

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

ESTUDO DE ESTRUTURAS, INTERAÇÕES E
RECONHECIMENTO MOLECULAR EM CARBOIDRATOS
UTILIZANDO SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL

Cristina Saldanha Pereira

Tese apresentada como parte dos
requisitos para a 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 FAPESP/CAPES

São Carlos – SP

2004

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

P436ee

Pereira, Cristina Saldanha.

Estudo de estruturas, interações e reconhecimento molecular em carboidratos utilizando simulação computacional / Cristina Saldanha Pereira. -- São Carlos : UFSCar, 2004.

134 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Química teórica. 2. Simulação de biomoléculas. 3. Dinâmica molecular. 4. Trehalose. 5. Ciclodextrinas. 6. Bioproteção. I. Título.

CDD: 541.2 (20^a)

Dedico esta tese a minha família em agradecimento a todo esforço empregado na minha formação. A meus pais, irmãos, sobrinhos e cunhados.

A Riccardo, per la felicità che questo amore infinito ha portato e per quanto questo mi ha fatto crescere. Per il supporto, con l'affetto e l'aiuto professionale. Per l'allegria nella convivenza e per fare di me una persona migliore.

“No, non perdetevi il tempo ragazzi, non è poi tanto quanto pensate, dopo l'inverno arriva l'estate, camminano le ore, non si fermano i minuti...”

(Angelo Branduardi)

Ao Prof. Dr. **Luiz** Carlos Gomide Freitas, agradeço a oportunidade, orientação, carinho e amizade ao longo de todos estes anos de trabalho conjunto. Minha formação como cientista é fruto do seu trabalho e meu desempenho profissional será também reflexo da sua forma tão especial de orientar.

Ao Dr. **Roberto** Lins, agradeço a orientação e disponibilidade constantes, a toda ajuda e ensinamentos que foram essenciais para a realização deste trabalho e em especial para a etapa desenvolvida em Zurique. Sobretudo, agradeço a grande amizade, carinho e presença positiva que foram para mim sempre grandes fontes de força e motivação.

I would like to thank Prof. **Philippe** Hünenberger for the opportunity to work in his group at ETH-Zürich. For the confidence in my work, for the secure and methodical way of supervision. For sharing his time, knowledge and ideas in so productive discussions. And the most important, for the friendship and opportunity to follow this scientific “partnership”.

AGRADECIMENTOS

A **Thereza** e **Roberto** (e Phaedra), por todo apoio e ajuda na minha mudança e tempo em Zurique. Pela amizade e carinho, que foram essenciais a minha adaptação a nova vida e ambiente de trabalho. A todos os momentos felizes que tivemos juntos e a confiança, que nos permitiu dividir tanto bons quanto maus momentos.

A **André**, por toda a ajuda e contribuição fundamentais na etapa do trabalho realizada em São Carlos. Pela amizade, e acolhida carinhosa, junto com a Karina e o querido Gabriel, no meu retorno a São Carlos.

A **Daniel**, companheiro de muitas empreitadas, novas descobertas e aprendizado, agradeço a amizade, carinho, companhia alegre e positiva, e a ajuda em momentos cruciais em Zurique.

Aos eternos amigos: **Diogo, Aelson, Eliane, Carla, Tales, Vanessa**, que mesmo longe sempre acompanharam de perto minha vida e meu trabalho, solidários e preocupados nos momentos difíceis, felizes e orgulhosos com as minhas vitórias e felicidade, agradeço a amizade sólida ao longo de todos estes anos e a felicidade por dividir nossas vidas.

A **Fábio**, pela grande ajuda, acolhida e apoio no meu retorno a São Carlos, mas acima de tudo pela amizade e carinho que me dão a certeza que todos estes anos em São Carlos valeram muito não apenas por motivos profissionais.

A **Wilson**, por toda ajuda e apoio, e pela felicidade do tempo que compartilhamos.

Aos colegas do LQT, **Carlos, Luciano, Silvana, Osmair**, pelo companheirismo e convivência feliz.

Ao Professor Wilfried van Gunsteren, pelo apoio financeiro e exemplo positivo durante a realização do trabalho em Zurique.

A todos os colegas do grupo IGC pela ajuda e convivência durante a realização do trabalho em Zurique. Em especial agradeço a **Dra. Indira Chandrasekhar**, **Chris Oostenbrink**, **Mika Kastenholz**, **Markus Christen** e **Ulf Börjesson** cuja ajuda foi indispensável para a realização desta etapa do trabalho.

Às secretárias do PPGQ, **Ariane**, **Cristina** e **Luciani**, pela competência e atenção com que sempre cuidaram dos meus assuntos.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de doutorado e financiamento dos recursos computacionais utilizados.

À CAPES, pela concessão da bolsa PDEE em Zurique.

Ao National Center of Competence in Research (NCCR) in Structural Biology, pelo complemento da bolsa em Zurique.

Ao DQ e ao PPGQ, pelas instalações e recursos oferecidos em São Carlos.

Ao Laboratory of Physical Chemistry, ETH-Zürich pelas instalações e recursos oferecidos em Zurique.

RESUMO

ESTUDO DE ESTRUTURAS, INTERAÇÕES E RECONHECIMENTO MOLECULAR EM CARBOIDRATOS UTILIZANDO SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL. Neste trabalho métodos de química computacional foram utilizados para estudar, a nível atômico, carboidratos derivados da glicose. Dois sistemas de interesse foram considerados: trehalose e ciclodextrinas. O dissacarídeo trehalose é conhecido por suas propriedades bioprotetoras. Produzida em grandes quantidades em organismos capazes de sobreviver a condições extremamente desfavoráveis, a trehalose desempenha seu papel protetor através da estabilização de bioestruturas como proteínas e membranas. No presente estudo, simulações de dinâmica molecular foram utilizadas para investigar a interação da trehalose com uma proteína e uma membrana. Para investigar a interação trehalose-proteína, simulações de dinâmica molecular da proteína lisozima em solução e temperatura ambiente foram conduzidas na presença e ausência de trehalose. Os resultados mostram que as moléculas de trehalose agrupam-se e movem-se em direção à proteína mas não expõem completamente a água da sua superfície ou formam ligações de hidrogênio. Além disso, a presença do açúcar não reduz significativamente flutuações conformacionais na proteína. A interação trehalose-membrana foi investigada realizando-se simulações de uma bicamada lipídica na ausência e presença de duas concentrações de trehalose em duas temperaturas. Os resultados mostram que o açúcar é capaz de minimizar o efeito destrutivo da temperatura elevada e estabilizar a estrutura da bicamada. A trehalose interage com a membrana formando ligações de hidrogênio, porém, as moléculas de água não são completamente removidas da superfície da biomolécula. Na alta temperatura o efeito protetor da trehalose é correlacionado com um aumento no número de ligações de hidrogênio com a membrana e de moléculas de trehalose conectando três ou mais moléculas lipídicas. Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos que apresentam uma cavidade capaz de acomodar e modificar as propriedades de uma grande variedade de moléculas. O comportamento estrutural em solução é determinante para a complexação. Simulações de dinâmica molecular foram realizadas para as três ciclodextrinas naturais (α , β e γ) em solução à temperatura ambiente. Os resultados mostram que a flexibilidade conformacional em água é definida principalmente por flutuações no esqueleto do anel. Ligações de hidrogênio internas entre as hidroxilas secundárias estão presentes em solução e possuem um caráter altamente dinâmico, onde ligações de hidrogênio alternativas são formadas com água. Moléculas de água foram observadas dentro das cavidades e apresentam um tempo de residência nesta região que pode ser vinculado ao tamanho da ciclodextrina.

ABSTRACT

STUDY OF STRUCTURES, INTERACTIONS AND MOLECULAR RECOGNITION IN CARBOHYDRATES USING COMPUTER SIMULATION. In this work, computer simulation methods were applied to investigate glucose-derived carbohydrates in solution at atomistic resolution. The carbohydrates considered were: trehalose and cyclodextrins. The disaccharide trehalose is well known for its bioprotective properties. Produced in large amounts in organisms able to survive extremely damaging conditions trehalose plays its protective role by stabilizing biostructures such as proteins and lipid membranes. In the present study, molecular-dynamics simulations were used to investigate the interaction of trehalose with a protein and a membrane. To investigate the interaction trehalose-protein molecular-dynamics simulations of the protein lysozyme in solution have been carried out in the presence and in the absence of trehalose at room temperature. The results show that the trehalose molecules cluster and move towards the protein, but do neither completely expel water from its surface, nor form hydrogen bonds. Furthermore, the coating by trehalose does not significantly reduce the conformational fluctuations of the protein. The interaction trehalose-membrane was investigated performing simulations of a lipid bilayer in the absence and in the presence of trehalose at two different concentrations and temperatures. The results show that trehalose is able to minimize the disruptive effect of elevated temperature and stabilize the bilayer structure. Trehalose is found to interact directly with the bilayer through hydrogen bonds. However, the water molecules at the bilayer surface are not completely replaced. At high temperature the protective effect of trehalose is correlated with an increase in the number of hydrogen bonds with the bilayer and of trehalose molecules bridging three or more lipid molecules. Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides presenting a cavity able to accommodate and modify the properties of a huge variety of molecules. Their structural behavior in solution is determinant for the complexation abilities. Molecular dynamics simulations have been performed in solution for the three natural (α , β and γ) cyclodextrins at room temperature. Results show that the conformational flexibility in solution is mainly defined by variations in the ring backbone of these molecules. Interglucose secondary hydrogen bonds are present in solution and show a very dynamical character, where alternative hydrogen bonds to water molecules are present. Water molecules were found to exist inside the cavities and present residence times in this region that is dependent on the size of the cyclodextrin molecule.

SUMÁRIO

Capítulo 1- Introdução

1.1- Carboidratos - Estrutura, Funções e Propriedades	1
1.2- Carboidratos - Abordagem Teórica.....	5
1.3- Objetivos.....	7

Capítulo 2- Metodologia

2.1- Mecânica Molecular e Campo de Força.....	8
2.2- Mecânica Estatística.....	11
2.3- Método de Dinâmica Molecular.....	13
2.3.1- Métodos de Integração.....	14
2.3.1.1- Algoritmo de Verlet.....	15
2.3.1.2- Algoritmo de Beeman.....	16
2.3.1.3- Algoritmo <i>Leap-Frog</i>	16
2.4- Condições Periódicas de Contorno.....	17
2.5- Raio de Corte e Convenção de Imagem Mínima.....	18
2.6- Tratamento das Interações Eletrostáticas.....	19
2.6.1- Métodos de Ewald.....	19
2.6.2- Aproximação do Campo de Reação.....	21

Capítulo 3- Interação Trehalose-Proteína

3.1- Introdução.....	23
3.1.1- Trehalose.....	23
3.1.2- Trehalose e Criptobiose.....	24
3.1.3- Trehalose na Estabilização de Membranas e Proteínas.....	27
3.2- Interação Trehalose-Proteína Lisozima.....	29
3.2.1- Métodos.....	29
3.2.1.1- Sistemas Moleculares.....	29
3.2.1.2- Simulações de Dinâmica Molecular.....	30
3.2.1.3- Obtenção das Cargas para Trehalose.....	31
3.2.2- Resultados e Discussões	33
3.2.2.1- Desvios a Partir da Estrutura Inicial	33

3.2.2.2- Interações Trehalose-Proteína.....	36
3.2.2.3- Flutuações Estruturais da Proteína.....	41
3.2.3- Conclusões.....	42

Capítulo 4- Interação Trehalose-Membrana

4.1- Métodos.....	45
4.1.1- Simulações de Dinâmica Molecular.....	45
4.1.2- Sistemas Moleculares.....	46
4.1.3- Equilibração dos Sistemas.....	49
4.1.4- Análises.....	50
4.2- Resultados e Discussões.....	52
4.2.1- Simulações a 325 K.....	52
4.2.2- Simulações a 475 K.....	59
4.2.3- Comparação entre as Simulações a 325 K e 475 K.....	70
4.3- Conclusões.....	71

Capítulo 5- Ciclodextrinas em Solução

5.1- Introdução.....	73
5.1.1- Ciclodextrinas.....	73
5.1.2- Ciclodextrinas - Abordagem Teórica.....	76
5.2- Métodos.....	79
5.2.1- Modelos Moleculares.....	79
5.2.2- Simulações de Dinâmica Molecular.....	82
5.2.3- Análises.....	83
5.3- Resultados e Discussões	85
5.3.1- Estrutura das Ciclodextrinas.....	85
5.3.2- Hidratação e Interação com a Água.....	97
5.4- Conclusões.....	104

Capítulo 6 - Conclusões.....	106
-------------------------------------	------------

Capítulo 7- Referências Bibliográficas.....	109
--	------------

Capítulo 1

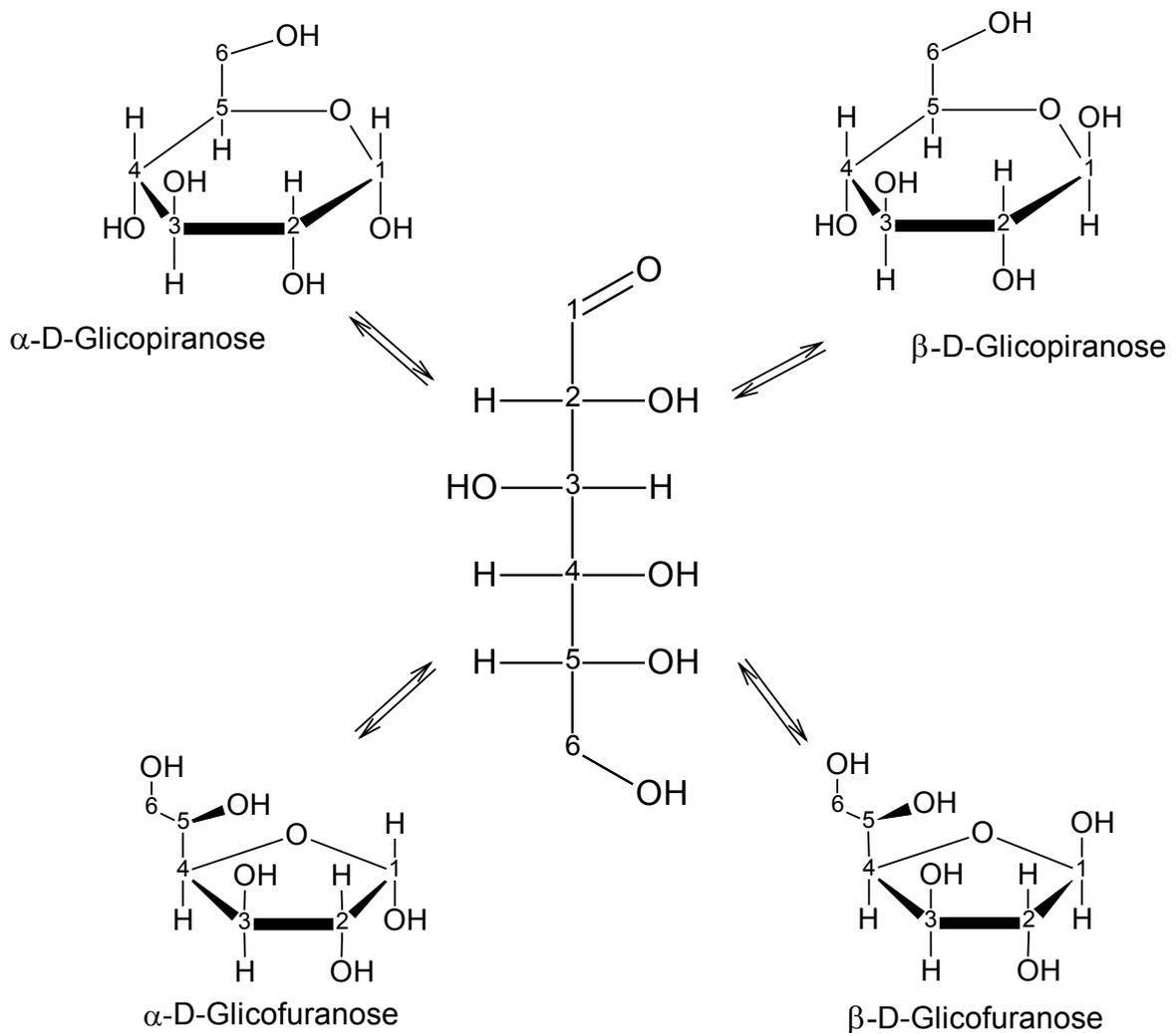
INTRODUÇÃO

1.1- CARBOIDRATOS - ESTRUTURA, FUNÇÕES E PROPRIEDADES

Carboidratos (também denominados sacarídeos, glicídios ou açúcares) representam a mais abundante classe de biomoléculas encontradas na natureza. Formados exclusivamente por átomos de carbono, oxigênio e hidrogênio, estes compostos apresentam funções essenciais para a sobrevivência de organismos das mais variadas espécies. Quimicamente, carboidratos são definidos como polihidroxi-aldeídos (ou aldoses), -cetonas (ou cetoses), -ácidos ou -álcoois com fórmula empírica geral $(CH_2O)_n$. A maioria dos átomos de carbono da estrutura é simétrica e os vários estereoisômeros possuem propriedades físico-químicas e biológicas distintas. Os açúcares encontrados comumente na natureza, denominados açúcares D, apresentam o último carbono assimétrico da cadeia com configuração absoluta R. Os açúcares da série L, ou seja com configuração absoluta S no último carbono assimétrico, são raramente encontrados na natureza (ROBYT, 1998).

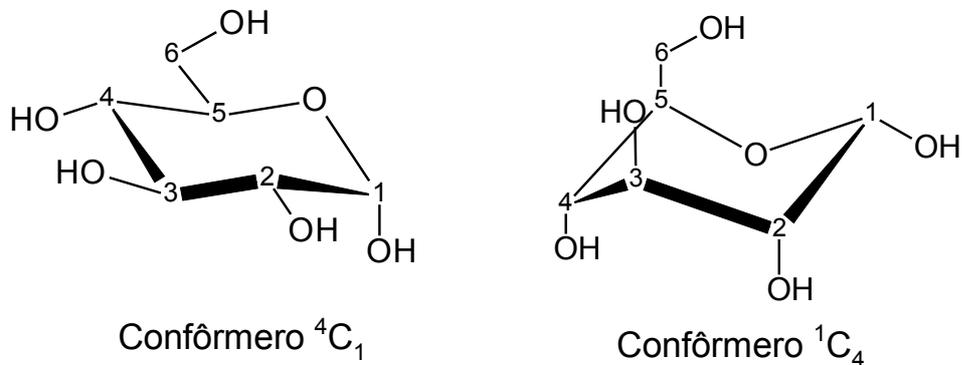
Os monossacarídeos, unidades fundamentais na formação de carboidratos mais complexos, são constituídos por cadeias curtas, contendo de três a sete carbonos. As cadeias de monossacarídeos são bastante flexíveis, contendo cinco ou mais carbonos podem formar estruturas cíclicas devido à presença dos reativos grupos aldeído e cetona. A ciclização interna ocorre com a reação do grupo carbonila com um dos grupos hidroxila da 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 α e β dos monossacarídeos cíclicos (Figura 1.1). A ciclização é uma reação reversível e em solução aquosa existe um equilíbrio entre as várias formas isoméricas possíveis, fenômeno denominado mutarrotação (veja como exemplo a glicose, Figura 1.1).

FIGURA 1.1- Equilíbrio (mutarrotação) existente em solução entre as diferentes formas isoméricas do monossacarídeo glicose.



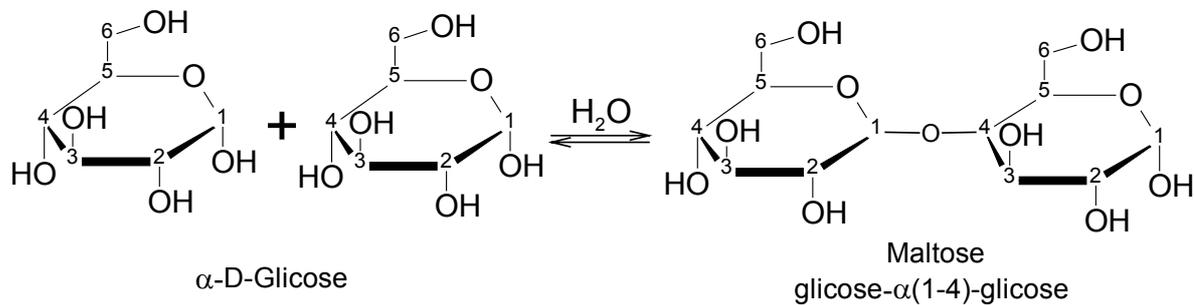
As conformações em cadeia são as mais estáveis para monossacarídeos com anéis de seis átomos (piranoses), no entanto, na maioria dos sistemas biológicos um dos dois possíveis conformêros em cadeia é consideravelmente mais estável. No caso da glicose a conformação em cadeia 4C_1 , com todos os substituintes volumosos na posição equatorial, é preferida à conformação 1C_4 , com os substituintes em orientação axial (Figura 1.2) (LEHMANN, 1998). A energia das diferentes conformações é também definida pela orientação do grupamento hidroxietila (CH_2OH), e pela possibilidade de formação de ligações de hidrogênio pelas hidroxilas, que apresentam grande liberdade rotacional. Ligações de hidrogênio internas, com moléculas vizinhas de outros carboidratos e com a água, são características comuns nestes sistemas.

FIGURA 1.2- As duas formas isoméricas em cadeia do monossacarídeo α -D-glucopiranosose



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 do segundo monossacarídeo ou oligossacarídeo (veja como exemplo a formação do dissacarídeo maltose na Figura 1.3). Considerando-se a grande variedade de unidades monoméricas e as múltiplas possibilidades para a formação de ligações glicosídicas, o número de oligo- ou polissacarídeos que podem ser formados é enorme (LAINE, 1994). Como existem múltiplos sítios para a formação de ligações glicosídicas em um resíduo monomérico, cadeias ramificadas são comuns em polissacarídeos. Polissacarídeos podem ser classificados em diferentes grupos: homopolissacarídeos de estrutura linear (por exemplo, celulose, amilose) ou ramificada (amilopectina, glicogênio); heteropolissacarídeos que podem ser alternados (agarose, caragenan), em bloco (alginato) ou com diferentes formas de ramificação (pectin, xantana) (LEHMANN, 1988).

FIGURA 1.3- Formação da ligação glicosídica α -(1 \rightarrow 4) entre dois resíduos de glicose para a formação do dissacarídeo maltose.



Carboidratos apresentam como mais amplo papel funcional, fornecer energia e constituir reserva energética. O metabolismo da glicose para a produção de ATP (adenosina tri-fosfato), cujas ligações ricas em energia (± 10 Kcal) são quebradas sempre que as células precisam de energia para as reações bioquímicas, é a fonte primária de energia para todos os seres vivos, excluindo os vírus (ROBYT, 1998). Organismos vegetais são auto-suficientes em termos de demanda energética sendo capazes, através da fotossíntese, de produzir sua própria reserva energética. Nestes organismos a glicose é armazenada na forma de amido. Os animais não são capazes de produzir glicose a partir de outros substratos, sendo, portanto, dependentes da alimentação para obter energia. A glicose obtida através da alimentação é armazenada na forma de glicogênio nestes organismos.

Além da função energética, carboidratos também estão entre as classes de moléculas que mais participam da constituição de tecidos e células. Constituem a parede celular dos vegetais, onde são encontrados na forma de celulose, um polímero de glicose e o mais abundante carboidrato encontrado na natureza. Na carapaça dos insetos são encontrados na forma de quitina, um polímero que confere extrema resistência ao exo-esqueleto. Além disso, uma série de carboidratos é encontrada circundando a membrana plasmática de células de animais, promovendo coesão entre as mesmas.

Nas últimas décadas, novas descobertas no estudo de sistemas biológicos tem revelado que carboidratos apresentam papéis biológicos extremamente relevantes que vão muito além de suas clássicas funções energéticas e estruturais. Em 1988 o termo "*glycobiology*" (glicobiologia) foi introduzido chamando a atenção para a importância de oligossacarídeos para o correto funcionamento de proteínas com as quais estes se encontram associados (RADEMACHER et al., 1988). A

glicobiologia aborda a participação de carboidratos em eventos biológicos com foco em dois temas principais: a influência de carboidratos nas propriedades de biomoléculas com as quais estão associados e seu envolvimento em fenômenos de reconhecimento molecular (DWEK, 1996).

Quando associados a proteínas e lipídios, carboidratos alteram suas propriedades e funções das mais diversas formas, não havendo seguramente uma função universal para a glicosilação (DWEK, 1996; VARKI et al., 1999). Glicoproteínas e glicolipídios são os componentes principais da superfície externa de células de mamíferos e essenciais em processos biológicos importantes que incluem: fertilização, defesa imunológica, replicação viral, infecção parasital, crescimento e adesão celular, degradação de coágulos sanguíneos e inflamação (DWEK, 1996).

A descoberta do papel central apresentado por carboidratos para o correto funcionamento de proteínas e lipídios aos quais se encontram associados e da sua participação em fenômenos biológicos relevantes levaram a um notável crescimento do interesse no estudo destas biomoléculas e suas propriedades (BASHKIN, 2000; HURTLEY et al., 2001; DWEK e BUTTERS, 2002), sendo esta notadamente uma área de pesquisa com contribuições de caráter interdisciplinar.

1.2- CARBOIDRATOS - ABORDAGEM TEÓRICA

A grande variedade de papéis funcionais apresentados por carboidratos na natureza é certamente relacionada com a sua grande diversidade estrutural. Esta diversidade impõe inúmeras dificuldades na caracterização experimental de oligo e polissacarídeos (WOODS, 1995; WORMALD et al., 2002). Ainda que estruturas estáticas possam ser obtidas de cristais ou fibras, através do emprego de cristalografia de raios-X, não se pode afirmar com certeza que em solução estas moléculas adotem conformações similares as do estado sólido. Por outro lado, estudos utilizando Ressonância Magnética Nuclear (RMN) fornecem informações sobre a conformação de carboidratos em solução, porém com uma resolução limitada na presença de equilíbrio entre conformeros. Inúmeras outras técnicas experimentais (microscopia eletrônica, difração de luz e neutrons, dicroísmo circular, espectroscopia de infra-vermelho, etc) fornecem informações úteis, porém ainda mais indiretas sobre a conformação de carboidratos (PÉREZ e KOUWIJZER, 1999).

Devido às dificuldades experimentais, métodos de modelagem molecular tem

emergido com uma poderosa ferramenta para complementar e auxiliar técnicas experimentais na investigação carboidratos. Métodos de modelagem, quando utilizando funções de energia potencial confiáveis, são capazes de fornecer uma visão estrutural detalhada de biomoléculas. A compreensão dos sistemas a nível molecular é capaz de levar à elucidação de fenômenos biológicos importantes, definidos pela estrutura molecular, cujos mecanismos podem ser explorados em aplicações tecnológicas ou estendidos para a compreensão de outros processos. Em particular, simulações de dinâmica molecular em solvente explícito (VAN GUNSTEREN e BERENDSEN, 1990) fornecem informações em uma escala de tempo e tamanho geralmente inacessíveis a métodos experimentais (resolução atômica na escala de fentosegundos). O preço a pagar reside no fato da precisão das simulações ser intrinsecamente vinculada à exatidão dos campos de força empregados.

O estudo de biomoléculas através de métodos de química computacional se consolidou nas últimas décadas através do desenvolvimento de campos de força para o estudo de aminoácidos e proteínas (VAN GUNSTEREN et al., 1994; FRIESNER e GUNN, 1996; WANG et al., 2001), ácidos nucleicos (LAFONTAINE e LAVERY, 1999; BEVERIDGE e McCONNELL 2000; OROZCO et al., 2003) e lipídios (TIELEMAN et al., 1997; FELLER, 2000; FORREST e SANSOM, 2000). Neste contexto, o desenvolvimento de campos de força para carboidratos é significativamente mais complexo (maior variedade de unidades monoméricas e tipos de ligação, efeitos estereoeletrônicos, escassez de dados experimentais adequados para o refinamento de parâmetros). Apresentando superfícies de energia potencial altamente complexas devido à combinação de fenômenos como: efeitos anomérico e exo-anomérico, interações dipolo-dipolo e um grande número de possibilidades para formação de ligações de hidrogênio, internas e externas; carboidratos enquadram-se provavelmente como a mais desafiadora classe de biomoléculas para estudos teórico-moleculares. Como resultado, a área de simulação de carboidratos apenas recentemente vem apresentando avanços significativos (PÉREZ et al., 1996; WOODS, 1998), com um número crescente de estudos teóricos abordando carboidratos, e campos de força para considerar particularmente esta classe de biomoléculas (PÉREZ et al., 1998). A primeira publicação dedicada especificamente à área de simulação computacional de carboidratos foi apresentada em 1990 (FRENCH e BRADY, 1990), desde lá

inúmeras publicações e simpósios especializados foram realizados e a área tem apresentado grande expansão (PÉREZ et al., 1996; WOODS, 1998; GRIGERA, 2000; WORMALD et al., 2002).

Neste trabalho, métodos de química computacional são utilizados para o estudo de carboidratos derivados da glicose em solução e interações destes compostos envolvendo reconhecimento molecular.

1.3- OBJETIVOS

Este estudo tem por motivação um interesse científico intrínseco por carboidratos e suas propriedades, aliado à extrema importância destas biomoléculas para a natureza e para a ciência.

Através da utilização de métodos de modelagem molecular, pretende-se obter informações detalhadas sobre estrutura e propriedades de carboidratos em solução e dos mecanismos através dos quais estas moléculas podem interagir. São abordados neste trabalho especificamente os sacarídeos derivados da glicose: trehalose e ciclodextrinas.

Os estudos sobre o dissacarídeo trehalose (descritos nos capítulos 3 e 4) tiveram como objetivos a caracterização da estrutura deste composto e a investigação das razões que permitem a este açúcar promover a estabilização da estrutura de proteínas e membranas expostas a condições termodinâmicas desfavoráveis, bem como os mecanismos através dos quais este fenômeno se processa.

As investigações sobre as ciclodextrinas (descritas no capítulo 5) tiveram como objetivo caracterizar estas moléculas, assim como suas propriedades em solução, e comparar o comportamento molecular em solução das três ciclodextrinas naturais: α -, β - e γ -ciclodextrina.

A metodologia necessária para efetivar estes estudos é apresentada no capítulo 2 e no capítulo 6 são apresentadas as conclusões obtidas.

Capítulo 2

METODOLOGIA

Neste capítulo são apresentados e discutidos conceitos teóricos básicos que fundamentam a metodologia empregada na realização deste trabalho.

2.1- MECÂNICA MOLECULAR E CAMPO DE FORÇA

Certos problemas de interesse em modelagem molecular são inviáveis de serem tratados com métodos de Mecânica Quântica. Para sistemas com muitos corpos, por considerar o movimento de todos os elétrons, cálculos com mecânica quântica são inviáveis do ponto de vista computacional. Em geral, esta metodologia pode ser utilizada para sistemas com simetria, para os quais simplificações podem ser utilizadas, viabilizando assim o custo em tempo de computação.

Nas situações em que a Mecânica Quântica não pode ser aplicada, uma alternativa é a representação das interações moleculares utilizando funções de potencial que, tanto quanto possível, guardem relações próximas com resultados obtidos diretamente da Mecânica Quântica. Esta abordagem, conhecida como Mecânica Molecular (BURKERT e ALLINGER, 1982; RAPPÉ e CASEWIT, 1997), não considera explicitamente o movimento dos elétrons e calcula a energia do sistema como função apenas das posições dos núcleos atômicos.

Esta exclusão do movimento eletrônico está fundamentada na aproximação de Born-Oppenheimer que estabelece as bases matemáticas para tratar o movimento dos núcleos no campo de potencial gerado pelos elétrons (LEVINE, 1991). A Mecânica Molecular assume que o movimento das partículas que compõem o sistema pode ser tratado utilizando-se as leis de Newton da Mecânica Clássica. Logo, na Mecânica Molecular, uma molécula é tratada como um corpo sujeito às leis da Mecânica Clássica newtoniana. Assim, átomos e moléculas são tratados como pontos de massa interagindo através de forças que dependem da separação entre as partículas e de suas orientações relativas (ISRAELACHVILI, 1985).

Na Mecânica Molecular, dado um sistema de interesse, representa-se a energia potencial como a soma de um certo número de contribuições relacionadas com as interações entre átomos covalentemente ligados (potencial harmônico linear,

potencial harmônico angular, potencial torsional próprio, etc) e as interações entre átomos não ligados (potencial Lennard-Jones e Coulomb). Ao conjunto destes termos convencionou-se chamar “*campo de força*”. A construção de um campo de força está sujeita a decisões sustentadas por dados semiempíricos e sujeitos à intervenção do observador, que formula as expressões matemáticas representativas das interações. Conseqüentemente, campos de força diferentes têm sido propostos na literatura (RAPPÉ e CASEWIT, 1997). Em geral, para um mesmo sistema, os dados obtidos com campos de força diferentes tendem a concordar entre si. Entretanto, embora um grande esforço para a produção de parâmetros de campo de força estejam sendo efetuados, a área está aberta a contribuições, notadamente quanto à necessidade da formulação de métodos que eliminem, tanto quanto possível, aspectos subjetivos do observador.

Os termos mais comumente utilizados para representar as interações entre os átomos de um sistema molecular são:

- Potencial harmônico linear (interações de dois corpos)

O potencial da ligação química, V_d , descreve a energia associada ao desvio da distância d , entre dois átomos ligados covalentemente, da distância de equilíbrio d_0 :

onde d é 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.

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

- Potencial harmônico angular (interações de três corpos)

Este potencial, V_θ , está associado aos desvios do ângulo de equilíbrio θ_0 , formado entre três átomos i - j - k , covalente e consecutivamente ligados:

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

onde θ é o ângulo definido pela ligação i-j-k, θ_0 é o ângulo de equilíbrio e K_θ é a constante elástica da força.

- Potencial torsional (interações de quatro corpos)

O potencial torsional V_φ representa explicitamente a torção própria de ligações covalentes entre dois átomos. Para um conjunto de átomos i, j, k, l, o potencial torsional próprio para rotação em torno de um eixo definido pela ligação j-k pode ser definido por:

$$V_\varphi = k_\varphi [1 + (p\varphi + \delta)]$$

onde K_φ é a constante da força, p é a periodicidade do potencial e δ é a fase.

- Potencial Lennard-Jones (interações de dois corpos)

O potencial Lennard-Jones, representando a interação entre dois átomos i e j não ligados, é dado por:

$$V_{LJ}(r_{ij}) = \sum_{i < j} \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6}$$

onde r_{ij} é a distância entre os átomos i e j e A_{ij} e B_{ij} são parâmetros que dependem do tipo de átomo envolvido na interação, $A_{ij}=4\varepsilon\sigma^{12}$ e $B_{ij}=4\varepsilon\sigma^6$. É conveniente ressaltar que este potencial é utilizado geralmente para descrever a interação entre átomos separados por três ou mais ligações covalentes. Na expressão do potencial, o primeiro termo descreve a repulsão que ocorre quando há sobreposição de densidade eletrônica com a aproximação dos átomos i-j; o termo atrativo representa as interações devidas à formação de dipolos induzidos instantâneos, originados por flutuações na densidade de carga eletrônica dos átomos.

- Potencial Coulomb (interações de dois corpos)

A interação eletrostática entre dois átomos i e j é representada pelo potencial Coulomb:

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

onde r_{ij} é a distância entre os átomos i e j , q_i e q_j são suas cargas parciais, ϵ_0 é 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 de dados experimentais (cristalografia de raios-X, espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear, etc).

A implementação da Mecânica Molecular pressupõe somente o cálculo de propriedades mecânicas, o que impede a obtenção de propriedades termodinâmicas em geral. A utilização dos campos de força para calcular propriedades termodinâmicas é possível com auxílio adicional do formalismo da Mecânica Estatística.

2.2- MECÂNICA ESTATÍSTICA

Simulações computacionais geram informações sobre o comportamento das moléculas do sistema estudado. Dados como posições e velocidades atômicas, bem como forças inter e intramoleculares não podem ser usados diretamente para calcular propriedades termodinâmicas de um sistema. Cabe à Mecânica Estatística estabelecer relações entre a constituição molecular de um sistema e suas propriedades macroscópicas. O objetivo é prever fenômenos macroscópicos e calcular propriedades macroscópicas a partir das propriedades das moléculas individuais constituintes do sistema estudado (MCQUARRIE, 1976).

O estado termodinâmico de um sistema pode ser completamente descrito por um pequeno conjunto de parâmetros, tais como, volume, concentração,

temperatura, etc. Porém, do ponto de vista microscópico, existem inúmeros estados quânticos compatíveis com este estado macroscópico fixo. Para o cálculo de uma propriedade termodinâmica é necessário, a princípio, conhecer o estado em que o sistema se encontra, já que os valores das propriedades, em geral, são diferentes em cada um dos estados quânticos possíveis. Entretanto, como a degenerescência de um sistema de N-corpos é da ordem de 10^N (LEVINE, 1991) é praticamente impossível determinar em qual destes 10^N possíveis estados quânticos o sistema se encontra.

A Mecânica Estatística postula que num sistema com energia constante o valor de uma propriedade termodinâmica macroscópica é uma média dos seus valores nos estados quânticos correspondentes, considerando-se que todos os estados quânticos possíveis apresentam o mesmo peso estatístico (MQUARRIE, 1976; CHANDLER, 1987).

Portanto, assumindo que o valor observável de uma propriedade macroscópica é uma média dos seus valores nos estados quânticos correspondentes, introduz-se o conceito média de "*ensemble*" de Gibbs.

Um "*ensemble*" mecânico estatístico consiste em um conjunto, virtual ou mental, constituído por um grande número de réplicas de um sistema, caracterizadas pelos mesmos parâmetros termodinâmicos, mas diversos estados quânticos ou clássicos. As partículas de cada réplica apresentam diferentes valores para o conjunto de posições e momentos. Assim, para que as médias termodinâmicas possam representar propriedades termodinâmicas obtidas experimentalmente, as configurações do sistema devem ser amostradas de acordo com a distribuição de probabilidade do "*ensemble*" considerado (HILL, 1960).

Os diferentes métodos de simulação molecular representam formas diferentes de se realizar a amostragem das configurações do sistema com a densidade de probabilidade requerida. 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 neste trabalho a principal metodologia empregada foi o Método de Dinâmica Molecular restringiremos as discussões apenas a este método. Excelentes introduções sobre o método de Monte Carlo podem no entanto ser facilmente encontradas (RUBINSTEIN, 1981; ALLEN e TILDSLEY, 1987; LEACH, 1996; BARLETTE e FREITAS, 1999; LANDAU e BINDER, 2000; FRENKEL e BEREND, 2001).

2.3- MÉTODO DE DINÂMICA MOLECULAR

O método de Dinâmica Molecular é a técnica utilizada para simular a evolução temporal de um sistema. Esta metodologia recorre à integração das equações de movimento clássicas para determinar posição, velocidade e aceleração das partículas do sistema em um dado instante do tempo.

Dado a superfície de potencial, a força atuando em cada partícula do sistema pode ser calculada, obtendo-se as equações de movimento das mesmas segundo as leis de Newton. A integração das equações de movimento fornece as coordenadas das partículas em função do tempo.

Para um sistema constituído por N átomos com posições r_1, r_2, \dots, r_n , se o potencial total de interação $V(r_1, r_2, \dots, r_n)$ é uma função diferenciável das coordenadas atômicas, então:

$$F_i = - \frac{\partial V(r_1, r_2, \dots, r_n)}{\partial r_i}$$

$$\frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} = \frac{F_i}{m_i}$$

onde t representa o tempo, F_i , a força sobre o átomo i , e m_i a sua massa.

Com o cálculo do gradiente de potencial, F_i é obtida, e a integração numérica da equação de Newton para a partícula i pode ser realizada em pequenos intervalos de tempo Δt , normalmente da ordem de femtosegundos ($1 \text{ fs} = 10^{-15}$ segundos). Obtém-se então um conjunto de trajetórias para as partículas. Este conjunto de trajetórias é posteriormente utilizado para calcular valores médios de propriedades mecânicas do sistema que podem ser escritas como função da configuração espacial dos componentes. Discussões mais aprofundadas sobre o método de Dinâmica Molecular podem ser encontradas em (ALLEN e TILDESLEY, 1987; VAN GUNSTEREN e BERENDSEN, 1990; VAN GUNSTEREN, 1994; RAPAPORT, 1995; LEACH, 1996).

2.3.1- Métodos de Integração

A definição da trajetória do sistema no método de Dinâmica Molecular envolve a resolução de uma equação diferencial de segunda ordem. Como esta equação não possui solução analítica, o problema é resolvido utilizando-se aproximação numérica.

Métodos numéricos para a solução desta classe de equações diferenciais de segunda ordem estão fundamentados em técnicas de diferenciação finita (GEAR, 1974). No método de Dinâmica Molecular, a idéia básica é a realização da integração das equações de movimento em pequenas etapas, separadas no tempo por um intervalo fixo δt .

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 $t + \delta t$. Assume-se que durante o intervalo de tempo δt , a força seja constante. A nova força sobre as partículas, em suas novas posições, é então determinada levando às novas posições e velocidades no tempo $t + 2\delta t$, e assim consecutivamente.

Existem inúmeros algoritmos para a integração das equações de movimento que utilizam o método de diferenciação finita (VAN GUNSTEREN e BERENDSEN, 1977; BERENDSEN e VAN GUNSTEREN, 1986), todos assumem que propriedades dinâmicas (velocidades, acelerações, etc.) podem ser aproximadas por expansão em séries de Taylor.

Os métodos utilizados para a integração das equações de movimento em simulações de Dinâmica Molecular que tem alcançado uso generalizado são os métodos de Verlet (VERLET, 1967), Beeman (BEEMAN, 1976) e Leap-Frog (HOCKNEY, 1970). Estes métodos são detalhados a seguir.

2.3.1.1- Algoritmo de Verlet

O algoritmo de Verlet (VERLET, 1967) é provavelmente o método mais utilizado para integração das equações de movimento em simulações de Dinâmica Molecular. Este algoritmo utiliza as posições e acelerações no tempo t e as posições do passo anterior, $r(t-\delta t)$, para calcular as novas posições em $t + \delta t$. Formalmente estas relações podem ser escritas como:

$$\begin{aligned}r(t + \delta t) &= r(t) + \delta tv(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 a(t) + \dots \\r(t - \delta t) &= r(t) - \delta tv(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 a(t) - \dots\end{aligned}$$

Somando-se as equações obtém-se:

$$r(t + \delta t) = 2r(t) - r(t - \delta t) + \delta t^2 a(t)$$

As velocidades não são consideradas explicitamente no algoritmo de Verlet, mas podem ser calculadas de várias formas. Uma forma simples é dividir a diferença entre as posições no tempo $t+\delta t$ e $t-\delta t$ por $2\delta t$:

$$v(t) = [r(t + \delta t) - r(t - \delta t)] / 2\delta t$$

Alternativamente, as velocidades podem ser calculadas na metade do passo de integração:

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

A implementação do algoritmo de Verlet é razoavelmente simples e a necessidade de armazenamento de dados é modesta, considerando-se que a velocidade de cada uma das partículas não precisa ser necessariamente armazenada.

2.3.1.2- Algoritmo de Beeman

O método de Beeman (BEEMAN, 1976) para integração das equações de movimento produz as mesmas trajetórias que o método de Verlet, porém apresenta um cálculo mais preciso das velocidades. O formalismo do método é diferente do algoritmo de Verlet:

$$r(t + \delta t) = r(t) + \delta t v(t) + \frac{2}{3} \delta t^2 a(t) - \frac{1}{6} \delta t^2 (t - \delta t)$$
$$v(t + \delta t) = v(t) + \frac{1}{3} \delta t a(t) + \frac{5}{6} \delta t a(t) - \frac{1}{6} \delta t a(t - \delta t)$$

Uma consequência da maior precisão no cálculo das velocidades é a melhor representação da conservação da energia do sistema, já que a energia cinética é calculada diretamente das velocidades. Entretanto, como as equações utilizadas são mais complexas do que as utilizadas no método de Verlet, o método de Beeman é computacionalmente mais custoso.

