

UFRRJ

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE

**Abordagem teórica das interações dissacarídeo-protótipo de
membrana fosfolipídica**

Cynthia Santos Soares

2022



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

**ABORDAGEM TEÓRICA DAS INTERAÇÕES DISSACARÍDEO-
PROTÓTIPO DE MEMBRANA FOSFOLIPÍDICA**

CINTHIA SANTOS SOARES

Sob a orientação da Professora

CLARISSA OLIVEIRA DA SILVA

e

Co-orientação do Professor

GLAUCO FAVILLA BAUERFELDT

Tese submetida como requisito parcial para
obtenção do grau de **Doutora em Química**, no
curso de Pós-Graduação em Química, Área de
Concentração em Química.

Seropédica, RJ

Julho de 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S676a Santos Soares, Cinthia, 1984-
Abordagem teórica das interações dissacarídeo
protótipo de membrana fosfolipídica / Cinthia Santos
Soares. - Seropédica, 2022.
132 f.

Orientadora: Clarissa Oliveira da Silva.
Coorientador: Glauco Favilla Bauerfeldt.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Pós-Graduação em Química, 2022.

1. Interação dissacarídeo-membrana fosfolipídica. I.
Oliveira da Silva, Clarissa, 1970-, orient. II.
Favilla Bauerfeldt, Glauco, 1974-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Pós
Graduação em Química. IV. Título.

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

CINTHIA SANTOS SOARES

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Química,
no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração em Química.

TESE APROVADA EM 06/07/2022

Clarissa Oliveira da Silva
(Dra.) UFRRJ (Orientadora) Presidente da Banca

Cristiano Jorge Riger
(Dr.) UFRRJ – Titular interno

Márcio Soares Pereira
(Dr.) UFRRJ – Titular interno

Camila Silva de Magalhães
(Dra.) UFRJ – Titular externo

Leonardo Baptista
(Dr.) UERJ – Titular externo



Emitido em 07/07/2022

DELIBERAÇÃO Nº 309/2022 - DQF (11.39.00.25)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 07/07/2022 13:21)

CLARISSA OLIVEIRA DA SILVA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQF (11.39.00.25)
Matrícula: 1354432

(Assinado digitalmente em 11/07/2022 08:53)

CRISTIANO JORGE RIGER
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DBQ (11.39.00.24)
Matrícula: 1844240

(Assinado digitalmente em 07/07/2022 14:05)

MARCIO SOARES PEREIRA
CHEFE DE DEPARTAMENTO - TITULAR
DQF (11.39.00.25)
Matrícula: 1808284

(Assinado digitalmente em 08/07/2022 09:43)

LEONARDO BAPTISTA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 053.120.556-89

(Assinado digitalmente em 11/07/2022 09:24)

CAMILA SILVA DE MAGALHAES
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 077.313.237-65

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número:
309, ano: **2022**, tipo: **DELIBERAÇÃO**, data de emissão: **07/07/2022** e o código de verificação: **79710e3d6b**

DEDICATÓRIA

*Dedico essa tese ao meu Amado Jesus,
à Santíssima Virgem Maria, à São José,
à São Miguel Arcanjo, aos meus pais,
Inez e Adel, e ao meu esposo Leo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Ti, meu Amado, pelo dom da vida e pelas oportunidades que me concedeste até aqui. Senhor, “sois meu refúgio e minha cidadela, meu Deus, em quem eu confio.” (Sl 90/91) Obrigada porque Tu me fizeste “um trenó triturador, novinho, eriçado de pontas...” (Is 41:15a). Obrigada, meu Senhor, por teres me concedido a graça de nascer de pais tão maravilhosos e íntegros, que me ensinaram a fazer tua vontade e cumprir minha vocação. Obrigada, em especial, pela minha mãe, que foi porto seguro aqui nessa Terra durante todos os anos que Tu quiseste que vivêssemos juntos: o Senhor, ela e eu. Agradeço também, meu Deus, pelo meu melhor amigo e companheiro, meu amado esposo Leo, que, com tamanha paciência, foi apoio durante todos esses anos de estudo. Obrigada por ter preparado para mim um companheiro adequado e que me ajuda a trilhar um caminho de conversão, rumo ao Céu. Agradeço pelos irmãos do Grupo de Oração Resgatando Vidas para Cristo e do Exército de São Miguel (Instituto Hessed), que foram instrumentos do teu amor e misericórdia, particularmente nesses últimos tempos nos quais Tu me chamas a dar um autêntico testemunho de fé e esperança. Agradeço, meu Deus, pela amiga e professora Clarissa, escolhida por Ti para despertar em mim o interesse pela Química Computacional, área da Química que julgo ter grande “semelhança” com o Senhor dada a profundidade e beleza, e me ensinar que é preciso concluir, de maneira objetiva, quando é possível concluir. Obrigada, Senhor, pelo amigo e professor Glauco, meu querido co-orientador. Gratidão por ter posto em meu caminho esse que tem o dom de, com seu testemunho, desacomodar e fazer voltar a queimar a “chama que ainda fumeja”... (Mt 12:20) Louvado sejas Tu também, meu Amado, pelos amigos Aline e Wellington, Edite, Jaime, Felipe, Renato Jonas e Renato Vieira, que foram instrumentos teus para que eu não desistisse dado o prolongado tempo para conclusão desse trabalho. Por fim, agradeço a Ti, Mãe Santíssima, Nossa Senhora do Rosário de Pompeia, a Vós, meu glorioso pai São José, e a Vós, São Miguel Arcanjo, pela poderosa intercessão e constante auxílio em tempos de tão grande batalha. Quem como Deus? **Ninguém é como Deus!**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

SOARES, Cinthia Santos. **Abordagem teórica das interações dissacarídeo-protótipo de membrana fosfolipídica**. 2022. 132p. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

A presente tese teve como objetivo principal estudar as interações entre uma molécula de dissacarídeo e um protótipo de membrana fosfolipídica, formado por um sistema dimérico composto por duas moléculas de fosfolipídio. Tal estudo foi feito de maneira teórica, utilizando métodos quânticos para a modelagem dos sistemas moleculares de interesse: um método baseado na Teoria do Funcional da Densidade (B97-D/6-31G(d,p)) e um método semi-empírico (PM6). Os dissacarídeos considerados foram trealose, maltose e celobiose. O fosfolipídio considerado foi dioctanoil-fosfatidilcolina. O estudo de tais interações envolveu a construção do protótipo de membrana fosfolipídica e a criação de um protocolo para a aproximação dos dissacarídeos ao protótipo e se deu por meio do cálculo da energia de interação quando na formação dos sistemas interagentes (dissacarídeo-protótipo de membrana fosfolipídica). Com base em critérios geométricos, foram identificados dois tipos de interações entre todos os dissacarídeos e o protótipo de membrana fosfolipídica: interações com grupos fosfato e com grupos trimetil-amônio. Foram obtidos os espectros de absorção no infravermelho para o protótipo de membrana fosfolipídica isolado e para todos os sistemas interagentes – quatro para a trealose, três para a maltose e dois para a celobiose, a fim de comparar o comportamento do sinal correspondente ao estiramento assimétrico do grupo fosfato para agregados fosfolipídicos secos e agregados fosfolipídicos na presença de diferentes carboidratos, indicado na literatura como diferentemente afetado pela presença de diferentes carboidratos. Utilizando uma equação que relaciona o valor da constante de acoplamento de spin heteronuclear à três ligações ${}^3J_{C1,H1'}$ ao valor do ângulo diedro definido pela sequência de átomos C1–O–C1'–H1', ao longo da ligação glicosídica da trealose, foram calculados os respectivos valores de ${}^3J_{C1,H1'}$ para todos os quatro sistemas interagentes obtidos. A partir do cálculo de população de Boltzmann para os sistemas interagentes, foi obtido um valor médio para a constante de acoplamento, que foi comparado ao resultado experimental disponível na literatura. Os valores de energia de interação dissacarídeo-

