIER, P.; DENUZIERE, A.; VITON, C. & DOMARD, A. "Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan". *Biomacromolecules*, **2**(3):765, 2001.
- SORLIER, P.; VITON, C. & DOMARD, A. "Relation between solution properties and degree of acetylation of chitosan: Role of aging". *Biomacromolecules*, **3**(6):1336, 2002.
- STEWART, J. J. P. "Optimization of Parameters for Semiempirical Methods .1. Method". *Journal of Computational Chemistry*, **10**(2):209, 1989.

- STORER, J. W.; GIESEN, D. J.; CRAMER, C. J. & TRUHLAR, D. G. "Class-Iv Charge Models - a New Semiempirical Approach in Quantum-Chemistry". *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **9**(1):87, 1995.
- STRUSZCZYK, H. "Microcrystalline Chitosan .1. Preparation and Properties of Microcrystalline Chitosan". *Journal of Applied Polymer Science*, **33**(1):177, 1987.
- STRYER, L. *Biochemistry*. New York, W.H. Freeman & Co Ltd. 2002. 1100 p.
- SUGIYAMA, J.; BOISSET, C.; HASHIMOTO, M. & WATANABE, T. "Molecular directionality of beta-chitin biosynthesis". *Journal of Molecular Biology*, **286**(1):247, 1999.
- THERY, V.; RINALDI, D.; RIVAIL, J. L.; MAIGRET, B. & FERENCZY, G. G. "Quantum-Mechanical Computations on Very Large Molecular-Systems - the Local Self-Consistent-Field Method". *Journal of Computational Chemistry*, **15**(3):269, 1994.
- TIRONI, I. G.; SPERB, R.; SMITH, P. E. & VAN GUNSTEREN, W. F. "A GENERALIZED REACTION FIELD METHOD FOR MOLECULAR-DYNAMICS SIMULATIONS". *Journal of Chemical Physics*, **102**(13):5451, 1995.
- TOMASI, J. & PERSICO, M. "Molecular-Interactions in Solution - an Overview of Methods Based on Continuous Distributions of the Solvent". *Chemical Reviews*, **94**(7):2027, 1994.
- URAGAMI, T.; YOSHIDA, F. & SUGIHARA, M. "Studies of Synthesis and Permeabilities of Special Polymer Membranes .51. Active-Transport of Halogen Ions through Chitosan Membranes". *Journal of Applied Polymer Science*, **28**(4):1361, 1983.
- VACHOUD, L.; ZYDOWICZ, N. & DOMARD, A. "Physicochemical behaviour of chitin gels". *Carbohydr. Res.*, **326**(4):295, 2000.
- VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; GROENHOF, G.; MARK, A. E. & BERENDSEN, H. J. C. "GROMACS: Fast, flexible, and free". *Journal of Computational Chemistry*, **26**(16):1701, 2005.
- VAN GUNSTEREN, W. F.; BAKOWIES, D.; BURGI, R.; CHANDRASEKHAR, I.; CHRISTEN, M.; DAURA, X.; GEE, P.; GLATTLI, A.; HANSSON, T.; OOSTENBRINK, C.; PETER, C.; PITERA, J.; SCHULER,

- L.; SOARES, T. A. & YU, H. B. "Molecular dynamics simulation of biomolecular systems". *Chimia*, **55**(10):856, 2001.
- VANDERSPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; BUUREN, A. R. V.; APOL, E.; MEULENHOF, P. J.; TIELEMAN, D. P.; SIJBERS, A. L. T. M.; FEENSTRA, K. A.; DRUNEN, R. V. & BERENDSEN, H. J. C. *Gromacs User Manual version 3.3*, [www.gromacs.org](http://www.gromacs.org). 2005
- VANGUNSTEREN, W. F. & BERENDSEN, H. J. C. "Algorithms for Macromolecular Dynamics and Constraint Dynamics". *Molecular Physics*, **34**(5):1311, 1977.
- VERLET, L. "Computer Experiments on Classical Fluids .I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules". *Physical Review*, **159**(1):98, 1967.
- VIEIRA, R. S. & BEPPU, M. M. "Dynamic and static adsorption and desorption of Hg(II) ions on chitosan membranes and spheres". *Water Research*, **40**(8):1726, 2006a.
- VIEIRA, R. S. & BEPPU, M. M. "Interaction of natural and crosslinked chitosan membranes with Hg(II) ions". *Colloids and Surfaces a- Physicochemical and Engineering Aspects*, **279**(1):196, 2006b.
- WARSHEL, A. & LEVITT, M. "Theoretical Studies of Enzymic Reactions - Dielectric, Electrostatic and Steric Stabilization of Carbonium-Ion in Reaction of Lysozyme". *Journal of Molecular Biology*, **103**(2):227, 1976.
- YUI, T.; IMADA, K.; OKUYAMA, K.; OBATA, Y.; SUZUKI, K. & OGAWA, K. "Molecular and Crystal-Structure of the Anhydrous Form of Chitosan". *Macromolecules*, **27**(26):7601, 1994.
- YUI, T.; TAKI, N.; SUGIYAMA, J. & HAYASHI, S. "Exhaustive crystal structure search and crystal modeling of beta-chitin". *International Journal of Biological Macromolecules*, **40**(4):336, 2007.
- ZHOU, D.; ZHANG, L. & GUO, S. L. "Mechanisms of lead biosorption on cellulose/chitin beads". *Water Research*, **39**(16):3755, 2005.
- ZUGENMAIER, P. & SARKO, A. "The variable virtual bond". *Fiber Diffraction Methods: ACS Symposium Series*, 1980. p.225