2.3.1.3- Algoritmo Leap-Frog

É a variação mais simples do método de Verlet. O algoritmo calcula as velocidades na metade do intervalo de integração e usa estas velocidades para calcular as novas posições (HOCKNEY, 1970):

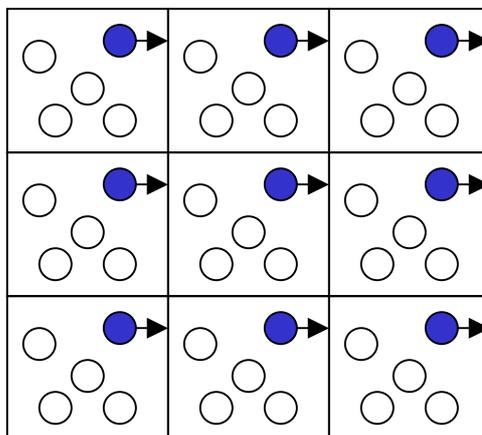
$$v(t + \frac{1}{2} \delta t) = v(t - \frac{1}{2} \delta t) + \delta t a(t)$$
$$r(t + \delta t) = r(t) + \delta t v(t + \frac{1}{2} \delta t)$$

Como pode ser observado, as velocidades e posições não são calculadas ao mesmo tempo. Em consequência disto, as energias cinética e potencial também não podem ser calculadas no mesmo instante. Desta forma, a energia total do sistema, em um dado instante t , não pode ser obtida diretamente utilizando-se o algoritmo Leap-Frog.

2.4- CONDIÇÕES PERIÓDICAS DE CONTORNO

Em geral, para obter propriedades macroscópicas a partir da simulação de um sistema molecular é necessário um número elevado de partículas (frações do número de Avogadro). Dois grandes problemas decorrem desta exigência: a inviabilidade de se trabalhar com um número tão elevado de partículas e os efeitos de superfície. Para contorná-los, utilizam-se condições periódicas de contorno (ALLEN e TILDESLEY, 1987). Esta técnica possibilita a realização de simulações utilizando-se um número relativamente pequeno de partículas. Efeitos de superfície são eliminados e as partículas consideradas sofrem o efeito das forças como se estivessem no interior do sistema. Utilizando condições periódicas de contorno, os átomos do sistema que está sendo simulado são colocados em uma caixa, a qual é recoberta por imagens da caixa original. Isto é equivalente a replicar periodicamente a caixa original em todas as direções do espaço, sem necessariamente definir as coordenadas para os átomos que estão nas caixas réplica. No decorrer da simulação, quando um átomo move-se na caixa original, sua imagem periódica, em cada uma das caixas imagens, move-se da mesma maneira. Quando um átomo sai da caixa original, atravessando uma de suas seis faces, uma de suas imagens entra pela face oposta, com velocidade idêntica. Desta forma, o número total de átomos na caixa central e no sistema como um todo, é conservado. Na Figura 2.1 é apresentado um desenho esquemático de um sistema periódico em duas dimensões.

FIGURA 2.1- Representação de condições periódicas de contorno em um sistema bidimensional.

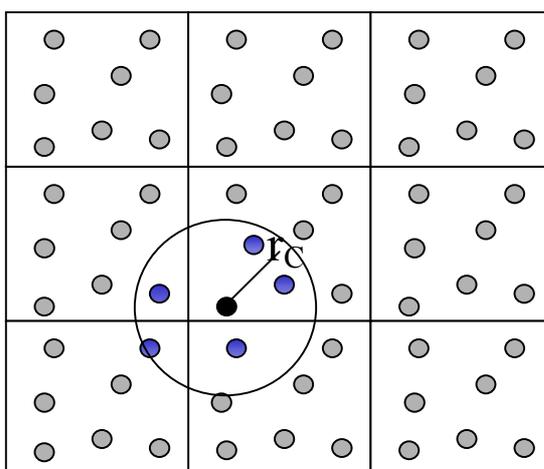


2.5- RAIOS DE CORTE E CONVENÇÃO DE IMAGEM MÍNIMA

Em simulações de Dinâmica Molecular, o cálculo das interações não ligantes consiste na fase mais trabalhosa do estudo. As funções potenciais geralmente utilizadas para definição das interações não ligantes são a função potencial Lennard-Jones e a função Coulomb.

A função potencial Lennard-Jones define interações de curto alcance ($V \sim r^{-6}$), pois o potencial de interação cai rapidamente com o aumento da distância entre as partículas. Para o tratamento das interações de curto alcance usualmente é empregado o truncamento do potencial em um raio de corte esférico (Figura 2.2), geralmente da ordem de $L/2$ (L o comprimento da célula de simulação) para evitar a interação da partícula com sua própria imagem ou com a mesma molécula duas vezes (ALLEN e TILDESLEY, 1987). Cada partícula interage com partículas reais ou imagens, que estão dentro do raio de corte. A interação considerada de fato é a que ocorre com a partícula ou imagem periódica mais próxima. Esta situação é definida como convenção de imagem mínima (LEACH, 1996). É importante que o raio de corte utilizado não permita a interação da partícula com sua própria imagem ou com a mesma molécula duas vezes.

FIGURA 2.2- Raio de corte esférico e convenção de imagem mínima para um sistema periódico bidimensional.



2.6- TRATAMENTO DAS INTERAÇÕES ELETROSTÁTICAS

O tratamento correto das interações eletrostáticas em simulações, apresenta grande importância devido a dois fatores principais: (i) o cálculo das interações eletrostáticas é a etapa de uma simulação com maior demanda computacional, (ii) as aproximações feitas no tratamento destas interações afetam sensivelmente muitas observáveis simuladas. Para evitar a presença de uma interface com o vácuo, simulações com solvente explícito são realizadas comumente em condições periódicas de contorno (Seção 2.4) e as interações eletrostáticas podem ser calculadas de duas formas: truncando a interação Coulombica além de um raio de corte definido ou usando métodos baseados em somas de Ewald. Ambas as escolhas contam com duas aproximações críticas: no primeiro caso a negligência das interações Coulombicas além do raio de corte e no segundo a exata periodicidade do sistema. A utilização do truncamento do potencial além do raio de corte, produz efeitos que em muitos casos comprometem severamente os resultados obtidos das simulações (SCHREIBER e STEINHAUSER, 1992). De maneira geral este método tem sido suplantado por métodos baseados em somas de Ewald, que produzem trajetórias estáveis onde métodos baseados na utilização de raio de corte falham (CHEATHAM et al., 1995) ou por métodos que empregam *reaction field approximation* (aproximação do campo de reação).

2.6.1- Métodos de Ewald

Métodos de Ewald são hoje em dia utilizados rotineiramente em simulações empregando representação explícita do solvente. A base para todos os métodos que envolvam *lattice summation*, Particle-Particle-Particle Mesh Ewald, P3M, (HOCKNEY e EASTWOOD, 1981), Particle Mesh Ewald, PME, (DARDEN et al., 1993), Smooth Particle Mesh Ewald, SPME, (ESSMANN et al., 1995), é o formalismo da *soma de Ewald* (Ewald, 1921). Nesta técnica, uma determinada partícula interage com as demais partículas do sistema e com todas as suas imagens em um arranjo infinito de células periódicas que no limite apresenta forma esférica (Figura 2.3).

A função potencial coulombica definida para as interações carga-carga na caixa de simulação principal é escrita como:

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

Considerando-se que as caixas imagens estão relacionadas com a caixa de simulação principal, de tamanho L, através de vetores múltiplos ($n_x L$, $n_y L$, $n_z L$) a contribuição das interações entre as cargas da caixa central e as imagens de todas as partículas é dada por:

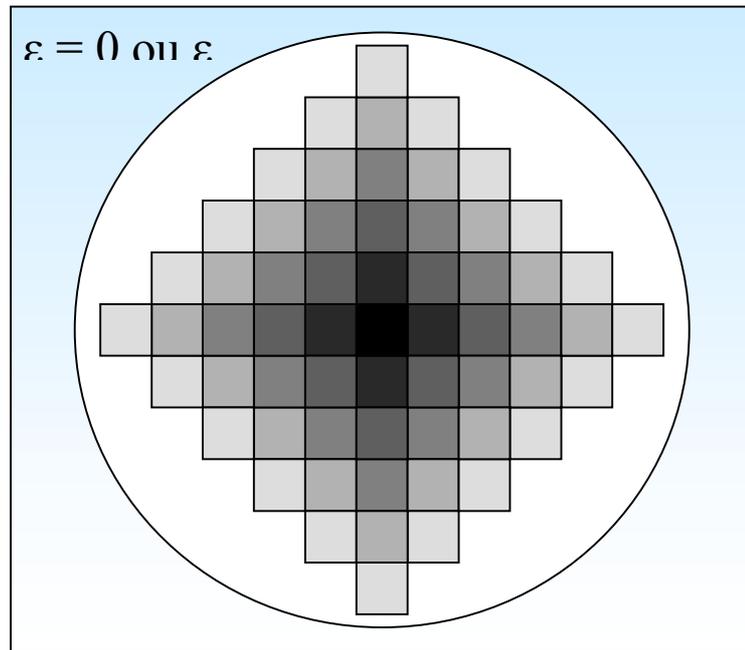
$$V_C = \frac{1}{2} \sum_{|n=0}^{\infty} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 |r_{ij} + n|}$$

Onde $n = (n_x L, n_y L, n_z L)$ e n_x , n_y e n_z são números inteiros.

Conforme a soma vai sendo realizada, novas células são adicionadas ao arranjo, a adição é realizada em seqüência, a partir das caixas mais próximas da caixa de simulação central. A natureza do meio que envolve o arranjo das células periódicas deve ser especificada através de sua constante dielétrica, pois os resultados diferem conforme a permissividade do meio é alterada (ALLEN e TILDSLEY, 1987).

Ainda que métodos de Ewald sejam formalmente exatos para sistemas periódicos, eles são apenas aproximados para a simulação de moléculas biológicas em soluções, já que estes sistemas são inerentemente não periódicos. A imposição da periodicidade artificial em simulações de biomoléculas pode perturbar os potenciais de força média para equilíbrios conformacionais e até mesmo inverter as estabilidades relativas de estados enovelados e não enovelados em proteínas (HÜNENBERGER e MCCAMMON, 1999a, 1999b, HÜNENBERGER, 1999, WEBER et al., 2000,)

FIGURA 2.3- Construção de um arranjo de células periódicas no método *soma de Ewald*.

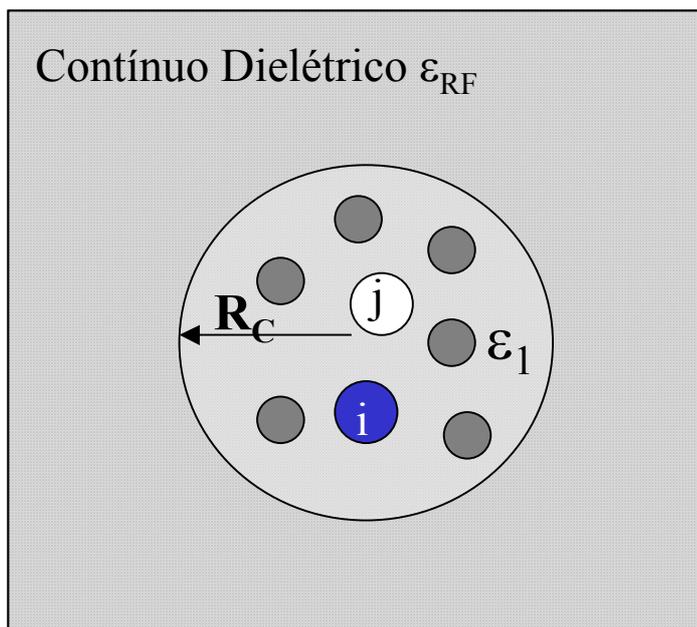


2.6.2- Aproximação do Campo de Reação

Uma alternativa a métodos baseados em soma de Ewald é a utilização do método denominado aproximação do campo de reação (*reaction field approximation*) (LEACH, 1996, TIRONI et al., 1995). Neste método é empregado um raio de corte (R_C), dentro qual as cargas são tratadas explicitamente e uma permissividade $\epsilon_1=1$ é normalmente utilizada, o ambiente fora deste raio é modelado como um contínuo dielétrico com permissividade relativa ϵ_{RF} (Figura 2.4). A inclusão da polarização deste contínuo leva à modificação das interações eletrostáticas Coulombicas dentro da região definida pelo raio de corte. Assim o potencial eletrostático dentro do raio de corte V_{CRF} é definido efetivamente como:

$$V_{CRF} = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_1} \left(\frac{1}{r_{ij}} - \frac{\frac{\epsilon_1 - \epsilon_{RF}}{\epsilon_1 + 2\epsilon_{RF}} r_{ij}^2}{R_C^3} - \frac{1 - \frac{\epsilon_1 - \epsilon_{RF}}{\epsilon_1 + 2\epsilon_{RF}}}{R_C} \right)$$

FIGURA 2.4- Representação esquemática do método *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 heterogêneos, como macromoléculas em solução ou cristal. A permissividade relativa utilizada, ϵ_{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. Resultados de simulações de proteínas no estado cristalino mostram que os dois métodos apresentam resultados bastante similares no que compete a reprodução da estrutura experimental (WALSER et al., 2001)

Capítulo 3

INTERAÇÃO TREHALOSE-PROTEÍNA

Neste capítulo é apresentado o estudo realizado sobre a interação do dissacarídeo trehalose com proteínas. Inicialmente é apresentada uma introdução geral sobre este açúcar, sua relação e participação no fenômeno de proteção biológica de organismos, através da estabilização de biomoléculas como membranas e proteínas.

3.1- INTRODUÇÃO

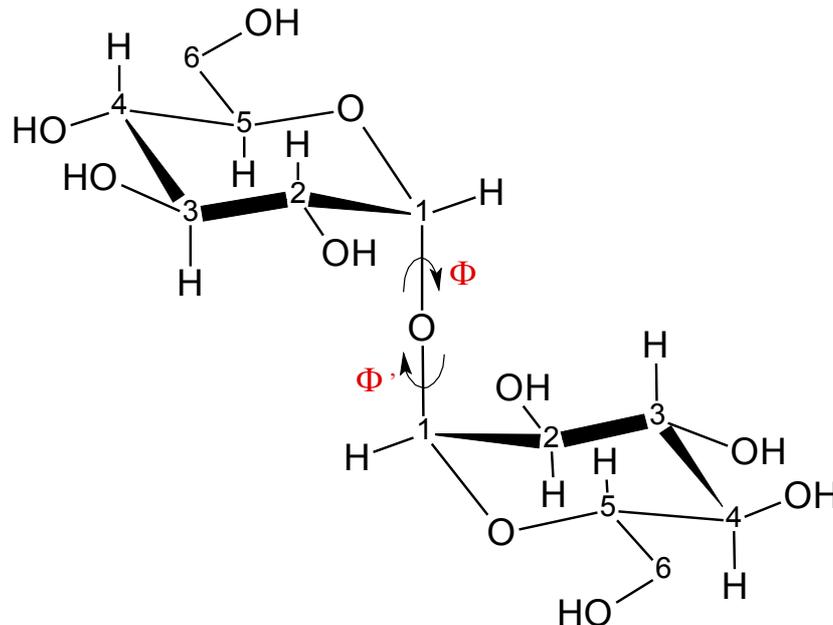
3.1.1-Trehalose

O dissacarídeo trehalose (TRH) é um açúcar não redutor formado por dois resíduos de glicose através de uma ligação glicosídica α -(1→1) (Figura 3.1). Este composto natural é o principal carboidrato componente (aproximadamente 80-90%) da hemolinfa de insetos (WYATT e KALF, 1957) e é também comumente encontrado em leveduras e cogumelos (BIRCH, 1972; KOCH e KOCH, 1925). Estudos sobre o metabolismo de tardígrados (WESTH e RAMLOV, 1991; SOMME, 1996), nemátodos (MADIN e CROWE, 1975; BEHM, 1997), leveduras (SINGER e LINDQUIST, 1998a; DAMORE et al., 1991; ELEUTHERIO et al., 1993), plantas de ressurreição (SCOTT, 2000; WINGLER, 2002) e espécies de *Artemia* (CLEGG, 1965; 1997; CLEGG e JACKSON, 1992) mostram que estes organismos são capazes de sobreviver a quase completa desidratação (anidrobiose), choque térmico ou stress osmótico através do acúmulo, nestas condições, de grandes quantidades de TRH. Embora as funções biológicas desses organismos sejam interrompidas sob estas condições, a TRH é capaz de estabilizar a estrutura de células e biomoléculas durante períodos de stress e restaurá-las às condições funcionais se o organismo for submetido a condições favoráveis de hidratação e temperatura. Este fenômeno, denominado criptobiose, vem intrigando cientistas ao longo de muitos anos. O termo *cryptobiosis* (*hidden life*) foi criado pelo cientista David Keilin em 1959 e por ele definido como um estado onde não existem sinais observáveis de vida e as atividades metabólicas tornam-se dificilmente mensuráveis, ou encontram-se reversivelmente paralisadas

(KEILIN, 1959).

A seguir são descritos detalhes sobre este insólito estado de organização biológica, que permanece até hoje não completamente esclarecido.

FIGURA 3.1- Representação em cadeira da estrutura molecular do dissacarídeo TRH. Os ângulos de torção glicosídicos Φ e Φ' estão indicados na figura.



3.1.2- Trehalose e Criptobiose

A natureza apresenta inúmeras estratégias para a sobrevivência de organismos. Entre as mais intrigantes estão os mecanismos biológicos que preservam organismos vivos expostos a condições prejudiciais como temperaturas extremamente altas ou baixas, desidratação ou ausência de oxigênio (FEOFILOVA, 2003). Este fenômeno, denominado criptobiose, envolve uma suspensão reversível do metabolismo e um isolamento efetivo das modificações ocorridas no ambiente (KEILIN, 1959; CLEGG, 2001). A criptobiose é um estado biológico muito particular, considerando-se que os organismos capazes de atingí-lo exibem características que diferem drasticamente das de organismos vivos, porém não podem ser considerados mortos. Pode-se inferir, portanto, que existem três estados de organização biológica: vida, morte e criptobiose (CLEGG, 2001). Este fenômeno é difundido nos reinos animal e vegetal e ocorre por exemplo em: tardígrados, nemátodos, cistos de

crustáceos, leveduras, bactérias, fungos, musgos, sementes e até em plantas superiores inteiras (denominadas plantas de ressurreição) (CLEGG, 2001; CROWE et al., 1992; GUPPY e WITHERS, 1999; FEOFILOVA, 2003). Em grande parte dos processos criptobióticos a detecção de condições desfavoráveis desencadeia a produção de grandes quantidades de dissacarídeos, especialmente TRH (em micróbios e animais) e sacarose (em plantas) (CROWE et al., 2002; CROWE, 2002). No entanto, os mecanismos através dos quais estes sacarídeos possam estabilizar sistemas vivos durante ciclos de congelamento-descongelamento, aquecimento-resfriamento, desidratação-hidratação permanecem ainda tema de muita discussão.

O estado criptobiótico melhor conhecido certamente é a anidrobiose, ou sobrevivência a quase completa desidratação (CROWE et al., 1992, 1997). Para este estado específico, duas hipóteses principais tem sido defendidas para explicar o efeito protetor dos açúcares.

A hipótese da substituição da água (*water replacement hypothesis*) sugere que durante a desidratação, os açúcares são capazes de substituir as moléculas de água ao redor de grupos polares e iônicos presentes em membranas fosfolipídicas e proteínas. Mimetizando o papel da água, o açúcar levaria à estabilização da estrutura nativa da biomolécula e à manutenção da atividade biológica (CROWE et al., 1984; 1992; 1997; 1998b; CARPENTER et al., 1994). A interação com o açúcar ocorreria através de ligações de hidrogênio, anteriormente formadas com as moléculas de água substituídas.

A hipótese da vitrificação (*vitrification hypothesis*) sugere que os açúcares encontrados em sistemas anidrobióticos, reconhecidos como excelentes agentes vitrificantes, protegem bioestruturas através da formação de vidros amorfos (*amorphous glasses*), deste modo reduzindo flutuações estruturais e prevenindo denaturação ou ruptura mecânica (SUN e LEOPOLD, 1994; 1997; SUN et al., 1994; 1996; WILLIAMS e LEOPOLD, 1989).

A poucos anos um consenso tem se formado de que estes dois mecanismos não são necessariamente mutuamente exclusivos (CLEGG, 2001; CROWE et al.; 1998a; 2002; CROWE, 2002; CARPENTER, et al., 1994; SUN e LEOPOLD, 1997) já que a vitrificação poderia ocorrer simultaneamente com uma interação direta da bioestrutura com o açúcar.

Recentemente uma terceira hipótese tem sido defendida, segundo esta, durante a desidratação a TRH concentraria uma camada residual de água próxima à

superfície de proteínas, preservando portanto, em grande extensão a solvatação e suas propriedades nativas (BELTON e GIL, 1994; COTTONE et al, 2002). Esta hipótese, denominada *water entrapment hypothesis*, contrasta com a hipótese da substituição da água e foi formulada para o caso específico de proteínas e TRH, baseando-se na teoria termodinâmica, desenvolvida por S.N. Timasheff, sobre o comportamento de proteínas em solução, na presença de um terceiro componente (TIMASHEFF, 1993). Segundo esta teoria, solutos, incluindo açúcares, são preferencialmente excluídos das primeiras camadas de hidratação de proteínas, resultando numa maior estabilidade da biomolécula, fenômeno denominado hidratação preferencial de proteínas (TIMASHEFF, 2002; XIE e TIMASHEFF, 1997).

É importante salientar que não apenas açúcares podem estar envolvidos com os mecanismos de proteção biológica. Estudos indicam que em muitos casos, compostos como arbutina, ácido ascórbico e várias famílias de proteínas (*stress proteins*) podem apresentar um papel importante na proteção de células e em alguns casos sua ação pode estar vinculada com a ação dos sacarídeos (SINGER e LINDQUIST, 1998a; OLIVER et al., 2001; CLEGG, 2001; CROWE et al., 2002).

Entre os sacarídeos relacionados com os mecanismos da criptobiose, a TRH é um dos mais eficientes agentes protetores e portanto, extensivamente estudada (CROWE et al., 2001; RICHARDS et al., 2002; ELBEIN et al., 2003). Estudos comparativos sobre a estabilização de membranas e proteínas *in vitro* mostram que em determinadas condições a TRH apresenta efeito protetor superior a outros mono e dissacarídeos (CROWE et al., 1987; CROWE et al., 1996; SOLA-PENA e MEYER-FERNANDES, 1998). A superioridade da TRH como bioprotetor tem sido ao longo do tempo motivo de muita polêmica, criando o que se denominou “o mito da TRH” (CROWE et al, 2001). Várias razões tem sido apresentadas para justificar a superioridade da TRH, entre elas se incluem: sua alta temperatura de transição vítrea, seu amplo raio de hidratação e certas peculiaridade no diagrama de misturas TRH-água. Inúmeros estudos experimentais (BRANCA et al., 1999; 2003; SUSSICH et al., 2001; BALLONE et al., 2000) e teóricos (LIU et al., 1997; CONRAD e de PABLO, 1999; ENGELSEN e PEREZ, 2000) tem investigado as propriedades da TRH, tanto em solução, como no estado sólido, tentando fornecer subsídios para a conexão entre as propriedades, ditas anômalas, deste açúcar e a notável habilidade protetora. Entretanto, até agora nenhum consenso foi atingido e o “mito da TRH” permanece.

As propriedades únicas da TRH deram origem a uma surpreendente gama de aplicações do açúcar em tecnologia, que incluem: estabilização de proteínas, membranas, lipossomas e vacinas (CROWE et al., 2001), preservação hipotérmica de células e órgãos de mamíferos (CROWE et al., 2003; FUKUSE et al., 1999; EROGLU et al., 2002), o uso em cosméticos (NORCIA, 2000) e produtos alimentícios (RICHARDS et al., 2002). A TRH parece também ser eficiente no tratamento de uma doença ocular comum chamada *dry eye syndrome*, onde inclusive teste clínicos em seres humanos já vem sendo realizados (MATSUO, 2001; MATSUO et al., 2002).

3.1.3- Trehalose na Estabilização de Membranas e Proteínas

Inúmeros estudos comprovam que a TRH efetivamente estabiliza bioestruturas como membranas e proteínas sob condições desfavoráveis (CROWE et al., 1984; 1987; 1998a; 2001; 2003; CARPENTER e CROWE, 1989; CARPENTER et al., 1994; PRESTRELSKI et al., 1993; ALLISON et al., 1999; NAKAGAKI et al., 1992; HOEKSTRA et al., 1997; SINGER e LINDQUIST, 1998b).

Estudos experimentais mostram claramente que a TRH é capaz de estabilizar biomembranas, lipossomas e bicamadas lipídicas expostas a ciclos de desidratação-reidratação (CROWE et al., 1984; 1987; 2001). Em particular, a TRH é capaz de inibir fusão entre bicamadas, vazamentos, separação de fases e a formação de fases não organizadas (CROWE et al., 1987; 2001; HOEKSTRA et al., 1997). Tais estudos sugerem que a TRH reduz o stress mecânico imposto à membrana na desidratação, impedindo que as cadeias lipídicas se aproximem. Mantendo o espaçamento entre as cadeias, o açúcar conseqüentemente manteria a membrana na fase fluída, relevante para os processos biológicos. A interação direta entre moléculas lipídicas e moléculas de TRH, através da formação de ligações de hidrogênio, tem sido demonstrada por inúmeras técnicas experimentais, incluindo: espectroscopia de infra vermelho, calorimetria diferencial de varredura, ressonância magnética nuclear (RMN) e difração de raios-X (CROWE et al., 1984; LEE et al., 1986; NAKAGAKI et al., 1992; TSVETKOVA et al., 1998; NAGASE et al., 1999; LUZARDO et al., 2000; LAMBRUSCHINI et al., 2000; RICKER et al., 2003). Estes resultados indicam que as moléculas de TRH estão efetivamente localizadas perto das cabeças lipídicas, mimetizando possivelmente a solvatação. Inúmeros autores

atribuem o efeito estabilizador da TRH a esta interação direta com a membrana, isto é, em termos da hipótese da substituição da água, mencionada previamente (CROWE et al., 1987; 1992; 1997; 1998b). Outros autores, no entanto, atribuem a estabilização pela TRH a um puro efeito mecânico. Este ponto de vista, baseado na teoria proposta por Bryant e Wolfe para a estabilização de membranas por solutos (BRYANT e WOLFE, 1992; WOLFE e BRYANT, 1999), entende que a estabilização envolve a formação de uma matriz vítrea que impede mecanicamente mudanças de fases e flutuações conformacionais em bicamadas lipídicas (KOSTER et al., 1994; 2000; ZHANG e STEPONKUS, 1996). A hipótese da vitrificação é capaz de explicar as diferenças entre a habilidade protetora de diferentes açúcares e também a maior eficiência da TRH como estabilizante. A teoria não exclui a possibilidade de ligações de hidrogênio específicas entre as moléculas lipídicas e o açúcar, entretanto estas interações não são interpretadas como fator determinante para o processo de estabilização (KOSTER et al., 2000; WOLFE e BRYANT, 1999).

No caso de proteínas expostas à desidratação a TRH parece impedir alterações conformacionais na estrutura terciária, que levam a perda completa da função biológica, especialmente o desenovelamento (CARPENTER e CROWE, 1989; CARPENTER et al., 1994; PRESTRELSKI et al., 1993; SASTRY e ANGMON, 1997; SINGER e LINDQUIST, 1998b; ALLISON et al., 1999). Na estabilização de proteínas, tanto a hipótese da substituição da água, quanto da vitrificação também tem sido racionalizadas para explicar o efeito da TRH, porém neste caso, uma terceira hipótese foi proposta. A chamada *water entrapment hypothesis*, segundo a qual durante a desidratação a TRH concentraria a água residual perto da superfície da proteína, preservando portanto em grande extensão a solvatação e suas propriedades nativas, foi apresentada por Belton e Gil em 1994 (BELTON e GIL, 1994) e discutida em outros estudos (SASTRY e ANGMON, 1997, ALLISON, 1999, DATTA et al., 2001; COTTONE et al., 2002,).

Nas últimas décadas, inúmeros estudos experimentais tem abordado o problema da interação TRH-membrana, entretanto apenas dois estudos teóricos, utilizando protocolos de minimização de energia, foram reportados (CHANDRASEKHAR e GABER, 1988; RUDOLPH et al., 1990). O primeiro estudo mostra que, na ausência de água, são observadas conformações energeticamente estáveis onde a TRH pode realizar ligações de hidrogênio com múltiplas moléculas lipídicas (CHANDRASEKHAR e GABER, 1988). Uma extensão do método para a

comparação entre os efeitos da TRH, sacarose e glicose apresentou resultados que não concordaram, entretanto, com a ordem experimental esperada para a eficiência destes açúcares (RUDOLPH et al., 1990).

Até o presente trabalho apenas um estudo (reportado em duas publicações), envolvendo a interação da proteína corboxi-mioglobina com a TRH, havia utilizado simulações moleculares na investigação dos mecanismos de interação entre TRH e proteínas (COTTONE et al., 2001; 2002). Investigações empregando simulações moleculares sobre a interação TRH-membrana não haviam sido reportadas até então. Esta tese se insere portanto, num contexto onde são muito poucas as informações pertinentes aos detalhes moleculares dos mecanismos de interação da TRH com proteínas e membranas, e onde os inúmeros resultados experimentais, algumas vezes contraditórios, não foram ainda capazes de elucidar completamente o fenômeno de proteção biológica.

Neste trabalho a interação da TRH com proteínas e membranas foi investigada (utilizando o método de Dinâmica Molecular) com o objetivo de se compreender melhor como se processam os mecanismos de interação a nível molecular, e buscar uma explicação para o efeito estabilizador do açúcar sobre estas biomoléculas. Para efeitos de organização neste capítulo será apresentado o estudo realizado sobre a interação TRH-proteína e no capítulo seguinte o estudo sobre a interação TRH-membrana.

3.2- INTERAÇÃO TREHALOSE-PROTEÍNA LISOZIMA

Neste estudo simulações de dinâmica molecular (DM) da proteína lisozima, à temperatura ambiente em solução, foram realizadas na presença e ausência da TRH. A seguir são descritos todos os detalhes envolvidos no estudo realizado.

3.2.1- MÉTODOS

3.2.1.1-Sistemas Moleculares

A estrutura cristalina da proteína lisozima (código PDB 194L), determinada com resolução de 1,33 Å (VANEY et al., 1996), foi utilizada como ponto de partida em todas as simulações. Dois sistemas foram considerados: um contendo apenas a

proteína em água e outro contendo a proteína em água na presença de TRH em uma concentração aproximada de 0,5 M. Em ambos os casos simulações de DM foram realizadas sob condições periódicas de contorno em uma caixa cúbica inicial de 7.2 nm de aresta. As moléculas de TRH, quando inclusas, foram distribuídas uniformemente por toda a caixa, mantendo uma distância de pelo menos 0,5 nm entre elas e da superfície da proteína. O sistema foi então solvatado preenchendo a caixa com moléculas de água modelo SPC/E (BERENDSEN et al., 1987) impondo uma distância mínima de 0,28 nm entre elas e entre qualquer átomo do soluto. As coordenadas das 139 moléculas de água pertencentes à estrutura cristalográfica da proteína foram preservadas. Finalmente, as oito moléculas de água com maior potencial eletrostático no átomo de oxigênio, e distância mínima de 1,0 nm de qualquer átomo da proteína, foram substituídas por íons cloreto para neutralizar o sistema. Este procedimento resultou em um sistema com 106 moléculas de TRH, 8 íon cloreto e 9319 moléculas de água (35695 átomos) para o sistema com TRH e 8 íons cloreto e 11663 moléculas de água (36960 átomos) no sistema sem TRH.

3.2.1.2- Simulações de Dinâmica Molecular

Todas as simulações foram realizadas utilizando-se o campo de força AMBER96 (CORNELL et al., 1995) em conjunto com uma versão modificada (conjunto de cargas otimizado para a TRH, veja abaixo) do campo de força Glycam98 (WOODS e CHAPELLE, 2000) implementado no programa NWChem 4.1 (HARRISON et al, 2000). Os sistemas foram equilibrados utilizando-se uma série de etapas. Primeiro o solvente teve energia minimizada com 200 passos do algoritmo *steepest-descent*, mantendo a proteína, TRH (quando presente) e os contra-íons fixos. Esta etapa foi seguida por 200 passos adicionais de minimização com todos os átomos de soluto livres. A equilibração do solvente, mantendo a proteína, TRH (quando presente) e íons cloreto fixos, foi prosseguida realizando-se então 20 ps de DM a 298 K. Sucessivos períodos de equilibração para o soluto (solvente fixo) foram então realizados a 50, 100, 150, 200, 250 e 298 K com redefinições (*reassignments*) das velocidades a cada 5 ps. Finalmente o sistema inteiro (soluto e solvente) foi equilibrado por 50 ps de DM a 298 K. Seguindo os 100 ps de equilibração, simulações para produção de dados foram conduzidas no ensemble NPT (número de partículas, pressão e temperatura constantes) por 1,5 e 2,5 ns para os sistemas

sem e com TRH, respectivamente. A temperatura foi mantida em 298 K através de acoplamento a um banho térmico (BERENDSEN et al., 1984) com tempos de relaxação de 0,4 e 0,1 ps para solvente e soluto, respectivamente. A pressão foi mantida constante em 1 atm realizando um acoplamento isotrópico das coordenadas do sistema a um banho de pressão (Berendsen et al., 1984) com tempo de relaxação de 0,4 ps. Interações eletrostáticas de longa distância foram consideradas empregando-se o método SPME (*Smooth Particle Mesh Ewald*) (ESMANN et al., 1995). Um raio de corte de 1,0 nm foi utilizado para as interações não ligantes de curto alcance. O método SHAKE (RYCKAERT et al., 1977) foi empregado para manter todas as ligações envolvendo átomos de hidrogênio em seus valores de equilíbrio. Um intervalo de 2 fs foi utilizado para integrar as equações de movimento, baseando-se no algoritmo leapfrog (HOCKNEY, 1970). As coordenadas de todos os átomos do sistema foram escritas a cada 1 ps para realização das análises

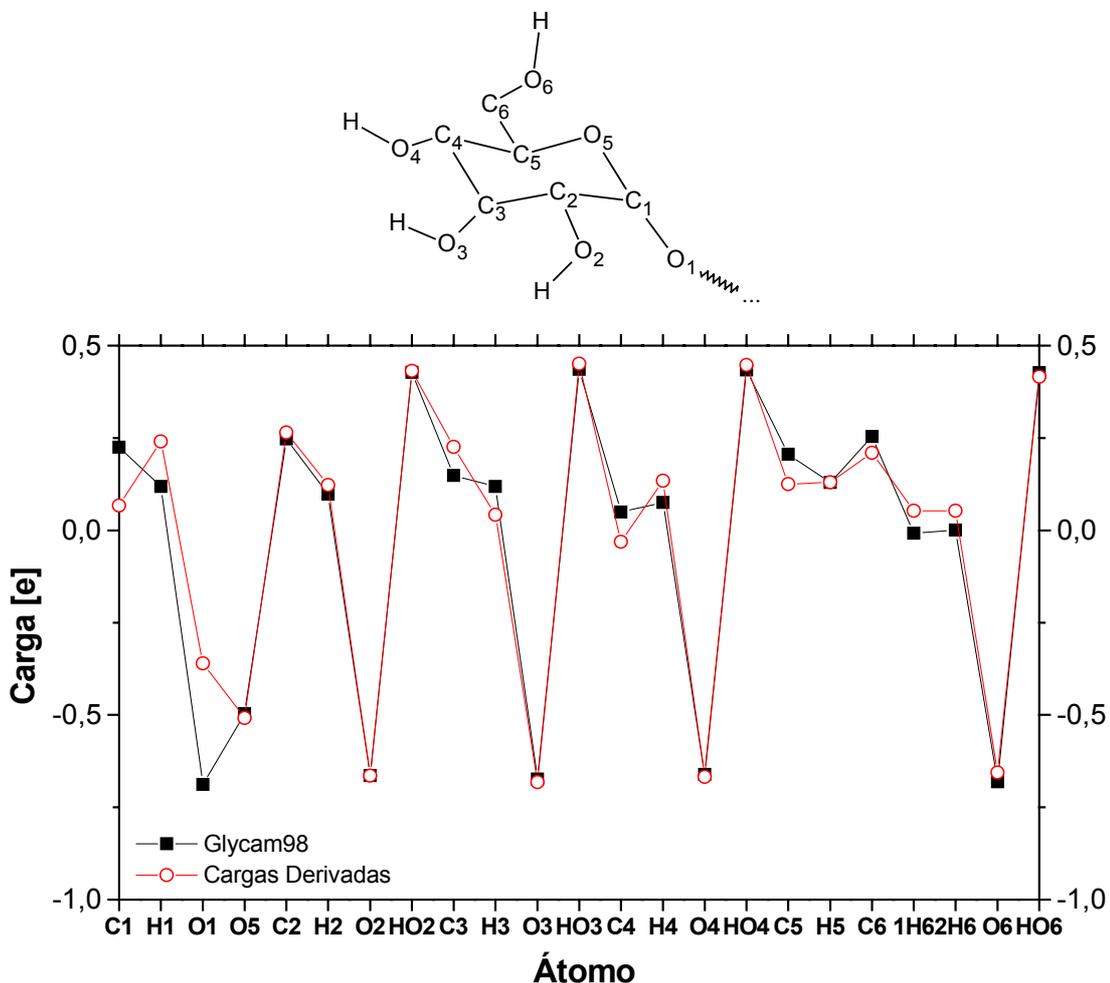
3.2.1.3- Obtenção das Cargas para Trehalose

As presentes simulações utilizam o campo de força Glycam98 (WOODS e CHAPELLE, 2000) para descrever as moléculas de TRH, exceto as cargas parciais atômicas, que foram reotimizadas para o caso específico do dissacarídeo. Conjuntos de cargas em campos de força para carboidratos são normalmente derivados baseado-se em pequenos fragmentos (DAMM et al., 1997; KONY et al., 2002) ou na molécula de glicose (WOODS et al., 1995; WOODS e CHAPELLE, 2000). Entretanto, a TRH (assim como resíduos em oligo e polissacarídeos) apresenta um grupo hidroxila funcionalizado através de uma ligação glicosídica. Tal modificação no ambiente químico do grupo provavelmente altera suas propriedades eletrostáticas. Para minimizar este problema, as cargas parciais para o dissacarídeo TRH foram obtidas utilizando-se o método RESP (BAYLY et al., 1993). Inicialmente a geometria do dissacarídeo foi otimizada empregando cálculo Hartree-Fock a nível 6-31G* e um primeiro conjunto de cargas parciais foi obtido através de um ajuste do *restrained electrostatic potential (RESP)* baseado na estrutura otimizada. Todos os cálculos foram realizados utilizando-se o programa NWChem4.1 (HARRISON et al., 2000). Uma simulação de DM (1 ns) a 298K foi realizada para a TRH em uma caixa com 869 moléculas de água SPC/E (BERENDSEN et al., 1987) utilizando-se este primeiro conjunto de cargas. O procedimento de derivação das cargas foi então

repetido para as duas estruturas médias da TRH correspondendo aos intervalos 0,0-0,5 e 0,5-1,0 ns da DM em água. O valor médio destes dois conjuntos de carga foi definido então como o conjunto final de cargas para a TRH. Valores de 0,005a.u. e 0,001a.u. foram utilizados respectivamente para vínculos harmônicos e hiperbólicos (*harmonic e hyperbolic restrains*) em todos os ajustes RESP.

Uma segunda simulação de DM (1 ns), utilizando o conjunto final de cargas para a TRH, foi realizada partindo-se de uma estrutura inicial distorcida ($\Phi=240^\circ$ e $\Phi'=300^\circ$, com Φ e Φ' definidos pelos átomos O5-C1-O1-C1' e C1-O1-C1'-O5, respectivamente (Figura 3.1)) que convergiu para a estrutura experimental em 100 ps. Os correspondentes valores médios dos ângulos diedros glicosídicos $\Phi=\Phi'=51 \pm 9^\circ$ apresentaram bom acordo com valores determinados através de RMN ($\Phi=\Phi'=41 \pm 5^\circ$) (BATTA et al., 1997) e experimentos de Dicroísmo Circular ($\Phi=\Phi'=60^\circ$) (DUDA e STEVENS, 1990). O conjunto final de cargas obtido é comparado ao conjunto correspondente para a molécula de glicose no campo de força Glycam98 (WOODS e CHAPELLE, 2000) na Figura 3.2. Os dois conjuntos são bastante similares para a maioria dos átomos. As diferenças mais significativas estão restritas, como esperado, à região da ligação glicosídica. A derivação de cargas através de ajuste RESP (BAYLY et al., 1993) visa manter o momento de dipolo da molécula o mais próximo possível do seu valor mecânica-quântico, resultando durante as simulações em uma descrição realística das interações intermoleculares, tanto entre moléculas idênticas, quanto entre moléculas distintas. Todo o procedimento de derivação das cargas foi realizado de acordo com a filosofia dos campos de força Amber96/Glycam98 (CORNELL et al., 1995; WOODS e CHAPELLE, 2000) preservando assim a compatibilidade dos parâmetros.

FIGURA 3.2- Comparação entre o conjunto de cargas atômicas derivado para a TRH no presente estudo e o conjunto de cargas para a glicose do campo e força Glycam98.



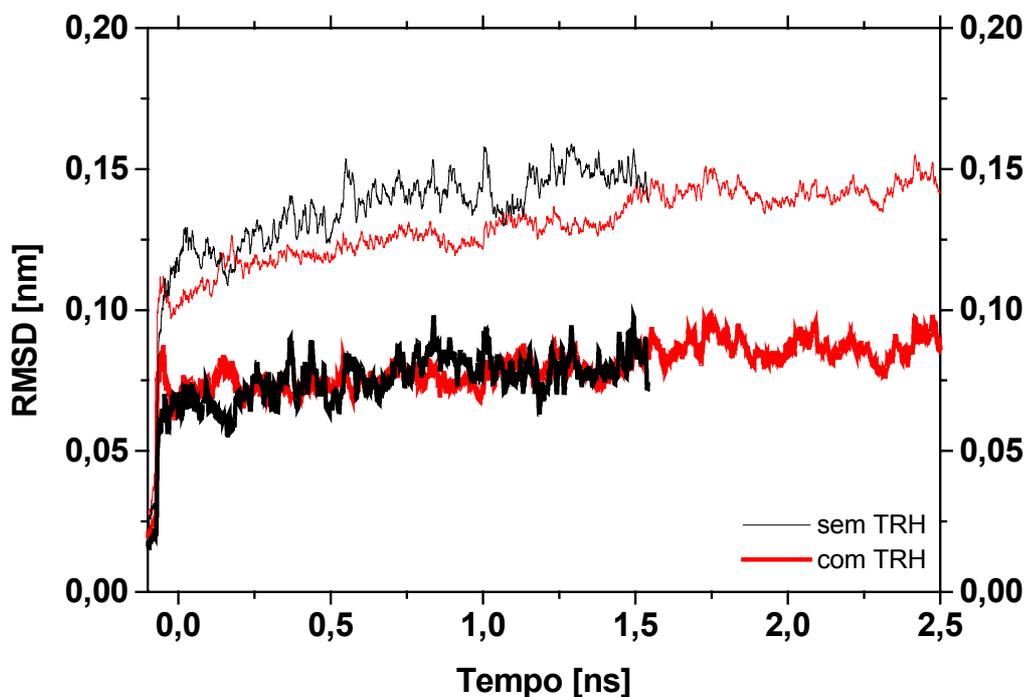
3.2.2- RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.2.2.1- Desvios a Partir da Estrutura Inicial

Após a equilibração inicial de 100 ps nenhum desvio significativo foi observado na energia total dos sistemas e nas contribuições individuais para a energia de interação (potencial e não ligante) (dados não apresentados).