protótipo de membrana fosfolipídica não mostraram concordância com o comportamento do sinal correspondente ao estiramento assimétrico do grupo fosfato, isso considerando os sistemas interagentes de mais baixa energia, sem correção de ponto zero. Tal resultado foi compreendido como sendo um forte indício de que as interações com grupos trimetil-amônio também precisam ser consideradas nessa avaliação. Já o valor médio obtido para a constante de acoplamento de spin heteronuclear, comparou-se muito bem ao valor experimental disponível na literatura, sendo um indicativo de que os valores dos ângulos glicosídicos da trealose presentes nos sistemas interagentes obtidos teoricamente comparam-se àqueles assumidos pelo dissacarídeo em sistemas interagentes reais, de forma que o método PM6, utilizado para a modelagem dos sistemas interagentes, pode ser apontado como um método computacional capaz de descrever adequadamente os efeitos estabilizantes da ligação glicosídica da trealose nesse tipo de sistema.

Palavras-chave: Conformação de fosfolipídios. Membrana fosfolipídica. Interação dissacarídeo-membrana.

ABSTRACT

SOARES, Cinthia Santos. **Theoretical approach of disaccharide-phospholipid membrane interactions**. 2022. 132p. Thesis (Philosophy Doctor in Chemistry). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

The main objective of this thesis was to study the interactions between a disaccharide molecule and a phospholipid membrane prototype, formed by a dimeric system composed of two phospholipid molecules. This study was carried out theoretically, using quantum methods to model the molecular systems of interest: a method based on the Density Functional Theory (B97-D/6-31G(d,p)) and a semi-empirical method (PM6). The disaccharides considered were trehalose, maltose and cellobiose. The phospholipid considered was dioctanoyl-phosphatidylcholine. The study of such interactions involved the construction of the phospholipid membrane prototype and the creation of a protocol for the approximation of the disaccharides to the prototype. Based on geometric criteria, two types of interactions were identified between all disaccharides and the phospholipid membrane prototype: interactions with phosphate groups and with trimethyl-ammonium groups. Infrared absorption spectra were obtained for the isolated phospholipid membrane prototype and for all interacting systems - four for trehalose, three for maltose and two for cellobiose, in order to compare the behavior of the signal corresponding to the asymmetric stretching of the phosphate group for dry phospholipid aggregates and phospholipid aggregates in the presence of different carbohydrates, indicated in the literature as differently affected by the presence of different carbohydrates. Using an equation that relates the value of the heteronuclear spin coupling constant ${}^3J_{C1,H1'}$ to the value of the dihedral angle defined by the sequence of atoms C1-O-C1'-H1', along the glycosidic bond of trehalose, the respective values of ${}^3J_{C1,H1'}$ were calculated for all four interacting systems obtained. From the calculation of the Boltzmann population for the interacting systems, an average value for the coupling constant was obtained, which was compared to the experimental result available in the literature. The values of disaccharide-prototype phospholipid membrane interaction energy did not show agreement with the behavior of the signal corresponding to the asymmetric stretching of the phosphate group,

considering the lowest energy interacting systems, without zero point correction. This result was understood as a strong indication that interactions with trimethyl-ammonium groups also need to be considered in this evaluation. The average value obtained for the heteronuclear spin coupling constant, compared very well to the experimental value available in the literature, being an indication that the values of the glycosidic angles of trehalose present in the interacting systems theoretically obtained are compared to those assumed by the disaccharide in real interacting systems, so that the PM6 method, used to model the interacting systems, can be pointed out as a computational method capable of adequately describing the stabilizing effects of the trehalose glycosidic bond in this type of system.

Keywords: Phospholipid conformation. Phospholipid membrane. Dissaccharide-membrane interaction.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1) A bicamada fosfolipídica	16
1.2) Fosfolípidios de membrana	18
1.3) A conformação das fosfatidilcolinas	20
1.4) A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) como técnica para o estudo conformacional de agregados fosfolipídicos	21
2. OBJETIVOS	23
3. REVISÃO DA LITERATURA	24
4. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	30
4.1) Métodos Clássicos	30
4.2) Métodos Quânticos	32
4.3) O método de Hartree-Fock	34
4.4) Métodos Semi-empíricos	45
4.4.1) O método MNDO	46
4.4.2) O método PM6	47
4.5) A Teoria do Funcional da Densidade	48
4.5.1) As equações de Kohn-Sham	52
4.5.2) O funcional B97	52
4.5.3) A DFT Corrigida para Interações Dispersivas	56
5. METODOLOGIA	58
Etapa 1) Seleção do método computacional	58
Etapa 2) Avaliação das interações dispersivas	61
Etapa 3) Obtenção dos sistemas monoméricos	64
Etapa 4) Obtenção do sistema dimérico	65
Etapa 5) Estudo da interação dissacarídeo-PMF	68
Etapa 6) Comparação com dados experimentais	71

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	74
Etapa 1) Seleção do método computacional	74
Etapa 2) Avaliação das interações dispersivas	75
Etapa 3) Obtenção dos sistemas monoméricos	76
Etapa 4) Obtenção do sistema dimérico	82
Etapa 5) Estudo da interação dissacarídeo-PMF	90
Etapa 6) Comparação com dados experimentais	118
7. CONCLUSÕES	122
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124

1. INTRODUÇÃO

As células e seus compartimentos são delimitados por estruturas denominadas membranas celulares. As membranas celulares são costumeiramente chamadas de membranas fosfolipídicas. Isso se deve ao fato de que grande parte das membranas celulares é majoritariamente composta por fosfolipídios. A estrutura de tais membranas é bastante particular, sendo formadas por bicamadas fosfolipídicas.

É fato que a composição das membranas celulares é bem diversa, havendo diversidade quando se comparam os diferentes tipos de células, os diferentes tipos de organelas e, inclusive, as diferentes porções interna e externa que constituem as bicamadas fosfolipídicas. No entanto, os glicerofosfolipídios de colina são os fosfolipídios mais abundantes na porção externa de muitas membranas celulares.^{1,2}

A manutenção da estrutura das membranas é extremamente importante para a viabilidade celular, uma vez que tais membranas se constituem em uma barreira seletiva capaz de impedir que moléculas produzidas no interior da célula deixem esse ambiente, bem como que moléculas indesejáveis provenientes do meio externo se difundam para seu interior. Tal permeabilidade seletiva é garantida majoritariamente através de sistemas de transporte específicos constituídos por proteínas. De uma maneira geral, os componentes lipídicos das membranas constituem a barreira seletiva, enquanto que as proteínas atuam como sistemas específicos de transporte que possibilitam a permeabilidade seletiva.^{3,4}

A compartimentalização das células é fator primordial para seu perfeito funcionamento, de modo que há muito tempo se tem trabalhado no desenvolvimento de processos de preservação de materiais biológicos capazes de manter a morfologia das membranas celulares. Os processos mais comumente utilizados para a preservação de materiais biológicos tais como tecidos e órgãos para transplantes baseiam-se em técnicas de congelamento (criopreservação) e de congelamento seguido de desidratação (liofilização).