Os desvios posicionais atômicos (RMSD) a partir da estrutura cristalográfica da lisozima, calculados considerando-se todos os átomos da proteína, assim como apenas os átomos de carbono C α são apresentados na Figura 3.3.

FIGURA 3.3- Variação do RMSD a partir da estrutura cristalográfica da lisozima durante as simulações na presença (vermelho) e ausência (preto) da TRH. O RMSD foi calculado considerando todos os átomos da proteína (linhas finas), ou apenas os átomos de carbono $C\alpha$ (linhas grossas).



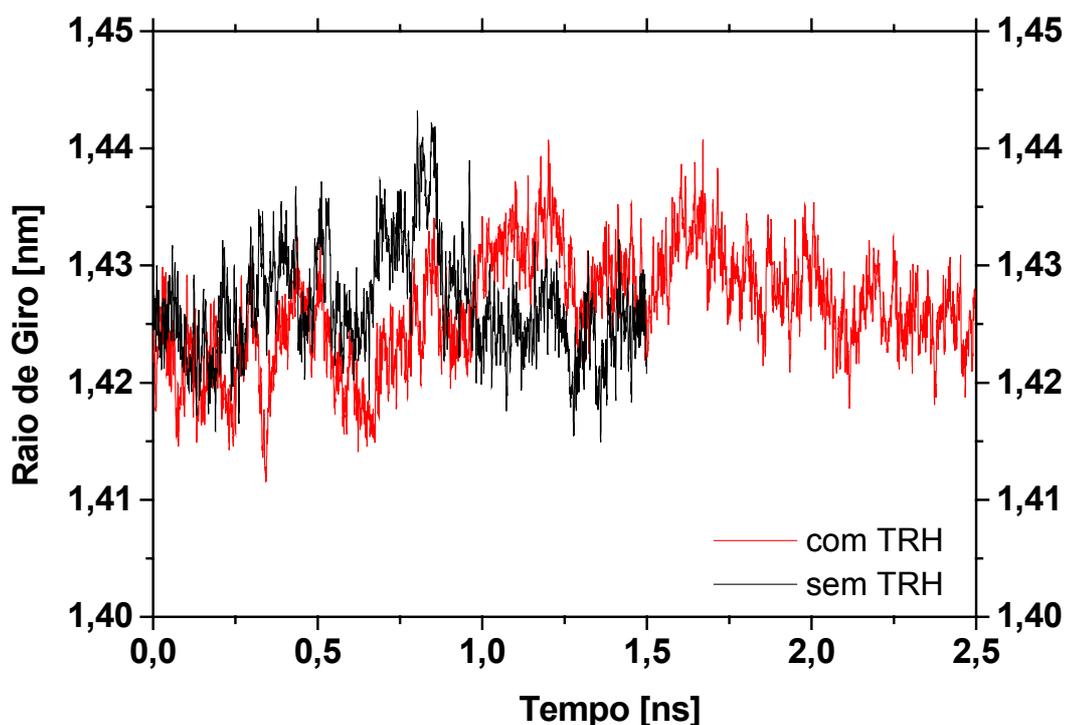
Como pode ser observado, nas duas simulações a convergência no RMSD ocorre essencialmente dentro dos 0,1 ns de equilíbrio para os átomos $C\alpha$. Após este período apenas desvios moderados são observados. O RMSD para todos os átomos da proteína também converge dentro do tempo de equilíbrio. Entretanto, o valor do RMSD para a simulação em presença da TRH é sistematicamente menor (aproximadamente 0,02 nm) comparado à simulação sem o dissacarídeo. Esta diferença não é observada no RMSD para os átomos $C\alpha$, sugerindo, portanto, que a estrutura secundária da proteína não é afetada pela presença da TRH.

O raio de giro da proteína em função do tempo é apresentado na Figura 3.4. Como pode ser observado, não existem desvios significativos e em ambas as simulações (com ou sem TRH) os valores são muito semelhantes.

Estes resultados se encontram em acordo com dois estudos recentes, empregando cristalografia de raios-X, que investigam a proteína lisozima na ausência e presença da TRH (DATTA et al., 2001; SARASWATHI et al., 2002). Ainda que os fatores térmicos atômicos apresentem-se levemente menores na

presença do aditivo estabilizante, a estrutura da proteína permanece essencialmente não afetada pela TRH (DATTA et al., 2001; SARASWATHI et al., 2002). A estabilidade das propriedades: RMSD, energia total e raio de giro, indica que os sistemas (com e sem TRH) atingiram o equilíbrio dentro dos 0,1 ns de equilibrção, com a proteína apresentando apenas pequenos desvios a partir da estrutura cristalográfica durante as simulações. A TRH, portanto, quando presente no meio, não altera significativamente a estrutura da lisozima.

FIGURA 3.4- Variação do raio de giro da proteína lisozima durante as simulações na presença (vermelho) e ausência (preto) da TRH.



3.2.2.2- Interações Trehalose-Proteína

A configuração inicial do sistema proteína-TRH foi obtida distribuindo-se uniformemente as moléculas de TRH na caixa de simulação (Figura 3.5a). A variação da distância média entre os átomos de oxigênio da TRH e o centro de geometria da proteína durante a simulação é apresentada na Figura 3.6. O perfil da variação indica que as moléculas de TRH tendem a agregar-se e mover-se em direção à superfície da proteína dentro do primeiro 1 ns de simulação. Este novo arranjo (Figura 3.5b) parece ser essencialmente estável por todo o resto da simulação (Figura 3.6).

FIGURA 3.5- Configuração inicial (a) e final (b) do sistema contendo TRH. As moléculas de água foram removidas por clareza. As moléculas de TRH são representadas em azul, a proteína em amarelo na configuração inicial e em vermelho na configuração final.

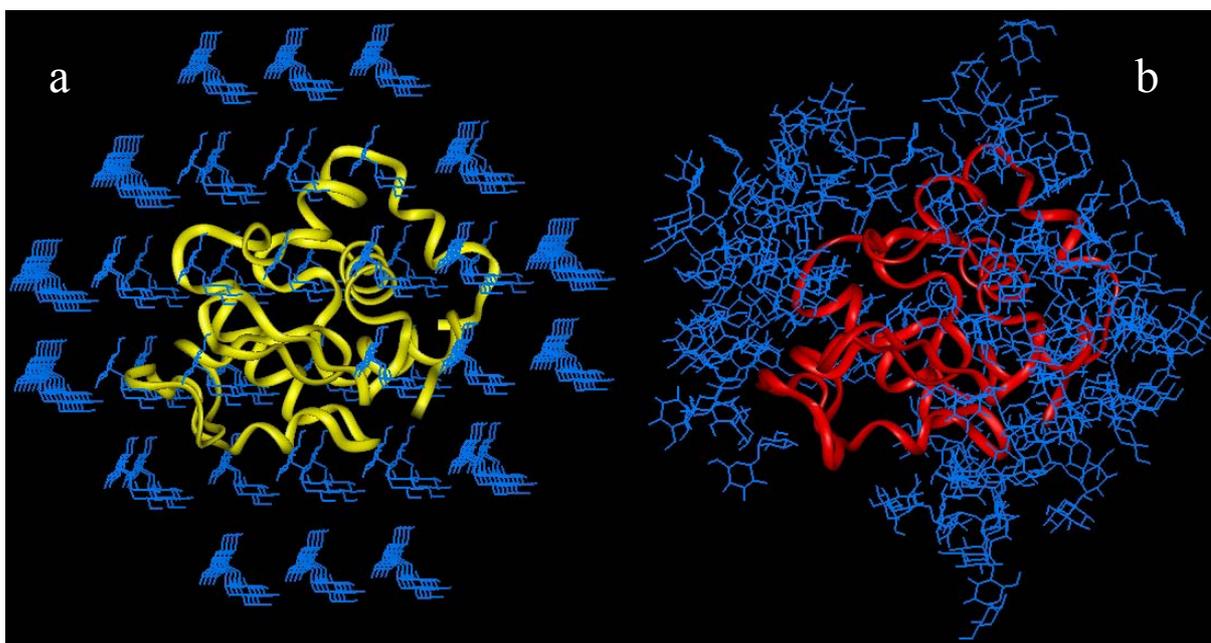
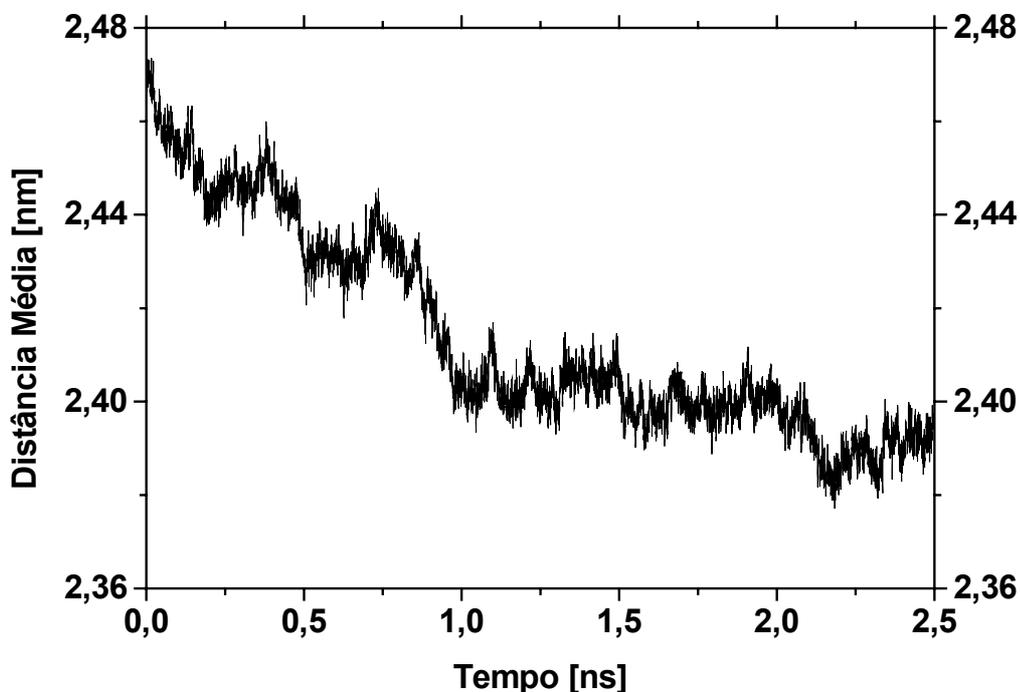


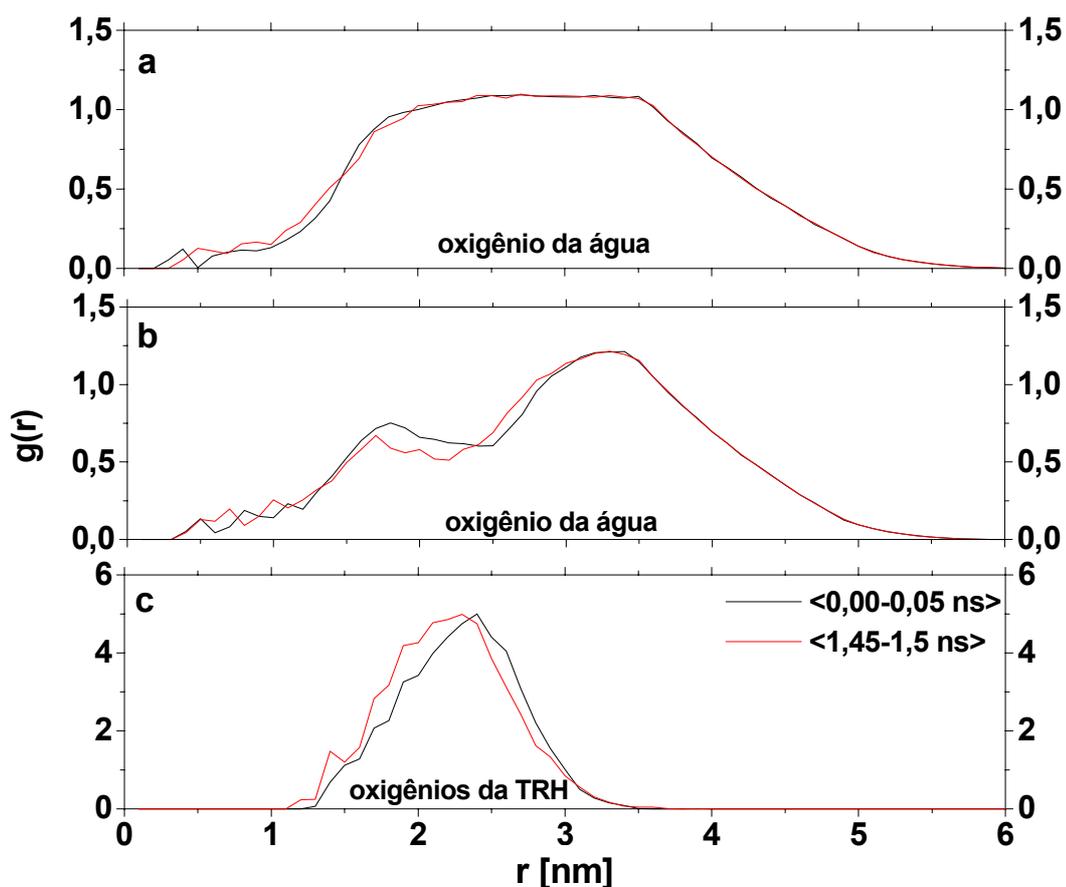
FIGURA 3.6- Variação da distância média entre os átomos de oxigênio da TRH e o centro de geometria da proteína lisozima durante a simulação incluindo TRH.



As distribuições radiais de pares, $g(r)$, correspondendo ao oxigênio da água e aos oxigênios da TRH ao redor do centro geométrico da proteína, calculadas para as duas simulações nos primeiros 5 ps e no intervalo 1,45-1,50 ns (sistema equilibrado), são apresentadas na Figura 3.7. As distribuições iniciais e equilibradas para a água no sistema sem TRH (Figura 3.7a) são, como esperado, praticamente indistinguíveis. No sistema com TRH estas distribuições apresentam-se diferentes indicando que no intervalo aproximado 1,5-3,0 nm um certo número de moléculas de água foram substituídas por moléculas de TRH (Figura 3.7b). Comparando as distribuições iniciais e finais no sistema contendo TRH (Figuras 3.7 b e c) as seguintes observações podem ser feitas: um deslocamento da distribuição da TRH em direção a superfície da proteína (conforme antecipado pelas Figuras 3.5 e 3.6); um deslocamento da distribuição da água para longe da proteína (densidade reduzida no intervalo aproximado 1,5-2,5 nm e aumentada no intervalo aproximado 2,5-3,5 nm). A densidade da água no intervalo aproximado 0,0-1,5 nm é essencialmente não afetada, indicando que (numa escala de tempo de nanosegundos) as moléculas de água mais fortemente ligadas à proteína não são deslocadas e formam uma camada fina entre a superfície da proteína e a camada

formada pelas moléculas de TRH. Esta camada é composta de aproximadamente 125 moléculas de água, segundo estimado pela integral de $4\pi r^2 g(r)$.

FIGURA 3.7- Função distribuição radial de pares ($g(r)$) para o oxigênio da água e os oxigênios da TRH em torno do centro de geometria da proteína nos intervalos 0,00-0,05 ns (preto) e 1,45-1,50 ns (vermelho) das simulações na ausência (a) e presença (b, c) da TRH.



A evolução temporal do número de ligações de hidrogênio (LH) no sistema contendo TRH é apresentado na Figura 3.8. Os critérios utilizados para definir uma LH foram distância hidrogênio-aceptor menor que 0,25 nm e ângulo doador-hidrogênio-aceptor maior do que 135° . As correspondentes variações globais no número de LH durante a simulação são apresentadas na Tabela 3.1.

FIGURA 3.8- Variação do número de LH entre a proteína lisozima e as moléculas de TRH (a) e água (b), e entre as moléculas de TRH e água (c), durante a simulação em presença de TRH.

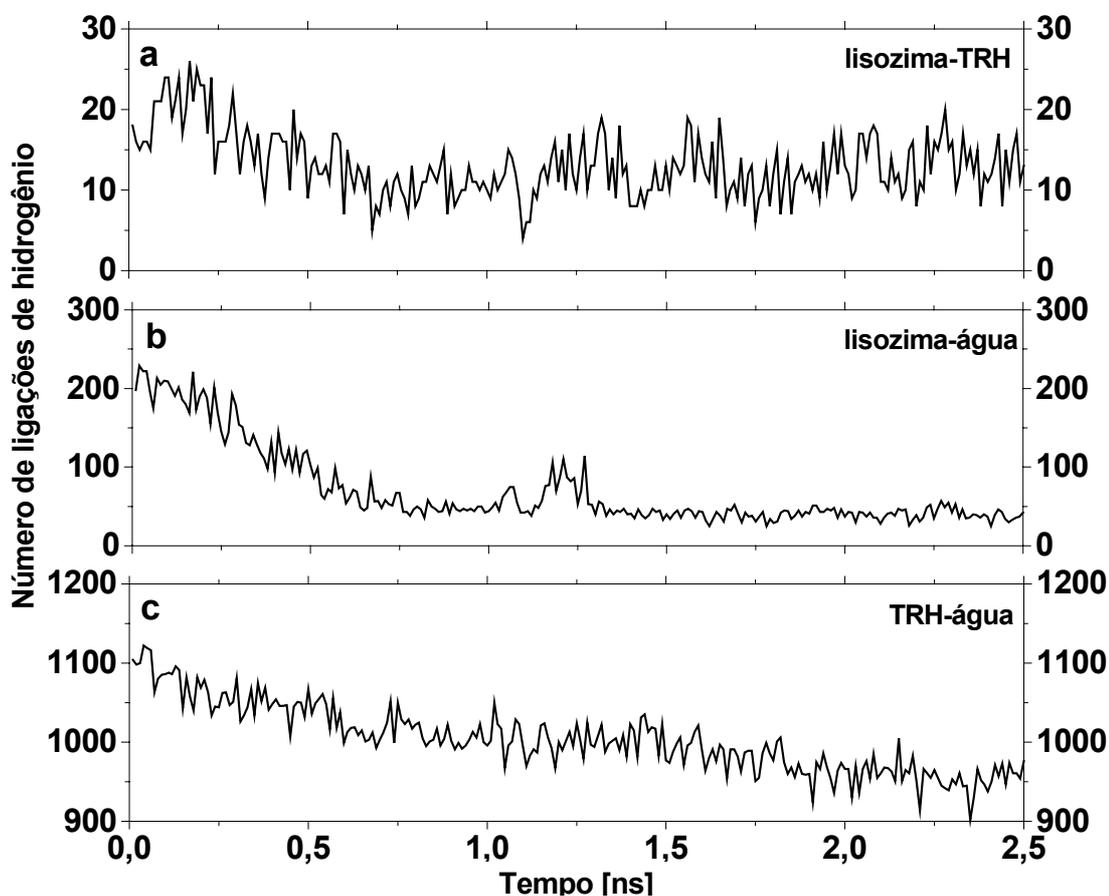
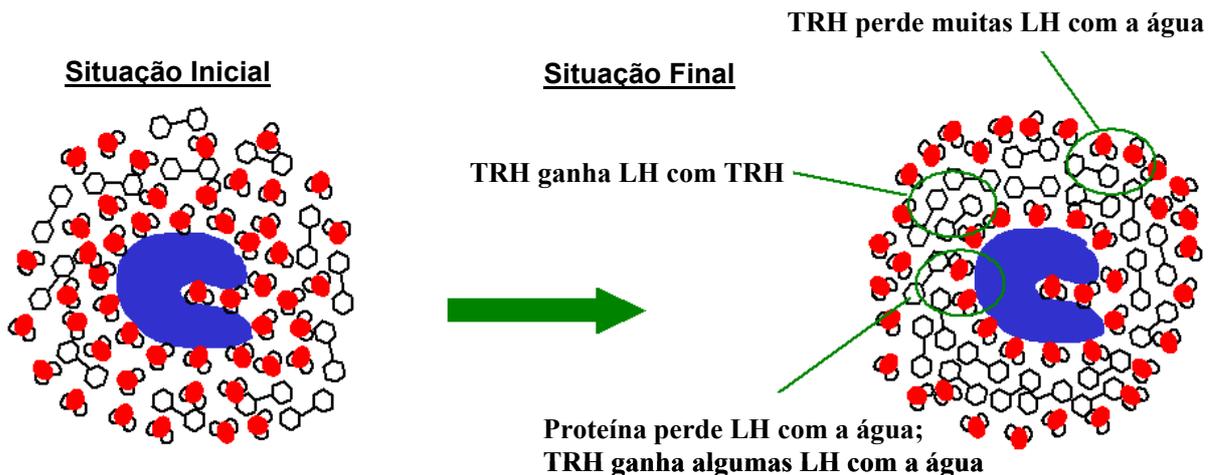


Tabela 3.1- Valor inicial e variação (entre parênteses) do número de LH entre as espécies presentes durante a simulação no sistema com TRH. Os valores médios foram calculados sobre os intervalos 0,0-0,2 ns (inicial) e 2,3-2,5 ns (final). O asterisco indica o número médio de LH do subconjunto de moléculas de água que pelo menos uma vez durante a simulação estiveram formando LH com a proteína.

	Lisozima	TRH	Água	Água *
Lisozima	100 (0,0)	20 (-7)	199 (-161)	199 (-161)
TRH	-	353 (+22)	1085 (-133)	378 (-66)
Água	-	-	15492 (+82)	4460 (+129)

Como pode ser notado, inesperadamente, ainda que as moléculas de TRH agrupem-se em torno da proteína, o número de LH diretas proteína-TRH não aumenta (Figura 3.8a). Ao contrário, uma leve diminuição é observada durante o curso da simulação. Por outro lado, como um efeito indireto da formação da camada de TRH, o número de LH proteína-água diminui aproximadamente quatro vezes durante os 0,8 ns iniciais da simulação (Figura 3.8b), correspondentes à equilibração das moléculas de TRH. Esta observação sugere que as moléculas de TRH competem eficientemente com a proteína pela formação de LH com as moléculas de água *trapped* na fina camada presente na sua superfície. Esta interpretação é corroborada pela análise das LH restritas ao subconjunto de moléculas de água que pelo menos uma vez durante simulação formaram LH com a proteína (Tabela 3.1). Este subconjunto de moléculas perde um número menor de LH com a TRH (aproximadamente metade) comparado às moléculas de água no *bulk* da solução. De fato, no início da simulação este subconjunto de moléculas ganha LH da TRH (+14 em 0,5 ns, porém perde (-11) em 1,0 ns, para finalmente atingir -66 em 2,4 ns). Porém, em adição a este pequeno acréscimo no número de LH TRH-água próximo à superfície da proteína, o *clustering* das moléculas de TRH provoca uma grande perda de LH TRH-água no sistema como um todo, sendo esta a tendência dominante na evolução temporal da quantidade (Figura 3.8 c). Finalmente, o número de LH TRH-TRH aumenta, enquanto o número de ligações proteína-proteína permanece essencialmente inalterado (Table 3.1). Estas observações estão sumarizadas na Figura 3.9 na forma de um modelo proposto para a interação TRH-proteína em solução aquosa (0,5 M de TRH) na escala de nanosegundos.

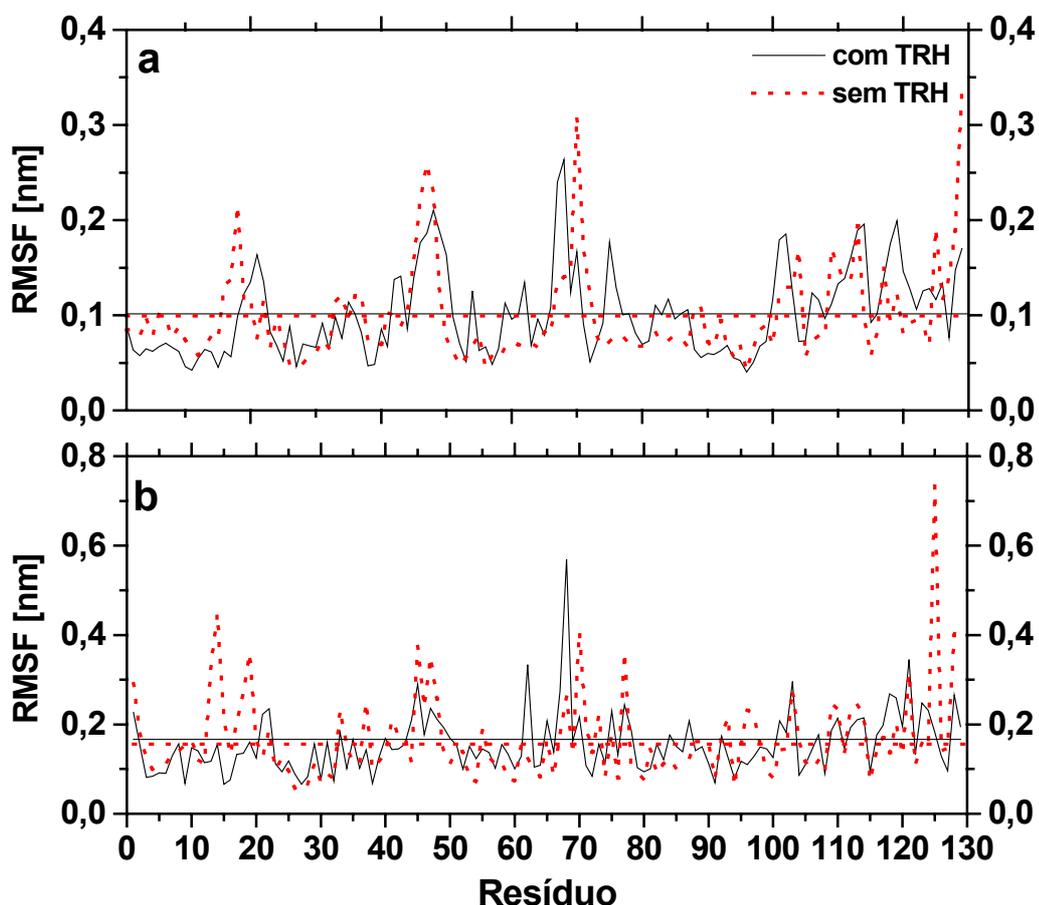
FIGURA 3.9- Modelo para a interação TRH-proteína em solução aquosa na escala de nanosegundos. Na situação inicial, a TRH é distribuída homogeneamente em solução. A presença da proteína induz um agrupamento nas moléculas de TRH e o *trapping* de uma camada fina de moléculas de água na superfície da proteína. As moléculas de TRH na camada formada pelo dissacarídeo competem eficientemente com a proteína para a formação de LH com as moléculas de água na camada *trapped*, efetivamente desolvatando a proteína. O processo global resulta em uma perda de LH proteína-água, um ganho de LH TRH-TRH e uma perda geral de LH TRH-água (o ganho destas ligações na superfície da proteína é menor do que a perda no *bulk* da solução devido ao clustering das moléculas de TRH).



3.2.2.3- Flutuações Estruturais da Proteína

As flutuações estruturais apresentadas pela proteína a partir da estrutura cristalográfica foram obtidas nas simulações através do cálculo do RMSF (*root-mean-square fluctuations*) das posições atômicas. O RMSF foi calculado sobre o intervalo 1,0-1,5 ns para os átomos $C\alpha$ e para a média de todos os átomos de cada resíduo de aminoácido (Figura 3.10). As flutuações calculadas não apresentaram diferenças significativas com relação à presença de TRH (Figura 3.10 a e b). As flutuações médias para os átomos $C\alpha$ foram 0,101 nm e 0,099 nm para o sistema com e sem TRH, respectivamente (Figura 3.10a). Os valores médios considerando a posição média de todos os átomos de cada resíduo foram 0.155 nm e 0.166 nm para o sistema com e sem TRH, respectivamente. Estes resultados contrastam com observações prévias da interação TRH-proteína baseadas em uma simulação da mioglobina (COTTONE, et al., 2001). Neste estudo, a adição da TRH à proteína solvatada parece ter diminuído consideravelmente o movimento de todos os átomos da proteína a 300K, incluído átomos do *backbone*. Este desacordo pode ter surgido devido a imprecisões estatísticas originárias do curto tempo das simulação (300 ps) ou muito provavelmente devido a concentração de TRH significativamente maior utilizada no estudo (aproximadamente 23 M) (COTTONE, et al., 2001).

FIGURA 3.10- RMSF para a lisozima considerando apenas os átomos de carbono $C\alpha$ (a) ou a posição média de todos os átomos de cada resíduo de aminoácido (b). As flutuações médias foram obtidas no intervalo 1,0-1,5 ns da simulação na presença (preto) e ausência (vermelho) da TRH. As linhas horizontais representam a média para todos os resíduos.



3.2.3- CONCLUSÕES

Os principais mecanismos propostos para racionalizar os (parcialmente contraditórios) dados experimentais sobre a estabilização de proteínas pela TRH (discutidos em detalhes anteriormente) são: (i) interação direta entre a TRH e a proteína através de LH (hipótese da substituição da água) (PRESTRELSKI et al., 1993; CARPENTER e CROWE, 1989; ALLISON et al., 1999); (ii) o *entrapment* de moléculas de água próximo à superfície biomolecular (hipótese *water entrapment*), (BELTON e GIL, 1994; COTTONE et al., 2002); ou (iii) a formação de uma matriz de TRH com alta viscosidade (hipótese da vitrificação), (SUN et al., 1998; CROWE et

al., 1998a). Interpretando os resultados das presentes simulações em termos das três hipóteses acima mencionadas deve-se manter em mente que as simulações aqui realizadas investigam apenas um dado intervalo de concentração (soluções aquosas moderadamente concentradas, 0.5 M), uma escala de tempo bastante curta (2.5 nanosegundos) e sistemas à temperatura ambiente.

Mantendo estas restrições em mente, os resultados das presentes simulações não fornecem suporte para a hipótese da substituição das águas. Ainda que as moléculas de TRH agrupem-se em torno da proteína, elas não expõem as moléculas de água mais próximas da sua superfície. Além disso, o número de LH proteína-TRH não aumenta durante o curso da simulação. Isto porém não exclui a possibilidade da substituição da água em uma escala de tempo maior. Porém, espera-se que o *clustering* inicial das moléculas de TRH, levando a um aumento na viscosidade local, venha a diminuir significativamente a ocorrência de tal processo. Previamente já foi demonstrado que a co-cristalização da lisozima com TRH, sorbitol ou sacarose não afeta significativamente a camada de hidratação da proteína, indicando a ausência de forte interação direta entre a proteína e estes aditivos, e sugerindo que o efeito de estabilização de carboidratos deve ocorrer fora da vizinhança imediata da proteína (DATTA et al., 2001)

Os resultados das simulações também não corroboram a hipótese da vitrificação. Ainda que o *clustering* das moléculas de TRH próximo à proteína promova pequenos desvios na conformação da proteína a partir da estrutura cristalina, o efeito observado foi bastante discreto. Estas observações estão de acordo com a sugestão de que a TRH não afeta significativamente a dinâmica de bioestruturas sob condições ideais (i.e. em solução a temperatura ambiente) (DATTA et al., 2001, SARASWATHI, et al., 2002, CROWE et al., 2001). Porém, esta conclusão é restrita ao intervalo de concentrações moderadas investigadas neste trabalho, pois em concentrações maiores ou em matrizes vítreas de TRH não há dúvida de que a flexibilidade da proteína é reduzida (COTTONE et al., 2001, SUN et al., 1998).

Finalmente, os resultados das simulações são mais facilmente interpretados no contexto da hipótese *water entrapment* (BELTON e GIL, 1994) já que uma camada de água foi preservada na superfície da proteína na escala de tempo investigada. Os resultados concordam com observações experimentais que sugerem que a TRH em solução é totalmente excluída das primeiras camadas de hidratação

de proteínas (XIE e TIMASHEFF, 1997; SOLA-PENNA e MEYER-FERNANDES, 1996) e também com um estudo teórico, utilizando DM, sobre a interação TRH-mioglobina (COTTONE et al., 2002). Além disso, a simulação sugere que a água *trapped* pode apresentar propriedades particulares. Como as moléculas de TRH competem eficientemente com a proteína para a formação de LH com as moléculas de água *trapped* (Figura 3.9), reduzindo o número de LH proteína-solvente por um fator de quatro, esta camada é esperada apresentar reduzida propriedade eletrostática de solvatação na direção da proteína. Tal redução na solvatação pode ser responsável por um aumento compensatório de interações intra-proteína, e assim pela estabilização da estrutura nativa.

O objetivo do presente estudo foi o uso de simulações de DM na tentativa de esclarecer o(s) mecanismos de estabilização de proteínas pela TRH. A análise dos resultados levaram à sugestão de um modelo a nível molecular para a interação TRH-proteína em soluções moderadamente concentradas, a temperatura ambiente, e escala de nanosegundos. Claramente simulações de DM adicionais, envolvendo a proteína numa faixa mais ampla de concentrações e temperaturas, são necessárias para fornecer um entendimento mais profundo do mecanismo global de indução de estabilização de bioestruturas pela TRH.

No capítulo seguinte investigações a respeito da interação da TRH com outra classe de biomoléculas (membranas) são apresentadas.

Capítulo 4

INTERAÇÃO TREHALOSE-MEMBRANA

Neste capítulo são descritos todos os detalhes do estudo realizado sobre a interação TRH-membrana. Simulações de Dinâmica Molecular foram empregadas para investigar, a nível molecular, o comportamento de uma membrana fosfolipídica na fase biológica relevante, líquida cristalina ($L\alpha$), na ausência e na presença de TRH. Sistemas contendo diferentes concentrações de TRH foram investigados a 325 K e 475 K numa tentativa de compreender melhor os mecanismos de ação do dissacarídeo sobre a estrutura de membranas, especialmente quando expostas a condições desfavoráveis. Uma bicamada do lipídio dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), constituinte comum de membranas biológicas encontradas em células e organelas, foi utilizada como modelo nas investigações.

4.1- MÉTODOS

4.1.1- Simulações de Dinâmica Molecular

Todas as simulações de dinâmica molecular (DM) desta etapa foram realizadas utilizando-se o programa GROMOS96 (VAN GUNSTEREN et al., 1996) e extensões do campo de força GROMOS96 45A3 (SCHULER et al., 2001) desenvolvidas para simulações de lipídios (CHANDRASEKHAR et al., 2003) e carboidratos (LINS e HÜNENBERGER, 2004). Todas as simulações foram realizadas em solução aquosa utilizando-se o modelo SPC (BERENDSEN et al., 1981) para a água.

As equações de Newton foram integradas empregando o algoritmo leap-frog (HOCKNEY, 1970) e um intervalo de integração de 2 fs. O método SHAKE (RYCKAERT et al., 1977) foi utilizado para manter todas as distâncias de ligação em seus valores de equilíbrio. As simulações foram conduzidas no ensemble isotérmico-isobárico (NPT). A temperatura foi mantida constante acoplando separadamente as coordenadas do solvente e do soluto (TRH e membrana) a um banho térmico com um tempo de relaxação de 0.1 ps (BERENDSEN et al., 1984). A pressão foi mantida constante em 1 atm realizando um acoplamento anisotrópico das coordenadas do

sistema a um banho de pressão com tempo de relaxação de 0.5 ps e compressibilidade isotérmica de 0.46×10^3 ($\text{kJ mol}^{-1} \text{nm}^{-3}$) (BERENDSEN et al., 1984). Interações não-ligantes foram tratadas utilizando um esquema *twin-range cutoff* (van GUNSTEREN e BERENDSEN, 1990). Dentro de um raio de corte de curto alcance de 0,8 nm, as interações foram calculadas a cada intervalo de integração, baseando-se em uma lista de vizinhos atualizada a cada 5 passos. As interações de alcance intermediário foram calculadas simultaneamente com a atualização da lista de vizinho e assumidas constantes no intervalo de atualização, até um raio de corte de longo alcance de 1,4 nm. Para tratar as interações eletrostáticas, além do raio de corte de longo alcance (1,4 nm) foi utilizada a aproximação do campo de reação (TIRONI et al., 1995) com uma permissividade dielétrica relativa de 54 para o solvente. Em todas as simulações as coordenadas atômicas de todos os átomos do sistema foram escritas a cada 1 ps para realização das análises.

4.1.2.- Sistemas Moleculares

Uma membrana hidratada, composta por uma bicamada de 2x64 moléculas de DPPC (Figura 4.1), foi simulada na presença de duas concentrações de TRH em duas temperaturas (325 K e 475 K). Um total de seis simulações foram realizadas envolvendo:

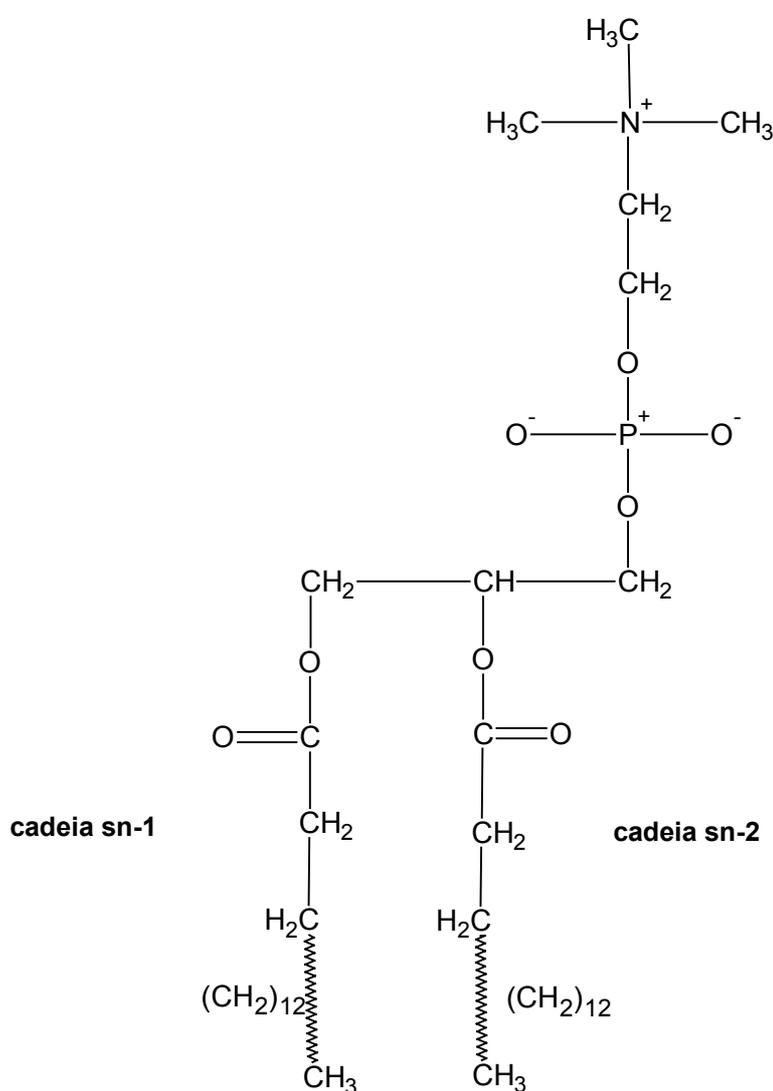
- (i) a membrana de DPPC em água pura a 325 K e a 475 K (simulações controle);
- (ii) a membrana em uma solução 1 molal de TRH (64 moléculas) a 325 K e 475 K;
- (iii) a membrana em uma solução 2 molal de TRH (128 moléculas) a 325 K e 475 K.

A temperatura elevada não representa necessariamente uma situação física real, foi utilizada como um artifício para colocar a membrana sob stress e investigar como a TRH afeta sua resposta nestas condições.

A concentração da solução nos sistemas com 64 e 128 moléculas de TRH é exatamente 1,06 e 2,12 molal (m), respectivamente. Para simplificar, estas concentrações serão referidas como 1 m e 2 m. Em termos de unidades massa/massa [TRH/(TRH+água)] estas concentrações correspondem a soluções com 21% e 42% de TRH. As correspondentes concentrações molares (calculadas após as etapas de equilíbrio a 325 K) são aproximadamente 0,6 M e 1,0 M, respectivamente. Optamos pelo uso de concentrações molal (mol soluto/kg solvente) por não haver dependência com o volume da solução, que varia devido às

simulações serem realizadas no ensemble NPT. As concentrações foram escolhidas arbitrariamente, porém encontram-se dentro de um intervalo de valores investigados em diferentes estudos experimentais em sistemas TRH-membrana (NAKAGAKI et al., 1992; TAKAHASHI et al., 1997; NAGASE et al., 1999; LUZARDO et al., 2000). É importante, no entanto, ressaltar que estas concentrações são significativamente menores que as consideradas em experimentos com membranas desidratadas (CROWE et al., 1998).

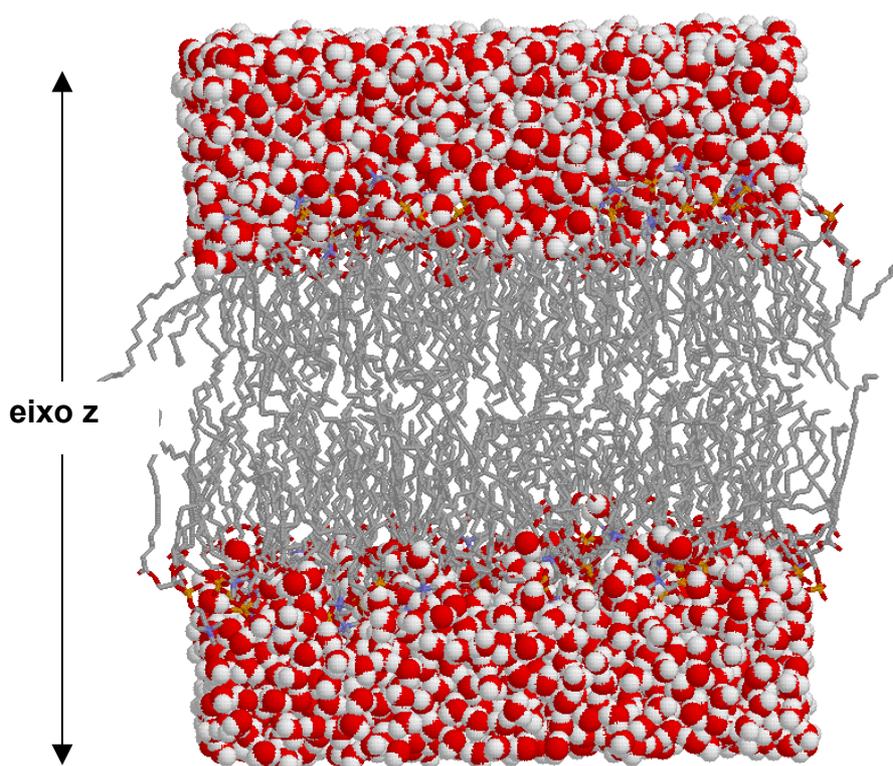
FIGURA 4.1- Representação de uma molécula de DPPC.



Uma bicamada de DPPC completamente hidratada (3655 moléculas de água, implicando 28 a 29 moléculas por lipídio) na fase líquida cristalina, previamente equilibrada durante 2,5 ns de DM a 325 K, foi utilizada como estrutura inicial em

todas as simulações (Figura 4.2). Esta configuração foi utilizada, sem nenhuma etapa adicional de equilíbrio, para as simulações na ausência de TRH. Nas simulações incluindo TRH, as moléculas de água foram removidas e 64 (solução 1 m) ou 128 (solução 2 m) moléculas de TRH foram uniformemente distribuídas no sistema, mantendo uma distância mínima de 0,5 nm entre elas e dos sítios na superfície da membrana. Os sistemas foram então resolvatados com 3339 moléculas de água (resultando em 26 a 27 moléculas por lipídio), impondo uma distância mínima de 0,28 nm entre elas e qualquer outro átomo de soluto. As dimensões da caixa de simulação foram aproximadamente as mesmas nas direções x e y (5,8 x 6,2 nm) e variaram na direção z conforme o aumento da concentração da TRH (7,3, 7,8 e 8,5 nm para as solução com 0 m, 1 m e 2 m de TRH, respectivamente). No total o número de átomos dos sistemas foram: (i) 17365, simulações na ausência de TRH, (ii) 18401, simulações na presença de TRH a 1 m e (iii) 20385, simulações na presença de TRH a 2 m.