A criopreservação é um processo que visa à suspensão do metabolismo e a manutenção das características celulares. O processo de criopreservação é composto por três etapas: diluição, resfriamento e congelamento. A etapa de diluição consiste, basicamente, na adição de substâncias capazes de garantir a viabilidade das células durante a etapa de congelamento. Dentre as substâncias diluentes destacam-se os

chamados crioprotetores, que são substâncias capazes de atravessar ou não as membranas celulares. O glicerol e o dimetil-sulfóxido são exemplos de crioprotetores penetrantes, enquanto que certas proteínas do ovo e o dissacarídeo α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 1)- α -D-glicopiranosose (trealose) são exemplos de crioprotetores não-penetrantes.

Tal como a criopreservação, a liofilização visa à suspensão do metabolismo e a manutenção das características celulares e é composta por três etapas: diluição, congelamento e desidratação. A etapa de diluição consiste na adição de substâncias capazes de garantir a viabilidade celular durante as etapas de congelamento e desidratação. O dissacarídeo trealose é descrito na literatura como substância capaz de aumentar a viabilidade de materiais biológicos preservados por liofilização.⁵ Assim, a trealose parece atuar não somente como crioprotetor, mas também como protetor de materiais biológicos durante a desidratação em processos de liofilização.

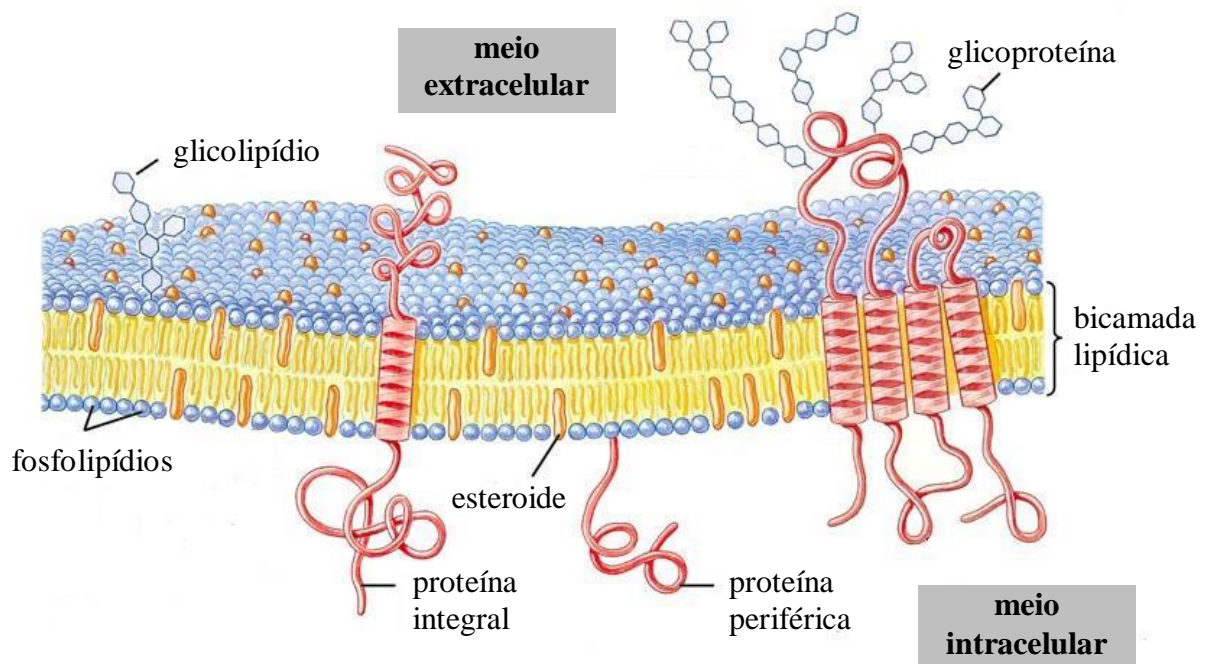
No entanto, ainda não se sabe ao certo qual (quais) mecanismo (mecanismos) está (estão) associado (associados) à capacidade protetora da trealose. Uma das teorias propostas para explicar tal capacidade é que esse carboidrato seja capaz de interagir de forma diferenciada com as porções polares dos fosfolípidios de membrana, mantendo a estrutura das membranas celulares e, conseqüentemente, a morfologia celular.

1.1) A bicamada fosfolipídica

Com base no fato de que, em ambiente aquoso, os lipídios de membrana se organizam, formando compartimentos bilamelares,⁶ Danielli e Davsen propuseram, em 1935, que as membranas celulares fossem formadas por bicamadas lipídicas⁷. No entanto, mais tarde, em 1972, o modelo de membrana proposto por Danielli e Davsen foi substituído pelo modelo de mosaico fluido, proposto por Singer e Nicolson.⁸ Segundo esses autores, as membranas celulares são constituídas por uma bicamada lipídica dinâmica na qual estão inseridas proteínas integrais e periféricas. Esse modelo é amplamente difundido e aceito até os dias atuais, embora alguns novos conceitos tenham sido a ele incorporados por Simons e Ikonen⁹ e Brown e London¹⁰, em 1997. Esses novos conceitos incluem a organização dos lipídios em micro-domínios de composição e dinâmica diferenciadas em relação à composição e dinâmica da bicamada fosfolipídica. Esses micro-domínios são denominados *rafts*.¹¹

Figura 1. Esquema representativo das membranas celulares e seus principais componentes.

Adaptado da referência¹².



Uma vez que as proteínas de membrana parecem ter funções específicas, tais como transporte, sinalização e catálise, os lipídios são os principais constituintes das membranas celulares. Sendo assim, o uso da terminologia bicamada lipídica é muito comum quando se faz alusão à estrutura das membranas celulares, muito embora os lipídios de membrana não estejam limitados à função estrutural. Os lipídios podem modificar as funções das proteínas de membrana através da modificação de propriedades individuais, tais como a estrutura e a conformação dos lipídios, e através da modificação de propriedades coletivas, tais como fluidez, espessura e forma das membranas.¹³

As bicamadas lipídicas podem existir em três estados de agregação (sólido-cristalino, gel e líquido-cristalino), dependendo da temperatura e da composição. O estado sólido-cristalino é caracterizado por cadeias carbônicas totalmente estendidas, o estado gel por cadeias carbônicas menos estendidas e, o estado líquido-cristalino, por cadeias raramente estendidas. Em condições naturais, as membranas celulares apresentam-se no estado líquido-cristalino.¹⁴

Aproximadamente mil e quinhentos tipos de lipídios foram identificados na bainha da mielina de axônios do sistema nervoso central de humanos. No entanto,

somente cerca de trinta apresentam-se em quantidades consideráveis.¹⁵ Os fosfolipídios, os glicolipídios e os esteroides são as principais classes de lipídios presentes nas bicamadas lipídicas.⁴ Dentre os lipídios que compõem as membranas celulares, destaca-se a classe dos fosfolipídios, que corresponde a 40–90% dos lipídios presentes nas membranas celulares, exceto nas membranas dos cloroplastos.¹⁶

Dessa forma, os fosfolipídios são muito importantes para a manutenção da estrutura membranar e, conseqüentemente, para a viabilidade e função celular. Os fosfolipídios são moléculas que apresentam considerável variedade estrutural, de modo que o conteúdo fosfolipídico das membranas é bastante diverso. Esta diversidade parece ser fundamental para a manutenção da estrutura das membranas. Assim, um estudo detalhado a respeito da função individual dos fosfolipídios de membrana ainda é um grande desafio.

1.2) Fosfolipídios de membrana

A classe de lipídios denominada fosfolipídios compreende duas subclasses, os glicerofosfolipídios e os esfingofosfolipídios. Glicerofosfolipídios possuem em suas estruturas a porção glicerol, enquanto esfingofosfolipídios possuem a porção esfingosina. Os glicerofosfolipídios são os lipídios mais abundantes na porção externa das membranas celulares.¹⁷

Os diferentes glicerofosfolipídios de membrana diferem entre si apenas por seus grupos polares, tendo em vista que todos eles são derivados do ácido fosfatídico, sendo o átomo de carbono central em configuração R. Os grupos polares mais abundantes em glicerofosfolipídios são os aminoálcoois colina e etanolamina, o aminoácido serina e os álcoois glicerol e inositol.⁴

A distribuição dos diferentes fosfolipídios varia consideravelmente quando membranas de diferentes origens são comparadas, de modo que qualquer tentativa de generalização é muito difícil. No entanto, em termos de composição de ambas as porções externa e interna das membranas, de uma maneira geral, as fosfatidilcolinas e esfingomiélinas são encontrados nas porções externas das membranas, enquanto que as fosfatidiletanolaminas e fosfatidilserinas são encontrados nas porções internas das membranas celulares.¹⁸

Figura 2. Representação esquemática para os glicerofosfolípídios derivados do ácido fosfatídico.

R¹ e R² são cadeias carbônicas com muitos átomos, geralmente abertas.

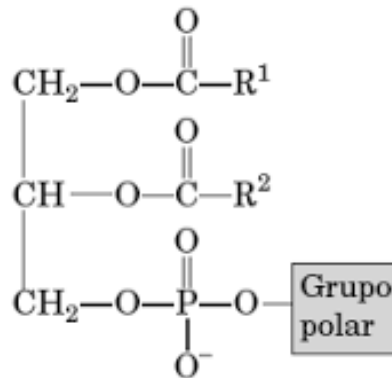
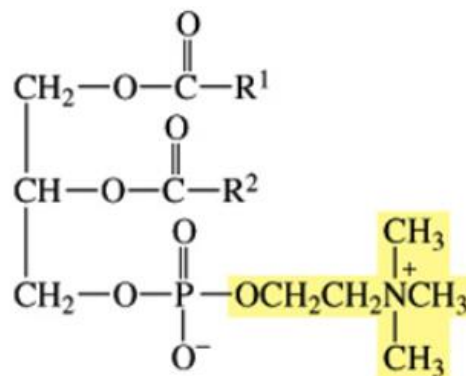


Figura 3. Esquema representativo das fosfatidilcolinas, que correspondem aos fosfolípídios mais comumente encontrados na porção externa de diversas bicamadas fosfolipídicas.¹⁸



As cadeias carbônicas R¹ e R² conferem variabilidade estrutural às fosfatidilcolinas. Tais cadeias são provenientes da reação de esterificação entre fosfatidilcolina e ácidos graxos. Os ácidos graxos mais comumente encontrados nas fosfatidilcolinas apresentam cadeias carbônicas compostas por número par de átomos de carbono, usualmente 14, 16, 18 e 20, conforme descrito por Nelson e Cox.¹²

Tabela 1. Ácidos graxos mais comumente encontrados nas fosfatidilcolinas.¹²

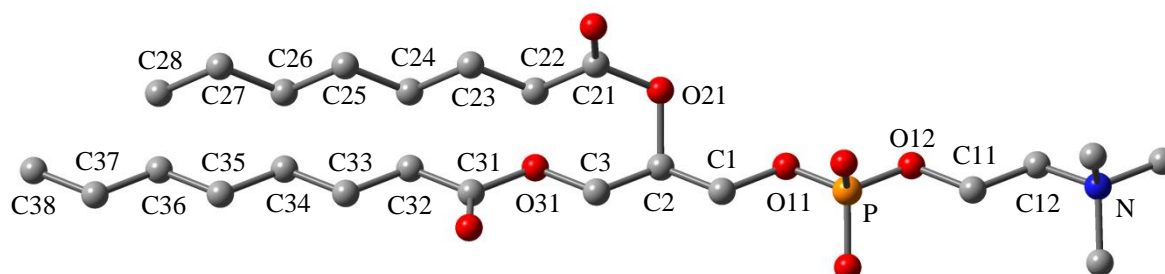
Ácido graxo	Nome usual	Abreviação
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}_2\text{H}$	Mirístico	C14:0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}_2\text{H}$	Palmítico	C16:0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}_2\text{H}$	Esteárico	C18:0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CHCH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$	Oleico	C18:1(9c)
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CHCHCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$	Linoleico	C18:2(9c,12c)
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CHCHCH}_2)_3\text{CHCH}(\text{CH}_2)_3\text{CO}_2\text{H}$	Araquidônico	C20:4(5c,8c,11c,14c)

1.3) A conformação das fosfatidilcolinas

A maioria dos estudos envolvendo a conformação de fosfatidilcolinas utiliza o sistema de numeração e a definição dos ângulos diedros introduzida por Sundaralingam, em 1972. Segundo essa convenção, o átomo de carbono ligado ao grupo polar colina é designado como C1, o grupo polar é designado como cadeia α e as cadeias carbônicas dos ácidos graxos ligados aos átomos de carbono C2 e C3 são designadas como cadeia β e cadeia γ . No sistema de numeração de Sundaralingam, o primeiro numeral (1, 2 ou 3) refere-se às cadeias α , β e γ , respectivamente. A conformação da porção glicerol (cadeia θ) é definida pelos ângulos diedros θ_1 , θ_2 , θ_3 e θ_4 , enquanto a conformação das cadeias α , β e γ são definidas pelos ângulos diedros α_n , β_n e γ_n , nos quais n é um número inteiro que aumenta conforme aumenta numeração dos átomos de cada uma das cadeias.

Figura 4. Numeração de Sundaralingam para a fosfatidilcolina 2R,3-dioctanoil-glicero-1-fosforilcolina.

Os átomos de hidrogênio foram omitidos para facilitar a visualização.



A orientação relativa das cadeias α , β e γ é definida pelos ângulos diedros θ da porção glicerol. Enquanto o ângulo diedro θ_1 define a orientação do grupo polar em

relação à porção glicerol, o ângulo diedro θ_2 define a orientação do grupo polar em relação à cadeia carbônica β . Já o ângulo diedro θ_3 define a orientação da cadeia carbônica γ em relação à porção glicerol e o ângulo diedro θ_4 define a orientação relativa entre ambas as cadeias carbônicas β e γ . Uma vez que a variação destes ângulos corresponde a rotações ao longo de ligações C–C, acredita-se que as conformações mais estáveis de glicerofosfolipídios apresentem para estes ângulos os valores de 60° , 180° ou -60° .

Tabela 2. Definição dos ângulos diedros da molécula de 2R,3-dioctanoil-glicero-1-fosforilcolina, segundo a convenção de Sundaralingam.