FIGURA 4.2- Bicamada (2x64) hidratada de DPPC utilizada como configuração inicial nas simulações realizadas. A água é representada com um modelo de esferas e o DPPC com um modelo de varetas. Átomos de oxigênio em vermelho, carbono em cinza, hidrogênio em branco, nitrogênio em azul e fósforo em laranja.

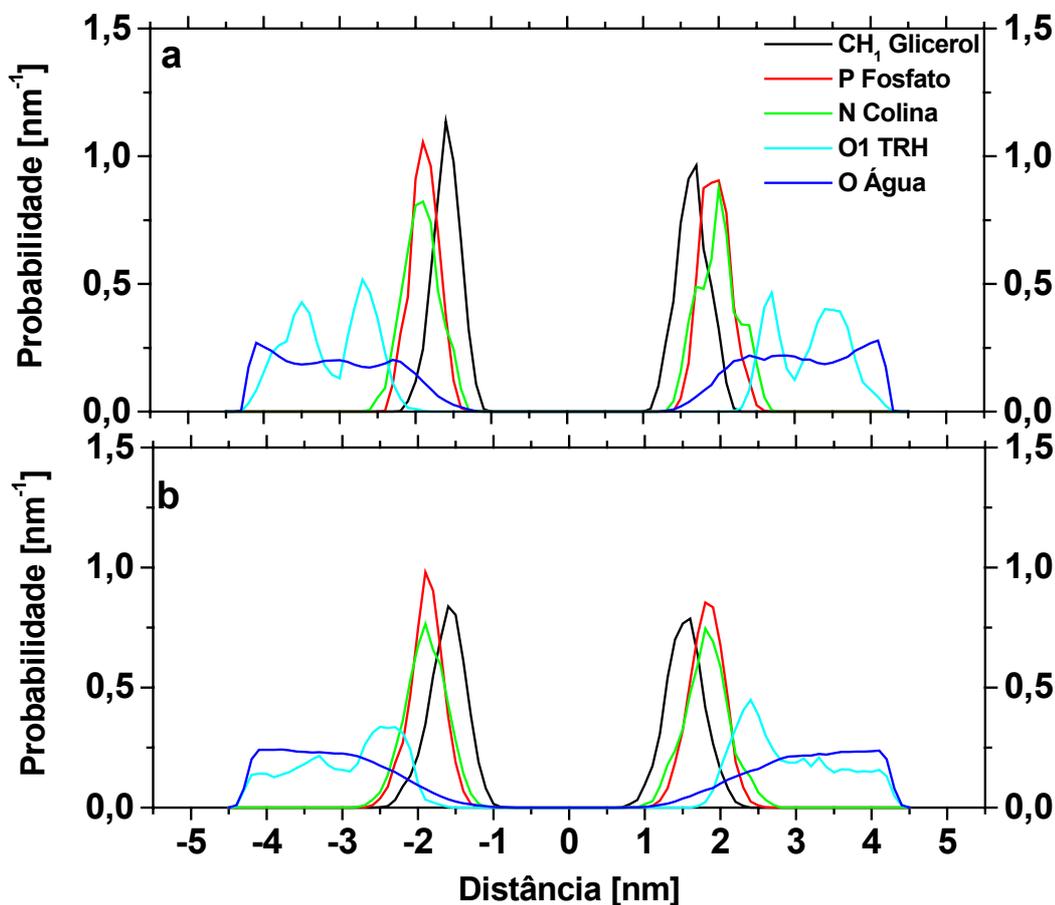


4.1.3- Equilibração dos Sistemas

Nos sistemas sem TRH a configuração equilibrada a 325 K por 2,5 ns foi utilizada diretamente para iniciar as duas simulações, uma a 325 K e a outra a 475 K. Para os sistemas com TRH um procedimento especial de equilibrção foi utilizado para permitir uma relaxação adequada das moléculas de TRH em torno da membrana. O sistema (DPPC, TRH e as recém introduzidas moléculas de água) inicialmente teve a energia minimizada com 1000 passos do algoritmo *steepest descent*. Seguindo, 1,5 ns de uma simulação de DM de pré-equilibrção a 325 K e volume constante foi realizada. Neste ponto a temperatura do sistema foi elevada para 500 K e 5 ns de DM foram realizados nesta temperatura e a volume constante, mantendo-se a posição de todos os átomos da membrana fixos através do uso de vínculos (*constraints*) nas coordenadas espaciais. As distribuições de átomos específicos da membrana, TRH e água ao longo da normal da membrana (eixo-z) para o sistema com concentração 2 m, correspondendo ao início da pré-equilibrção a 325 K e ao fim da equilibrção a 500 K, são apresentadas na Figura 4.3. Como pode se observado, as moléculas de TRH, distribuídas inicialmente em duas camadas (remanescente de seu posicionamento inicial no sistema), durante a equilibrção adquirem uma distribuição mais homogênea, com maior densidade nas regiões próximas à superfície da membrana. Resultados semelhantes foram observados para o sistema contendo 1 m de TRH (dados não apresentados).

As simulações a 325 K e 475 K com as diferentes concentrações de TRH foram originadas das correspondentes configurações finais da equilibrção a 500 K. Os sistemas foram relaxados por 250 ps de DM na temperatura correspondente (325 K ou 475 K), mantendo os átomos da membrana fixos. Para as simulações a 475 K esta etapa foi seguida por mais 100 ps de DM divididos em quatro blocos onde as posições dos átomos da membrana foram gradualmente liberadas. As seis simulações (sem TRH, com TRH a 1 e 2 m, em duas temperaturas) foram conduzidas por 6 ns cada e as análises realizadas sobre este intervalo.

FIGURA 4.3- Distribuição de probabilidade para átomos específicos da TRH, DPPC e água, ao longo da normal (eixo z) da bicamada, para o sistema contendo TRH a 2 m no início da pré-equilibração a 325 K (a) e no fim da equilibração a 500 K (b). As distribuições representam valores médios calculados nos últimos 0,25 ns de cada período de equilibração.



4.1.4- Análises

Uma série de análises foi realizada neste estudo, a maioria sobre a estrutura da membrana. Para facilitar a compreensão, descrevemos abaixo estas análises e a forma como foram realizadas.

A área média por cadeia lipídica, medida que indica o empacotamento molecular das cadeias e consequentemente as interações intermoleculares na membrana, foi calculada dividindo-se a superfície do plano xy da caixa de simulação pelo número de lipídios por camada (64).

Os parâmetros de ordem (S_{CD}) para os átomos de carbono das duas cadeias apolares do DPPC (cadeias sn-1 e sn-2, veja Figura 4.1) foram obtidos nas

simulações através do cálculo do tensor parâmetro de ordem $S_{ij} = 1/2 \langle 3 \cos \theta_i \cos \theta_j - 1 \rangle$, onde θ_i representa o ângulo entre o iésimo eixo molecular em C_n e a normal da bicamada, que neste caso coincide com o eixo-z da caixa de simulação (EGBERTS e BERENDSEN, 1988). A média é realizada sobre o tempo total de simulação e sobre as 128 moléculas de DPPC. Os eixos moleculares definidos para um átomo de carbono C_n são z: vetor entre C_{n-1} e C_{n+1} ; y: vetor perpendicular a z e no plano definido por C_{n-1} , C_n e C_{n+1} , x: vetor perpendicular a z e y. Os parâmetros de ordem S_{CD} são calculados dos correspondentes elementos diagonais S_{zz} , S_{yy} e S_{xx} da matriz tensor através da relação: $-S_{CD} = 2/3 S_{xx} + 1/3 S_{yy}$. Efetivamente os valores de S_{CD} definem a orientação e organização dos átomos de carbono das cadeias lipídicas em relação à normal da membrana, e indiretamente a dinâmica das moléculas. Valores experimentais de S_{CD} do quarto ao oitavo grupo CH_2 de cadeias fosfolipídicas variam em torno de $0,2 \pm 0,02$ (NAGLE, 1993). Para os grupos CH_2 em direção ao fim da cadeias os valores de parâmetro de ordem caem para próximo de zero indicando a ausência de orientações preferenciais (NAGLE, 1993, NAGLE e TRISTAM-NAGLE, 2000). Valores obtidos a partir de simulações moleculares em geral apresentam boa concordância com os valores experimentais, e o perfil de variação dos parâmetros de ordem ao longo das cadeias é normalmente bem representado, havendo diferenças mais significativas com relação aos átomos de carbono próximos aos grupos carbonila (PASTOR e VENABLE, 1994; EGBERTS et al., 1994; CHANDRASEKHAR et al., 2003)

Distribuições de probabilidade normalizadas foram calculadas para átomos específicos das moléculas de TRH, DPPC e água ao longo da normal da bicamada (eixo z da caixa de simulação, veja Figura 4.2). Os átomos considerados foram o fósforo (grupo fosfato do DPPC), o nitrogênio (grupo colina do DPPC), o grupo CH_1 (modelo de átomos unidos, grupo glicerol do DPPC), o oxigênio glicosídico da TRH e o oxigênio da água.

Coefficientes de difusão (D) foram calculados para as moléculas de DPPC, TRH e água. Os coeficientes foram obtidos através da relação de Einstein $2NDt = \langle |R(t) - R(0)|^2 \rangle$ (válida para longos intervalos de tempo, t), onde o lado direito da equação refere-se ao quadrado do deslocamento posicional médio de um átomo específico, e N é o número de graus de liberdade translacionais considerados. Os seguintes átomos tiveram D calculados: CH_1 (átomos unidos, grupo glicerol) para DPPC, oxigênio glicosídico para a TRH e oxigênio para a água. As médias foram

realizadas sobre todas as moléculas de DPPC, TRH ou água, respectivamente. Devido à anisotropia do sistema, D para TRH e água foram calculados separadamente no plano xy (D_{xy} , com $N=2$) e ao longo do eixo z (D_z , com $N=1$). No primeiro caso o intervalo de tempo (t) considerado foi o tempo total de simulação (6 ns). No segundo caso, o movimento das moléculas ao longo do eixo-z é restrito pela membrana e o intervalo considerado foi aquele para o qual o quadrado do deslocamento posicional ΔR_z^2 médio permanece aproximadamente linear em função do tempo (tipicamente 200 ps para as simulações a 325 K e 20 ps para as simulações a 475 K). O valor onde ΔR_z^2 atinge uma região de *plateau* no gráfico ($\Delta R_z^2 \times t$) foi também reportado neste caso.

Ligações de hidrogênio (LH) foram monitoradas e classificadas de acordo com os pares de espécies presentes nas simulações (TRH-TRH, TRH-DPPC, TRH-água e DPPC-água). Os critérios utilizados para definir uma LH foram: distância hidrogênio-acceptor menor que 0,25 nm e ângulo doador-hidrogênio-acceptor maior do que 135° . Todos os átomos de oxigênio da TRH e DPPC foram considerados como aceptores de LH e todos os grupos hidroxila como doadores. A interação entre TRH e DPPC foi adicionalmente caracterizada analisando-se os padrões de ligação apresentados pelas moléculas de TRH. Um padrão é denotado por uma série de números inteiros (em ordem decrescente) indicando o número de LH formadas entre uma molécula de TRH e moléculas de DPPC. Por exemplo, o padrão “211” representa uma molécula de TRH formando simultaneamente duas LH com uma única molécula de DPPC e duas LH com outras duas moléculas, diferentes da primeira. Os resultados apresentados mostram o número médio de moléculas de TRH que apresentam, durante a simulação, os diferentes padrões de conectividade. Os dados foram também organizados de forma a mostrar o *degree of bridging*, isto é, o número de moléculas de DPPC distintas que formam pelo menos uma LH com uma única molécula de TRH (por exemplo, 3 para o padrão “211”).

4.2- RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.2.1- Simulações a 325 K

A 325 K a área média por lipídeo para a bicamada de DPPC na presença de TRH (tanto a 1 m quanto a 2 m) é levemente maior quando comparada à simulação

sem TRH (Figura 4.4a). Os valores correspondentes de $0,56 \text{ nm}^2$ e $0,58 \text{ nm}^2$ (média para o último 1 ns das simulações com e sem TRH, respectivamente) encontram-se no intervalo esperado para uma membrana de DPPC completamente hidratada simulada com o mesmo campo de força e condições de simulação semelhantes (CHANDRASEKHAR et al., 2003). A leve expansão da bicamada na presença de TRH concorda com estudos experimentais utilizando DPPC (e outros fosfolipídios) que sugerem que as moléculas de TRH intercalam-se entre as cabeças polares dos lipídios e aumentam o espaçamento entre as cadeias (NAKAGAKI et al., 1992; LUZARDO et al., 2000; TAKAHASHI et al., 1997). No entanto, a variação observada no valor da área por lipídeo com a adição de TRH é da mesma ordem de magnitude da flutuação da propriedade na membrana modelo em água pura, como observado em uma simulação de 10 ns (área média de 0.57 nm^2 com desvio padrão de 0.005 nm^2 , dado não apresentado). Assim não se pode afirmar com segurança que o aumento observado na área por lipídeo é causado pela TRH, ainda que este seja consistente e ocorra nas simulações com as duas diferentes concentrações do açúcar. A evolução temporal do volume da caixa de simulação (Figura 4.4b) mostra valores essencialmente constantes nas três simulações indicando o equilíbrio atingido na densidade dos sistemas.

A 325 K, a dinâmica das cadeias lipídicas é apenas levemente afetada pela presença da TRH, como pode ser avaliado pelos parâmetros de ordem (S_{CD}) calculados para os consecutivos átomos de carbono das cadeias sn-1 e sn-2 de DPPC nas diferentes simulações (Figura 4.5). Os parâmetros de ordem decrescem levemente com a adição de TRH a 1 m, porém, aumentando-se a concentração para 2 m esta tendência não se mantém. Note que os valores de S_{CD} para a cadeia sn-2 na ausência da TRH são ligeiramente superestimados quando comparados aos dados experimentais (DOULIEZ et al., 1995), uma característica reconhecida do campo de força utilizado para a representação dos lipídeos (CHANDRASEKHAR et al., 2003).

A mobilidade das moléculas de DPPC, TRH e água é também apenas levemente afetada pelas mudanças na concentração da TRH, como pode ser observado pelos coeficientes de difusão lateral (D_{xy}) e transversal (D_z) calculados para estas espécies (Tabela 4.1).

FIGURA 4.4- Área por lipídeo (a) e volume da caixa (b) em função do tempo de simulação para as simulações com as diferentes concentrações de TRH a 325 K .

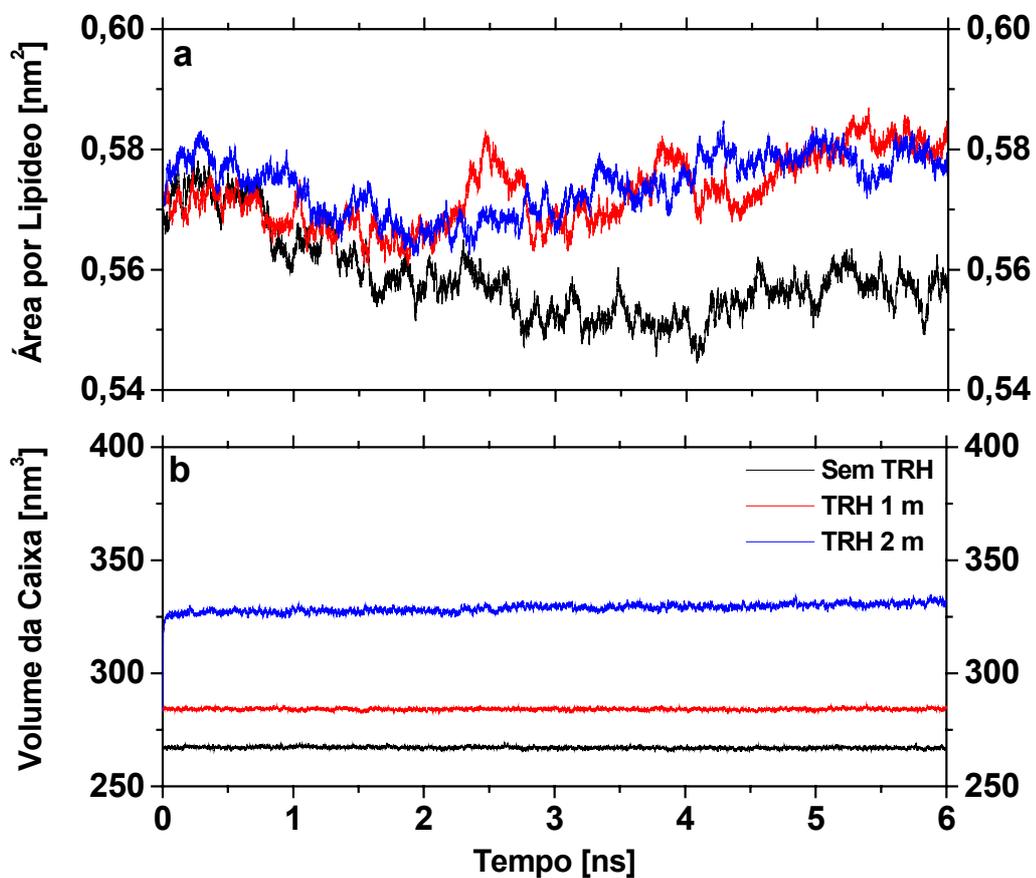


FIGURA 4.5- Parâmetros de ordem (S_{CD}) calculados nas diferentes simulações a 325 K para os respectivos átomos de carbono das cadeias sn-1 (a) e sn-2 (b) de DPPC. Valores experimentais para a cadeia sn-2 a 325 K (DOULIEZ et al., 1995) são apresentados para comparação. Os valores representam médias sobre as 128 moléculas de DPPC e sobre os 6 ns de simulação.

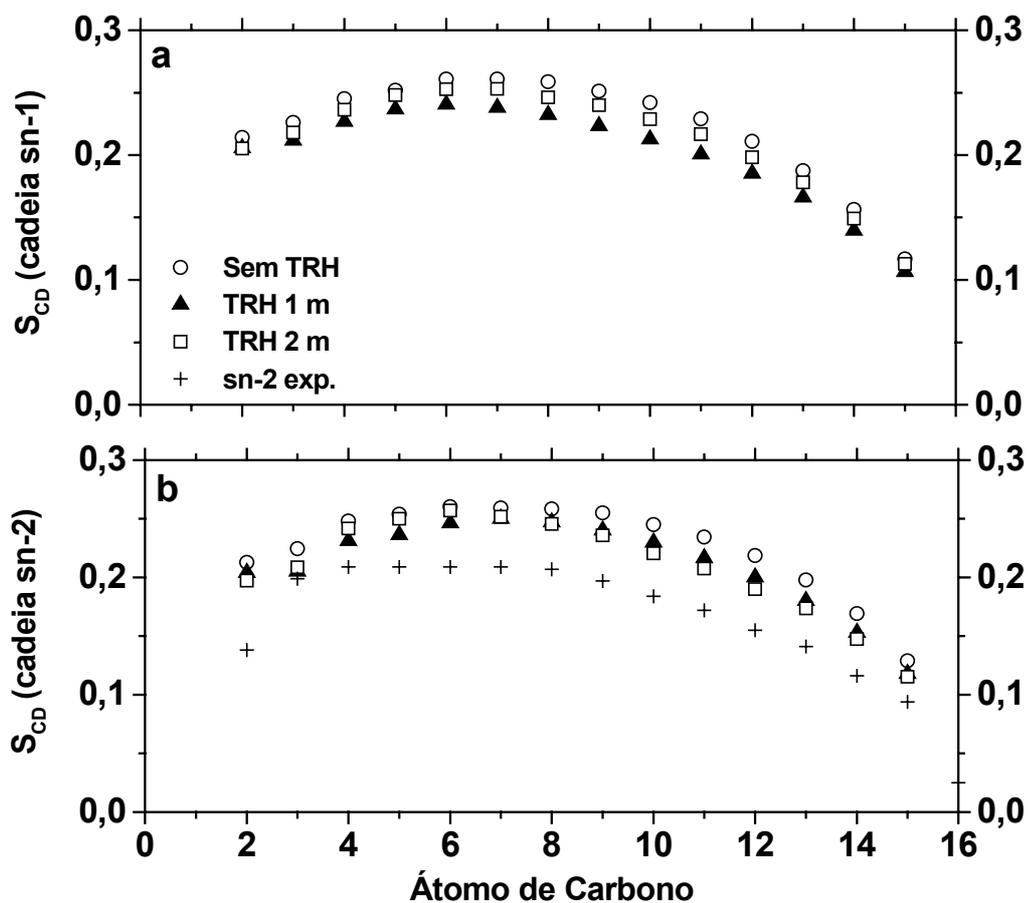


TABELA 4.1- Coeficientes de difusão lateral (D_{xy}) e transversal (D_z) calculados para as moléculas de água, TRH e DPPC durante as simulações a 325 K com diferentes concentrações de TRH (C_{TRH}). O valor de *plateau* da variação temporal do quadrado do deslocamento médio ao longo do eixo-z (ΔR_z^2) é também reportado para as moléculas de TRH e água.

	C_{TRH} [m]	D_{xy} [$10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$]	D_z [$10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$]	ΔR_z^2 [nm^2]
Água	0	4,80	2,48	2,27
	1	3,61	2,12	2,18
	2	2,41	1,79	3,06
TRH	0	-	-	-
	1	0,135	0,115	0,80
	2	0,149	0,101	0,74
DPPC	0	0,014	-	-
	1	0,031	-	-
	2	0,037	-	-

A difusão das moléculas de água diminui sistematicamente com o aumento da concentração de TRH, mas no máximo duas vezes quando a concentração de TRH aumenta de 0 para 2 m. Por outro lado, a difusão das moléculas de TRH não é afetada pelo aumento da concentração do dissacarídeo. Note que os coeficientes de difusão laterais, tanto para água quanto para a TRH, são sistematicamente maiores do que os coeficientes de difusão transversais, consequência da difusão restrita na direção do eixo z (impossibilidade de se ultrapassar os planos da membrana). Os valores de D_{xy} calculados para água ($2,41 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$) e TRH ($1,49 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$) no sistema com TRH a 2 m estão em bom acordo com resultados experimentais para a difusão da água ($D=1,05 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$) e TRH ($D=1,51 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$) em uma solução com 44% de TRH a 323 K (EKDAWI-SEVER et al., 2003). Em contraste com as outras espécies, o coeficiente de difusão lateral das moléculas de DPPC aumenta, aproximadamente por um fator de 3, com o aumento da concentração de TRH de 0

para 2 m. Os valores são da mesma ordem de magnitude do coeficiente de difusão lateral obtido com experimentos de espalhamento de nêutrons em bicamadas de DPPC ($D_{lat}=1 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$) (SACKMANN, 1995). Entretanto, deve-se salientar que os coeficientes de difusão calculados para o DPPC são apenas indicativos já que a variação do quadrado do deslocamento posicional médio em função do tempo não apresentou um perfil linear no intervalo de tempo da simulação, 6 ns. As alterações limitadas na mobilidade das três espécies indicam que o sistema encontra-se em um estado difusivo até mesmo na mais alta concentração de TRH, exclui-se portanto a existência de um estado vítreo nestas condições.

As distribuições de densidade para átomos específicos das moléculas de TRH, DPPC e água ao longo da normal da membrana (eixo-z) durante os últimos 0,25 ns das simulações (Figura. 4.6) mostram que a membrana permanece intacta em todos os casos. Entretanto, as distribuições dos átomos das cadeias lipídicas são levemente alargadas na presença da TRH (Figura 4.6 b e c). Os picos de densidade observados para a TRH nas proximidades da superfície da membrana, assim como a sobreposição entre estes picos e os correspondentes aos átomos das cabeças lipídicas indicam que as moléculas de TRH interagem fortemente com a membrana. Note também que a distribuição das moléculas de TRH é mais homogênea a 2 m do que a 1 m, sugerindo que a membrana pode ter alcançado saturação entre as duas concentrações. Numa última e importante observação, nota-se que a camada formada pelas moléculas de TRH, mesmo muito próxima, não exclui completamente as moléculas de água da superfície da membrana.

A interação direta entre as moléculas de TRH e DPPC pode ser comprovada pela análise da formação de ligações de hidrogênio (LH). Na Tabela 4.2 são apresentados o número total de LH presente em média entre as diferentes espécies no sistema, assim como esta quantidade dividida (*scaled*) pelo número total de moléculas participantes da interação. Este último valor, expresso em porcentagem, indica o número esperado de LH entre quaisquer duas moléculas das espécies correspondentes, selecionadas aleatoriamente no sistema.

FIGURA 4.6- Distribuição de probabilidade para átomos específicos da TRH, DPPC e água, ao longo da normal (eixo z) da bicamada, calculada a 325 K para as simulações sem TRH (a), com TRH a 1 m (b) e com TRH a 2 m (c).

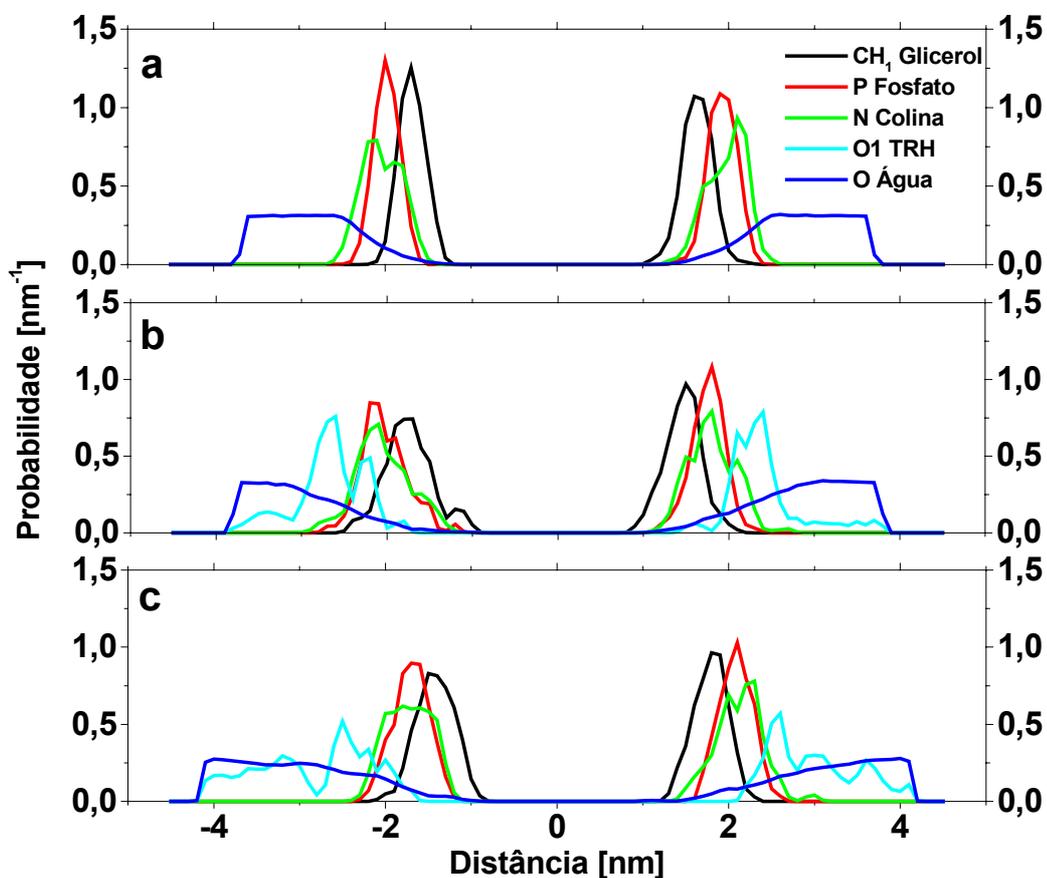


TABELA 4.2- Número médio de ligações de hidrogênio (LH) e probabilidade (P) de formação de LH entre todas as espécies presentes nas simulações a 325 K. Desvios padrões (DP) são reportados para as duas quantidades. As médias foram calculadas no intervalo 2,0-6,0 ns de cada simulação.

C_{TRH}	TRH - DPPC		TRH - TRH		TRH - Água		DPPC - Água		
	1 m	2 m	1 m	2 m	1 m	2 m	0 m	1 m	2 m
LH	95,70	114,52	25,97	93,74	683,19	1373,00	552,06	449,48	435,52
DP	8,77	6,16	4,08	8,85	15,99	28,27	12,38	10,22	12,94
P [%]	1,168	0,699	0,652	0,567	0,320	0,321	0,118	0,105	0,102
DP [%]	0,141	0,046	0,163	0,053	0,007	0,007	0,003	0,002	0,003

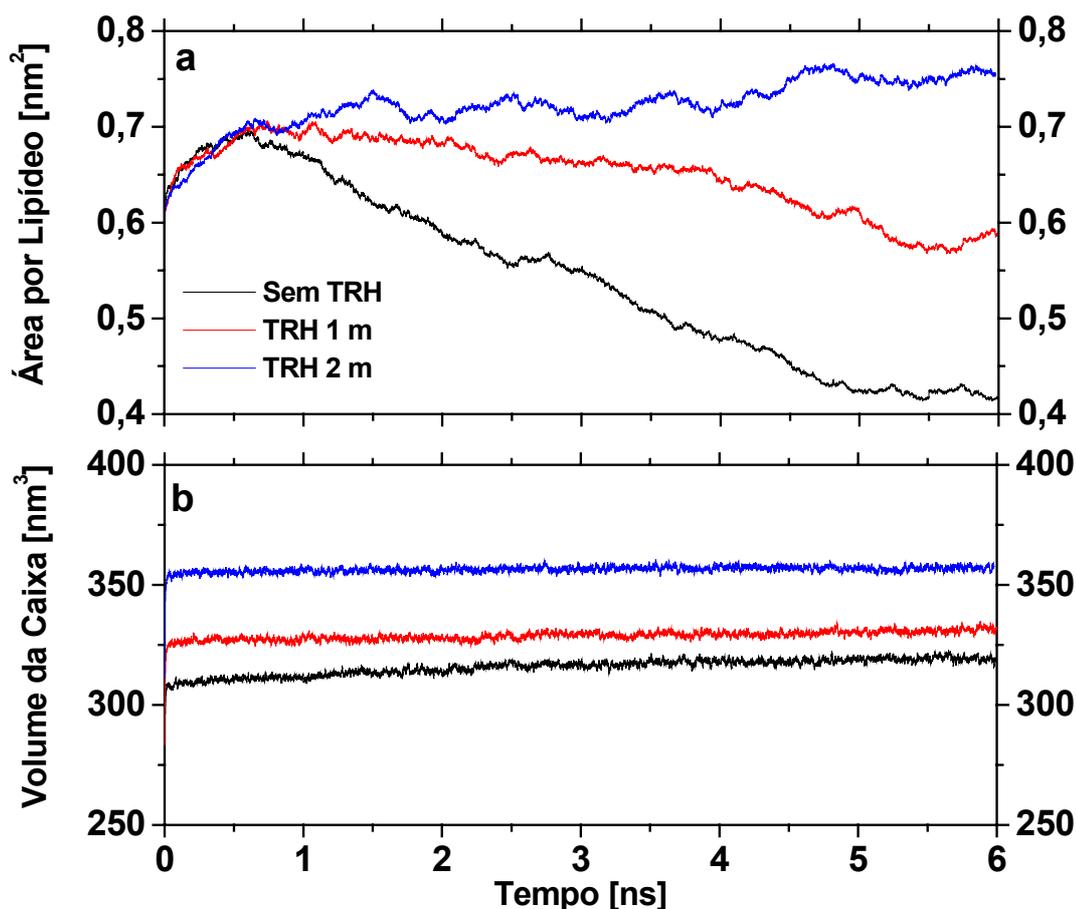
Entre todas as espécies presentes, a maior probabilidade para formação de LH foi encontrada entre pares de moléculas de TRH e DPPC. Este resultado indica certamente uma grande afinidade entre estas espécies, mas é também relacionado com fato de TRH e DPPC conterem um grande número de grupos hábeis a formação de LH. Como esperado, duplicando-se a concentração de TRH aumenta-se o número médio de LH entre TRH-DPPC, TRH-TRH e TRH-água. Porém a probabilidade para formação de LH entre TRH-DPPC diminui levemente com o aumento da concentração de TRH. Esta fato é indicativo de efeitos de saturação, como já previamente sugerido pela análise das Figuras 4.6 b e c. O número médio de LH entre DPPC e água diminui 19% com o aumento da concentração de TRH de 0 para 1 m. Porém, duplicando-se a concentração de TRH, este valor não é significativamente alterado. A observação de que a soma das LH entre TRH-DPPC e água-DPPC, em ambas as concentrações de TRH, é aproximadamente igual ao número de LH água-DPPC no sistema sem TRH, concorda com a afirmação anterior de que a água não é completamente excluída da superfície da membrana pelas moléculas de TRH. Ao contrário, TRH parece substituir água em apenas um quinto dos sítios de LH providos pela membrana.

4.2.2- Simulações a 475 K

A 475 K a área média por lipídio para a bicamada de DPPC é caracterizada por uma expansão inicial (aproximadamente 20% em 1 ns) seguida por diferentes comportamentos dependendo da concentração de TRH, como pode ser observado na Figura 4.7a. Uma redução sistemática significativa é observada no valor da propriedade durante a simulação sem TRH. Na presença de TRH a 1 m esta redução também é observada, porém é menos acentuada. Em contraste, a simulação com TRH a 2 m é caracterizada por um valor quase constante da área por lipídeo. O valor correspondente de $0,75 \text{ nm}^2$ (média sobre o último 1 ns) no entanto, é maior do que o valor de $0,64 \text{ nm}^2$, sugerido como a melhor estimativa experimental para uma membrana de DPPC totalmente hidratada na fase líquida-cristalina a 325 K (NAGLE e TRISTRAM-NAGLE, 2000). A evolução temporal do volume da caixa de simulação (Figura 4.7b) mostra que, ainda que os sistemas sem TRH e com TRH a 1 m sofram uma contração lateral significativa (redução acentuada na área por lipídeo), o aumento da temperatura contudo leva a uma expansão global do sistema.

Esta expansão é, entretanto, quase negligível para o sistema com TRH a 2 m. Estes resultados indicam que somente esta última simulação consiste em um sistema em completo equilíbrio.

FIGURA 4.7- Área por lipídeo (a) e volume da caixa (b) em função do tempo de simulação para as simulações com as diferentes concentrações de TRH a 475 K .



A análise das distribuições para átomos específicos das moléculas de água e DPPC ao longo da normal da bicamada, valores médios nos últimos 0,25 ns da simulação sem TRH (Figura 4.8a), fornece a explicação para a dramática redução na área por lipídeo. Nesta simulação a estrutura de bicamada da membrana é quase completamente destruída (compare com a Figura 4.6a a 325 K). A distribuição dos átomos das cabeças lipídicas e do grupo glicerol encontram-se praticamente sobrepostas e são bastante alargadas. A clara separação entre as duas camadas da membrana não é mais observada e a água distribui-se extensamente sobre todo o intervalo de distâncias. A preservação da estrutura da membrana é apenas

levemente melhorada na simulação contendo TRH a 1 m (Figura 4.8b). Em contraste, com a inclusão de TRH na concentração de 2 m a integridade da bicamada é mantida na simulação (Figura 4.8c), um resultado surpreendente considerando a altíssima temperatura imposta ao sistema. Ainda que as distribuições dos átomos lipídicos sejam mais largas do que a 325 K, a estrutura ainda pode ser caracterizada como uma bicamada. A distribuição dos átomos do grupo glicerol é claramente distinguível da distribuição dos átomos das cabeças polares, que encontram-se orientados para a fase aquosa. Assim como a 325 K, as distribuições evidenciam alta afinidade das moléculas do açúcar pela superfície da membrana, mas não há uma completa desolvatação das cabeças lipídicas devido à presença da camada de TRH (Figura 4.8c).

As diferenças no comportamento da membrana durante as simulações à alta temperatura são melhores apreciadas examinando a configuração dos sistemas ao fim dos 6 ns de simulação (Figura 4.9). A ruptura, termicamente induzida, da estrutura da membrana na ausência da TRH fica evidente na Figura 4.9b. Na concentração de 1 m, a TRH já é capaz de reduzir o efeito destrutivo da temperatura (Figura 4.9c). Porém, é somente na concentração de 2 m que a membrana pode ainda ser definida como uma bicamada (Figura 4.9d).

Análises dos parâmetros de ordem (S_{CD}) para as cadeias sn-1 e sn-2 a 475 K revelam o efeito da concentração da TRH (Figura 4.10). Na ausência do dissacarídeo, a mobilidade das cadeias é consideravelmente aumentada comparando-se com os resultados a 325 K (Figura 4.5) e com dados experimentais para a cadeia sn-2, consequência do grande movimento térmico e também da ruptura da membrana. Esta mobilidade é entretanto sistematicamente reduzida com o aumento da concentração de TRH. O efeito é mais pronunciado para os átomos de carbono próximos às cabeças lipídicas, podendo isto ser efeito da proximidade da camada de TRH formada na superfície da membrana. Ainda que na simulação com TRH a 2 m a membrana apresente uma estrutura em bicamada estável, os correspondentes parâmetros de ordem permanecem significativamente baixos quando comparados aos obtidos na correspondente simulação a 325 K e aos dados experimentais. Este resultado pode ser consequência tanto da temperatura elevada, como do concomitante aumento na área média por lipídio.

FIGURA 4.8- Distribuição de probabilidade para átomos específicos da TRH, DPPC e água, ao longo da normal (eixo z) da bicamada, calculada a 475 K para as simulações sem TRH (a), com TRH a 1 m (b) e com TRH a 2 m (c).

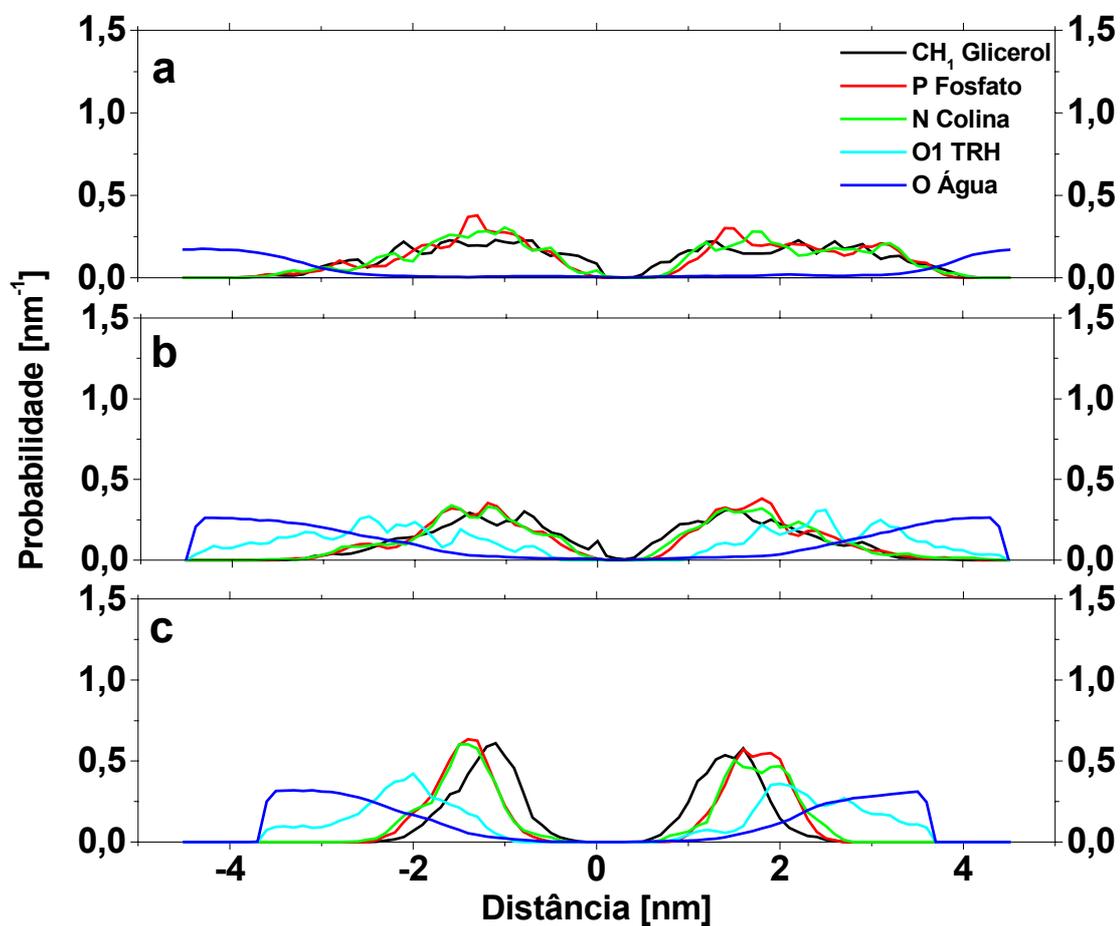


FIGURA 4.9- Configuração final dos sistemas sem TRH a 325K (a), sem TRH a 475 K (b), com TRH 1 m a 475K (c) e com TRH 2 m a 475 K (d). As moléculas de DPPC são representadas usando um modelo de varetas e as moléculas de TRH um modelo de esferas. As moléculas de água foram removidas por clareza. Átomos de carbono são representados em cinza, oxigênio em vermelho, fósforo em amarelo, nitrogênio em azul e hidrogênio em branco

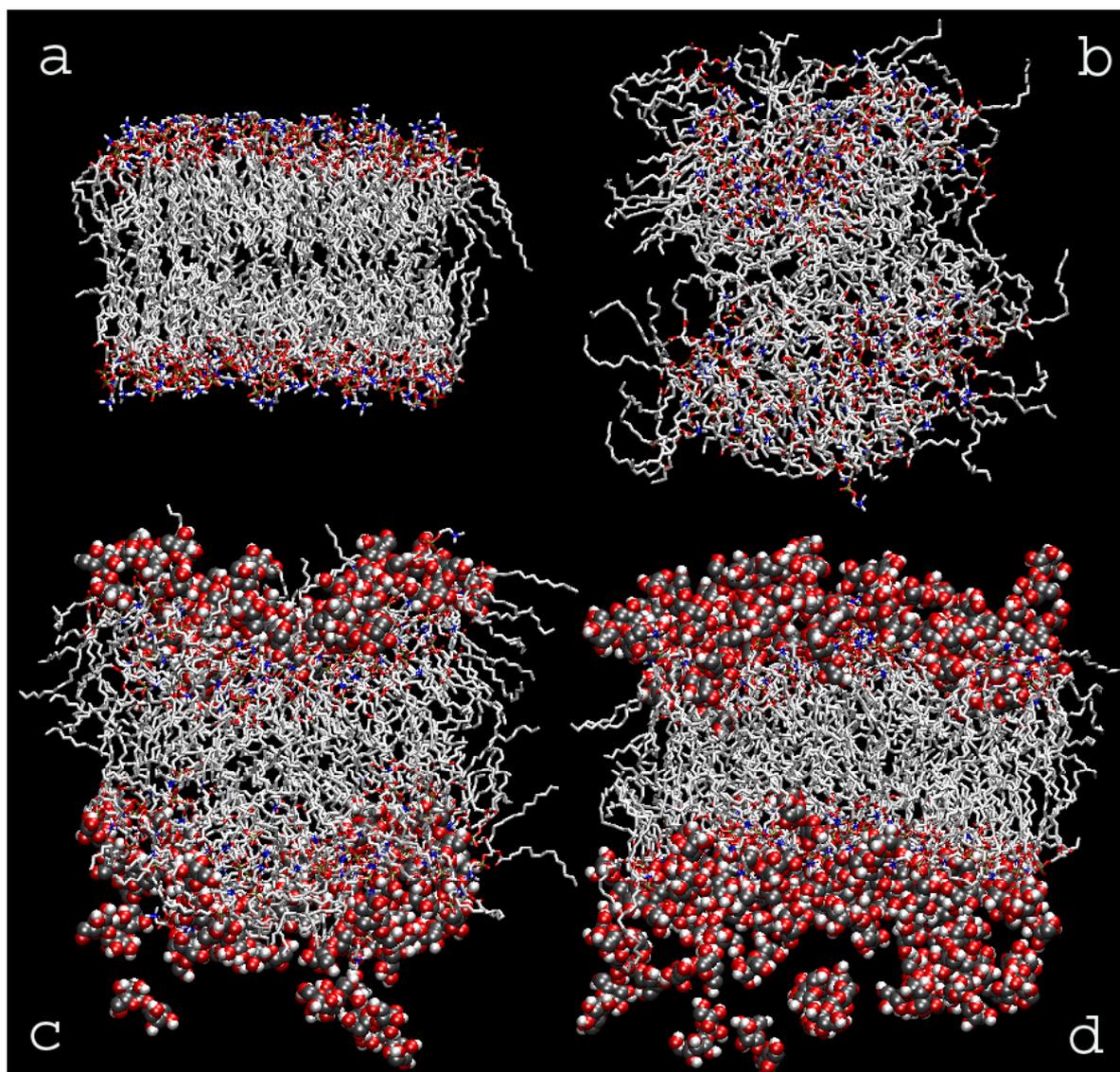
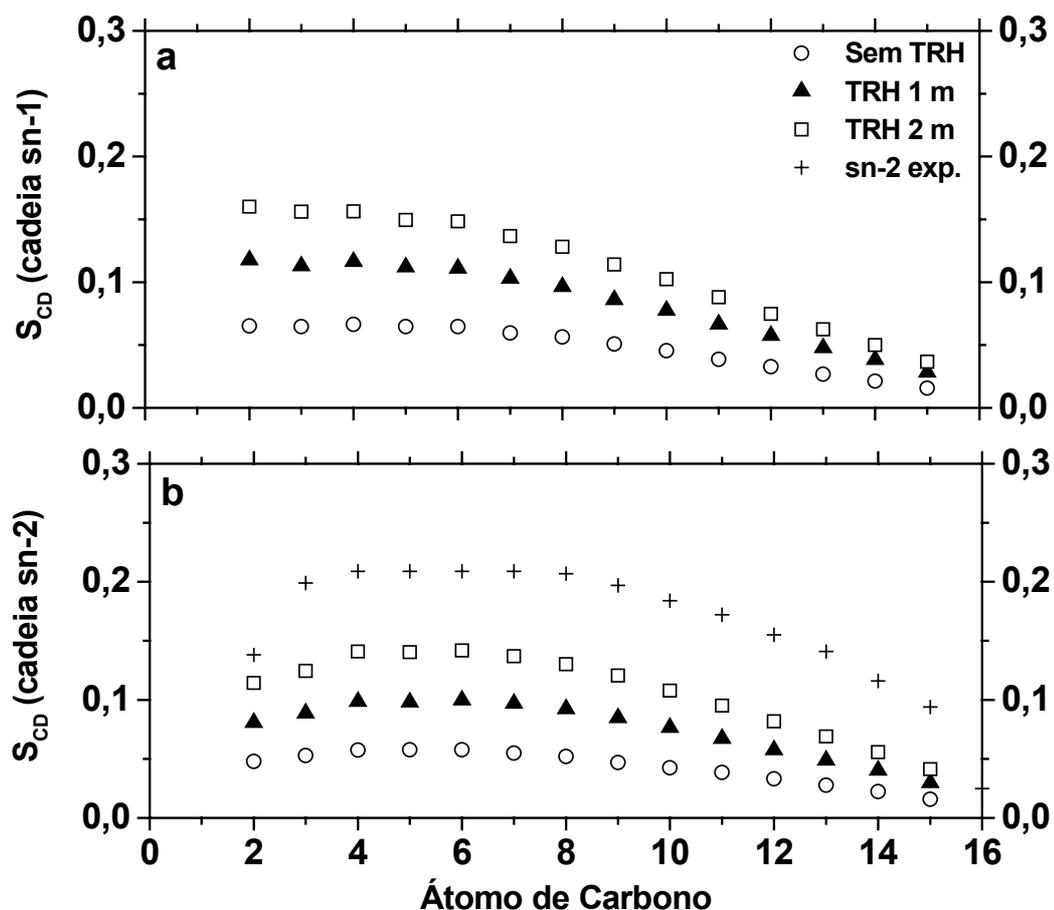


FIGURA 4.10- Parâmetros de ordem (S_{CD}) calculados nas diferentes simulações a 475 K para os respectivos átomos de carbono ao longo das cadeias sn-1 (a) e sn-2 (b) de DPPC. Valores experimentais para a cadeia sn-2 a 325 K (DOULIEZ et al., 1995) são apresentados para comparação. Os valores representam médias sobre as 128 moléculas de DPPC e sobre os 6 ns de simulação.



Os coeficientes de difusão lateral para as moléculas de água, TRH e DPPC, como pode ser observado na Tabela 4.3, são uma ou duas ordens de grandeza maiores do que os correspondentes valores a 325 K (Tabela 4.1), consequência do maior movimento térmico existente nos sistemas à temperatura elevada. Novamente apenas diferenças limitadas são observadas entre as simulações com diferentes concentrações de TRH. A única exceção é o decréscimo (aproximadamente 2 vezes) no coeficiente de difusão lateral das moléculas de DPPC com a inclusão de TRH no sistema. É interessante notar que a difusão lateral das moléculas de TRH a 475 K é aproximadamente 5 vezes menor do que a difusão transversa, enquanto a 325 K era de 20 a 50% maior (Tabela 4.1). A redução relativa da mobilidade

lateral (comparada com a transversa) é provavelmente uma consequência do agrupamento das moléculas de TRH e interação próxima com a superfície da membrana na alta temperatura (veja abaixo). Note também o valor excepcionalmente alto de ΔR_z^2 para a água na simulação sem TRH, que reflete a ruptura da membrana, permitindo deslocamentos maiores na direção z. Como a inclusão do dissacarídeo não induz mudanças consideráveis (valores com diferentes ordens de magnitude) na dinâmica difusional dos sistemas, é improvável que a preservação da estrutura da membrana na presença de TRH a 2 m ocorra meramente devido a um efeito cinético (ruptura da membrana ocorrendo além dos 6 ns de simulação). Ao contrário, a preservação da membrana parece ser resultado de uma maior estabilidade termodinâmica.

TABELA 4.3 - Coeficientes de difusão lateral (D_{xy}) e transversal (D_z) calculados para as moléculas de água, TRH e DPPC durante as simulações a 475 K com diferentes concentrações de TRH (C_{TRH}). O valor de *plateau* da variação temporal do quadrado do deslocamento médio ao longo do eixo-z (ΔR_z^2) é também reportado para as moléculas de TRH e água.

	C_{TRH} [m]	D_{xy} [$10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$]	D_z [$10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$]	ΔR_z^2 [nm^2]
Água	0	171	114	31,02
	1	163	168	8,38
	2	171	134	4,81
TRH	0	-	-	-
	1	1,02	4,53	7,36
	2	1,05	5,47	2,76
DPPC	0	0,273	-	-
	1	0,139	-	-
	2	0,125	-	-

A análise das LH durante as simulações a 475 K (Tabela 4.4) revela uma redução global (32-46% para os diferentes sistemas) no número total de LH, quando comparado às simulações a 325 K (Tabela 4.2). Este resultado é coerente com a maior mobilidade existente nos sistemas devido à alta temperatura. A diminuição é também evidente nas LH entre as espécies TRH-TRH, TRH-água e DPPC-água consideradas individualmente. Por exemplo, o número de LH DPPC-água a 475 K diminui 37% e 41% (quando comparado a 325 K) para os sistemas com 1 m e 2 m de TRH, respectivamente. Notavelmente, entretanto, o número de LH entre TRH-DPPC apresenta exatamente uma tendência oposta à 475 K, aumentando 22% e 67% nos sistemas com TRH a 1 m e 2 m, respectivamente. Concordantemente, a fração de sítios de LH fornecidos pela membrana, nos quais TRH substitui água (aproximadamente um quinto a 325 K), aumenta para 25% (TRH a 1 m) ou 43% (TRH a 2 m). O aumento no número de LH TRH-DPPC à alta temperatura não pode ser causado pela rápida difusão das moléculas de TRH em direção à superfície da membrana já que: (i) a distribuição das moléculas de TRH foi inicialmente pré-equilibrada por 5 ns a 500 K e (ii) a difusão da TRH não é drasticamente maior a 475 K do que a 325 K (Tabelas 4.1 e 4.3). Assim, o aumento no número de LH parece ser termodinamicamente dirigido. Este resultado concorda com um estudo recente utilizando espectroscopia de infra-vermelho para estudo de misturas binárias de lipídios na ausência e presença de TRH. Neste trabalho é mostrado que a interação direta entre a TRH e as cabeças lipídicas torna-se mais efetiva quando a temperatura é aumentada (RICKER et al., 2003). Note finalmente, que o efeito de saturação observado a 325 K para as LH entre TRH-DPPC, quando duplicada a concentração de TRH, é significativamente reduzido a 475 K. O número médio de LH TRH-DPPC a 475 K aumenta 1,6 vezes, duplicando-se a concentração de TRH, enquanto a 325 K este número aumenta 1,2 vezes.

A natureza das LH TRH-DPPC é analisada em mais detalhes na Tabela 4.5. Como pode ser observado, as moléculas de TRH são capazes de formar simultaneamente múltiplas LH, em alguns casos com a mesma molécula de DPPC, em outros com moléculas distintas. Foram observadas nas simulações configurações onde uma única molécula de TRH é capaz de formar até oito LH com moléculas lipídicas. Comparando-se as ocorrências dos diferentes padrões de LH a 325 K e 475 K observações interessantes podem ser feitas. A 325 K a maioria das moléculas de TRH (72% e 85% para TRH a 1 m e a 2 m, respectivamente)

pertencem aos padrões “0”, “1” ou “11”, isto é, não formam LH com a membrana ou formam apenas uma única ligação com uma ou duas moléculas distintas de DPPC. Com o aumento da temperatura, a ocorrência destes três padrões é reduzida (para 62% e 69%, respectivamente). Em contraste, a ocorrência de todos os outros padrões, envolvendo múltiplas LH entre uma única molécula de TRH com a mesma molécula de DPPC e/ou com múltiplas moléculas (*bridging*) aumenta sistematicamente (a única exceção são os padrões “21”, “22” e “311” para TRH a 1 m). Devido à ligação de múltiplas moléculas de DPPC com uma mesma molécula de TRH parecer ser um fator chave para a estabilização da membrana a alta temperatura, a ocorrência de moléculas de TRH com específicos *degree of bridging* (isto é, formando pelo menos uma LH com um certo número de distintas moléculas de DPPC) é analisada na Tabela 4.6. Os resultados mostram claramente que a contribuição para o aumento no número de LH entre TRH-DPPC com a elevação da temperatura provêm principalmente de um aumento no *degree of bridging* das moléculas de TRH. Isto é, de uma maior probabilidade de encontrar moléculas de TRH ligadas a três ou mais moléculas de DPPC distintas. As mudanças no *degree of bridging* são responsáveis por 63-65% do aumento no número total de LH TRH-DPPC. A contribuição remanescente é devida a um aumento na multiplicidade média das LH entre moléculas de TRH e DPPC.

TABELA 4.4- Número médio de ligações de hidrogênio (LH) e probabilidade (P) de formação de LH entre todas as espécies presentes nas simulações a 475 K. Desvios padrões (DP) são reportados para as duas quantidades. As médias foram calculadas no intervalo 2,0-6,0 ns de cada simulação.

C _{TRH}	TRH – DPPC		TRH -TRH		TRH - Água		DPPC - Água		
	1 m	2 m	1 m	2 m	1 m	2 m	0 m	1 m	2 m
LH	116,77	190,27	17,27	58,15	432,65	859,91	295,21	285,38	255,88
DP	10,39	12,11	4,90	7,44	22,38	26,42	36,79	19,01	17,65
P [%]	1,425	1,161	0,409	0,359	0,202	0,201	0,063	0,067	0,060
DP [%]	0,157	0,137	0,102	0,047	0,010	0,006	0,008	0,004	0,004

TABELA 4.5- Número médio de moléculas de TRH apresentando padrões de LH específicos com moléculas de DPPC, durante as simulações com TRH a 1 m e 2 m a 325 K e 475 K. Um padrão é denotado por uma série de números inteiros (em ordem decrescente) indicando o número de LH formadas entre as moléculas de TRH e uma série de moléculas de DPPC . Um zero indica moléculas que não formam nenhuma LH com DPPC, enquanto “outros” indica moléculas de TRH formando mais de cinco LH. Os valores médios foram calculados no intervalo 2,0-6,0 ns de cada simulação.

Padrão	1 m, 325 K	1 m, 475 K	2 m, 325 K	2 m, 475 K
0	19,16	17,02	68,63	49,50
1	15,91	12,98	24,05	22,42
11	11,29	9,43	16,50	15,82
111	2,63	3,96	3,10	6,29
1111	0,30	1,11	0,58	1,32
11111	0,00	0,27	0,00	0,12
2	3,09	4,78	4,53	7,49
21	6,27	5,45	6,34	9,84
211	1,81	3,29	2,81	6,30
2111	0,46	1,24	0,56	2,09
22	0,59	0,43	0,27	0,75
221	0,42	0,45	0,15	0,88
3	0,50	0,65	0,17	1,12
31	0,61	0,67	0,21	1,25
311	0,62	0,53	0,05	0,92
32	0,01	0,04	0,01	0,08
4	0,01	0,07	0,00	0,18
41	0,03	0,05	0,00	0,16
5	-	0,00	-	0,01
outros	0,29	1,53	0,04	1,45
total	64	64	128	128

TABELA 4.6- Número médio de moléculas de TRH simultaneamente *bridging* um número específico de distintas moléculas de DPPC, através de múltiplas LH, durante as simulações com TRH a 1 m e 2 m a 325 K e 475 K. Um zero indica moléculas que não formam nenhuma LH com DPPC enquanto “outros” indica moléculas de TRH formando ligações com mais de cinco moléculas distintas. A contribuição relativa de cada padrão de *bridging* para o aumento no número total de LH TRH-DPPC a 475 K é também indicado. Os valores médios foram calculados no intervalo 2,0-6,0 ns de cada simulação.

Degree of bridging	1 m 325 K	1 m 475 K	Contribuição [%]	2 m 325 K	2 m 475 K	Contribuição [%]
0	19,16	17,02	-	68,63	49,50	-
1	15,91	12,98	-14	24,05	22,42	-2
2	18,80	16,07	-26	23,33	27,91	12
3	5,50	8,35	41	6,11	14,55	33
4	0,96	2,89	37	1,17	4,23	16
5	0,07	0,84	18	0,01	0,54	4
outros	0,00	0,3	9	0,00	0,02	0,2
total	64	64	65	128	128	63

4.2.3- Comparação entre as Simulações a 325 K e 475 K

As simulações a 325 K mostram que nesta temperatura a presença da TRH não altera significativamente estrutura e dinâmica da membrana. As moléculas de TRH claramente apresentam alta afinidade pela superfície da membrana e interagem com as moléculas de DPPC formando LH. Entretanto, a água não é completamente expelida da superfície da membrana pelo *clustering* das moléculas de TRH. Nas duas concentrações consideradas, aproximadamente um quinto das LH que ocorrem entre DPPC-água na ausência de TRH são substituídas por ligações com o dissacarídeo quando este é inserido no sistema. Nesta temperatura em torno de 80% das moléculas de TRH não formam LH com a membrana, ou formam apenas uma única ligação com uma ou duas moléculas distintas de DPPC. No entanto, moléculas apresentando padrões mais complexos de ligação também foram observadas nas simulações.

A 475 K a membrana inicialmente sofre uma expansão lateral significativa. Após, o comportamento depende crucialmente da concentração de TRH no sistema. Na ausência do açúcar a membrana colapsa em uma estrutura que não pode ser mais definida como uma bicamada. Na presença de 1 m de TRH o efeito destrutivo da temperatura é de alguma forma reduzido. Entretanto, apenas no sistema com TRH a 2 m a integridade da membrana é preservada. Nesta concentração o efeito protetor da TRH parece estar relacionado com um aumento significativo (67%) no número de LH entre TRH-DPPC. No entanto, o número de LH do sistema como um todo diminui 32% aumentando-se a temperatura. Além disto, o aumento observado pode ser atribuído principalmente a um crescimento considerável no número de moléculas de TRH conectando três ou mais moléculas lipídicas através de LH múltiplas. Esta fato sugere que, após a expansão térmica inicial da membrana, as moléculas de TRH intercalam-se entre as cabeças lipídicas, prevenindo o colapso da membrana em um estado desestruturado através da formação de LH simultâneas com múltiplas moléculas de DPPC (*bridging*). O papel chave apresentado pelas LH TRH-DPPC na estabilização da estrutura da membrana exposta a condições desfavoráveis encontra-se em concordância qualitativa com inúmeros estudos experimentais (CROWE et al., 1984; LEE et al., 1986; NAKAGAKI et al., 1992; TSVETKOVA et al., 1998; NAGASE et al., 1999; LUZARDO et al., 2000; LAMBRUSCHINI et al., 2000; RICKER et al., 2003).

4.3- CONCLUSÕES

O objetivo principal deste estudo foi investigar a interação do dissacarídeo TRH com uma bicamada de DPPC em duas temperaturas distintas, utilizando simulações de DM.

Tentando interpretar os resultados destas simulações em termos das duas principais hipóteses para os mecanismos da ação protetora da TRH sobre membranas (substituição da água e vitrificação, descritas no capítulo anterior) deve-se ter em mente que: (i) estas simulações investigam apenas um dado tipo de bioestrutura (membrana de DPPC) e condição de stress (temperatura artificialmente elevada); (ii) um certo intervalo de concentração (soluções de TRH 0 - 2 m), e (iii) uma escala de tempo bastante curta (6 ns). Além disso, as duas hipóteses mencionadas foram desenvolvidas baseadas predominantemente em dados experimentais envolvendo membranas completamente (ou quase completamente) desidratadas. Mantendo estas restrições em mente, os presentes resultados são mais facilmente interpretados no contexto da hipótese da substituição da água porque: (i) foram observadas interações, via LH, entre as moléculas de DPPC e TRH e (ii) estas interações foram reforçadas quando a membrana foi submetida ao stress térmico. Porém, o termo “substituição” não se enquadra perfeitamente neste caso já que a água não foi completamente expelida da superfície da membrana, apenas uma fração das LH DPPC-água foram substituídas por ligações DPPC-TRH. Uma completa substituição da água poderia, no entanto, ocorrer em uma situação de quase completa desidratação, condição não considerada neste estudo. A hipótese da vitrificação não pode ser utilizada para explicar a estabilização da membrana a 475 K pois as constantes de difusão das diferentes espécies no sistema foram apenas ligeiramente afetadas pela concentração de TRH. Assim, como esperado para esta temperatura e concentração de TRH, o sistema permanece num estado difusivo (oposto a vítreo). Finalmente, as presentes observações sobre o sistema TRH-membrana contrastam com os resultados apresentados no capítulo 3 deste trabalho e os obtidos em uma simulação independente para um sistema TRH-proteína (COTTONE et al., 2002). É importante notar que as concentrações de TRH usadas em nosso estudo (interação TRH-lisozima) são significativamente menores do as empregadas no estudo de Cottone e colaboradores (interação TRH-carboxi-mioglobina), porém, em ambos os casos foi demonstrado que a TRH não interage

diretamente com a proteína através de LH. Ao contrário, a camada de TRH próxima a proteína preservou uma fina camada de moléculas de água na sua superfície, fornecendo suporte para a hipótese *water entrapment*. Esta aparente discrepância sugere que o mecanismo de estabilização pela TRH pode ser não específico e variar dependendo da natureza da bioestrutura e da condição de stress imposta ao sistema.

Capítulo 5

CICLODEXTRINAS EM SOLUÇÃO

Neste capítulo é apresentada a etapa do trabalho envolvendo os estudos sobre dinâmica e estrutura de ciclodextrinas isoladas em solução. Inicialmente uma introdução sobre estes oligossacarídeos, suas principais características, usos e propriedades é discutida. Após, todos os detalhes sobre as investigações realizadas são apresentados.

5.1- INTRODUÇÃO

5.1.1-Ciclodextrinas

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos constituídos por unidades de α -D-glicose através de ligações α -(1-4). As CDs naturais, conhecidas como α -, β - e γ -CD, apresentam anéis formados por seis, sete ou oito unidades de α -D-glicose, respectivamente (Figura 5.1) e são obtidas através da ação da enzima glucanotransferase sobre as moléculas do polissacarídeo amido. A estrutura molecular destes derivados da glicose assemelha-se a um cone truncado (Figura 5.2). Devido à formação de ligações α -(1-4), todas as hidroxilas secundárias encontram-se situadas no lado do anel que apresenta maior diâmetro, enquanto todas as hidroxilas primárias encontram-se do lado oposto, ou seja, no lado com menor diâmetro (Figura 5.2). Esta organização molecular gera uma estrutura cônica característica, apresentando uma superfície exterior relativamente hidrofílica e uma cavidade interior relativamente hidrofóbica (BENDER e KOMIYAMA, 1978).

Em consequência desta estrutura molecular única, CDs apresentam a capacidade de formar complexos de inclusão com uma grande variedade de compostos, tanto em solução quanto no estado sólido (SZEJTLI, 1982). A formação e a estabilidade de complexos de inclusão são consequência da ação coordenada de interações intermoleculares diversas, como forças de van der Waals, interações hidrofóbicas, eletrostáticas, e ligações de hidrogênio (SZEJTLI, 1982). Complexos supramoleculares formados por CDs tem recebido grande atenção por contribuírem para a compreensão do reconhecimento molecular envolvido em fenômenos

biológicos de extrema importância como: hidratação macromolecular, interações hidrofóbicas de proteínas e interações enzima-substrato (LEHN, 1995; SZEJTLI e OSA, 1996; CONNORS, 1997). No entanto, o grande interesse voltado para a pesquisa de CDs é devido, sobretudo, à capacidade intrínseca destes compostos formarem complexos de inclusão capazes de alterar significativamente as propriedades das substâncias complexadas (SZEJTLI, 1982). Propriedades como solubilidade, volatilidade, difusão, reatividade, fluorescência, etc, podem ser modificadas sem nenhuma alteração aparente na estrutura química da substância ou da CD.

FIGURA 5.1- Representação da estrutura molecular das três CDs naturais α -, β -, e γ -CD.

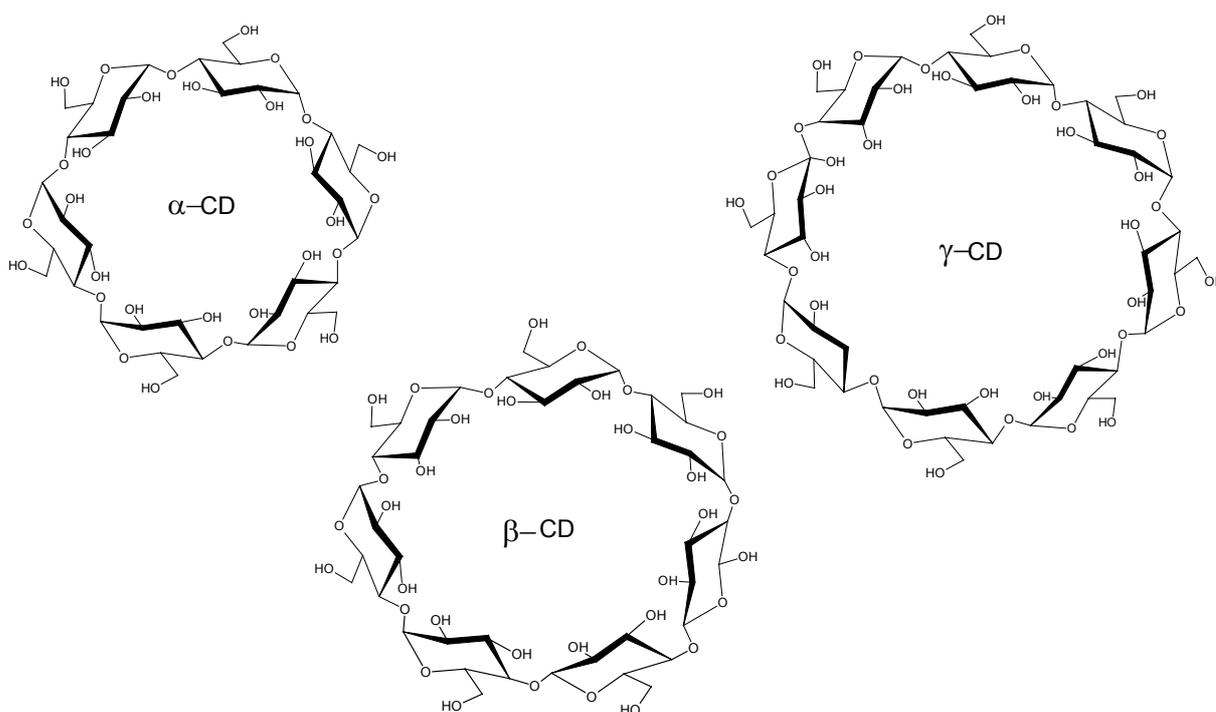
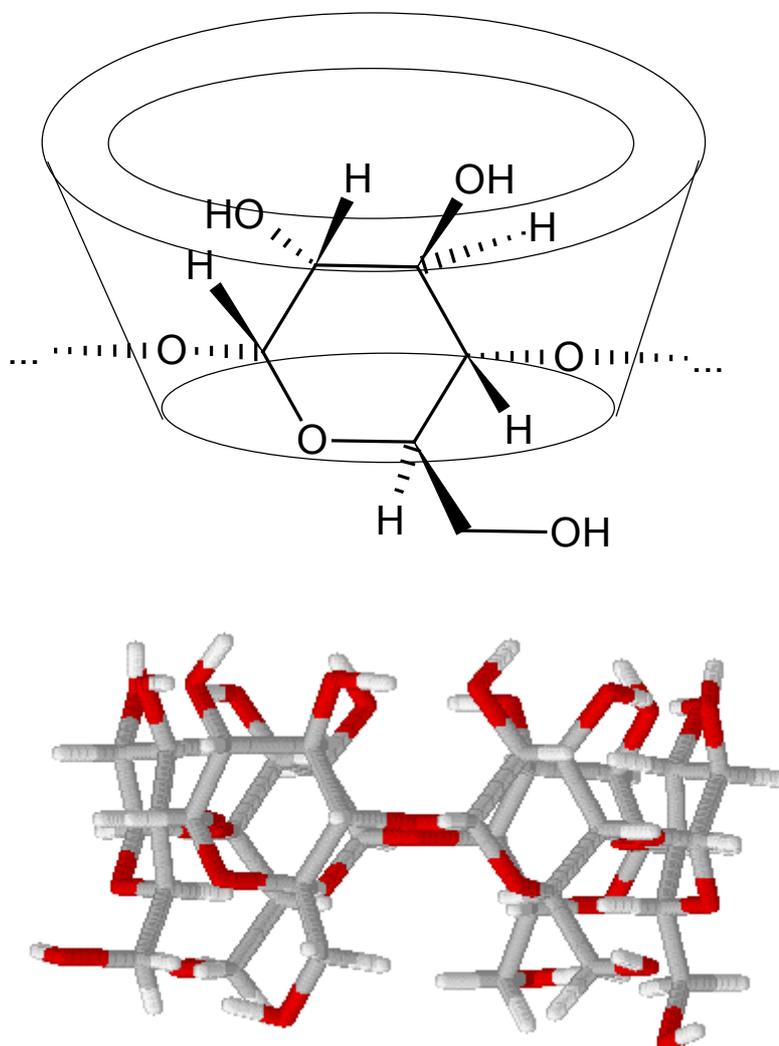


FIGURA 5.2- Modelos esquemáticos da estrutura molecular das CDs. Átomos de carbono são representados em cinza, oxigênio em vermelho e hidrogênio em branco.



A utilização de CDs como agentes complexantes e encapsulantes constitui uma tecnologia amplamente disseminada em metodologias analíticas (SCHNEIDERMAN e STALCUP, 2000; FANALI, 2000) e na indústria (DUCHÊNE, 1987; SZEJTLI, 1988; HEDGES, 1998). Devido ao caráter quiral das unidades de glicose que as constituem, CDs podem formar complexos enantio- e diastoméricos com moléculas que apresentem centros quirais. Esta propriedade permite sua utilização em análises enantioseletivas, principalmente em métodos cromatográficos (SCHNEIDERMAN e STALCUP, 2000; FANALI, 2000). Na indústria alimentícia a microencapsulação em CDs é um dos métodos mais eficientes para proteger aromas contra a oxidação, degradação ao calor e evaporação (HEDGES et al., 1995).

Estima-se que em torno de 70% da produção industrial de CDs é destinada à indústria alimentícia, de cosméticos e de produtos higiênicos (SZEJTLI, 1998).

Apesar de absorver apenas uma pequena parcela da produção industrial das CDs, a área farmacêutica tem concentrado a maioria das pesquisas relacionadas a estes compostos (SZEJTLI, 1998). Grande parte das moléculas utilizadas como fármacos são muito pouco solúveis em água e suscetíveis à degradação e, conseqüentemente sua absorção biológica é lenta e muitas vezes incompleta. CDs naturais e seus derivados sintéticos são utilizados com sucesso como sistemas carreadores em formulações farmacêuticas (FRÖMMING e SZEJTLI, 1994; LOFTSSON e BREWSTER, 1996; STELLA e RAJEWSKI, 1997; UEKAMA et al., 1998). Aplicadas para potencializar propriedades como solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade, CDs apresentam vantagens sobre outros veículos farmacêuticos por apresentarem baixas toxicidade e atividade farmacológica (IRIE e UEKAMA, 1997). Somado a isso, a complexação com CDs pode aumentar a atividade do fármaco e reduzir efeitos colaterais indesejáveis. Neste contexto, CDs têm sido pesquisadas como agentes potenciais na formulação de medicamentos quimioterápicos, reduzindo dois grandes obstáculos na sua utilização: a alta toxicidade e a resistência adquirida por células malignas (UTSUKI et al., 1996, GROSSE et al., 1998a, 1998b).

CDs são conhecidas a muitos anos e os estudos sobre estes sistemas vem apresentando um notável crescimento nas últimas décadas (SZEJTLI, 1998). Em anos recentes o interesse na pesquisa de CDs e seus complexos está voltado principalmente para novas aplicações: terapia fotodinâmica no tratamento de câncer (RUEBNER, 1996), proteção ambiental (GAO et al., 1998; BOVING et al., 1999; BOVING e BRUSSEAU, 2000), biotecnologia (BARDI et al., 2000), e para novas metodologias no estudo destes sistemas entre as quais se incluem métodos de química computacional (LIPKOWITZ, 1998).

5.1.2- Ciclodextrinas- Abordagem Teórica

A arquitetura molecular das CDs somada ao papel central da organização estrutural no seu comportamento as tornam sistemas extremamente atraentes a estudos teórico-computacionais. A possibilidade de investigar com detalhes atômicos a estrutura complexa destes carboidratos e obter uma análise detalhada da

formação dos complexos de inclusão, produziu nas últimas décadas um aumento considerável no número de estudos que utilizam técnicas de simulação computacional para estudo das CDs. Métodos computacionais permitem análises detalhadas da estrutura, dinâmica e comportamento químico de CDs e seus complexos. Métodos de Mecânica Quântica (MQ), Modelagem Molecular (MM), Monte Carlo (MC) e Dinâmica Molecular (DM) podem ser utilizados para interpretação racional de observações experimentais, fornecer informações não acessíveis a experimentos e prever o comportamento dos sistemas estudados (LIPKOWITZ, 1998).

O elevado número de átomos e a flexibilidade das CDs tornam difícil a aplicação de cálculos de MQ, mesmo quando condições de simetria são impostas. Cálculos quânticos *ab initio* e semiempíricos destes sistemas não são comumente encontrados na literatura (BODOR et al., 1995; GODINEZ et al., 1996; REINHARDT et al., 1996; STARIKOV et al., 1998; LIU et al., 1999; 2000; MU et al., 2001; LI et al., 2000; ADEAGBO et al., 2002). Em contraste, técnicas de simulação clássicas (MM, MC, DM) têm sido amplamente utilizadas no estudo de CDs e seus complexos (LIPKOWITZ, 1998). No entanto, apesar do elevado número de publicações, nota-se que a maioria dos estudos consistem em análises estruturais utilizando MM (protocolos para otimização de geometria e cálculo de energia) (LIPKOWITZ, 1998). Esta preferência se deve ao fato de que comparativamente a MC e DM, cálculos de MM são muito mais rápidos e simples de serem executados. O grande número de publicações de MM na área de CDs é reflexo direto da popularização de programas para modelagem molecular, o que lança dúvidas a respeito da qualidade de muitos destes estudos, visto que análises criteriosas dos campos de força utilizados nem sempre são realizadas (DODZIUK, et al., 2000; LIPKOWITZ, 1998; 2001).

Comparativamente aos demais métodos clássicos de simulação, o método de DM tem sido menos utilizado no estudo de CDs. Apesar de ser capaz de fornecer detalhes importantes à compreensão da natureza das CDs (PRABHAKARAN e HARVEY, 1987; KÖHLER et al., 1987a; 1987b; 1988a; 1988b; 1988c; POZUELO et al., 1996; 1997; KOZÁR e VENANZI, 1997; MANUNZA et al., 1997; BRAESICKE et al., 2000; STARIKOV et al., 2001) e do fenômeno da complexação (VAN HELDEN et al., 1992; MARK et al., 1994; KÖHLER et al., 1992; 1994; LIPKOWITZ et al., 1997a; 1997b; 1998, SUN et al., 2003, LAWTRAKUL et al., 2003), o método apresenta características que dificultam a realização destes estudos. O principal fator limitante

relaciona-se à escala de tempo dos fenômenos experimentados pelas CDs, que em sua maioria ocorrem numa escala algumas ordens de grandeza maior do que a técnica é capaz de alcançar com os recursos computacionais disponíveis atualmente. Outro fator limitante está relacionado com a complexidade dos sistemas. CDs apresentam um número muito grande de conformações energeticamente estáveis, um espaço de fases impossível de ser amostrado por completo com a técnica. Além disso, estudos consistentes sobre a complexação, em princípio, devem levar em consideração efeitos do solvente, simulando assim as condições reais da ocorrência da complexação. Esta situação cria dificuldades para a realização das simulações devido à necessidade de um número muito elevado de partículas nos sistemas a serem investigados. Estes fatores somados à facilidade de execução e corrente popularização de programas para cálculos de MM fazem com que o método de DM seja preterido no estudo de CDs (LIPKOWITZ, 1998), mesmo fornecendo informações mais detalhadas, consistentes e confiáveis do que estudos com MM (DODZIUK et al., 2000).

Surpreendentemente, apesar das dificuldades e da complexidade do problema, é possível constatar que na literatura existe um número muito maior de estudos, utilizando DM, que tratam da formação de complexos do que estudos tratando apenas das propriedades da CDs na forma não associada (LIPKOWITZ, 1998).

Na análise realizada da literatura constatamos que problemas que podem ser cruciais para a formação dos complexos de inclusão, como a flexibilidade das CDs e sua interação com a água, raramente são abordados em estudos de simulação computacional. Estes problemas ainda não foram completamente elucidados, e por dependerem diretamente da estrutura e organização molecular das CDs podem vir a ser compreendidos de forma mais abrangente através de investigações a nível molecular.

A utilização de CDs como agentes complexantes e carreadores depende fundamentalmente de seu comportamento em solução aquosa, que reflete diretamente na forma como estes açúcares associam-se. E de fato, a forma de interação com a água diferencia as propriedades e dirigem o uso das CDs naturais e seus derivados. O oligossacarídeo β -CD apresenta um comportamento anômalo com relação à solubilidade em água, sendo aproximadamente dez vezes menos solúvel que os homólogos α - e γ -CD (SZEJTLI, 1988; 1998). Por apresentar um

tamanho de cavidade ideal para inclusão de compostos farmacêuticos, aromas, hormônios, vitaminas, etc, e um custo de produção consideravelmente menor, a β -CD é a CD mais utilizada em aplicações industriais e farmacêuticas (SZEJTLI, 1998). No entanto, a solubilidade reduzida muitas vezes dificulta sua utilização em condições onde é desejável o aumento da solubilidade da substância complexada. Em formulações farmacêuticas, normalmente o potencial carreador da β -CD é aumentado com a utilização de derivados hidroxialquilados (UEKAMA et al., 1998). Um dos derivados sintéticos mais utilizados é o composto metilado (metil- β -CD), que apresenta solubilidade em água maior do que a ciclodextrina natural (UEKAMA et al., 1998; STARIKOV et al., 2001). Evidências experimentais sugerem que as moléculas de CD em água formam agregados, que, provavelmente, apresentam estrutura semelhante na α e γ -CD e diferente na β -CD, justificando assim as diferenças nos valores de solubilidade (COLEMAN et al., 1992). No entanto, este fenômeno permanece ainda pouco esclarecido e informações estruturais detalhadas sobre os sistemas podem contribuir para sua elucidação.

Neste estudo, simulações de DM foram realizadas para investigar as CDs naturais em água. A seguir descrevemos todos os detalhes computacionais e os elementos necessários para a realização das simulações assim com os resultados obtidos e as discussões envolvidas.

5.2- MÉTODOS

5.2.1. Modelos Moleculares

A etapa inicial deste estudo consistiu na obtenção de modelos moleculares para representação das CDs. A literatura apresenta uma grande variedade de campos de forças que vem sendo desenvolvidos para modelagem de carboidratos, (PÉREZ et al., 1998). Neste trabalho as CDs foram representadas utilizando-se o campo de força AMBER96 (CORNELL et al., 1995) em conjunto com o campo de força Glycam98 (WOODS e CHAPELLE, 2000) e um conjunto de cargas parciais atômicas que foram derivadas para considerar especificamente estes oligossacarídeos. Como já discutido anteriormente, as cargas do campo de força Glycam98 foram desenvolvidas considerando apenas moléculas de glicose isoladas (WOODS e CHAPELLE, 2000). Sendo as CDs oligômeros α -(1-4) de unidade de α -

D-glicose (Figura 5.1), a utilização destas cargas implicaria numa representação inadequada dos sítios envolvidos na formação das ligações glicosídicas. As cargas parciais pontuais foram derivadas utilizando a metodologia RESP, descrita no Capítulo 3 (seção 3.2.1.3), considerando porém, neste caso, um trímero de glicose α -(1-4). Esta metodologia (BAYLY et al., 1993) é utilizada na obtenção de cargas parciais compatíveis com a formulação do campo de força Amber (CORNELL et al., 1995), mantendo portanto a compatibilidade do campo de força. O conjunto final de cargas derivadas para os sítios constituintes das moléculas de CD é comparado ao conjunto correspondente no campo de força Glycam98 (WOODS e CHAPELLE, 2000) na Tabela 5.1. Como pode ser observado, as cargas derivadas, considerando um oligômero de glicose α -(1-4), diferem das cargas derivadas para a molécula de glicose isolada. Nota-se que as diferenças mais significativas encontram-se na região da ligação glicosídica, ausente na glicose livre.

Para validar o conjunto de cargas derivadas realizamos uma comparação entre duas estruturas da molécula de α -CD, uma construída com o campo de força: parâmetros (ligação, ângulos, diedros, van der Waals) presentes no campo de força Glycam98 e as cargas Derivadas; e outra obtida com cálculos de MQ a nível *ab initio* HF//3-21G*. Ambas as estruturas foram submetidas à otimização de energia, sendo a energia da estrutura definida pelo de campo de força minimizada, através do método steep-descendent, até gradiente 0,0001 com o programa TINKER (PONDER, 2001). A otimização da geometria através do calculo quântico, também realizada até gradiente 0,0001, foi realizada com o programa Gaussian98 (FRISCH et al., 1998). As duas moléculas apresentaram estrutura bastante semelhante em relação às coordenadas internas (distância e ângulos de ligação, ângulos de torção) e também à formação e distância de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas secundárias (dados não apresentados). O cálculo do RMSD entre as duas estruturas resultou num valor de 0,4 nm, indicando desta forma, apenas pequenos desvios estruturais e, portanto, uma concordância muito boa entre os resultados obtidos com o campo de força e o calculo quântico mais apurado.

TABELA 5.1- Cargas parciais derivadas para os sítios constituintes das moléculas de CD. Cargas atômicas parciais do campo de força Glycam98.

Sítio	Carga Derivada[e]	Carga Glycam98 [e]
C1	0.245	0.2252
C2	0.111	0.2474
C3	0.163	0.1484
C4	-0.017	0.0492
C5	0.304	0.2057
C6	0.030	0.2543
O4	-0.360	-0.6887
O2	-0.630	-0.6640
O3	-0.617	-0.6732
O5	-0.524	-0.4966
O6	-0.620	-0.6805
HO2	0.435	0.4281
HO3	0.378	0.4357
HO6	0.427	0.4266
H1	0.141	0.1186
H2	0.072	0.0978
H3	0.091	0.1188
H4	0.135	0.0754
H5	0.100	0.1295
H61	0.068	-0.0080
H62	0.068	0.0003

As simulações em solução aquosa foram realizadas em sistemas contendo uma molécula da específica CD em uma caixa cúbica periódica de água, modelo TIP3P (JORGENSEN et al., 1983), mimetizando uma solução diluída. Os sistemas foram preparados em duas etapas: (i) foi construída uma caixa, sob condições periódicas de contorno, contendo as moléculas de água (1450 nas simulações da α -CD e β -CD e 1600 na simulação da γ -CD). O sistema foi submetido a etapas de minimização para relaxamento de contatos desfavoráveis e obtenção de um mínimo de energia; (ii) a respectiva molécula de CD, com configuração aleatória de mínimo

de energia, obtida através de cálculos de minimização, foi inserida na caixa contendo as moléculas de água e então novamente a energia de todo o sistema foi minimizada. Os sistemas foram dimensionados de forma a se obter a completa hidratação da ciclodextrina e evitar que a molécula interagisse com sua imagem. Todos os átomos do sistema foram representados explicitamente. As moléculas de CD foram consideradas totalmente flexíveis, sem nenhuma restrição na geométrica interna.

5.2.2- Simulações de Dinâmica Molecular

Todas as simulações de DM desta etapa foram realizadas empregando o campo de força Amber/Glycam98 (WOODS e CHAPELLE, 2000), modificado através do uso das cargas parciais derivadas (descrito acima) e implementado no programa Tinker (PONDER, 2001). As equações de movimento foram integradas baseando-se no algoritmo de Verlet (VERLET, 1967) e empregando intervalo de integração de 1,0 fs. O método SHAKE/RATTLE (ANDERSEN, 1983) foi utilizado para manter as ligações envolvendo átomos de hidrogênio fixas em seus valores de equilíbrio. As simulações foram conduzidas no ensemble isotérmico-isobárico (NPT). A temperatura foi mantida constante em 298 K acoplando o sistema a um banho térmico com um tempo de relaxação de 0,1 ps (BERENDSEN et al., 1984). A pressão foi mantida constante em 1 atm realizando um acoplamento isotrópico das coordenadas do sistema a um banho de pressão com tempo de relaxação de 0,5 ps (BERENDSEN et al., 1984). Para tratamento das interações de curto alcance entre átomos não ligados covalentemente utilizou-se raio de corte de 1,0 nm. As interações eletrostáticas de longo alcance foram tratadas utilizando-se o método *Particle Mesh Ewald* (PME) (DARDEN et al., 1993). Simulações de DM de aproximadamente 2 ns foram realizadas para as três CDs a 298 K e 1 atm após a realização de 100 ps de aquecimento e equilibração na mesma temperatura e volume constante (NVT), definido pela densidade da água modelo TIP3P (JORGENSEN et al., 1983). As coordenadas de todas as partículas foram registradas em intervalos de 0,1 ps para realização das análises.