Cadeia θ		Cadeia α	
θ_1	O11–C1–C2–C3	α_1	C2–C1–O11–P
θ_2	O11–C1–C2–O21	α_2	C1–O11–P–O12
θ_3	C1–C2–C3–O31	α_3	O11–P–O12–C11
θ_4	O21–C2–C3–O31	α_4	P–O12–C11–C12
		α_5	O12–C11–C12–N
Cadeia β		Cadeia γ	
β_1	C1–C2–O21–C21	γ_1	C2–C3–O31–C31
β_2	C2–O21–C21–C22	γ_2	C3–O31–C31–C32
β_3	O21–C21–C22–C23	γ_3	O31–C31–C32–C33
β_4	C21–C22–C23–C24	γ_4	C31–C32–C33–C34
β_5	C22–C23–C24–C25	γ_5	C32–C33–C34–C35
β_6	C23–C24–C25–C26	γ_6	C33–C34–C35–C36
β_7	C24–C25–C26–C27	γ_7	C34–C35–C36–C37
β_8	C25–C26–C27–C28	γ_8	C35–C36–C37–C38

1.4) A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) como técnica para o estudo conformacional de agregados fosfolipídicos

A obtenção de informações conformacionais para fosfolipídios em agregados do tipo bicamada a partir de técnicas experimentais é ainda um grande desafio. Isso se deve ao caráter fluido destes agregados, o que inviabiliza a utilização de técnicas como difração de raios-X, difração de nêutrons ou difração de elétrons, mais aplicadas para

sistemas ordenados. Apesar disso, Wiener e White, em 1992, foram pioneiros em utilizar uma metodologia que combinava difração de raios-X e difração de nêutrons, de modo que foram obtidas informações relevantes a respeito da estrutura de bicamadas de dioleil-fosfatidilcolina (DOPC) em estado fluido, tais como a distribuição de diferentes átomos em função do eixo perpendicular ao plano das bicamadas.¹⁹ No entanto, informações refinadas a respeito das conformações individuais das moléculas de DOPC no agregado não foram obtidas.

A falta de informações experimentais a respeito da conformação de fosfolipídios em agregados bilamelares se traduz em um problema adicional para os estudos teóricos dedicados a esse fim, dado que os resultados obtidos teoricamente dificilmente são passíveis de confirmação. Além disso, tais informações poderiam ser úteis para a resolução de questões relacionadas ao efeito das vizinhanças sobre a conformação dos fosfolipídios, tais como: a presença de moléculas vizinhas altera a conformação assumida pelos fosfolipídios nos estados gasoso e monomérico? Qual o efeito do grau de hidratação sobre a conformação de fosfolipídios em agregados do tipo bicamada?

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é uma das técnicas experimentais mais eficazes para a definição de parâmetros estruturais e conformacionais de sistemas em solução, bem como para o estudo de interações soluto-solvente. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear baseada na abundância natural de carbono-13 (RMN de ¹³C) é particularmente útil para o estudo teórico de fosfolipídios, uma vez que as constantes de acoplamento de spin heteronuclear a três ligações carbono-fósforo (³J_{CP}) são extremamente sensíveis a mudanças conformacionais. Isso permite que dados de deslocamento químico e de constantes de acoplamento provenientes de espectros de RMN de ¹³C sejam utilizados para a confirmação de modelos obtidos a partir de cálculos teóricos.

Todavia, mesmo para sistemas simples contendo poucos núcleos magnéticos, a atribuição dos valores de deslocamento químico e de constante de acoplamento de spin nuclear obtidos experimentalmente não é uma tarefa trivial, de modo que nem sempre se tem à disposição os dados de RMN necessários para corroborar um modelo teórico. Neste sentido, cálculos teóricos podem fornecer uma estimativa prévia a respeito dos deslocamentos químicos e das constantes de acoplamento de spin nuclear, contribuindo consideravelmente para a atribuição de sinais obtidos experimentalmente.

Karplus foi o pioneiro na obtenção de equações teóricas para a estimativa de valores de constantes de acoplamento de spin heteronuclear a três ligações. Em seu trabalho de 1959, ele desenvolveu equações para os termos de contato elétron-spin das constantes de acoplamento de spin nuclear,²⁰ com base na Teoria de Ligação de Valência²¹. Utilizando quatro sistemas-modelo (etano, eteno, 1,2-cis-difluoreto e 1,2-trans-difluoreto), ele obteve equações para o cálculo da constante de acoplamento de spin nuclear a três ligações hidrogênio-hidrogênio ($^3J_{HH}$), hidrogênio-flúor ($^3J_{HF}$) e flúor-flúor ($^3J_{FF}$). As equações de Karplus têm como único parâmetro o ângulo diedro que define a orientação relativa entre os núcleos interagentes. Posteriormente, foram feitas diversas reparametrizações das equações de Karplus, de modo que foram obtidas equações para a estimativa da constante de acoplamento nuclear de carboidratos²², de nucleosídeos²³ e de proteínas²⁴. Sendo assim, ambas as abordagens, experimental e teórica, se complementam para a obtenção de informações sobre um determinado sistema molecular.

De uma maneira geral, raramente é possível uma comparação direta entre os resultados obtidos experimentalmente e teoricamente para uma dada propriedade, uma vez que resultados obtidos experimentalmente correspondem a valores médios associados ao conjunto de conformações estáveis de um sistema, enquanto resultados teóricos correspondem a valores individuais associados a uma dada conformação do sistema, se cálculos quanto-mecânicos são utilizados. Somente conhecendo o conjunto de conformações estáveis do sistema, os valores individuais da propriedade de interesse (associados a cada uma das conformações do sistema) e a abundância relativa das conformações se torna possível propor alguma comparação entre resultados experimentais e teóricos. Caso haja concordância entre esses, pode-se dizer que o modelo teórico é válido e passível de ser utilizado para a interpretação de resultados experimentais, bem como para o estudo de fenômenos inacessíveis experimentalmente.

2. OBJETIVOS

Admitindo como hipótese que as interações entre o dissacarídeo trealose e as porções polares dos fosfolípidios são diferenciadas em relação àquelas que são estabelecidas com as porções polares de dissacarídeos análogos, tal como maltose e celobiose, a presente tese tem como objetivo principal comparar qualitativa e quantitativamente, através do uso de métodos computacionais, as possíveis interações entre uma molécula de dissacarídeo e um protótipo de membrana fosfolipídica. Para tal, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- 1º) obtenção de um protótipo de membrana fosfolipídica,
- 2º) definição de um protocolo para a aproximação da molécula de dissacarídeo e o protótipo de membrana fosfolipídica e
- 3º) cálculo das energias de interação dissacarídeo-protótipo de membrana fosfolipídica.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Há aproximadamente 60 anos descobriu-se que alguns organismos que passam por um estágio dormente ao longo de seu desenvolvimento e que são capazes de resistir a longos períodos de escassez de água apresentam grandes quantidades do dissacarídeo trealose estocadas em seu interior.^{25,26,27,28} A princípio, poderia se pensar que esse dissacarídeo serviria de reserva durante os períodos de dormência, porém o trabalho de Clegg, de 1962, mostrou que, em cistos contendo embriões dormentes de camarões de salmoura, o dissacarídeo não é utilizado durante o período de dormência, uma vez que a concentração de trealose apresenta-se praticamente a mesma considerando-se cistos com idade entre 1 e 26 anos.²⁹ Além disso, foi observado que, após hidratação dos cistos, os níveis de trealose decaem a zero e o desenvolvimento dos embriões segue normalmente.³⁰

Essa observação levou a comunidade científica a crer que a principal função do dissacarídeo trealose nesses organismos seria a de manter a viabilidade dos mesmos durante o período de escassez hídrica. Sendo assim, em 1971, Crowe elaborou a chamada “hipótese de substituição da água”, que continua sendo investigada por diferentes métodos de pesquisa até os dias de hoje.³¹ Diante desse indício de que a trealose teria um comportamento diferenciado para essa função em relação aos outros carboidratos, vários estudos foram feitos a fim de verificar a eficiência da mesma na preservação da integridade de membranas e de vesículas fosfolipídicas na ausência de água, sendo que alguns deles serão descritos a seguir.^{32,33,34} De fato, a manutenção da viabilidade dos organismos, obviamente, depende da manutenção de sua integridade celular, de modo que vesículas fosfolipídicas constituem excelentes modelos para o estudo de uma possível interação entre trealose e células diversas.

Considerando a importância do processo de liofilização para a preservação de materiais biológicos, em 1984, foi feito um estudo utilizando trealose e outros carboidratos como aditivos no processo de preservação de vesículas fosfolipídicas liofilizadas.³⁵ Os estudos mostraram que a trealose foi o carboidrato mais eficiente na proteção das vesículas. Tal eficiência foi associada ao fato de que a quantidade de trealose necessária para a máxima preservação apresentou-se bem inferior às quantidades dos outros carboidratos.

No entanto, em meados dos anos 80, já era sabido que a desidratação de vesículas fosfolipídicas provoca a transição para o estado gel, acarretando em danos estruturais irreversíveis.^{36,37} De fato, ainda nos dias de hoje, esse fenômeno é utilizado para explicar o porquê da inviabilidade do processo de preservação de materiais biológicos na ausência de água. Em outras palavras, o aumento da temperatura de transição decorrente da desidratação, com conseqüente passagem ao estado gel, parece ser um dos fatores responsáveis pelo insucesso do processo de preservação de materiais biológicos na ausência de água. A partir dessa observação, os estudiosos da área passaram a se dedicar à investigação do efeito da adição de carboidratos sobre a temperatura de transição de agregados fosfolipídicos, como apresentado a seguir.

Em 1985, Crowe e colaboradores analisaram a influência da adição de trealose e de outros carboidratos sobre a temperatura de transição entre os estados gel e líquido-cristalino de vesículas fosfolipídicas liofilizadas.³⁸ Os estudos mostraram que alguns carboidratos foram capazes de provocar redução na temperatura de transição e que tal redução possibilitou às vesículas permanecerem no estado líquido-cristalino, que é o estado no qual naturalmente se encontram as vesículas fosfolipídicas. No entanto, dentre os carboidratos analisados, a trealose foi o que provocou maior redução na temperatura de transição. Essa observação (maior redução na temperatura de transição) juntamente com a observação feita no trabalho publicado pelos mesmos autores, em 1984 (menor quantidade necessária para máxima preservação), nos permite concluir que a trealose apresenta-se como um dos mais eficientes agentes protetores.

Acompanhando o desenvolvimento dos estudos dedicados à investigação do efeito da adição de carboidratos no processo de liofilização, encontram-se também trabalhos que se dedicaram ao estudo do efeito dos carboidratos na etapa de congelamento, que, no processo de liofilização, precede a etapa de desidratação. Para esses estudiosos, a formação de um estado vítreo seria condição para que houvesse redução na temperatura de transição e conseqüente aumento de viabilidade nos processos de liofilização. Essa ideia é a base da chamada “teoria da vitrificação”, que associa a capacidade protetora dos carboidratos à capacidade dos mesmos se apresentarem em estado vítreo. A seguir, serão apresentados dois estudos considerados fundamentais para a elaboração dessa teoria.

Em 1989, os pesquisadores Green e Angell apresentaram um estudo a respeito das temperaturas de transição vítrea da trealose e de outros carboidratos em soluções

aquosas de diferentes concentrações.³⁹ Os pesquisadores observaram que a trealose foi o carboidrato que apresentou maior temperatura de transição vítrea, em todas as concentrações analisadas, e associaram isso à capacidade protetora do dissacarídeo. Em 1994, Koster e colaboradores analisaram o efeito da adição de diferentes misturas de carboidratos capazes de se apresentar no estado vítreo sobre a temperatura de transição de vesículas fosfolipídicas liofilizadas.⁴⁰ Os autores determinaram que todas as misturas foram capazes de provocar uma redução na temperatura de transição, o que os levou a concluir que a formação de um estado vítreo seria fundamental para a redução da temperatura de transição.

No entanto, na mesma época em que o estudo de Koster e colaboradores foi publicado, Crowe e colaboradores apresentaram um estudo avaliando o efeito de alguns carboidratos sobre a liofilização de dois tipos de vesículas: vesículas com alta (ATT) e com baixa temperatura de transição (BTT).⁴¹ Os principais resultados apresentados pelos autores serão citados a seguir. Tanto o dissacarídeo trealose como o polissacarídeo dextrano, quando em estado vítreo, foram capazes de preservar a integridade de vesículas ATT, sendo que a quantidade de trealose necessária foi muito menor que a de dextrano, contrariando o trabalho de Green e Angell³⁹, uma vez que a temperatura de transição vítrea da trealose é inferior à do dextrano. Já em relação às vesículas BTT, somente a trealose apresentou efeito protetor. Dessa forma, os autores mostraram que, muito embora a vitrificação pudesse ter contribuído para a preservação de vesículas ATT, o mesmo não foi verificado para vesículas BTT, de forma que a “hipótese de vitrificação” não seria suficiente para explicar o efeito protetor dos carboidratos.

Em 1996, Crowe e colaboradores apresentaram um estudo com vesículas fosfolipídicas liofilizadas que teve como objetivo analisar se a trealose, de fato, teria algum efeito diferenciado em relação aos outros carboidratos.⁴² Os pesquisadores mostraram que a trealose manteve-se no estado vítreo mesmo após reidratação das vesículas e associaram isso à manutenção da estrutura das mesmas, sendo que, para a sacarose, o mesmo não foi observado. Dessa forma, os autores concluíram que não só a possibilidade de interações específicas, mas também a manutenção de um estado vítreo, é importante para a preservação da estrutura de vesículas fosfolipídicas e que a trealose teria um efeito diferenciado em relação a outros carboidratos, justamente pela sua capacidade de interagir com os fosfolipídios, bem como de manter seu estado vítreo.

Dessa forma, as hipóteses de “substituição da água” e da “vitrificação” não seriam mutuamente excludentes.

Analisando a literatura científica produzida a partir do ano 2000, podem-se encontrar ainda outros trabalhos dedicados ao estudo dos efeitos da adição de carboidratos em processos de liofilização de materiais biológicos. No entanto, o trabalho de Albertorio e colaboradores, de 2007, merece destaque.⁴³ Nesse trabalho, os autores compararam a eficiência da trealose e de diferentes dissacarídeos na preservação de bicamadas fosfolipídicas liofilizadas. O principal resultado desse estudo foi que os dissacarídeos cujas unidades monossacarídicas são ligadas através de ligação glicosídica do tipo α,α -(1→1) apresentaram-se bem mais eficientes na preservação das bicamadas, sendo tal eficiência associada a uma significativa redução da temperatura de transição. Os autores destacaram a trealose, que é o único dissacarídeo contendo ligação α,α -(1→1) encontrado naturalmente e, admitindo a hipótese da substituição de água, concluíram que tanto a ligação glicosídica α,α -(1→1) como a conformação adotada por esse dissacarídeo são fundamentais para que a mesma interaja de maneira diferenciada com os fosfolipídios, possibilitando a manutenção da estrutura dos agregados fosfolipídicos.