5.2.3- Análises

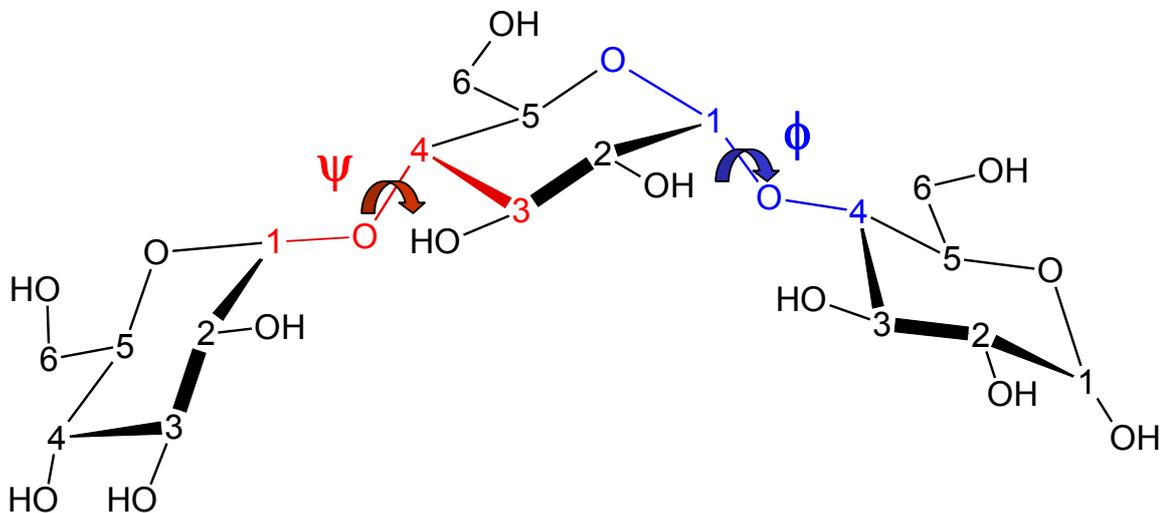
As análises realizadas a partir da trajetória das CDs naturais em água são descritas nesta seção.

Análises de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) foram realizadas para as três CDs naturais durante as simulações. Em suma o RMSD mostra os desvios estruturais, durante a dinâmica, a partir de uma estrutura de partida, tomada como referência. Para as três CDs foi considerada como estrutura de partida a inicial da dinâmica, ou seja, a primeira após aquecimento e equilíbrio. A cada 0,1 ps foi calculado o RMSD da nova estrutura com relação à estrutura inicial. Duas análises distintas foram executadas: uma considerando todos os átomos da CDs para o ajuste (*fitting*) a partir da estrutura de referência e a outra considerando apenas o esqueleto do anel, ou seja, apenas os átomos de carbono e oxigênio constituintes dos resíduos de glicose, desconsiderando os hidrogênios e os grupos laterais (OH e CH₂OH). Adicionalmente foram calculadas as distribuições estatísticas dos valores de RMSD.

Os ângulos de torção glicosídicos, ψ (C_{1_n}-O_{4_{n+1}}-C_{4_{n+1}}-C_{3_{n+1}}) e ϕ (O_{5_n}-C_{1_n}-O_{4_{n+1}}-C_{4_{n+1}}) envolvendo as ligações glicosídicas entre resíduos de glicose adjacentes (*n*) (Figura 5.3), foram calculados para todos os anéis de glicose de cada CD. Para a α -CD, por exemplo, foram monitorados durante toda a dinâmica, em intervalos de 0,1 ps, os seis diferentes ângulos de torção. Este mesmo intervalo foi utilizado para o cálculo dos ângulos na β -CD e γ -CD.

A formação de ligações de hidrogênio internas entre as hidroxilas secundárias (OH₂, OH₃, Figura 5.3) das moléculas de CD foi observada através do acompanhamento da variação da distância entre os átomos O_{2_n}...O_{3_{n+1}}, O_{2_n}...HO_{3_{n+1}}, O_{3_{n+1}}...HO_{2_n} de resíduos de glicose adjacentes durante toda a dinâmica (*n* refere-se ao número do resíduo de glicose). Uma ligação de hidrogênio entre os grupos OH foi caracterizada assumindo-se uma distância entre os sítios H...O menor que 0,2 nm e uma distância entre os sítios O...O menor do que 0,3 nm (FREITAS, 1993)

Figura 5.3- Representação esquemática de um trîmero de glicose onde são assinalados os ângulos de torção glicosídicos ψ ($C1_n-O4_{n+1}-C4_{n+1}-C3_{n+1}$), em vermelho, e ϕ ($O5_n-C1_n-O4_{n+1}-C4_{n+1}$), em azul.



A estrutura e dinâmica das moléculas de água em torno da cavidade das moléculas de CD foi investigada através de uma série de análises. Para estas análises o centro da cavidade foi definido com o cálculo do centro de geometria de cada molécula. Funções distribuição radial de pares, $g(r)$, e número de coordenação foram calculados para a água em função da distância a partir do centro da cavidade. Adicionalmente a probabilidade radial de encontrar água, em função da distância a partir do centro da molécula, foi também calculada. Desta análise foram calculados os raios aproximados das cavidades das três CDs. Tempos de residência, ou correlação, para as moléculas de água dentro da cavidade foram calculados durante as simulações em função de um dado raio de corte (um intervalo arbitrário entre 0,05 e 1,0 nm a partir do centro da cavidade). Dos dados de tempo de residência foram calculados: (i) o número de moléculas presentes na região definida pela cavidade em função do tempo de simulação e (ii) a variação da distância das moléculas de água a partir do centro da cavidade (por clareza somente as seis moléculas apresentando os mais longos tempos de residência dentro da cavidade foram apresentadas no gráfico).

5.3- RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.3.1- Estrutura das Ciclodextrinas

Após o período inicial de equilibração de 100 ps nenhum desvio significativo foi observado a partir dos valores médios de energia (energias potencial, cinética e total) e densidade dos sistemas (dados não apresentados).

Os resultados das análises de RMSD realizadas para α -, β - and γ -CD durante as simulações mostram flutuações estruturais bastante semelhantes para as três moléculas em solução, como pode ser observado pela evolução temporal (Figura 5.4) e distribuição (Figura 5.5) dos valores de RMSD. Nota-se que o RMSD considerando todos os átomos da molécula ou apenas o esqueleto do anel apresentam exatamente o mesmo perfil de variação. Esta observação indica que as variações estruturais nestas moléculas em água derivam principalmente das flutuações na estrutura do esqueleto do anel. Variações nas posições dos grupos hidroxila e hidroxi-metila, reconhecidamente grupos móveis, parecem ser menos determinantes para as flutuações estruturais globais nas CDs.

O fenômeno da flexibilidade conformacional das CDs permanece até hoje não completamente esclarecido. Por muito tempo estas moléculas foram consideradas conformacionalmente bastante rígidas (SAENGER, 1980; SZEJTLI, 1988; LI e PURDY, 1992). A cadeia de ciclos fechada, somada à existência de uma possível rede de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas secundárias de resíduos de glicose adjacentes, contribui para este ponto de vista. Porém, o conceito de estruturas completamente rígidas tem sido revisto (DODZIUK, 2002). O principal fator para esta mudança é a constatação de que as CDs são capazes de ajustar-se às características espaciais e eletrônicas de uma grande variedade de moléculas “hóspedes” durante a formação de complexos de inclusão. Este tipo de adaptação estrutural não é pertinente com estruturas rígidas. Assim as CDs, mesmo apresentando uma estrutura que impõe certa rigidez à molécula, apresentam mobilidade conformacional em diferentes graus. A existência de uma completa simetria nestes sistemas também parece não concordar com as observações de inúmeros estudos, tanto experimentais, quanto teóricos (PRABHAKARAN e HARVEY, 1987; KOEHLER et al., 1988; LIPKOWITZ, 1991; DODZIUK e

NOWINSKY, 2000; DODZIUK, 2002). A maioria das discussões sobre a flexibilidade das CDs tem sido baseada em estudos cristalográficos destes materiais no estado sólido, ou em análises em fase gasosa (PRABHAKARAN e HARVEY, 1987; KOEHLER et al., 1987; 1988c; LIPKOWITZ, 1991; SAENGER et al., 1998; DODZIUK e NOWINSKY, 2000; DODZIUK, 2002). A presença de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas secundárias (OH2 e OH3, Figura 5.3) de resíduos de glicose vizinhos é considerada um fator contribuinte para o aumento da rigidez das CDs (SZEJTLI e OSA, 1996; SAENGER et al., 1998). Nos estudos abordando a flexibilidade conformacional destas moléculas normalmente as ligações de hidrogênio secundárias são consideradas fator preponderante para a rigidez do macrociclo, tendo influência inclusive no espaço conformacional definido pelos ângulos de torção glicosídicos (SAENGER, 1980, SAENGER et al., 1998). Neste estudo, tanto os ângulos glicosídicos como as ligações de hidrogênio entre as hidroxilas secundárias foram analisados.

FIGURA 5.4- Variação do RMSD para as CDs durante a dinâmica em água. Valores calculados considerando-se todos os átomos da molécula (em preto) ou apenas os átomos do esqueleto do anel, sem os hidrogênios e os grupos laterais (em vermelho).

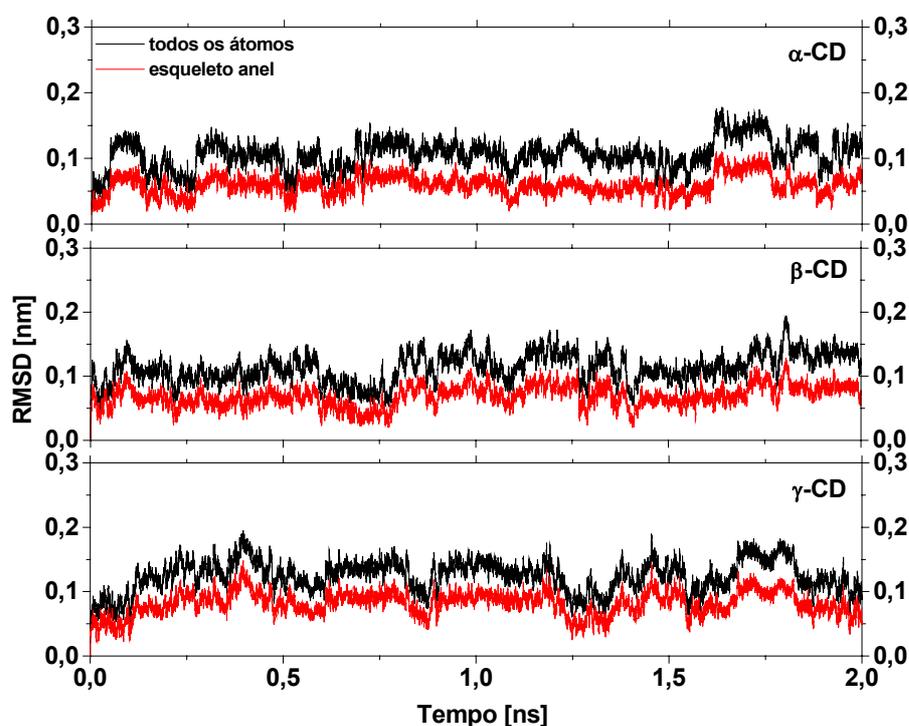
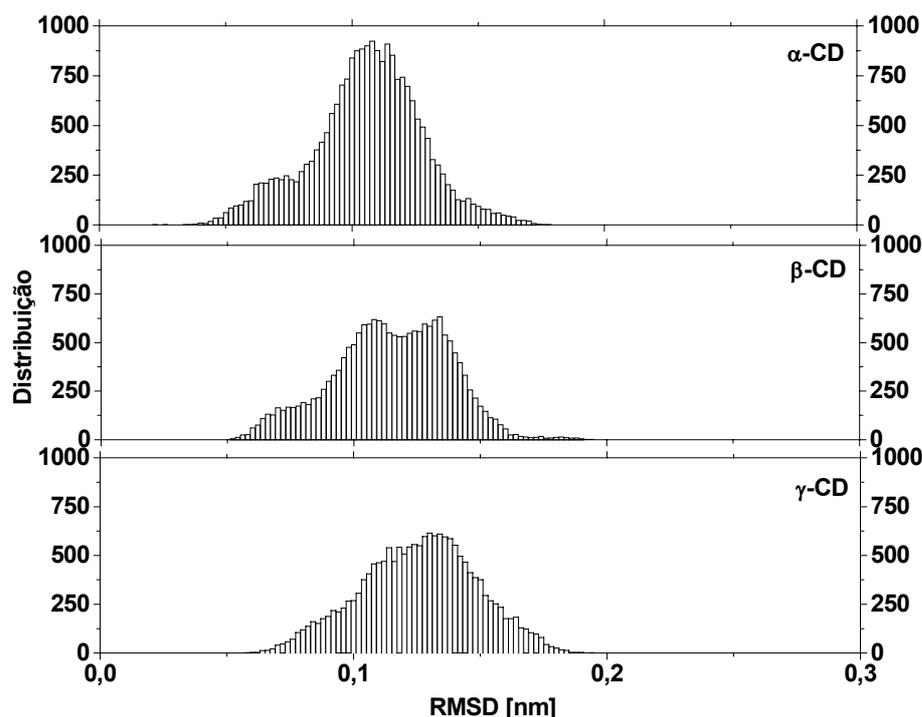


FIGURA 5.5- Distribuição dos valores de RMSD calculados considerando todos os átomos das moléculas de CD.



A evolução temporal dos ângulos glicosídicos ψ e ϕ para todos os resíduos de glicose das três moléculas de CD é apresentada nas Figuras 5.6-5.8 e Figuras 5.9-5.10, respectivamente. Como pode ser observado, durante as simulações ambos os ângulos apresentam uma variação considerável a partir dos valores médios nas três CDs. Os valores médios não diferem muito de dados experimentais para ψ e ϕ obtidos de uma análise estatística da estrutura cristalina das três CDs (ângulo ϕ : $108,1^\circ$ para α -CD, $111,9^\circ$ para β -CD e $109,9^\circ$ para γ -CD; ângulo ψ : $130,3^\circ$ para α -CD, $127,6^\circ$ para β -CD e $129,6^\circ$ para γ -CD) (LICHTENTHALER e IMMEL, 1994). Porém, fica claro o caráter flexível destes ângulos quando comparados aos ângulos diedros internos dos resíduos de glicose, cujos valores desviam muito pouco dos valores médios que caracterizam a conformação estável em cadeira (4C_1) (dados não apresentados). Os valores de RMSD mostram que as flutuações estruturais nas moléculas de CD são definidas basicamente pelas modificações que ocorrem no esqueleto do anel (Figura 5.4) e, portanto, pelas variações dos ângulos de torção glicosídicos, já que os ângulos de torção internos não desviam muito dos valores médios definindo conformações em cadeira para os resíduos de glicose.

FIGURA 5.6- Variação dos seis ângulos de torção glicosídicos ψ ($C1_n-O4_{n+1}-C4_{n+1}-C3_{n+1}$) (em preto), e valores médios (em vermelho), da molécula de α -CD durante a simulação em água. Desvios a partir dos valores médios (DP) são apresentados.

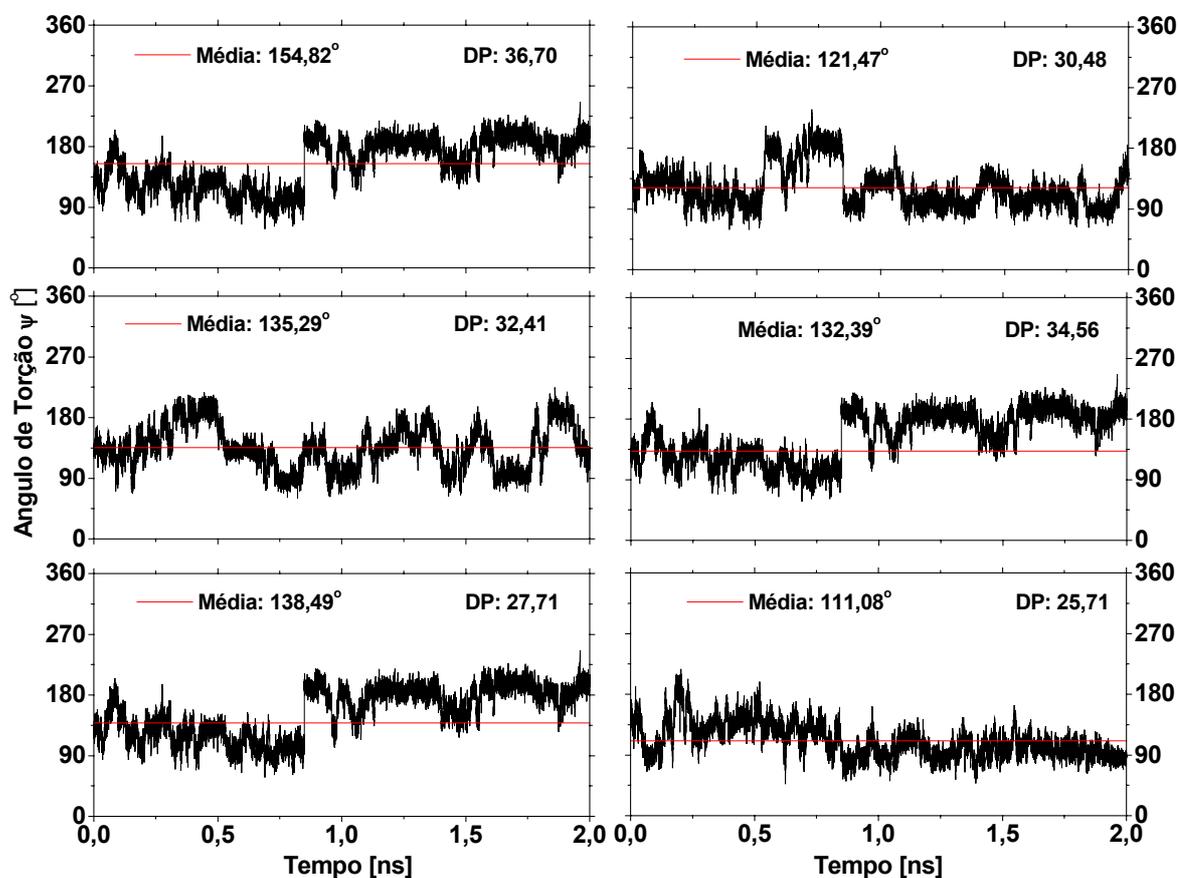


FIGURA 5.7- Variação dos sete ângulos de torção glicosídicos ψ ($C1_n-O4_{n+1}-C4_{n+1}-C3_{n+1}$) (em preto), e valores médios (em vermelho), da molécula de β -CD durante a simulação em água. Desvios a partir dos valores médios (DP) são apresentados.

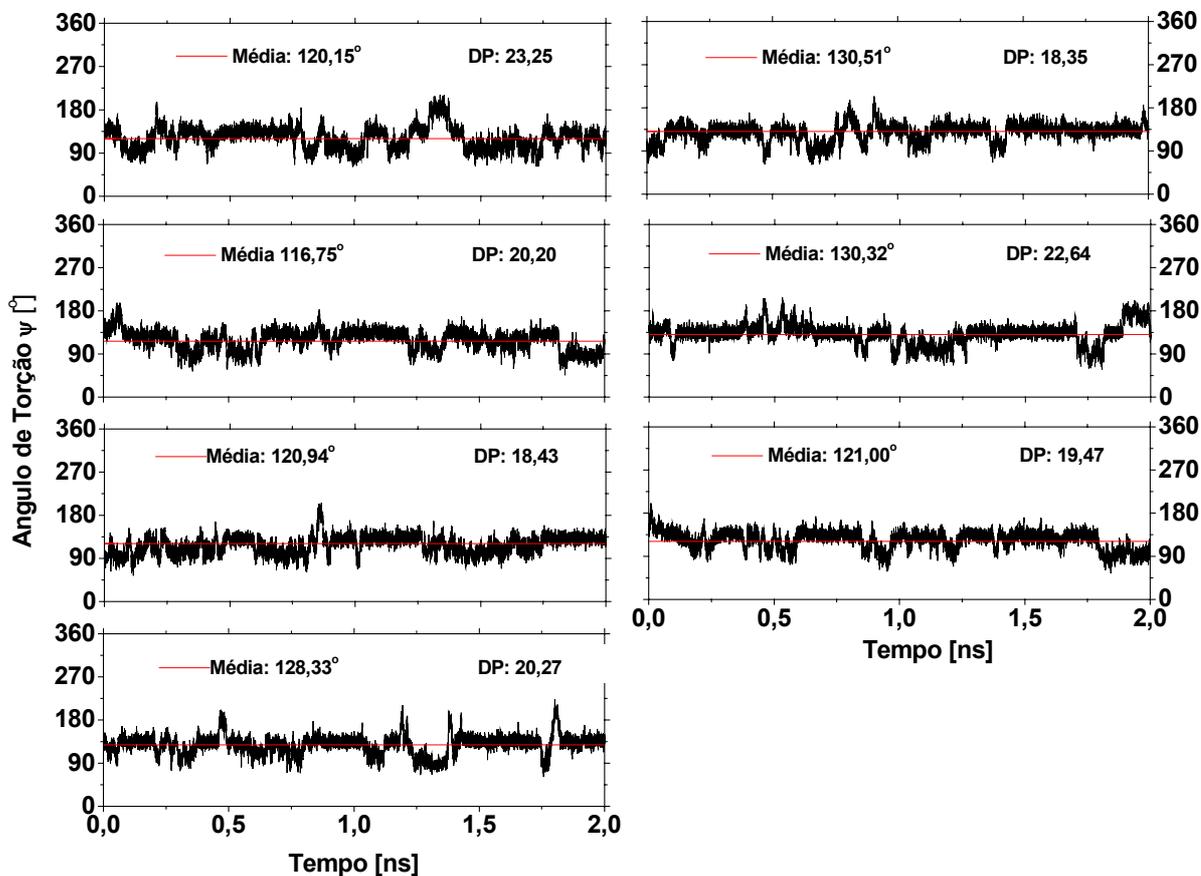


FIGURA 5.8- Variação dos oito ângulos de torção glicosídicos ψ ($C1_n-O4_{n+1}-C4_{n+1}-C3_{n+1}$) (em preto), e valores médios (em vermelho), da molécula de γ -CD durante a simulação em água. Desvios a partir dos valores médios (DP) são apresentados.

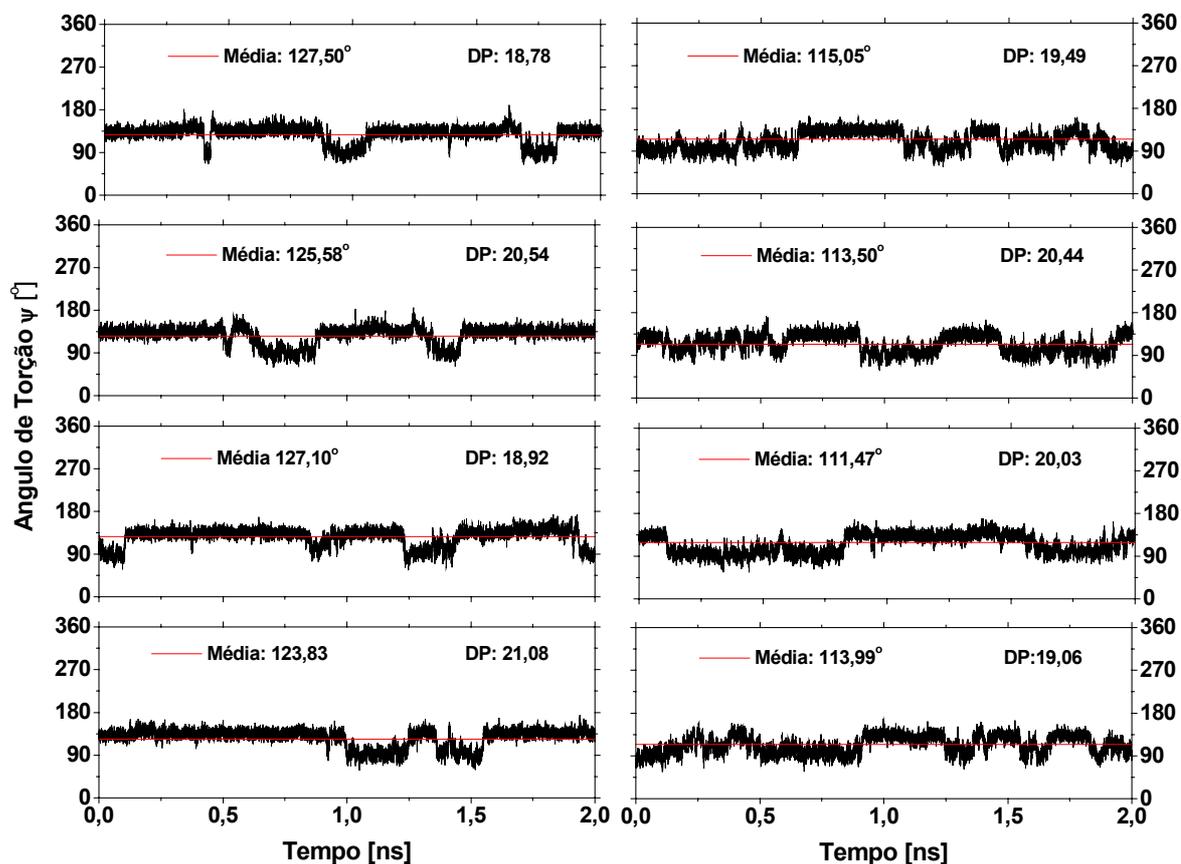


FIGURA 5.9- Variação dos seis ângulos de torção glicosídicos ϕ ($O5_n-C1_n-O4_{n+1}-C4_{n+1}$) (em preto), e valores médios (em vermelho), da molécula de α -CD durante a simulação em água. Desvios a partir dos valores médios (DP) são apresentados.

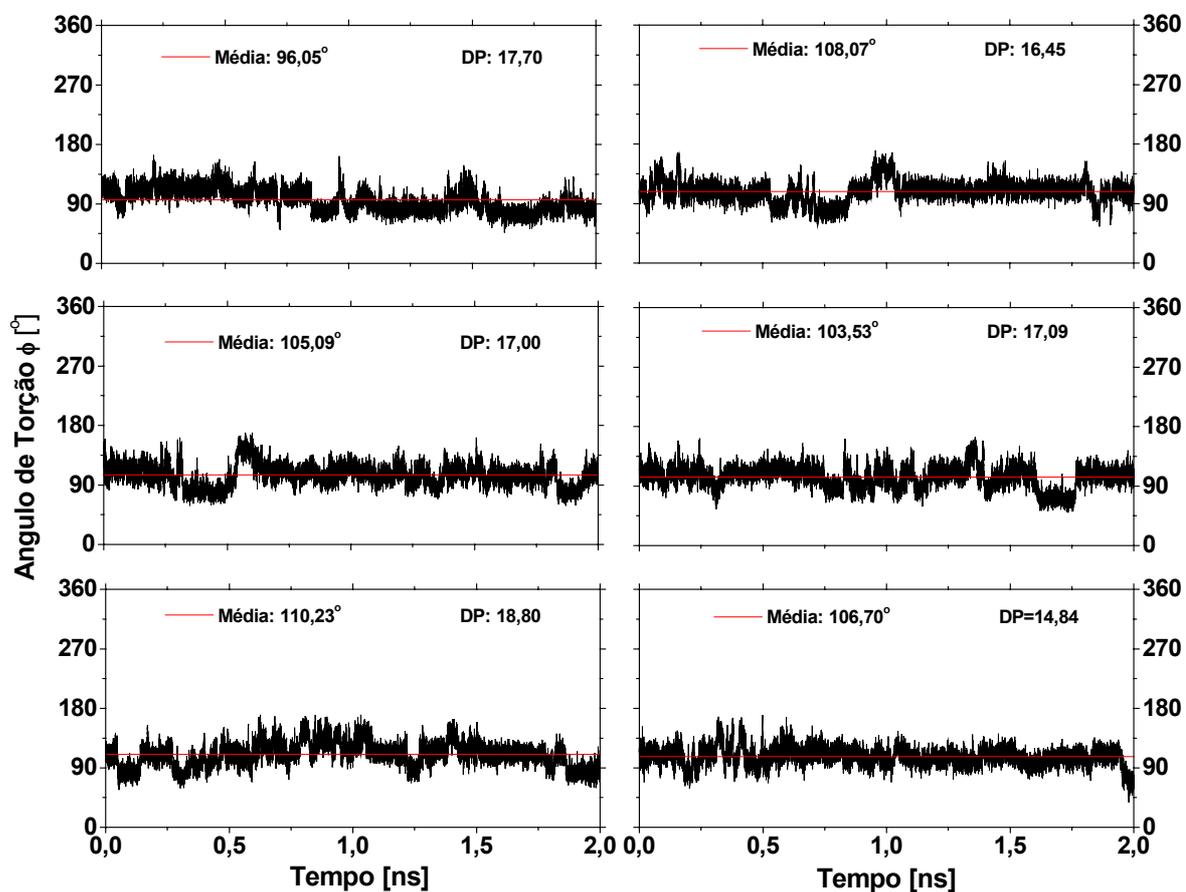


FIGURA 5.10- Variação dos sete ângulos de torção glicosídicos ϕ ($O5_n-C1_n-O4_{n+1}-C4_{n+1}$) (em preto), e valores médios (em vermelho), da molécula de β -CD durante a simulação em água. Desvios a partir dos valores médios (DP) são apresentados.

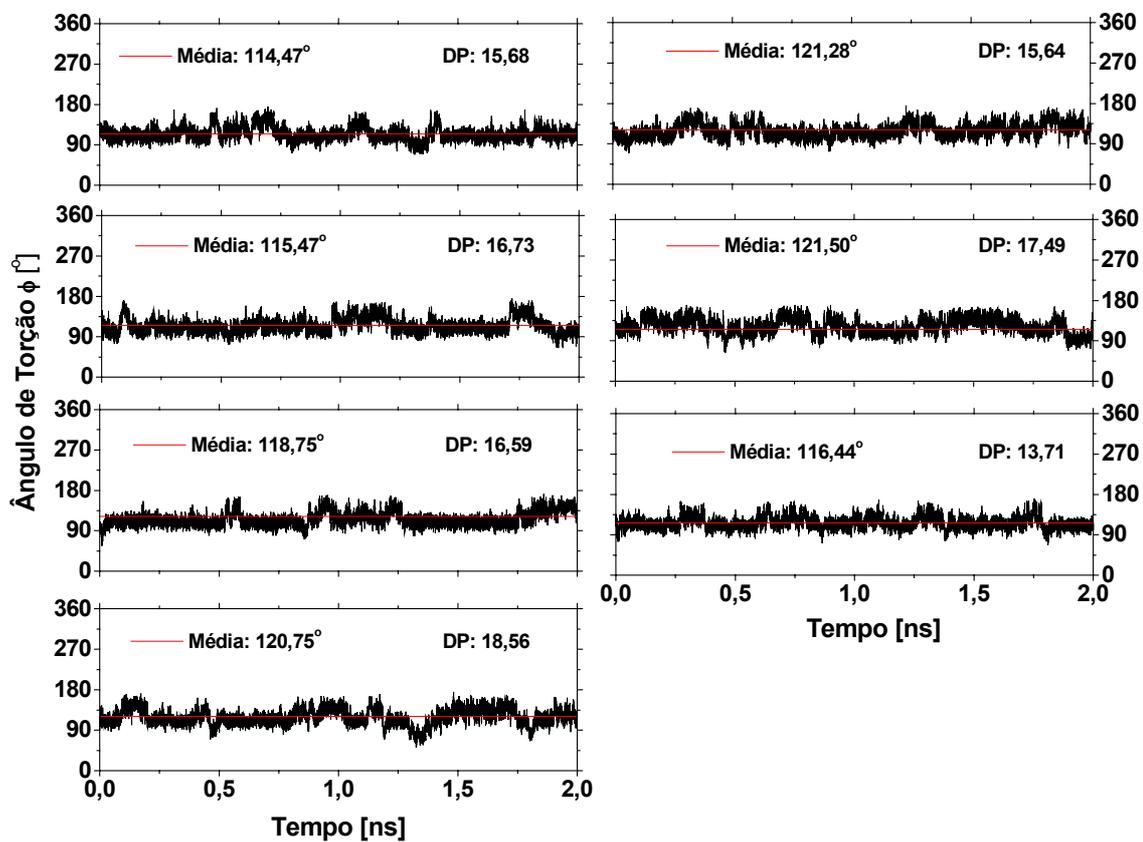
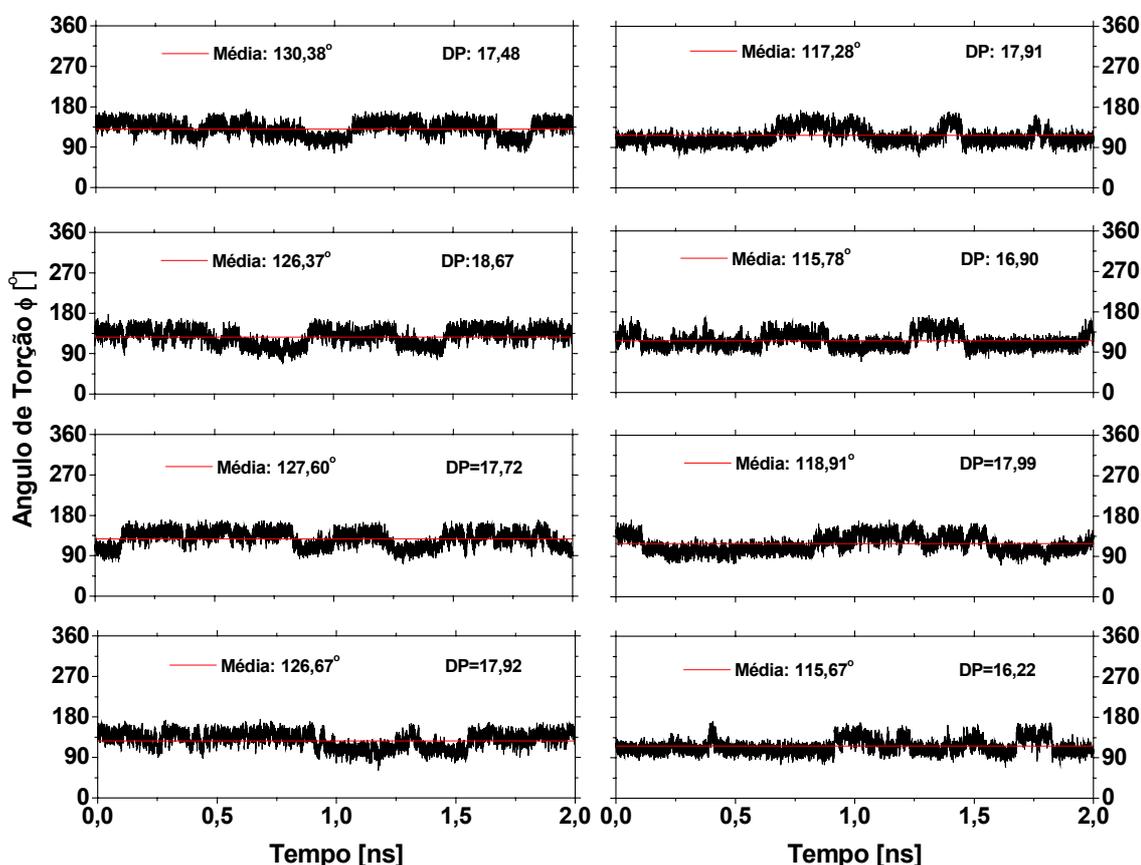


FIGURA 5.11- Variação dos oito ângulos de torção glicosídicos ϕ ($O5_n-C1_n-O4_{n+1}-C4_{n+1}$) (em preto), e valores médios (em vermelho), da molécula de γ -CD durante a simulação em água. Desvios a partir dos valores médios (DP) são apresentados.



Nas Figuras 5.12-5.14 é representada, em função do tempo de simulação, a variação da distância entre os átomos $O2_n \dots HO3_{n+1}$ e $O3_{n+1} \dots HO2_n$ de resíduos de glicose (n) adjacentes nas três moléculas de CDs. Nota-se que ligações de hidrogênio são formadas durante quase todo o tempo de simulação entre as hidroxila secundárias (OH_2 e OH_3) dos diferentes resíduos de glicose, nas três moléculas de CD. Outro ponto importante a ser notado é o caráter dinâmico destas ligações, aparentemente não existe uma direção preferencial para as ligações, que são formadas entre $O2 \dots HO3$ tão frequentemente quanto entre $O3 \dots HO2$. Este comportamento dinâmico alternado, chamado fenômeno flip-flop, já foi observado anteriormente para a β -CD no estado cristalino (BETZEL et al., 1984) e investigado em detalhes através de simulações de DM (KOEHLER et al., 1988c). Devido a considerações de simetria as propriedades dos diferentes anéis de glicose nas moléculas de CD devem ser idênticas em solução. As diferenças observadas

recaem sobre a insuficiente amostragem do espaço de fases nas simulações realizadas. Na γ -CD todos os anéis de glicose formam ligações de hidrogênio internas durante toda a simulação (Figura 5.14), o mesmo não é observado para α - and β -CD (Figura 5.12 e 5.13). Este resultado mostra que nas simulações realizadas a molécula de γ -CD apresenta um grau maior de simetria do que as moléculas de α - e β -CD. Entretanto, esta maior simetria não pode ser interpretada como rigidez, já que todas as ligações de hidrogênio apresentam um caráter altamente dinâmico, que concorda com as demais análises realizadas. Comparativamente a α - e β -CD a maior simetria da γ -CD é resultado de um equilíbrio dinâmico em solução. Em água o papel das ligações de hidrogênio internas em conferir rigidez às moléculas de CD não é tão efetivo. A presença de moléculas de água em torno dos grupos OH das CDs torna possível a existência de arranjos energeticamente estáveis no sistemas também quando ligações de hidrogênio são formadas entre a água e sítios das CDs. Certamente quando uma ligação de hidrogênio interna é quebrada quase simultaneamente há a formação de uma ligação de hidrogênio com a água, restaurando assim o equilíbrio energético no sistema. A possibilidade de formação de ligações de hidrogênio com a água contribui para aumentar a liberdade conformacional dos ângulos de torção glicosídicos, aumentando a flexibilidade das CDs em solução. Em solventes onde não existe a possibilidade de ligações de hidrogênios solvente-CD a estrutura destas moléculas deve apresentar um grau maior de rigidez, um meio de preservar as, energeticamente favoráveis, ligações de hidrogênio internas.

FIGURA 5.12- Evolução temporal da distância entre os átomos $O_{2_n} \dots HO_{3_{n+1}}$ (preto) e $O_{3_{n+1}} \dots HO_{2_n}$ (vermelho) dos resíduos de glicose (n) da α -CD em solução. Os valores foram calculados entre 0 e 2 ns com intervalos de 0,1 ps

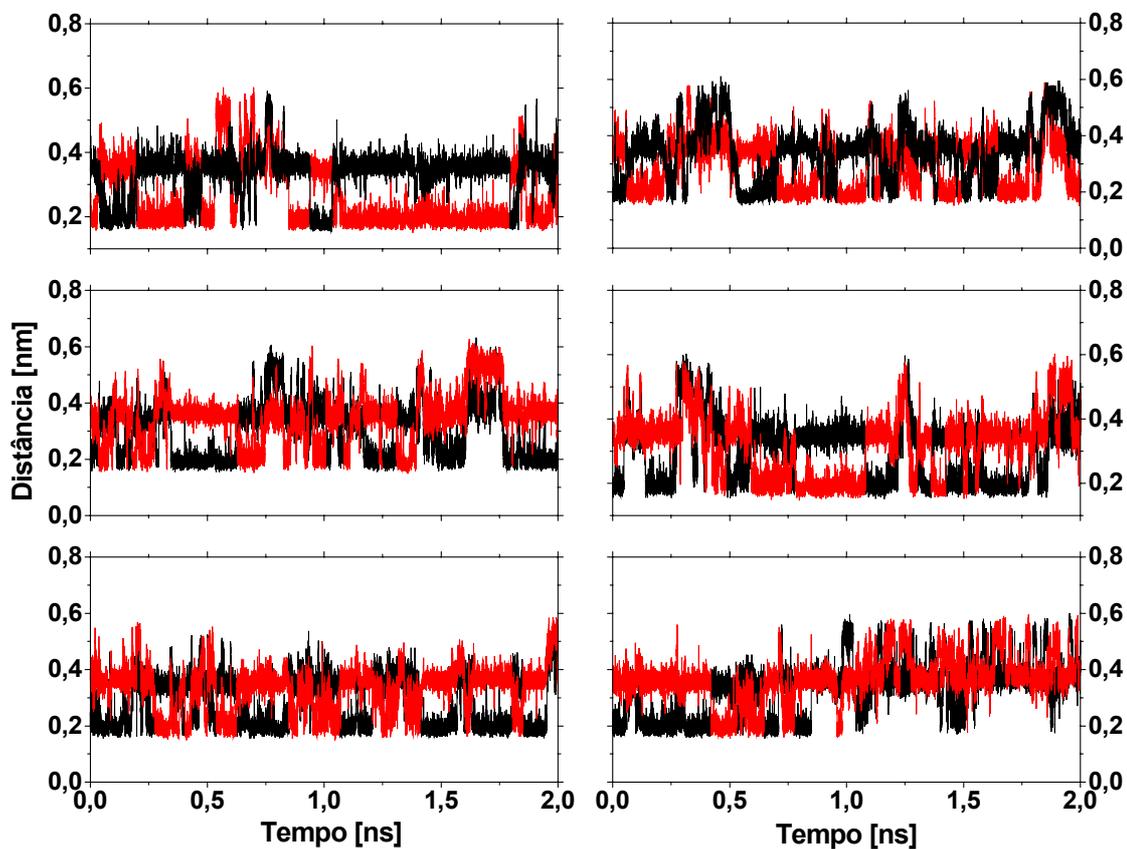


FIGURA 5.13- Evolução temporal da distância entre os átomos $O2_n \dots HO3_{n+1}$ (preto) e $O3_{n+1} \dots HO2_n$ (vermelho) dos resíduos de glicose (n) da β -CD em solução. Os valores foram calculados entre 0 e 2 ns com intervalos de 0,1 ps

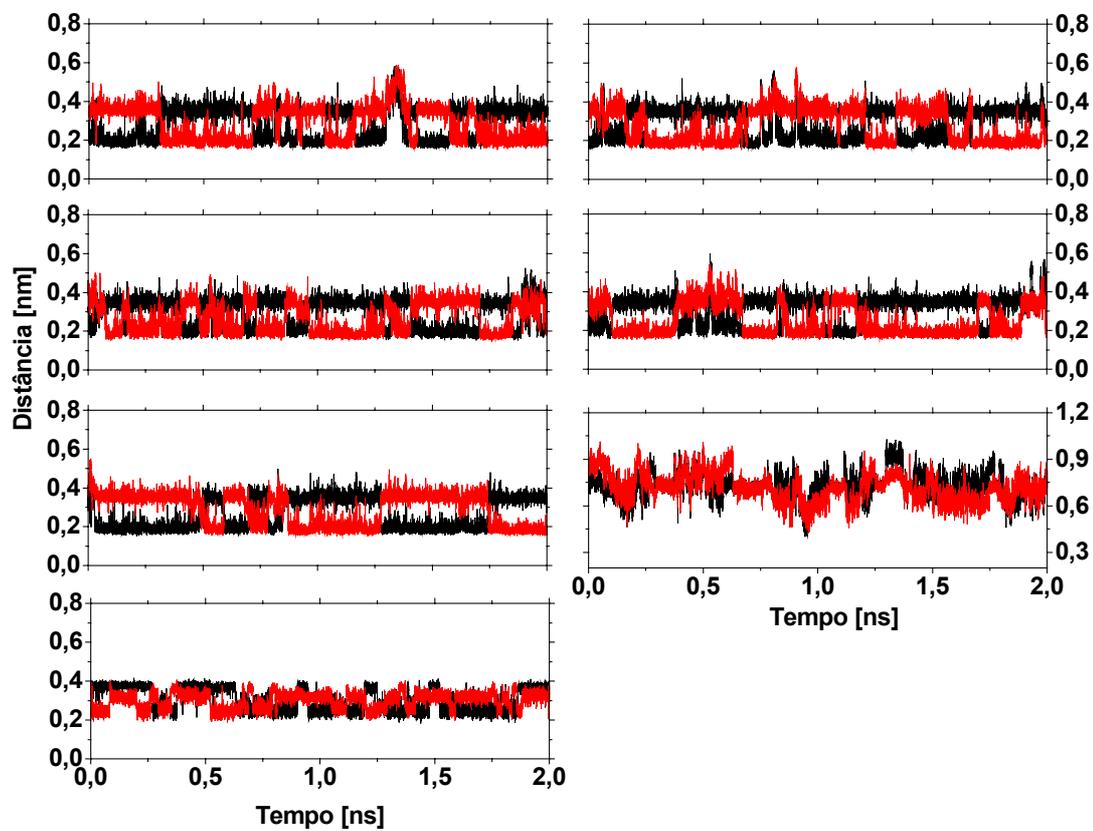
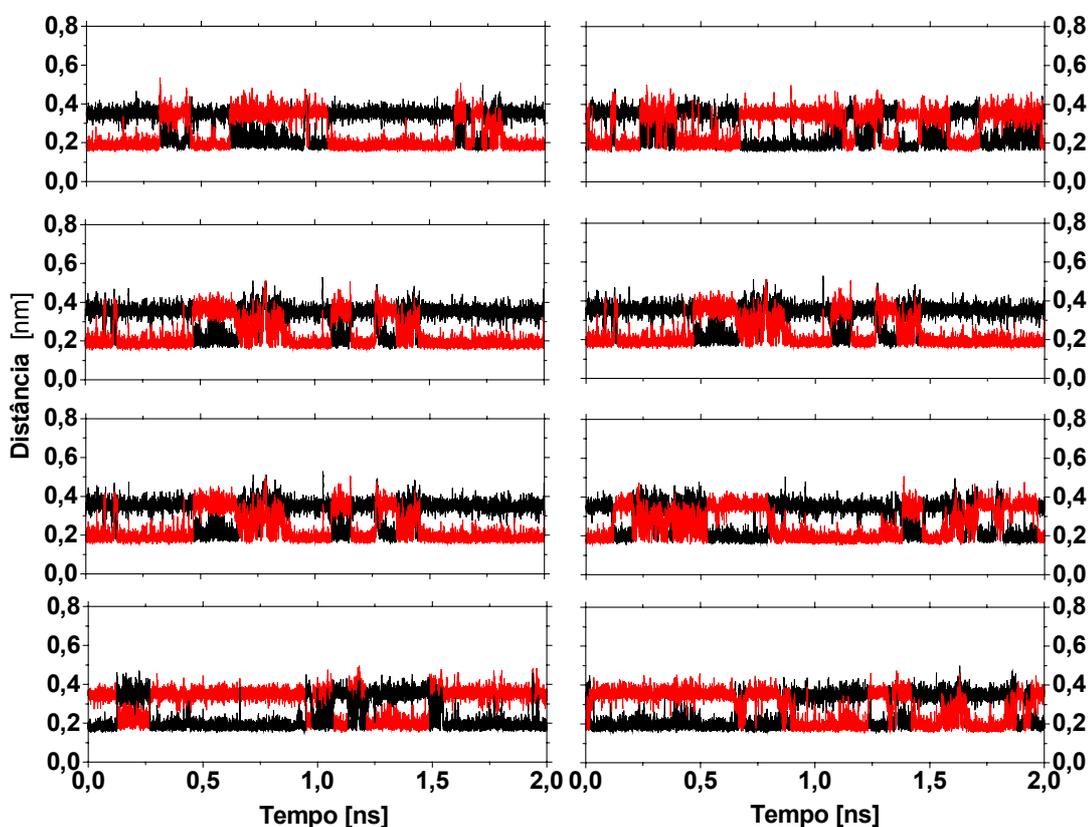


FIGURA 5.14- Evolução temporal da distância entre os átomos $O2_n \dots HO3_{n+1}$ (preto) e $O3_{n+1} \dots HO2_n$ (vermelho) dos resíduos de glicose (n) da γ -CD em solução. Os valores foram calculados entre 0 e 2 ns com intervalos de 0,1 ps



5.3.1-Hidratação e Interação com a Água

Funções distribuição radial de pares, $g(r)$, calculadas para as moléculas de água em torno de todos os átomos de oxigênio das moléculas de CD são apresentados nas Figuras 5.15, 5.16 e 5.17 para α -, β -, e γ -CD, respectivamente. Como poder ser observado, as funções $g(r)$ para os sítios O2, O3, O6 e O5 apresentam um formato típico para as três CDs. Pode-se observar a existência de correlação com o hidrogênio e o oxigênio da água nas distâncias características de aproximadamente 0,18 e 0,28 nm, correspondentes à formação de ligações de hidrogênio (FREITAS, 1993). Apesar da posição dos picos serem semelhantes, as intensidades são um tanto diferentes. Isto é esperado já que os sítios apresentam cargas e posições diferentes na molécula. Nota-se também a fraca correlação entre as moléculas de água e os átomos O4, indicando que estes encontram-se pouco

expostos ao solvente. A existência de picos definidos, porém com intensidades menores do que 1, se justifica pelo fato das CDs serem moléculas cíclicas e os átomos estarem apenas parcialmente expostos ao solvente. As funções $g(r)$ foram calculadas acumulando-se na mesma função as contribuições dos sítios idênticos de todos os resíduos de glicose. Ou seja, sítios iguais (todos os átomos O4, por exemplo) em resíduos diferentes, foram acumulados na mesma função. Considerando a simetria do sistema, as propriedades de todos os resíduos de glicose devem ser idênticas, não havendo nenhuma justificativa para a solvatação diferenciada de grupos idênticos. Porém, no intervalo de tempo da simulação a molécula de CD não consegue visitar todas as conformações do espaço de fases e, portanto, é possível observar diferenças na solvatação de sítios com os mesmos parâmetros de campo de força devido a diferenças instantâneas na geometria da molécula (dados não apresentados)

FIGURA 5.15- Funções distribuição radial de pares $g(r)$ para a água (OW, HW) em torno dos oxigênios da molécula de α -CD durante a simulação em solução

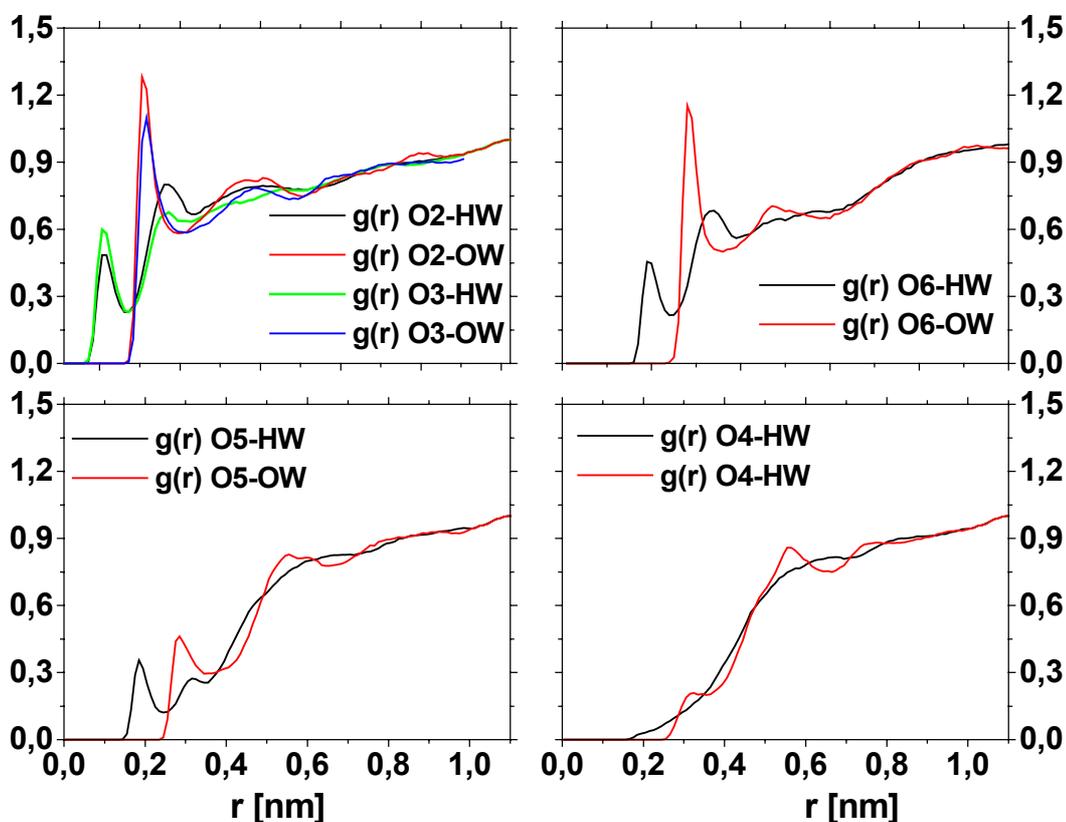


FIGURA 5.16- Funções distribuição radial de pares $g(r)$ para a água (OW, HW) em torno dos oxigênios da molécula de β -CD durante a simulação em solução.

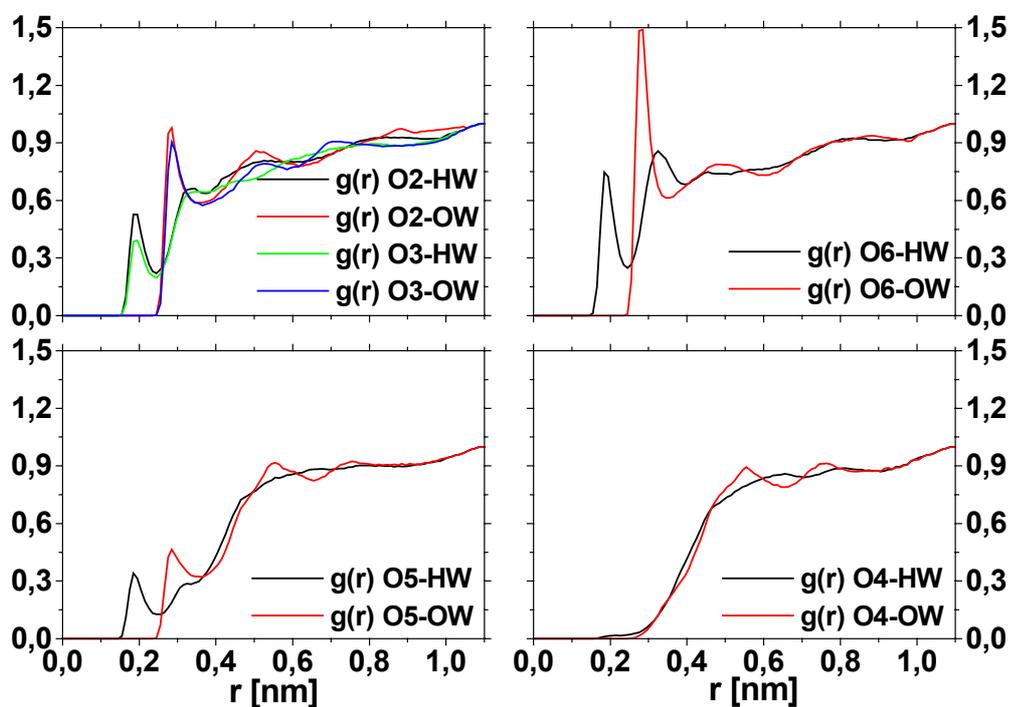
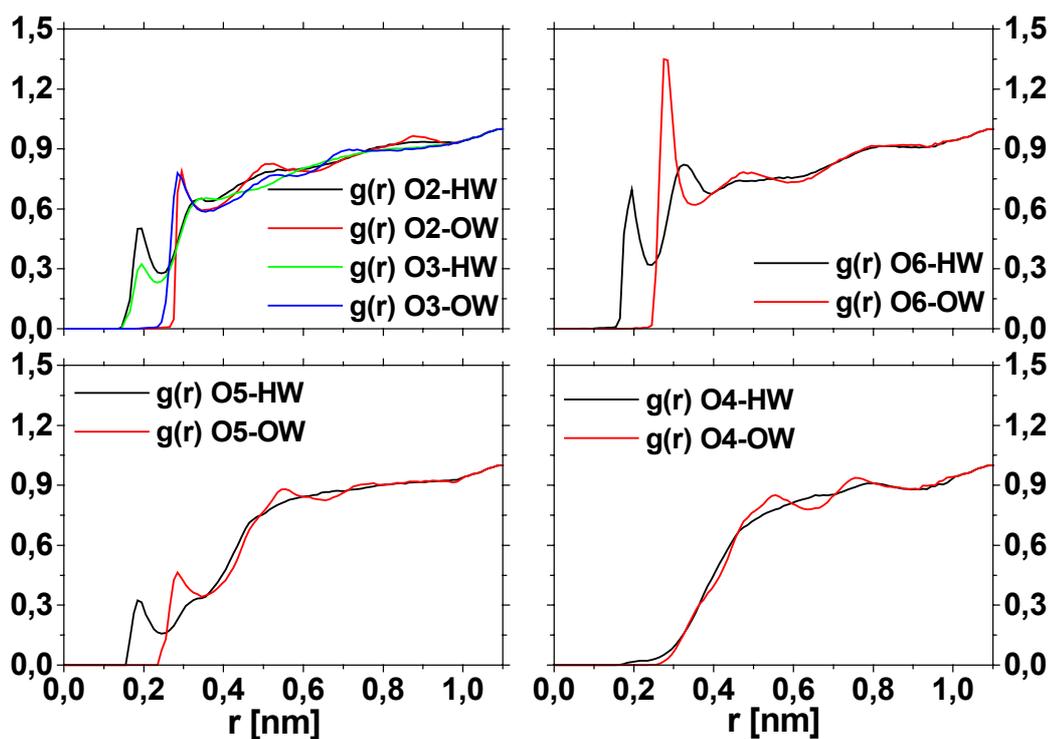


FIGURA 5.17- Funções distribuição radial de pares $g(r)$ para a água (OW, HW) em torno dos oxigênios da molécula de γ -CD durante a simulação em solução



Funções $g(r)$ calculadas para a água em torno do centro da cavidade das três CDs (Figura 5.18a) mostra a existência de duas regiões de correlação, uma próxima ao centro (máximos em aproximadamente 0,03, 0,17 e 0,25 nm para α -, β - e γ -CD, respectivamente), indicando a existência de moléculas de água dentro da cavidade; e outra entre 0,85 e 0,11 nm, correspondendo às moléculas situadas fora da cavidade. A forte correlação dentro da região da cavidade não indica um grande número de moléculas nesta região, como pode ser observado a partir dos resultados para a probabilidade de se encontrar água neste intervalo (Figura 5.18b), e números de coordenação calculados da integração das curvas de $g(r)$ (Figura 5.18c). No cálculo de $g(r)$ é realizada uma divisão pelo raio considerado, assim quanto menor este raio, maiores os valores de $g(r)$. Para as três CDs a probabilidade de encontrar moléculas de água dentro da cavidade, ainda que pequena, não é nula. Expandindo-se esta região nos gráficos pode-se observar que a probabilidade de encontrar água (Figura 5.18b) e os números de coordenação (Figura 5.18c) aumentam da α - para a γ -CD indicando, como esperado, que as moléculas de γ - e β -CD apresentando cavidades maiores são capazes de acomodar mais moléculas de água. Os mínimos locais observados em 0,25, 0,29 e 0,37 nm para α -, β - e γ -CD, respectivamente (Figura 5.18b), coincidem com as paredes das respectivas moléculas e definem, portanto, aproximadamente os raios das cavidades. A partir destes pontos a probabilidade e os números de coordenação para a água aumentam, correspondendo ao *bulk* da solução, fora da cavidade. O cálculo do número de moléculas de água na região esférica definida pelo raios da cavidade (0,25, 0,29 e 0,37 nm for α -, β - e γ -CD, respectivamente) em função do tempo, no último 1 ns das simulações (Figura 5.19), mostra claramente o efeito do tamanho da cavidade na capacidade da molécula acomodar moléculas de água. Para a α -CD na maior parte do tempo existem apenas 1 ou 2 moléculas de água na cavidade, enquanto para a β -CD este número aumenta para 3, 4 ou 5. Na γ -CD, na maior parte do tempo, existem entre 7 e 9 moléculas de água na cavidade.

FIGURA 5.18- Função distribuição radial de pares $g(r)$, probabilidade radial (PR) e número de coordenação (NC) para a água em torno do centro de cavidade das moléculas de CD durante a simulação em solução.

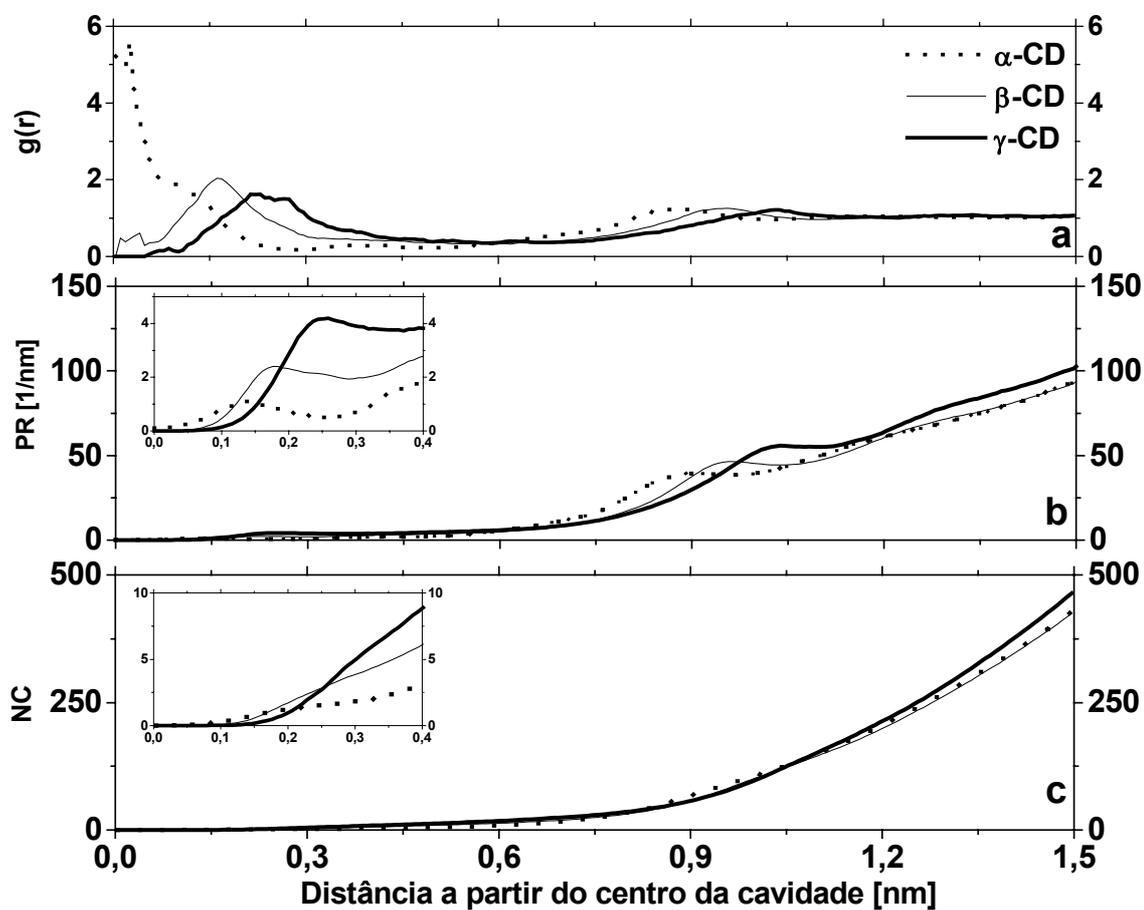
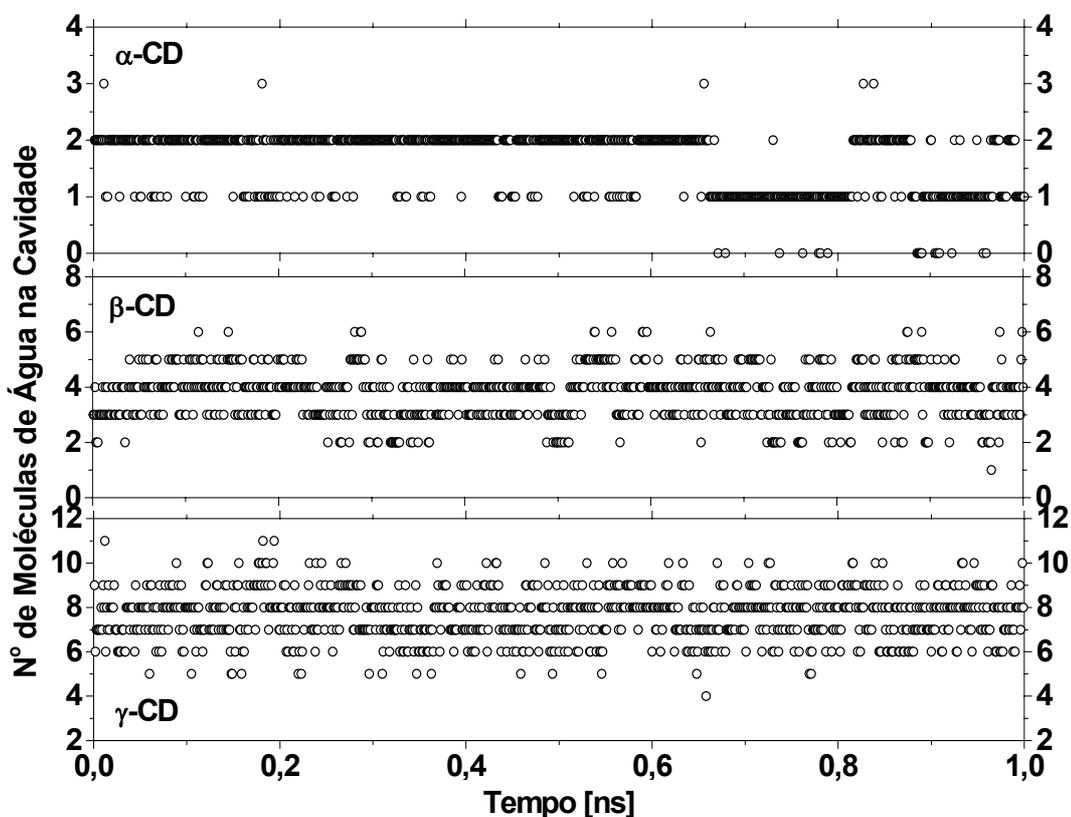


FIGURA 5.19- Número de moléculas de água presentes na região da cavidade das moléculas de CD durante o tempo de simulação



O tempo de residência, ou correlação, das moléculas de água em função de um raio esférico arbitrariamente definido a partir do centro da cavidade das moléculas de CDs, é apresentado na Figura 5.20. Como pode ser observado, a α -CD apresenta um comportamento diferenciado com relação a esta propriedade, com a água apresentando um tempo de residência de aproximadamente 98 ps na região esférica que define aproximadamente a cavidade da molécula (0,25 nm). Este valor é consideravelmente maior do que o tempo de residência observado para a água nas cavidades da β -CD (27 ps) e γ -CD (25 ps) definidas aproximadamente pelos raios esféricos 0,29 nm e 0,37 nm, respectivamente. Os resultados de tempo de residência indicam que moléculas de água que entram na cavidade da α -CD em média dispendem um tempo maior na região do que dispenderiam na cavidade das moléculas de β - e γ -CD. Este resultado pode estar relacionado com o tamanho das cavidades, as cavidades maiores permitem um fluxo maior de moléculas, passam na região um número maior de moléculas (como mostrado na Figura 5.19) e num processo mais dinâmico do que o que ocorre na cavidade da α -CD. Esta, por ser

menor, comporta um número menor de moléculas de água, que podem ocasionalmente permanecer presas numa conformação energeticamente estável dentro da cavidade, resultando num maior tempo de residência. A dinâmica da passagem das moléculas de água pelas cavidades das moléculas de CD pode ser melhor apreciada na Figura 5.21, que apresenta a variação da distância a partir do centro da cavidade (durante o último 1 ns das simulações) das seis moléculas de água com maior tempo de residência na região. Como pode ser observado, existe uma troca de moléculas de água dentro da cavidade, nas três CDs. Esta troca ocorre de forma mais dinâmica nas moléculas de β - e γ -CD do que na molécula de α -CD. Para o caso da β - e γ -CD os espaços vazios próximos ao centros das cavidade que aparecem esporadicamente não indicam a ausência de moléculas de água. Para o gráfico foram consideradas apenas as seis moléculas de água com maior tempo de residência na região da cavidade, porém, como a troca entre as moléculas de água é bastante dinâmica, existem efetivamente moléculas na região, porém com um tempo de residência menor.

FIGURA 5.20- Tempo de residência para as moléculas de água em função de um raio de corte esférico definido a partir do centro da cavidade das moléculas de CD.

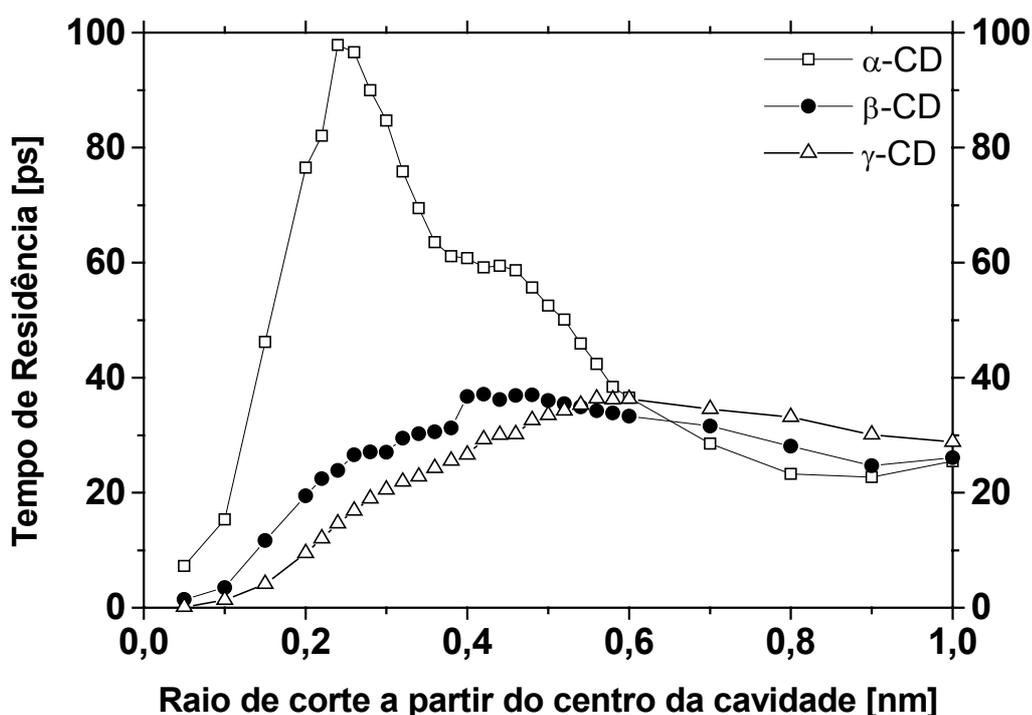
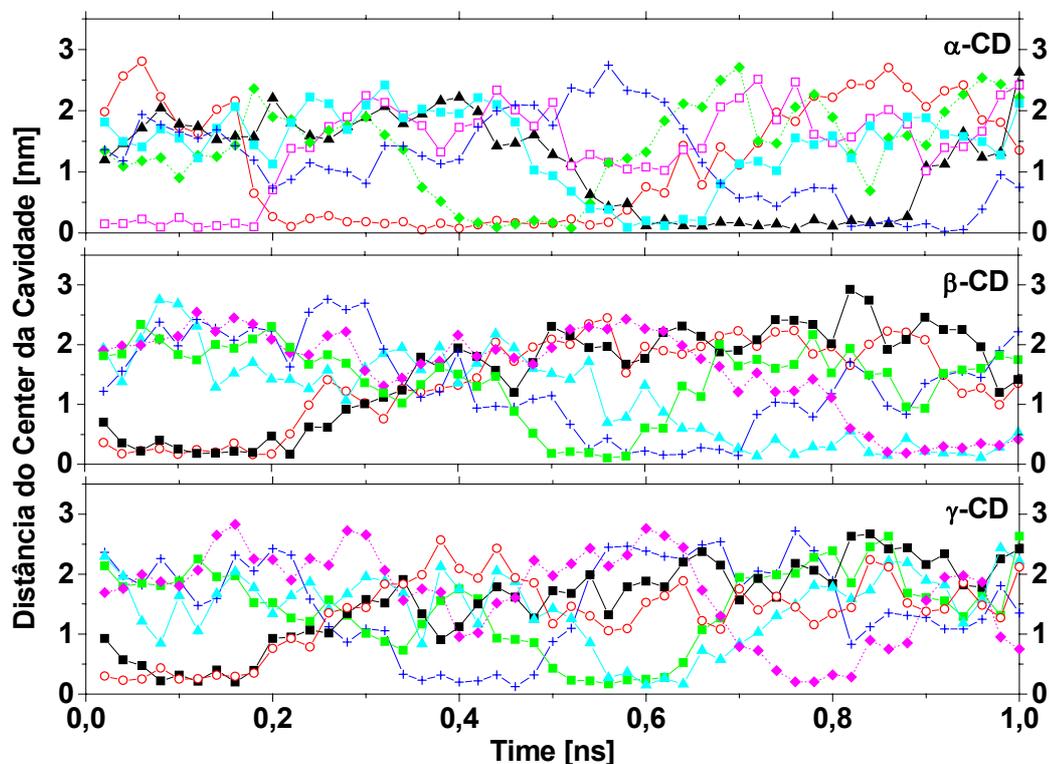


FIGURA 5.21- Variação da distância a partir do centro da cavidade das seis moléculas de água com maior tempo de residência na região. Dados foram obtidos no último 1 ns de cada simulação



5.4- CONCLUSÕES

As simulações realizadas para as três CDs mostram que estes compostos apresentam uma grande liberdade conformacional em solução. Análises de RMSD e ângulos de torção mostram que as variações conformacionais que ocorrem nas CDs são definidas principalmente pelas mudanças conformacionais presentes no esqueleto do anel das moléculas, e conseqüentemente, nos ângulos de torção glicosídicos (ϕ e ψ) conectando os resíduos de glicose. Os ângulos de torção internos não variam muito, definindo conformações estáveis em cadeira para os anéis de glicose. Ligações de hidrogênio entre as hidroxilas secundárias são formadas em solução e apresentam um caráter dinâmico, aparentemente não existe uma direção preferencial para as ligações, que são formadas entre O2...HO3 tão freqüentemente quanto entre O3...HO2. Este comportamento dinâmico alternado, denominado fenômeno flip-flop, já foi observado anteriormente nestes sistemas,

tanto no estado sólido quanto em solução. Devido à simetria dos sistemas, as diferenças observadas no comportamento dos diferentes anéis de glicose podem ser atribuídas a uma amostragem incompleta do espaço de fases nos 2 ns da simulação. Nas simulações realizadas, a molécula de γ -CD apresenta um grau maior de simetria do que as moléculas de α - e β -CD. Entretanto esta maior simetria não pode ser interpretada como rigidez já que os ângulos de torção glicosídicos e as ligações de hidrogênio internas apresentam um caráter altamente dinâmico. Comparativamente a α - e β -CD a maior simetria da γ -CD é resultado de um equilíbrio dinâmico em solução. Em água o papel das ligações de hidrogênio internas em conferir rigidez às moléculas de CD não é tão efetivo. A presença de moléculas de água em torno dos grupos OH torna possível a existência de arranjos energeticamente estáveis também quando ligações de hidrogênio são formadas entre a água e as CDs. A possibilidade de formação de ligações de hidrogênio com a água contribui para aumentar a liberdade conformacional dos ângulos de torção glicosídicos, aumentando a flexibilidade das CDs em solução. Em solventes onde não existe a possibilidade para formação de ligações de hidrogênios solvente-CD a estrutura destas moléculas deve apresentar um grau maior de rigidez, um meio de preservar as, energeticamente favoráveis, ligações de hidrogênio internas. A análise da hidratação das moléculas mostra que a água interage eficientemente através da formação de ligações de hidrogênio com os grupos polares das CDs, além disso as cavidades (que apresentam um caráter reconhecido como relativamente hidrofóbico) durante as simulações foram capazes de hospedar moléculas de água. O tempo de residência destas moléculas, assim como a dinâmica dentro das cavidades, é dependente do tamanho das respectivas cavidades. Pode-se concluir que o comportamento estrutural das CDs em solução aquosa é uma soma das contribuições da variação da estrutura interna e da interação com as moléculas de água. As moléculas de CD apresentam características intrínsecas ao arranjo molecular, porém, são sistemas bastante sensíveis a interações com as moléculas do ambiente em que estão imersas. A formação de ligações de hidrogênio com moléculas vizinhas pode promover mudanças conformacionais significativas na estrutura. Certamente a flexibilidade presente nestes sistemas e a interação com a água contribuem sobremaneira para a formação dos complexos de inclusão em solução. No entanto, este é um fenômeno de alta complexidade que não pode ser explicado sem a ação cooperativa de diversos efeitos químicos.

Capítulo 6

CONCLUSÕES

A principal conclusão que pode ser extraída dos estudos realizados sobre o fenômeno da proteção de bioestruturas pelo dissacarídeo trehalose é que os mecanismos de interação do açúcar parecem ser diferenciados dependendo da natureza da bioestrutura envolvida. Enquanto nas simulações realizadas com a proteína lisozima a TRH não mostrou uma interação direta com a biomolécula, preservando uma fina camada de água na sua superfície, nas simulações com a membrana interage efetivamente com as cadeias lipídicas, formando ligações de hidrogênio, que foram o fator chave para a proteção da estrutura contra o efeito destrutivo da alta temperatura. É importante salientar que as condições empregadas nos dois estudos não foram as mesmas, o que dificulta uma comparação direta entre os resultados, porém as diferenças são quase desprezíveis em termos da concentração da trehalose, fator central para o problema. Além disso, nas simulações em condições semelhantes (325 K e ~0,6 M para a membrana e 298 K e ~0,5 M para proteína) os resultados foram diferentes em relação ao fato da TRH interagir diretamente com a membrana mas não com a proteína, entretanto, em ambos os casos a TRH não altera significativamente estrutura e dinâmica de ambas as bioestruturas. Estas observações concordam com a sugestão de que sob condições ideais a trehalose não apresenta um efeito significativo sobre a estrutura de biomoléculas (CROWE et al., 2001). Porém em condições críticas (como a simulada através da exposição da membrana a alta temperatura) o açúcar apresenta um efeito importante de proteção e é sem dúvida um dos mais eficientes agentes capazes de estabilizar e proteger biomoléculas (CROWE et al., 2001, 1998). Uma característica comum em ambos os estudos foi a não completa remoção das moléculas de água da superfície das bioestruturas, resultado que pode estar vinculado com o excesso de água presente nos sistemas. Assim, uma completa substituição da água poderia ocorrer em uma situação de quase completa desidratação, condição não considerada nestes estudos.

Tentando interpretar os resultados obtidos das simulações no contexto das principais hipóteses para os mecanismos de proteção de biomoléculas pela trehalose, deve-se manter em mente que: (i) as simulações investigam apenas dois tipos de bioestrutura (membrana de DPPC e a proteína lisozima), (ii) um certo

intervalo de concentração (soluções de trehalose 0,5 - 1 M), (iii) uma escala de tempo bastante curta (menos de 10 ns) e (iv) uma única condição de stress (temperatura artificialmente elevada) foi investigada e apenas para o caso da membrana. Além disso as hipóteses para o fenômeno (substituição da água, vitrificação e *water entrapment*) foram desenvolvidas baseadas predominantemente em dados experimentais envolvendo membranas e proteínas completamente (ou quase completamente) desidratadas. Considerando estas restrições, os resultados das simulações abordando a interação trehalose-proteína são mais facilmente interpretados no contexto da hipótese *water entrapment* (BELTON e GIL, 1994; DATTA et al., 2001), já que uma camada de água foi preservada na superfície da proteína na escala de tempo investigada. Por outro lado, os resultados da interação trehalose-membrana se enquadram melhor no contexto da hipótese da substituição da água (CROWE et al., 1998a; 1998b) porque: (i) foram observadas interações, via ligações de hidrogênio, entre as moléculas lipídicas e a trehalose e (ii) estas interações foram reforçadas quando a membrana foi submetida ao stress térmico. Porém, o termo “substituição” não se enquadra perfeitamente neste caso já que a água não foi completamente expelida da superfície da membrana, apenas uma fração das ligações de hidrogênio DPPC-água foram substituídas por ligações DPPC-TRH. Finalmente, as observações contrastantes em relação à interação da TRH com membranas e proteínas concordam com resultados obtidos de duas simulação independentes, uma para um sistema TRH-carboxi-mioglobina (COTTONE et al., 2002) e outra para um sistema trehalose-DPPC (SUM et al, 2003), salientando-se que nestes estudos foram consideradas condições diferentes das empregadas neste trabalho. Esta discrepância sugere que o mecanismo de estabilização pela TRH pode ser não específico e variar dependendo da natureza da bioestrutura e da condição de stress imposta ao sistema. O último trabalho mencionado (SUM et al, 2003), investiga o mesmo sistema abordado neste estudo, trehalose e uma bicamada de DPPC, também utilizando simulações de DM. O trabalho foi publicado durante a fase final do processo de publicação de nosso estudo e, apesar de alguns resultados chave serem concordantes, o estudo não demonstrou a efetiva estabilização da estrutura da membrana pela TRH.

As investigações realizadas neste trabalho representam apenas um passo preliminar em direção a uma melhor compreensão dos mecanismos de estabilização de bioestruturas pela TRH. Porém, um número de questões centrais permanece

ainda a ser esclarecido: (i) como as interações TRH-biomolécula (e os mecanismos de proteção) são afetados pelo tipo de bioestrutura, natureza do stress externo e quantidade de água do sistema? (ii) qual é a efetiva razão termodinâmica para a estabilização da bioestrutura? (iii) porque a TRH é um agente protetor particularmente eficaz quando comparada a outros sacarídeos? Estas questões serão abordadas em trabalhos futuros.

Nos estudos envolvendo os oligossacarídeos CDs, fica claro que as três CDs naturais apresentam uma grande liberdade conformacional em solução. As moléculas de água interagem com as CDs formando ligações de hidrogênio com seu grupos polares e residindo na região das cavidades. O tamanho da cavidade influencia na simetria dos sistemas e também na capacidade de hospedar as moléculas de água. Pode-se concluir que o comportamento estrutural das CDs em solução aquosa é uma soma das contribuições de variação da estrutura interna e da interação com as moléculas de água. As moléculas de CD apresentam características intrínsecas ao arranjo molecular, porém, são sistemas bastante sensíveis a interações com as moléculas do ambiente em que estão imersas. Certamente a flexibilidade presente nestes sistemas e a interação com a água contribui sobremaneira para a formação dos complexos de inclusão em solução.

Para finalizar gostaríamos de acrescentar que as etapas desenvolvidas neste estudo levaram a três artigos (texto original em anexo):

Roberto D. Lins, Cristina S. Pereira, Philippe Hünenberger. 2004. **Trehalose-Protein Interaction in Aqueous Solution**. *Proteins: Structure, Functions and Bioinformatics*. 55:177-186.

Cristina S. Pereira, Roberto D. Lins, Indira Chandrasekhar, Luiz Carlos G. Freitas, Philippe H. Hünenberger. 2004. **Interaction of the Disaccharide Trehalose with a Phospholipid Bilayer: A Molecular Dynamics Study**. *Biophysical Journal*. 86: 2273-2285.

Cristina S. Pereira, André F. de Moura, Roberto D. Lins, Luiz Carlos G. Freitas 2004 **Structure and Dynamics of α -, β - and γ -Cyclodextrin in Water. A Comparative Molecular Dynamics Study**. A ser submetido para *Journal of Molecular Structure (Theochem)*

Capítulo 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adeagbo, W.A., V. Buss, & P. Entel. 2002. Inclusion complexes of dyes and cyclodextrins: Modeling supermolecules by rigorous quantum mechanics. *J. Incl. Phenom. Macro.* 44: 203-205.

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

Allison, S.D., B. Chang, T.W. Randolph, & J.F. Carpenter. 1999. Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. *Arch. Biochem. Biophys.* 365: 289-298.

Andersen, H.C. 1983. RATTLE - A velocity version of the shake algorithm for molecular-dynamics calculations. *J. Comput. Phys.* 52: 24-34.

Ballone, P., M. Marchi, C. Branca, & S. Magazu. 2000. Structural and vibrational properties of trehalose: a density functional study. *J. Phys. Chem. B.* 104: 6313-6317.

Bardi, L., A. Mattei, S. Steffan, & M. Marzona. 2000. Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with beta-cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability. *Enzyme Microb. Technol.* 27: 709-713.

Barlette, V.E., & L.C.G. Freitas. 1999. Termodinâmica estatística de líquidos com o Método de Monte Carlo. I. Metodologia. *Quim. Nova.* 22: 254-262.

Bashkin, J.K. 2000. Carbohydrates. *Chem. Rev.*, special issue, 100(12).

Batta, G., K.E. Kover, J. Gervay, M. Hornyak, & G.M. Roberts. 1997. Temperature dependence of molecular conformation, dynamics, and chemical shift anisotropy of alpha,alpha-trehalose in D2O by NMR relaxation. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 1336-

1345.

Bayly, C.I., P. Cieplak, W.D. Cornell, & P.A. Kollman. 1993. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J. Phys. Chem.* 97: 10269-10280.

Beeman, D. 1976. Some multistep methods for use in molecular dynamics calculations *J. Comput. Phys.* 20: 130-139.

Behm, C.A. 1997. The role of trehalose in the physiology of nematodes. *Intern. J. Parasitol.* 27: 215-229.

Belton, P.S., & A.M. Gil. 1994. IR and Raman spectroscopic studies of the interaction of trehalose with hen egg white lysozyme. *Biopolymers.* 34: 957-961.

Bender, M.L., & M. Komiyama. 1978. Cyclodextrin Chemistry. Springer-Verlag, Berlin.

Berendsen, H.J.C., J.R. Grigera, & T.P. Straatsma. 1987. The missing term in effective pair potential. *J. Phys. Chem.* 91: 6269-6271.

Berendsen, H.J.C., & van Gunsteren, W.F. 1986. Practical algorithms for dynamic simulations. Molecular dynamics simulation of statistical mechanical systems. *In* Proceedings of the Enrico Fermi Summer School. Varenna, Soc. Italiana di Fisica, Bologna. 43-65.

Berendsen, H.J.C., J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren, & J. Hermans. 1981. Interaction models for water in relation to protein hydration. *In* Intermolecular Forces. B. Pullman, editor. Reidel, Dordrecht. 331-342.

Berendsen, H.J.C., J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren, A. DiNola, & J. R. Haak. 1984. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 81: 3684-3690.

Betzel, C., W. Saenger, B.E. Hingerty, & G.M. Brown. 1984. Circular and flip-flop hydrogen bonding in β -cyclodextrin undecahydrate: a neutron diffraction study *J. Am. Chem. Soc.* 106: 7545-7557.

Beveridge D.L., & K.J. McConnell. 2000. Nucleic acids: theory and computer simulation, Y2K. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 182-196.