Conforme exposto anteriormente, diante da evidência de que carboidratos interagem com vesículas fosfolipídicas possibilitando a preservação de suas respectivas estruturas na ausência de água, foram elaboradas as hipóteses da substituição de água e da vitrificação. No entanto, considerando os trabalhos relacionados ao tema presentes na literatura, pode-se constatar que a hipótese da substituição de água é muito mais investigada que a da vitrificação. Além disso, percebe-se que alguns trabalhos nos quais a hipótese da vitrificação é considerada não abordam os aspectos moleculares relativos à formação da superfície vítrea composta por água e açúcar, tendo como objetivo o estudo do espaçamento entre as cadeias carbônicas dos fosfolipídios, que é compreendido como determinante para a manutenção do estado líquido-cristalino de vesículas fosfolipídicas na ausência de água.

Porém, compreendemos que ambas as hipóteses devem ser estudadas, uma vez que a experiência tem demonstrado que elas não são excludentes. Ainda, os aspectos moleculares relativos à interação carboidrato-sistema biológico devem ser sempre considerados, independente da hipótese em estudo, bem como da técnica utilizada para investigação. Isso porque somente a partir desse tipo de abordagem é possível obter

informações potencialmente capazes de contribuir para o entendimento das diferentes propriedades observadas para os diversos carboidratos, o que é interesse da comunidade científica há bastante tempo, conforme mencionado em parágrafos anteriores.

Posto isso, é importante mencionar também os trabalhos que se dedicaram não só à observação dos efeitos dos carboidratos em processos de liofilização, como também à determinação de propriedades físicas que pudessem fornecer informações capazes de indicar o mecanismo de ação dessas moléculas. Nesse sentido, destacam-se dois trabalhos que serão citados a seguir e que forneceram dados espectroscópicos utilizados até os dias de hoje como referência para o estudo da interação carboidrato-fosfolipídios. Tais dados têm sido particularmente úteis na investigação de possíveis interações específicas entre moléculas de carboidrato e grupos que constituem a região polar dos fosfolipídios, tal como fosfato, bem como na investigação de possíveis conformações para o sistema em questão.

O trabalho de Crowe, de 1985, além de avaliar o efeito da adição de carboidratos sobre a temperatura de transição de vesículas fosfolipídicas liofilizadas, analisou o espectro de absorção no infravermelho dos sistemas correspondentes. Os pesquisadores observaram que alguns carboidratos provocaram redução na intensidade do sinal correspondente ao estiramento assimétrico PO_2^- , localizado em 1246 cm^{-1} , bem como o deslocamento do mesmo para valores menores de número de onda. Além disso, foram detectadas mudanças nos sinais correspondentes às deformações angulares dos grupos $-\text{OH}$ dos carboidratos, localizados entre 1450 e 1350 cm^{-1} . Por fim, os pesquisadores destacaram a trealose como o carboidrato para o qual tais efeitos foram mais pronunciados.

O trabalho de Kapla e colaboradores, de 2015, apresentou dados espectroscópicos de ressonância magnética nuclear e de dinâmica molecular para sistemas compostos por trealose e vesículas fosfolipídicas.⁴⁴ Considerando esses sistemas, os pesquisadores forneceram valores experimentais e teóricos para várias constantes de acoplamento de spin homo e heteronuclear para a trealose, bem como informações conformacionais para o dissacarídeo. Além disso, os autores apresentaram dados relativos às ligações de hidrogênio estabelecidas entre a trealose e átomos selecionados da porção polar dos fosfolipídios em função da quantidade de moléculas de trealose consideradas. Eles concluíram que tais ligações ocorrem, principalmente,

entre os átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila do dissacarídeo e os átomos de oxigênio do grupo fosfato dos fosfolipídios.

Diante dessa breve revisão da literatura, pode-se concluir que são muitas as evidências a respeito da capacidade protetora da trealose em processos de preservação de vesículas fosfolipídicas e materiais biológicos diversos na ausência de água. No entanto, ainda não se sabe, de fato, o mecanismo molecular através do qual esse dissacarídeo desempenha tal função, sendo essa a problemática abordada na presente tese.

Utilizando um sistema molecular simplificado, justamente para focar a atenção nas interações específicas que podem se estabelecer entre dissacarídeos e as porções polares de fosfolipídios, e realizando um estudo comparativo tomando três dissacarídeos de glicose que diferem entre si apenas no tipo de ligação glicosídica, acreditamos estar realizando um estudo inicial potencialmente capaz de gerar informações que possibilitem associar tais interações à capacidade protetora diferenciada da trealose.

Uma vez constatado que as interações específicas estabelecidas entre trealose e as porções polares de fosfolipídios sejam diferenciadas, acreditamos que haverá um movimento em busca de compostos capazes de estabelecer um padrão de interações semelhante ao da trealose e que estudos para avaliar a capacidade protetora de tais compostos em processos de preservação de materiais biológicos serão realizados. Ou seja, tal constatação poderá acarretar em um aumento de eficiência e viabilidade das tecnologias de preservação de materiais biológicos na ausência de água já existentes.

Em outras palavras, o entendimento a respeito do mecanismo de interação em questão poderá ser útil para o desenvolvimento de substâncias análogas à trealose e que possam ser largamente utilizadas em processos de preservação na ausência de água, o que justifica a presente tese. Isso porque a síntese da α,α -trealose – que é a forma anomérica com propriedades protetoras – é um processo pouco viável, pois pode resultar na mistura das três formas anoméricas (α,α , β,β e α,β -trealose), de modo que praticamente toda a α,α -trealose disponível é extraída de bactérias e fungos que sintetizam α,α -trealose quando submetidos às mais variadas condições de estresse.

4. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Várias abordagens podem ser adotadas com o objetivo de tentar compreender os fenômenos químicos. Dentre elas, destacam-se as abordagens ditas teóricas, que visam, a partir da combinação da Física e da Matemática, gerar equações capazes de descrever os sistemas moleculares e, conseqüentemente, suas propriedades. As abordagens teóricas diferem entre si, fundamentalmente, no que diz respeito aos modelos utilizados para a descrição dos sistemas moleculares, que podem ser clássicos ou quânticos.