Birch, G.G. 1972. Mushroom sugar. *In Health and Food*. G.G. Birch, L.F. Green, & I.G. Plaskett, editors. Elsevier Science, New York. 49-53.

Bodor, N.S., M-J. Huang, & J.D. Watts. 1995. Theoretical-studies on the structures of natural and alkylated cyclodextrins. *J. Pharm. Sci.* 84: 330-336.

Boving, T.B., & M.L. Brusseau. 2000. Solubilization and removal of residual trichloroethene from porous media: comparison of several solubilization agents *J. Contam. Hydrol.* 42: 51-67.

Boving, T.B., X.J. Wang, & M.L. Brusseau. 1999. Cyclodextrin-enhanced solubilization and removal of residual-phase chlorinated solvents from porous media *Environ. Sci. Technol.* 33: 764-770.

Braesicke, K., T. Steiner, W. Saenger, & E.W. Knapp. 2000. Diffusion of water molecules in crystalline beta-cyclodextrin hydrates. *J. Mol. Graph. Model.* 18: 143-152.

Branca, C., S. Magazu, G. Maisano, & P.L. Migliardo. 1999. Anomalous cryoprotective effectiveness of trehalose: Raman scattering evidences. *J. Chem. Phys.* 111: 281-287.

Branca, C., S. Magazu, G. Maisano, S.M. Bennington, & B. Fak. 2003. Vibrational studies on disaccharide/H₂O systems by inelastic neutron scattering, Raman, and IR Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B.* 107: 1444-1451.

Bryant, G., & J. Wolfe. 1992. Interfacial forces in cryobiology and anhydrobiology.

Cryo-Letters .13: 23-36.

Burkert, U., & N. L. Allinger. 1982. *Molecular Mechanics*. American Chemical Society, Washington.

Carpenter, J.F., & Crowe, J.H. 1989. An infrared spectroscopy study of the interaction of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry*. 28: 3916-3922.

Carpenter, J.F., S.J. Prestrelski, T.J. Anchordoguy, & T. Arakawa. 1994. Interactions of stabilizers with proteins during freezing and drying. *In Formulation and Delivery of Proteins and Peptides*, J.L. Cleland, & R. Langer, editors. Am. Chem. Soc, Washington, DC. 134-147.

Chandler, D. 1987. *Introduction to Modern Statistical Mechanics*. Oxford University Press, New York.

Chandrasekhar, I., & B.P. Gaber. 1988. Stabilization of the bio-membrane by small molecules - interaction of trehalose with the phospholipids bilayer. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 5: 1163-1171.

Chandrasekhar, I., M. Kastenholz, R.D. Lins, C. Oostenbrink, L.D. Schuler, D.P. Tieleman, & W.F. van Gunsteren. 2003. A consistent potential energy parameter set for lipids: dipalmitoylphosphatidylcholine as a benchmark of the GROMOS96 45A3 force field. *Eur. Biophys. J.* 32: 67-77.

Cheatham, T.E., J.L. Miller, T. Fox, T.A. Darden, & P.A. Kollman. 1995. Molecular-dynamics simulations on solvated biomolecular systems - the Particle Mesh Ewald method leads to stable trajectories of DNA, RNA, and proteins *J. Am. Chem. Soc.* 117: 4193-4194.

Clegg, J.S. 1965. The origin of trehalose and its significance during formation of encysted dormant embryos of *Artemia salina*. *Comp. Biochem. Physiol.* 14: 135-143.

Clegg, J.S. 1997. Embryos of *Artemia franciscana* survive four years of continuous

- anoxia: the case for complete metabolic rate depression. *J. Exp. Biol.* 200: 467-475.
- Clegg, J.S. 2001. Cryptobiosis - a peculiar state of biological organization. *Comp. Biochem. Phys. B.* 128: 613-624.
- Clegg, J.S., & S.A. Jackson. 1992. Aerobic heat-shock activates trehalose synthesis in embryos of *Artemia franciscana*. *Febs. Lett.* 303: 45-47.
- Coleman, A.W, I. Nicolis, N. Keller, & J.P. Dalbiez. 1992. Aggregation of cyclodextrins - an explanation of the abnormal solubility of beta-cyclodextrin. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* 13: 139-143.
- Connors, K.A. 1997. The stability of cyclodextrin complexes in solution. *Chem. Rev.* 97: 1325-1357.
- Conrad, P.B., & J.J. de Pablo. 1999. Computer simulation of the cryoprotectant disaccharide alpha, alpha-trehalose in aqueous solution. *J. Phys. Chem. A.* 103: 4049-4055.
- Cornell, W.D., P. Cieplak, C.I. Bayly, I.R. Gould, K.M. Merz, D.M. Ferguson, D.C. Spellmeyer, T. Fox, J.W. Caldwell, & P.A. Kollman. 1995. A 2nd generation force-field for the simulation of proteins, nucleic-acids and organic-molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 117: 5179-5197.
- Cottone G., L. Cordone, & G. Ciccotti. 2001. Molecular dynamics simulation of carboxy-myoglobin embedded in a trehalose-water matrix. *Biophys. J.* 80: 931-938.
- Cottone, G., G. Ciccotti, & L. Cordone. 2002. Protein-trehalose-water structures in trehalose coated carboxy-myoglobin. *J. Chem. Phys.* 117: 9862-9866.
- Crowe, J.H., A.E. Oliver, & F. Tablin. 2002. Is there a single biochemical adaptation to anhydrobiosis? *Integr. Comp. Biol.* 42: 497-503.
- Crowe, J.H., F. Tablin, W.F. Wolkers, K. Gousset, N.M. Tsvetkova, & J. Ricker. 2003.

Stabilization of membranes in human platelets freeze-dried with trehalose. *Chem. Phys. Lipids.* 122: 41-52.

Crowe, J.H., F.A. Hoekstra, & L.M. Crowe. 1992. Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 579-599.

Crowe, J.H., J.F. Carpenter, & L.M. Crowe. 1998a. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60: 73-103.

Crowe, J.H., J.S. Clegg, & L.M. Crowe. 1998b. Anhydrobiosis: the water replacement hypothesis. *In* The properties of Water in Foods (ISO-POW 6) D.S. Reid, editor. Chapman and Hall, New York. 440-455.

Crowe, J.H., L.M. Crowe, & D. Chapman. 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science.* 223: 701-703.

Crowe, J.H., L.M. Crowe, A.E. Oliver, N. Tsvetkova, W. Wolkers, & F. Tablin. 2001. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology.* 43: 89-105.

Crowe, J.H., L.M. Crowe, J.F. Carpenter, & C.A. Wistrom. 1987. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.* 242: 1-10.

Crowe, J.H., L.M. Crowe, J.F. Carpenter, S. Prestrelski, F.A. Hoekstra, P. de Araújo, & A.D. Panek. 1997. Anhydrobiosis: cellular adaptation to extreme dehydration. *In* Handbook of Physiology, Vol. 2. W.H. Dantzler, editor. Oxford Univ. Press, Oxford. 1445-1477.

Crowe, L.M. 2002. Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis. *Comp. Biochem. Phys. A.* 131: 505-513.

Crowe, L.M., D.S. Reid, & J.H. Crowe. 1996. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys. J.* 71:2087-2093.

Damm, W., A. Frontera, J. Tirado-Rives, & W.L. Jorgensen. 1997. OPLS all-atom force field for carbohydrates. *J. Comput. Chem.* 18: 1955-1970.

Damore, T.G., R.G. Crumplen, & G.G. Stewart. 1991. The involvement of trehalose in yeast stress tolerance. *J. Ind. Microbiol.* 7: 191-195.

Darden, T., D. York, & L. Pedersen. 1993. Particle Mesh Ewald - an n.log(n) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* 98: 10089-10092.

Datta, S., B.K. Biswal, & M. Vijayan. 2001. The effect of stabilizing additives on the structure and hydration of proteins: a study involving tetragonal lysozyme. *Acta Crystallogr. D.* 57: 1614-1620.

Dodziuk H. 2002. Rigidity versus flexibility. A review of experimental and theoretical studies pertaining to the cyclodextrin nonrigidity. *J. Mol. Struct.* 614: 33-45.

Dodziuk, H., & K. Nowinski. 1994. Structure of cyclodextrins and their complexes .2. do cyclodextrins have a rigid truncated-cone structure? *J. Mol. Struct. (Theochem)* 110: 61-68.

Dodziuk, H., & O. Lukin. 2000. Dependence of the average energy between the 1 : 2 complexes of enantiomeric alpha-pinenes with alpha-cyclodextrin on the length of dynamic simulation. *Chem. Phys. Lett.* 327: 18-22.

Dodziuk, H., O. Lukin, & K.S. Nowinsky. 2000. Molecular mechanics calculations of molecular and chiral recognition by cyclodextrins. Is it reliable? The selective complexation of decalins by β -cyclodextrin *J. Molec. Struct.(Theochem)*. 503: 221-230.

Douliez, J.P., A. Leonard, & E.J. Dufourc. 1995. Restatement of order parameters in biomembranes - calculation of C-C bond order parameters from C-D quadrupolar splittings. *Biophys. J.* 68: 1727-1739.

Duchêne, D. 1987. Cyclodextrins and their Industrial Uses. Editions de Santé, Paris.

Duda, C.A., & E.S. Stevens. 1990. Trehalose conformation in aqueous-solution from optical-rotation. *J. Am. Chem. Soc.* 112: 7406-7407.

Dwek, R.A. 1996. Glycobiology: towards understanding the function of sugars. *Chem. Rev.* 96: 683-720.

Dwek, R.A., & T.D. Butters. 2002. Glycobiology. *Chem. Rev.*, special issue 102(2).

Egberts, E., & H.J.C. Berendsen. 1988. Molecular dynamics simulation of a smectic liquid crystal with atomic detail. *J. Chem. Phys.* 89: 3718-3732.

Egberts, E., S.J. Marrink, & H.J.C. Berendsen 1994. Molecular-dynamics simulation of a phospholipid membrane. *Eur. Biophys. J. Biophys.* 22: 423-436.

Ekdawi-Sever, N., J.J. de Pablo, E. Feick, & E. von Meerwall. 2003. Diffusion of sucrose and alpha,alpha-trehalose in aqueous solutions *J. Phys. Chem. A* 107: 936-943.

Elbein, A.D., Y.T. Pan, I. Pastuszak, & D. Carrol. 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology.* 13: 17R-27R.

Eleutherio, E.C.A., J.T. Silva, & A. Panek. 1993. Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *S. cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1156: 263-266.

Engelsen, S.B., & S. Perez. 2000. Unique similarity of the asymmetric trehalose solid-state hydration and the diluted aqueous-solution hydration. *J. Phys. Chem. B.* 104: 9301-9311.

Eroglu, A., M. Toner, & T.L. Toth. 2002. Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. *Fertil. Steril.* 77: 152-158.

Essmann, U., L. Perera, M.L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, & L.G. Pedersen. 1995. A Smooth Particle Mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* 103: 8577-8593.

Ewald, P. 1921. Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale. *Ann. Phys.* 64: 253-287.

Fanali, S. 2000. Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrins as chiral selectors. *J. Chromatogr. A.* 875: 89-122.

Feller, S.E. 2000. Molecular dynamics simulations of lipid bilayers. *Curr. Opin. Colloid. In.* 5: 217-223.

Feofilova, E.P. 2003. Deceleration of vital activity as a universal biochemical mechanism ensuring adaptation of microorganisms to stress factors: a review. *Appl. Biochem. Micro.* 39: 1-18.

Forrest, L.R., & M.S.P. Sansom. 2000. Membrane simulations: bigger and better? *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 174-181.

Freitas, L. C. G. 1993. Monte Carlo simulation of the binary liquid mixture water-methanol. *J. Mol. Struct. (Theochem)* 282: 151-158.

French, A.D., & J.W. Brady. 1990. Computer modeling of carbohydrate molecules. ACS Symposium Series 430, American Chemical Society, Washington, DC.

Frenkel, D., & S. Berend. 2001. Understanding Molecular Simulation. Academic Press, New York.

Friesner, R.A., & J.R. Gunn. 1996. Computational studies of protein folding. *Annu. Rev. Bioph. Biom.* 25: 315-342.

Frisch, M.J., G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, V.G. Zakrzewski, J.A. Montgomery, Jr., R.E. Stratmann, J.C. Burant, S. Dapprich, J.M. Millam, A.D. Daniels, K.N. Kudin, M.C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G.A. Petersson, P.Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J. Cioslowski, J.V. Ortiz, A.G. Baboul, B.B.

Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, J.L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E.S. Replogle, & J.A. Pople. 1998. Gaussian 98, Revision A.7., Gaussian, Inc., Pittsburgh PA.

Frömming, K. H., & J. Szejtli. 1994. Cyclodextrins in Pharmacy. Kluwer, Dordrecht.
Fukuse, T., T. Hirata, T. Nakamura, M. Ueda, M. Kawashima, S. Hitomi, & H. Wada. 1999. Role of saccharides on lung preservation. *Transplantation*. 68: 110-117.

Gao, S.X., L.S. Wang, Q.G. Huang, & S.K. Han. 1998. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons by beta-cyclodextrin and carboxymethyl-beta-cyclodextrin *Chemosphere*. 37: 1299-1305.

Gear, C.W. 1971. Numerical Initial Value Problems in Ordinary Differential Equations. Prentice-Hall Englewoodcliffs, NewYork.

Godinez, L.A., B.G. Schulze-Fiehn, S. Patel, C.M., Criss, J.D. Evanseck, & A.E. Kaifer. 1996. Observation and interpretation of anomalous inorganic anion binding with alpha- and beta-cyclodextrins in aqueous media. *Supramol. Chem.* 8: 17-22.

Grigera, R. 2000. Molecular Modeling of Carbohydrates. *J. Mol. Graphics Mod.*, special issue, 18(2).

Grosse, P.Y., F. Bressolle, & F. Pinguet. 1998. In vitro modulation of doxorubicin and docetaxel antitumoral activity by methyl-beta-cyclodextrin *Eur. J. Cancer* 34: 168-174.

Grosse, P.Y., F. Bressolle, P. Vago, J. Simony-Lafontaine, M. Radal, & F. Pinguet. 1998. Tumor cell membrane as a potential target for methyl-beta-cyclodextrin. *Anticancer Res.* 18: 379-384.

Guppy, M., & P. Withers. 1999. Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. *Biol. Rev.* 74: 1-40.

Harrison R.J., J.A., Nichols, T.P. Straatsma, M. Dupuis, E.J. Bylaska, G.I. Fann, T.L. Windus, E. Apra, J. Anchell, D. Bernholdt, P. Borowski. T. Clark, D. Clerc, H. Dachsel, B. de Jong, M. Deegan, K. Dylla, D. Elwood, H. Fruchtl, E. Glendenning, M. Gutowski, A. Hess, J. Jaffe, B. Johnson, J. Ju, R. Kendall, R. Kobayashi, R. Kutteh, Z. Lin, R. Littlefield, X. Long, B. Meng, J. Nieplocha, S. Niu, M. Rosing, G. Sandrone, M. Stave, H. Taylor, G. Thomas, J. van Lenthe, K. Wolinski, A. Wong, & Z. Zhang. 2000. NWChem, a computational chemistry package for parallel computers, version 4.0. Pacific Northwest National Laboratory, Richland, Washington 99352-0999, USA.

Hedges A.R. 1998. Industrial applications of cyclodextrins. *Chem. Rev.* 98: 2035-2044.

Hedges, A.R., W.J Shieh, & C.T. Sikorski, 1995. *In: Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*. Risch, S.J. & G.A. Reineccius, editors. ACS Symp. Ser. 590, 60. ACS, Washington, DC.

Hermann, D.W. 1986 *Computer Simulations Methods*. Springer-Verlag.

Hill, T.L. 1960. *An Introduction to Statistical Thermodynamics*. Addison-Wesley Publishing Company, New York.

Hockney, R. W. 1970. The potential calculation and some applications. *Methods Comput. Phys.* 9: 136-211.

Hockney, R.W., & J.W. Eastwood. 1981. *Computer Simulation Using Particles*. McGraw-Hill, New York.

Hoekstra, F.A., W.F. Wolkers, J. Buitink, E.A. Golovina, J.H. Crowe, & L.M. Crowe. 1997. Membrane stabilization in the dry state. *Comp. Biochem. Phys. A* 117: 335-341.

Hünenberger, P.H. 1999. Lattice-sum methods for computing electrostatic interactions in molecular simulations. *In Simulation and Theory of Electrostatic*

Interactions in Solution: Computational Chemistry, Biophysics, and Aqueous Solutions. L.R. Pratt, & G. Hummer, editors. American Institute of Physics, New York. 17-83.

Hünenberger, P.H., & J.A. McCammon. 1999a. Ewald artifacts in computer simulations of ionic solvation and ion-ion interaction: a continuum electrostatics study. *J. Chem. Phys.* 110: 1856-1872.

Hünenberger, P.H., & J.A. McCammon 1999b. Effect of artificial periodicity in simulations of biomolecules under Ewald boundary conditions: A continuum electrostatics study. *Biophys. Chem.* 78: 69-88.

Hurtley, S., R. Service, & P. Szuromi. 2001. Carbohydrates and Glycobiology. *Science*, special issue, 291(5512).

Irie, T., & K. Uekama. 1997. Pharmaceutical applications of cyclodextrins .3. Toxicological issues and safety evaluation *J. Pharm. Sci.* 86: 147-162.

Israelachvili, J. 1985. Intermolecular and Surface Forces. Academic Press.

Jorgensen, W.L., J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, & M.L. Klein. 1983. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water *J. Chem. Phys.* 79: 926-935.

Keilin, D. 1959. The problem of anabiosis or latent life: history and current concept. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* 150: 149-191.

Koch, E.M., & F.C. Koch. 1925. The presence of trehalose in yeast. *Science.* 61: 570-572.

Koehler, J.E.H., W. Saenger, & W.F. van Gunsteren. 1987a. Molecular dynamics simulation of crystalline β -cyclodextrin dodecahydrate at 293 K an 120K. *Eur. Biophys. J.* 15: 211-224.

Koehler, J.E.H., W. Saenger, & W.F. van Gunsteren. 1987b. A molecular dynamics simulation of crystalline α -cyclodextrin hexahydrate. *Eur. Biophys. J.* 15: 197-210.

Koehler, J.E.H., W. Saenger, & W.F. van Gunsteren. 1988a. Conformational differences between α -cyclodextrin in aqueous solution and in crystalline form. A molecular dynamics study. *J. Mol. Biol.* 203: 241-250.

Koehler, J.E.H., W. Saenger, & W.F. van Gunsteren. 1988b. On the occurrence of three-center hydrogen bonds in cyclodextrins in crystalline form and in aqueous solution: comparison of neutron diffraction and molecules dynamics results. *J. Biomol. Struct. Dynam.* 6: 181-198.

Koehler, J.E.H., W. Saenger, & W.F. van Gunsteren. 1988c. The flip-flop hydrogen bonding phenomenon. Molecular dynamics simulation of crystalline β -cyclodextrin. *Eur. Biophys. J.* 16: 153-168.

Köhler, J.E.H., M. Hohla, M. Richters, & W.A. Köning. 1992. Cyclodextrin derivatives as chiral selectors - investigation of the interaction with (R,S)-Methyl-2-Chloropropionate by enantioselective gas-chromatography, NMR-spectroscopy, and molecular-dynamics simulation. *Angew. Chem. Int. Edit.* 31: 319-320.

Köhler, J.E.H., M. Hohla, M. Richters, & W.A. Köning. 1994. A molecular-dynamics simulation of the complex-formation between Methyl(R)/(S)-2-Chloropropionate and Heptakis(3-O-Acetyl-2,6-di-O-Pentyl)-Beta-Cyclodextrin. *Chem. Ber.* 127: 119-126.

Kony, D., W. Damm, S. Stoll, & W.F. van Gunsteren, 2002. An improved OPLS-AA force field for carbohydrates. *J. Comp. Chem.* 23: 1416-1429.

Koster, K.L., M.S. Webb, & G. Bryant. 1994. Interactions between soluble sugars and POPC (1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine) during dehydration - vitrification of sugars alters the phase-behavior of the phospholipid. *Biochim. Biophys. Acta.* 1193: 143-150.

Koster, K.L., Y.P. Lei, M. Anderson, S. Martin, & G. Bryant. 2000. Effects of vitrified

and nonvitrified sugars on phosphatidylcholine fluid-to-gel phase transitions. *Biophys. J.* 78: 1932-1946.

Kozár, T., & C.A. Venanzi. 1997. Reconsidering the conformational flexibility of β -cyclodextrin *J. Mol. Struct. (Theochem)* 395: 451-468.

Lafontaine, I., & R. Lavery. 1999. Collective variable modelling of nucleic acids. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 170-176.

Laine, R.A. 1994. A calculation of all possible oligosaccharides isomers both branch and linear yields 1.05×10^{12} structures for a reducing hexasaccharide: The isomer barrier to development of single-methods saccharide sequencing or synthesis systems. *Glycobiology.* 4: 759-767.

Lambruschini, C., N. Relini, A. Ridi, L. Cordone, & A. Gliozzi. 2000. Trehalose interacts with phospholipid polar heads in Langmuir monolayers. *Langmuir.* 16: 5467-5470.

Landau, D.P., & K. Binder. 2000. A Guide to Monte Carlo Simulations in Statistical Physics. Cambridge University Press, Cambridge.

Lawtrakul, L., H., Viernstein, & P. Wolschann. 2003. Molecular dynamics simulations of beta-cyclodextrin in aqueous solution. *Int. J. Pharm.* 256: 33-41.

Leach, A.R. 1996. Molecular Modelling. Principles and Applications. Addison Wesley Longman Limited, Essex.

Lee C.W.B., J.S. Waugh, & R.G. Griffin. 1986. Solid-state NMR-study of trehalose/1,2-dipalmitoyl-sn-phosphatidylcholine interactions. *Biochemistry-US* 25: 3737-3742.

Lehmann, J. 1998. Carbohydrates: Structure and Biology. Georg. Thieme Verlag, Stuttgart.

Lehn, J.M. 1995. *Supramolecular Chemistry*. VCH, Weinheim.

Levine, I.N. 1991. *Quantum Chemistry*. Prentice-Hall Inc., New York.

Li, S., & W.C. Purdy. 1992. Cyclodextrins and their applications in analytical-chemistry. *Chem. Rev.* 92: 1457-1470.

Li, X.S., L. Liu, T.W. Um, & Q.X. Guo. 2000. A systematic quantum chemistry study on cyclodextrins. *Monatsh. Chem.* 131: 849-855.

Lichtenthaler, F.W., & S. Immel. 1996. Molecular modelling of saccharides .9. On the hydrophobic characteristics of cyclodextrins: computer-aided visualization of molecular lipophilicity patterns. *Liebigs Ann.* 1: 27-37.

Lichtenthaler, F.W., & S. Immel. 1994. Cyclodextrins, cyclomannins, and cyclogalactins with five and six (1→4)-linked sugar units: A comparative assessment of their conformations and hydrophobicity potential profiles. *Tetrahedron Asymm.* 5: 2045-2060.

Lins, R.D., & P.H. Hünenberger. 2004. A new GROMOS parameter set for glucose-based carbohydrates. *Em redação*.

Lipkowitz, K.B. 1991. Symmetry-breaking in cyclodextrins - a molecular mechanics investigation. *J. Org. Chem.* 56: 6357-6367.

Lipkowitz, K.B. 1998. Applications of computational chemistry to the study of cyclodextrins *Chem. Rev.* 98: 1829-1873.

Lipkowitz, K.B. 2001. Atomistic modeling of enantioselection in chromatography. *J. Chromatogr. A.* 906: 417-442.

Lipkowitz, K.B., G. Pearl, R. Coner, & M.A. Peterson. 1997. Explanation of where and how enantioselective binding takes place on permethylated beta-cyclodextrin, a chiral stationary phase used in gas chromatography. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 600-610.

Lipkowitz, K.B., R. Coner, M.A. Peterson, A. Morreale, & J. Shackelford. 1998. The principle of maximum chiral discrimination: Chiral recognition in permethyl-beta-cyclodextrin. *J. Org. Chem.* 63: 732-745.

Lipkowitz, K.B., R. Coner, M.A. Peterson, & A. Morreale. 1997. Enantioselective binding in gas chromatography: A computational study of chiral selection by permethyl-beta-cyclodextrin. *J. Phys. Org. Chem.* 10: 311-322.

Liu, L., X.S. Li, Q.X., Guo, & Y.C. Liu. 1999. Hartree-Fock and density functional theory studies on the molecular recognition of the cyclodextrin. *Chinese Chem. Lett.* 10: 1053-1056.

Liu, L., X.S. Li, T.W. Mu, Q.X. Guo, & Y.C. Liu. 2000. Interplay between molecular recognition and redox properties: A theoretical study of the inclusion complexation of beta-cyclodextrin with phenothiazine and its radical cation. *J. Incl. Phenom. Macro.* 38: 199-206.

Liu, Q., R.K. Schmidt, B. Teo, P.A. Karplus, & J.W. Brady. 1997. Molecular dynamics studies of the hydration of alpha, alpha-trehalose. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 7851-7862.

Loftsson, T., & M.E. Brewster. 1996. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.* 85: 1017-1025.

Luzardo, M.D., F. Amalfa, A.M. Nunez, S. Diaz, A.C.B. de Lopez, & E.A. Disalvo. 2000. Effect of trehalose and sucrose on the hydration and dipole potential of lipid bilayers. *Biophys. J.* 78: 2452-2458.

Madin, K.A.C., & J. H. Crowe. 1975. Anhydrobiosis in nematodes: carbohydrate and lipid metabolism during drying. *J. Exp. Zool.* 193: 335-342.

Manunza, B., S. Deiana, M. Pintore, & C. Gessa. 1997. Structure and internal motion of solvated beta-cyclodextrine: a molecular dynamics study *J. Mol. Struct. (Theochem)* 419: 133-137.

Mark, A.E., S.P. van Helden, P.E. Smith, L.H.M. Janssen, & W.F. van Gunsteren. 1994. Convergence properties of free-energy calculations - alpha-cyclodextrin complexes as a case-study. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 6293-6302.

Matsuo, T. 2001. Trehalose protects corneal epithelial cells from death by drying. *Brit. J. Ophthalmol.* 85: 610-612.

Matsuo, T., Y. Tsuchida, & N. Morimoto. 2002. Trehalose eye drops in the treatment of dry eye syndrome. *Ophthalmology.* 109: 2024-2029.

Mcquarrie, D. A. 1976. *Statistical Mechanics.* Harper and Row, New York.

Mu, T.W., L. Liu, X.S. Li, & Q.X. Guo. 2001. A theoretical study on the inclusion complexation of cyclodextrins with radical cations and anions. *J. Phys. Org. Chem.* 14: 559-565.

Nagase, H., H. Ueda, & M. Nakagaki. 1999. Relationship between hydrophobic index of saccharide and gel-liquid crystal transition temperature of the L-alpha-dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC)/saccharide/water system. *Chem. Pharm. Bull.* 47: 607-610.

Nagle, J.F. 1993. Area/lipid of bilayers from NMR. *Biophys. J.* 64: 1476-1481.

Nagle, J.F., & S. Tristram-Nagle. 2000. Structure of lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.* 1469: 159-195.

Nakagaki, M., H. Nagase, & H. Ueda. 1992. Stabilization of the lamellar structure of phosphatidylcholine by complex-formation with trehalose. *J. Membrane Sci.* 73: 173-180.

Norcia, M.A. 2000. Compositions and methods for wound management. *Off. Gaz. U.S. Patent Trademark Office* 1232: 424-448.

Oliver, A.E., O. Leprince, W.F. Wolkers, D.K. Hinch, A.G. Heyer, & J.H. Crowe.

2001. Non-disaccharide-based mechanisms of protection during drying. *Cryobiology*. 43: 151-167.

Orozco, M., A. Perez, A. Noy, & F.J. Luque. 2003. Theoretical methods for the simulation of nucleic acids. *Chem. Soc. Rev.* 32: 350-364.

Pastor, R., & R. Venable. 1994. *In* Computer Simulations of Biomolecular Systems, Vol. 2. W.F van Gunsteren, P.K. Weiner, & A. J. Wilkinson, editors. ESCOM Science, Leiden. 443-464.

Perez, S., & M.L. Kouwijzer. 1999. Shapes and interactions of polysaccharide chains. *In* Carbohydrates: Structures, Syntheses and Dynamics. P. Finch, editor. Kluwer Academic Press, 258-293.

Pérez, S., A. Imbert, S.B. Engelsen, J. Gruza, K. Mazeau, J. Jimenez-Barbero, A. Poveda, J.-F. Espinosa, B.P. van Eyck, G. Johnson, A.D. French, M.L.C.E. Kouwijzer, P.D.J. Grootenuis, A. Bernardi, L. Raimondi, H. Senderowitz, V. Durier, G. Vergoten, & K. Rasmussen. 1998. A comparison and chemometric analysis of several molecular mechanics force fields and parameter sets applied to carbohydrates. *Carbohydr. Res.* 314: 141-155.

Pérez, S., M. Kouwijzer, K. Mazeau, & S.B. Engelsen. 1996. Modeling polysaccharides: present status and challenges. *J. Mol. Graphics.* 14: 307-321.

Ponder, J.W. 2001. TINKER: Software Tools for Molecular Design. Versão 3.8.

Pozuelo, J., F. Mendicuti, & W.L. Mattice. 1997. Inclusion complexes of chain molecules with cycloamyloses .2. Molecular dynamics simulations of polyrotaxanes formed by poly(ethylene glycol) and alpha-cyclodextrins. *Macromolecules* 30: 3685-3690.

Pozuelo, J., J.M. Madrid, F. Mendicuti, & W.L. Mattice. 1996. Inclusion complexes of chain molecules with cycloamyloses .1. Conformational analysis of the isolated cycloamyloses using molecular dynamics simulations *Comput. Theor. Polym. Sci.* 6:

125-134.

Prabhakaran, M., & S.C. Harvey. 1987. Asymmetric oscillations in cyclodextrin - a molecular dynamics study. *Biopolymers*. 26: 1087-1096.

Prestrelski, S.J., N. Tedeschi, T. Arakawa, & J.F. Carpenter. 1993. Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophys. J.* 65: 661-671.

Rapaport, D.C. 1995. *The Art of Molecular Dynamics Simulation*. Cambridge University Press, Cambridge.

Rappé, A.K., & C.J. Casewit. 1997. *Molecular Mechanics Across Chemistry*. University Science Books, Sausalito.

Reinhardt, R., M., Richter, & P.P. Mager. 1996. Investigation of the conformational behaviour of permethylated cyclodextrins by molecular modeling. *Carbohydr. Res.* 291: 1-9.

Richards, A.B., S. Krakowka, L.B. Dexter, H. Schmid, A.P.M. Wolterbeek, D.H. Waalkens-Berendsen, A. Shigoyuki, & M. Kurimoto. 2002. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food Chem. Toxicol.* 40: 871-898.

Ricker, J.V., N.M. Tsvetkova, W.F. Wolkers, C. Leidy, F. Tablin, M. Longo, & J.H. Crowe. 2003. Trehalose maintains phase separation in an air-dried binary lipid mixture. *Biophys. J.* 84: 3045-3051.

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

Rubinstein, R.Y. 1981. *Simulation and the Monte Carlo Method*. John Wiley & Sons.

Rudolph, B.R., I. Chandrasekhar, B.P. Gaber, & M. Nagumo. 1990. Molecular modeling of saccharide-lipid Interactions. *Chem. Phys. Lipids*. 53: 243-261.

Ruebner, A., D. Kirsch, S. Andrees, W. Decker, B. Roeder, B. Spengler, R. Kaufmann, & J.G. Moser. 1997. Dimeric cyclodextrin carriers with high binding affinity to porphyrinoid photosensitizers. *J. Inclus. Phenom. Mol. Recogn.* 27: 69-84.

Ruebner, A., J.G. Moser, D. Kirsch, B. Spengler, S. Andrees, & S. Roehrs. 1996. Synthesis of beta-cyclodextrin dimers as carrier systems for photodynamic therapy of cancer *J. Inclusion Phenom. Mol. Recogn.* 25: 35-38.

Ryckaert, J.P., G. Ciccotti, & H.J.C. Berendsen. 1977. Numerical integration of cartesian equations of motion of a system with constraints molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comp. Phys.* 23: 327-341.

Sackmann, E. 1995. Physical basis of self-organization and function of membranes: physics of vesicles. *In Handbook of Biological Physics, Vol. 1A, Structure and Dynamics of membranes.* R. Lipowsky & E. Sackman, editors. Elsevier, Amsterdam. 213-304.

Saenger, W. 1980. Cyclodextrin inclusion-compounds in research and industry. *Angew. Chem. Int. Edit.* 19: 344-362.

Saenger, W., & T. Steiner. 1998. Cyclodextrin inclusion complexes: host-guest interactions and hydrogen-bonding networks. *Acta Crystallogr. A.* 54: 798-805.

Saenger, W., J. Jacob, K. Gessler, T. Steiner, D. Hoffmann, H. Sanbe, K. Koizumi, S.M. Smith, & T. Takaha. 1998. Structures of the common cyclodextrins and their larger analogues-beyond the doughnut. *Chem. Rev.* 98: 1787-1802.

Saraswathi, N.T., R. Sankaranarayanan, & M. Vijayan. 2002. Effect of stabilizing additives on the structure and hydration of proteins: a study involving monoclinic lysozyme. *Acta Crystallogr. D.* 58: 1162-1167.

Sastry, G.M. & N. Agmon. 1997. Trehalose prevents myoglobin collapse and preserves its internal mobility. *Biochemistry.* 36: 7097-7108.

Schneiderman, E., & A.M. Stalcup. 2000. Cyclodextrins: a versatile tool in separation science. *J. Chromatogr. B.* 745: 83-102.

Schreiber H., & O. Steinhauser. 1992. Molecular-dynamics studies of solvated polypeptides - why the cutoff scheme does not work. *Chem. Phys.* 168: 75-89.

Schuler, L.D., X. Daura, & W.F. van Gunsteren. 2001. An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase. *J. Comput. Chem.* 22: 1205-1218.

Scott, P. 2000. Resurrection plants and the secrets of the leaf. *Ann. Bot.* 85: 159-166.

Singer, M.A., & S. Lindquist. 1998a. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the yin and yang of trehalose. *Trends Biotech.* 16: 460-468.

Singer, M.A., & S. Lindquist. 1998b. Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Molecular Cell.* 1: 639-648.

Sola-Penna, M., & J.R. Meyer-Fernandes. 1998. Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars? *Arch. Biochem. Biophys.* 360:10-14.

Somme, L. 1996. Anhydrobiosis and cold tolerance in tardigrades. *Eur. J. Entomol.* 93: 349-357.

Starikov, E.B., K. Bräsicke, E.W. Knapp, & W. Saenger. 2001. Negative solubility coefficient of methylated cyclodextrins in water: a theoretical study. *Chem. Phys. Lett.* 336: 504-510.

Starikov, E.B., W. Saenger, & T. Steiner. 1998. Quantum chemical calculations on the weak polar host-guest interactions in crystalline cyclomaltoheptaose (beta-cyclodextrin)-but-2-yne-1,4-diol heptahydrate. *Carbohydr. Res.* 307: 343-346.

Stella, V.J., & R.A. Rajewski. 1997. Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery *Pharm. Res.* 14: 556-567.

Sum, A.K., R. Faller, & J.J. de Pablo. 2003. Molecular simulation study of phospholipid bilayers and insights of the interactions with disaccharides. *Biophys. J.* 85: 2830-2844.

Sun, M., X.H. Liu, L.S. Yan, G. Luo, & Y.F. Zhao. 2003. Molecular recognition between 4aS/R-galanthamine diastereoisomers and alpha-cyclodextrin. *J. Mol. Model* 9: 419-422.

Sun, W.Q., & A.C. Leopold. 1994. Glassy state and seed storage stability - A viability equation analysis. *Ann. Bot. London.* 74: 601-604.

Sun, W.Q., & A.C. Leopold. 1997. Cytoplasmic vitrification and survival of anhydrobiotic organisms. *Comp. Biochem. Phys. A.* 117: 327-333.

Sun, W.Q., A.C. Leopold, L.M. Crowe, & J.H. Crowe. 1996. Stability of dry liposomes in sugar glasses. *Biophys. J.* 70: 1769-1776.

Sun, W.Q., P. Davidson, & H.S.O. Chan. 1998. Protein stability in the amorphous carbohydrate matrix: relevance to anhydrobiosis. *BBA-Gen. Subjects.* 1425: 245-254.

Sun, W.Q., T.C. Irving, & A.C. Leopold. 1994. The role of sugar, vitrification and membrane phase-transition in seed desiccation tolerance. *Physiol. Plantarum.* 90: 621-628.

Sussich, F., C. Skopec, J. Brady, & A. Cesaro. 2001. Reversible dehydration of trehalose and anhydrobiosis: from solution state to an exotic crystal? *Carbohydr. Res.* 334: 165-176.

Szejtli, J. & T. Osa. 1996. *Comprehensive Supramolecular Chemistry. Vol.3 (Cyclodextrins).* Pergamon, Oxford.

Szejtli, J. 1982. Cyclodextrins and their Inclusion Complexes. Akadémiai Kiadó, Budapest.

Szejtli, J. 1988. Cyclodextrin Technology. Kluwer Academic, Dordrecht.

Szejtli, J. 1998. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.* 98: 1743-1753.

Takahashi, H., H. Ohmae, & I. Hatta. 1997. Trehalose-induced destabilization of interdigitated gel phase in dihexadecylphosphatidylcholine. *Biophys. J.* 73: 3030-3038.

Tieleman, D.P., S.J. Marrink, & H.J.C. Berendsen. 1997. A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems. *Biochim. Biophys. Acta.* 1331: 235-270.

Timasheff, S.N. 1993. The control of protein stability and association by weak-interactions with water - how do solvents affect these processes. *Annu. Rev. Biophys. Bio.* 22: 67-97.

Timasheff, S.N. 2002. Protein hydration, thermodynamic binding, and preferential hydration. *Biochemistry-US.* 41: 13473-13482.

Tironi, I.G., R. Sperb, P.E. Smith, & W.F. van Gunsteren. 1995. A generalized reaction field method for molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.* 102: 5451-5459.

Tsvetkova, N.M., B.L. Phillips, L.M. Crowe, J.H. Crowe, & S.H. Risbud. 1998. Effect of sugars on headgroup mobility in freeze-dried dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: Solid-state P-31 NMR and FTIR studies. *Biophys. J.* 75: 2947-2955.

Uekama, K., F. Hirayama, & T. Irie. 1998. Cyclodextrin drug carrier systems *Chem. Rev.* 98: 2045-2076.

Utsuki, T., H. Brem, J. Pitha, T. Loftsson, T. Kristmundsdottir, B.M. Tyler, & A. Olivi. 1996. Potentiation of anticancer effects of microencapsulated carboplatin by hydroxypropyl alpha-cyclodextrin. *J. Control. Rel.* 40: 251-260.

van Gunsteren, W.F. 1994. Molecular dynamics and stochastic dynamics simulation: a primer. *In* Computer Simulations of Biomolecular Systems, Vol. 2. W.F van Gunsteren, P.K. Weiner, & A. J. Wilkinson, editors. ESCOM Science, Leiden. 3-36.

van Gunsteren, W.F., & H.J.C. Berendsen. 1990. Computer simulation of molecular dynamics: methodology, applications and perspectives in chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29: 992-1023.

van Gunsteren, W.F., & H.J.C. Berendsen. 1977. Algorithms for macromolecular dynamics and constraint dynamics. *Mol. Phys.* 34: 1311-1327.

van Gunsteren, W.F., P.K. Weiner, & A. J. Wilkinson. 1994. Computer Simulations of Biomolecular Systems, Vol. 2. ESCOM Science Publishers, Leiden.

van Gunsteren, W.F., S.R. Billeter, A.A. Eising, P.H. Hünenberger, P. Krüger, A.E. Mark, W.R.P. Scott, & I.G. Tironi. 1996. Biomolecular Simulation: the GROMOS96 manual and user guide. Hochschulverlag an der ETH Zürich/Biomos, Zürich/Groningen.

van Helden, S.P., B.P. van Eijck, & L.H.M. Janssen. 1992. The conformational behavior of complexes of alpha-cyclodextrin with p-chlorophenol and p-hydroxybenzoic acid in water as studied by molecular-dynamics simulations *J. Biomol. Struct. Dynam.* 9: 1269-1283.

Vaney, M.C., S. Maignan, M. RiesKautt, & A. Ducruix. 1996. High-resolution structure (1.33 Å) of a HEW lysozyme tetragonal crystal grown in the apcf apparatus. Data and structural comparison with a crystal grown under microgravity from SpaceHab-01 mission. *Acta Crystallogr. D.* 52: 505-517.

Varki, A., R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, & J. Marth. 1999. Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY.

Verlet, L. 1967. Computer experiments on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Phys. Rev.* 159: 98-103.

Walser, R., P.H. Hünenberger, & W.F. van Gunsteren. 2001. Comparison of different schemes to Treat long-range electrostatic interactions in molecular dynamics simulations of a protein crystal. *Proteins.* 44: 509-519.

Wang, W., O. Donini, C.M. Reyes, & P.A. Kollman. 2001. Biomolecular simulations: recent developments in force fields, simulations of enzyme catalysis, protein-ligand, protein-protein, and protein-nucleic acid noncovalent interactions. *Annu. Rev. Bioph. Biom.* 30: 211-243.

Weber, W., P.H. Hünenberger, & J.A. McCammon. 2000. Molecular dynamics simulations of a polyalanine octapeptide under Ewald boundary conditions: influence of artificial periodicity on peptide conformation. *J. Phys. Chem. B.* 104: 3668-3675.

Westh, P., & H. Ramlov. 1991. Trehalose accumulation in the tardigrade adorybiotus-coronifer during anhydrobiosis. *J. Exp. Zool.* 258: 303-311.

Williams, R.J., & A.C. Leopold. 1989. The glassy state in corn embryos. *Plant. Physiol.* 89: 977-981.

Wingler, A. 2002. The function of trehalose biosynthesis in plants. *Phytochemistry.* 60: 437-440.

Wolfe, J., & G. Bryant. 1999. Freezing, drying and or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology.* 39:103-129.

Woods, R.J. 1995. 3-dimensional structures of oligosaccharides. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5: 591-598.

Woods, R.J. 1996. Computational carbohydrate chemistry: what theoretical methods can tell us. *Glycoconj. J.* 15: 209-216.

Woods, R.J., & R. Chappelle. 2000. Restrained electrostatic potential atomic partial charges for condensed-phase simulations of carbohydrates. *J. Mol. Struct. Theochem.* 527: 149-156.

Woods, R.J., A.R., Dwek, & C.J. Edge. 1995. Molecular mechanical and molecular dynamical simulations of glycoproteins and oligosaccharides. 1. GLYCAM_93 parameter development. *J. Phys. Chem.* 99: 3832-3846.

Wormald, M.R., A.J. Petrescu, Y-L Pao, A. Glithero, T. Elliott, & R.A. Dwek. 2002. Conformational studies of oligosaccharides and glycopeptides: complementarity of NMR, X-ray crystallography, and molecular modelling. *Chem. Rev.* 102: 371-386.

Wyatt, G. R., & G. F. Kalf. 1957. The chemistry of isect hemolymph. 2. Trehalose and other carbohydrates. *J. Gen. Physiol.* 40: 833-847.

Xie, G.F., & S.N. Timasheff. 1997. The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose. *Biophys. Chem.* 64: 25-43.

Zabel, V., W. Saenger, & S.A. Mason. 1986. A neutron diffraction study of the hydrogen bonding in β -cyclodextrin undecahydrate at 120K: from dynamic flip-flops to static homodromic chains: *J. Am. Chem. Soc.* 108: 3664-3673.

Zhang, J. & P.L. Steponkus. 1996. Proposed mechanism for depression of the liquid-crystalline-to-gel phase transition temperature of phospholipids in dehydrated sugar-phospholipid mixtures. *Cryobiology.* 33: 625-626.