4.1) Métodos Clássicos

Os métodos clássicos (denominados métodos de Mecânica Molecular) utilizam a Física Clássica para a descrição dos sistemas moleculares, que são tratados segundo um modelo de “bolas unidas por meio de molas”, sendo os átomos as “bolas” e as ligações químicas as “molas”. Nesses métodos, a energia E_{class} de um sistema molecular é composta pela soma de vários termos que levam em consideração o deslocamento dos átomos.⁴⁵ Uma das expressões mais simples para E_{class} é apresentada a seguir, contendo cinco termos que, obrigatoriamente, compõem a energia de um sistema molecular. Os métodos clássicos diferem entre si pela quantidade de termos considerados, bem como pelos parâmetros utilizados para expressar cada um dos termos que compõem a energia.

$$E_{class} = E_{estira} + E_{dobra} + E_{torção} + E_{eletros} + E_{vdW}$$

- E_{estira} é a energia associada à variação das distâncias de ligação (estiramento) entre dois átomos A e B, cuja forma funcional mais simples provém de uma série de Taylor escrita a partir da distância de equilíbrio entre os átomos R_0^{AB} , truncada no termo de segunda ordem:

$$E_{estira} = k^{AB} (R^{AB} - R_0^{AB})^2,$$

na qual k^{AB} é uma constante relacionada à constante de força da ligação entre os átomos A e B

- E_{dobra} é a energia associada à variação dos ângulos planos (dobramento) formados na ligação de três átomos A, B e C, cuja forma funcional é análoga à E_{estira} :

$$E_{\text{dobra}} = k^{ABC} (\theta^{ABC} - \theta_0^{ABC})^2$$

- $E_{\text{torção}}$ é a energia associada à variação dos ângulos diedros (torção) formados na ligação de quatro átomos A, B, C e D. $E_{\text{torção}}$ é, fundamentalmente, uma função periódica do ângulo diedro ω , que pode variar no intervalo de 0° a 360° , sendo escrita como uma série de Fourier de n termos, na qual cada termo corresponde à periodicidade de $(360/n)^\circ$ do ângulo ω :

$$E_{\text{torção}} = \sum_n V_n \cos(n\omega),$$

na qual V_n é um valor constante correspondente à respectiva barreira de energia associada à variação de ω

- E_{eletros} é a energia associada à interação entre dois átomos A e B carregados eletricamente, cujas cargas sejam Q_A e Q_B , e separados por uma distância R^{AB} :

$$E_{\text{eletros}} = \frac{1}{\epsilon} \frac{Q_A Q_B}{R^{AB}},$$

na qual ϵ é a constante dielétrica do meio

- E_{vdW} é a energia associada à interação entre dois átomos A e B polarizados e separados por uma distância R^{AB} . E_{vdW} está relacionada à interação entre dipolos formados devido ao surgimento de distribuições de carga distintas sobre os átomos, oriundas do movimento dos elétrons (dipolos induzidos). Tal energia é nula em grandes distâncias, apresenta um mínimo na distância em que os átomos polarizados “se tocam” e se torna extremamente alta em pequenas distâncias interatômicas. Uma expressão possível para descrever E_{vdW} é o chamado potencial de Lennard-Jones (E_{LJ}):

$$E_{LJ} = \frac{C_1}{(R^{AB})^{12}} - \frac{C_2}{(R^{AB})^6},$$

na qual C_1 e C_2 são constantes de ajuste

4.2) Métodos Quânticos

Os métodos quânticos (denominados métodos de Estrutura Eletrônica) utilizam a Física Quântica para a descrição dos sistemas moleculares e, considerando a aproximação de Born-Oppenheimer e uma determinada função de onda eletrônica (ψ_{ele}), a partir da resolução da equação de Schrödinger independente do tempo (equação 1), na qual H_{ele} é o operador hamiltoniano eletrônico do sistema molecular,

$$H_{ele}\psi_{ele} = E\psi_{ele} \quad (\text{equação 1}),$$

permitem obter a energia de um sistema molecular, a partir da equação 2.⁴⁶

$$E = \frac{\int \psi_{ele}^* H_{ele} \psi_{ele} dv}{\int \psi_{ele}^* \psi_{ele} dv} \quad (\text{equação 2})$$

A expressão matemática do operador hamiltoniano eletrônico é composta pela soma dos operadores energia cinética (T_i), energia potencial elétron-núcleo (V_{ia}), energia potencial elétron-elétron (V_{ij}) e energia potencial núcleo-núcleo (V_{mn}), conforme apresentado na equação abaixo.

$$H_{ele} = \sum_i T_i + \sum_i \sum_a V_{ia} + \sum_i \sum_{j>i} V_{ij} + \sum_a \sum_{b>a} V_{ab},$$

sendo

$$T_i = -\frac{1}{2} \nabla_i^2$$

$$V_{ia} = -\frac{Z_a}{R_{ia}},$$

na qual Z_a é a carga do núcleo a e R_{ia} é a distância entre o elétron i e o núcleo a

$$V_{ij} = \frac{1}{r_{ij}},$$

na qual r_{ij} é a distância entre o elétron i e o elétron j

$$V_{ab} = \frac{Z_a Z_b}{R_{ab}},$$

na qual Z_b é a carga do núcleo b e R_{ab} é a distância entre o núcleo a e o núcleo B.

Substituindo as expressões matemáticas correspondentes aos operadores, tem-se a seguinte expressão para o hamiltoniano eletrônico:

$$H_{\text{ele}} = -\sum_i \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_i \sum_a \frac{Z_a}{R_{ia}} + \sum_i \sum_{j>i} \frac{1}{r_{ij}} + \sum_a \sum_{b>a} \frac{Z_a Z_b}{R_{ab}},$$

que, mediante a definição dos operadores \mathbf{h}_i (composto pela soma do operador energia cinética do elétron i e dos operadores energia potencial entre o elétron i e todos os núcleos a), \mathbf{g}_{ij} (correspondente ao operador energia potencial entre o elétron i e o elétron j, V_{ij}) e V_{nn} (correspondente à soma dos operadores energia potencial entre o núcleo a e todos os outros núcleos b), conduz à equação 3:

$$H_{\text{ele}} = \sum_i \mathbf{h}_i + \sum_i \sum_{j>i} \mathbf{g}_{ij} + V_{nn} \quad (\text{equação 3}),$$

sendo

$$\mathbf{h}_i = -\sum_i \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_a \frac{Z_a}{R_{ia}}$$

$$g_{ij} = \frac{1}{r_{ij}}$$

$$V_{nn} = \sum_a \sum_{b>a} \frac{Z_a Z_b}{R_{ab}}$$

Tomando uma função de onda normalizada para os elétrons e substituindo a equação 3 na equação 2, segue que:

$$E = \int \psi_{ele}^* \left(\sum_i \mathbf{h}_i + \sum_i \sum_{j>i} g_{ij} + V_{nn} \right) \psi_{ele} dv$$

$$E = \sum_i \int \psi_{ele}^* \mathbf{h}_i \psi_{ele} dv + \sum_i \sum_{j>i} \int \psi_{ele}^* g_{ij} \psi_{ele} dv + V_{nn} \quad (\text{equação 4}),$$

na qual V_{nn} é a energia potencial núcleo-núcleo.

Os métodos quânticos diferem na maneira escolhida para resolver a equação 4. Nos métodos *ab initio* a resolução se dá de maneira rigorosa, o que quer dizer sem desprezar nem aproximar nenhuma das integrais envolvidas no cálculo da energia, enquanto que nos métodos semi-empíricos algumas integrais são desprezadas e outras aproximadas.

4.3) O método de Hartree-Fock⁴⁷

A função de onda antissimétrica mais simples possível para a descrição da estrutura eletrônica de sistemas moleculares corresponde a um determinante de dimensão N , sendo N o número de elétrons que compõem o sistema molecular, chamado determinante de Slater Φ_{SD} . Um determinante de Slater é formado por N orbitais moleculares ortonormais ϕ_i , compostos pelo produto de uma função espacial e uma função de spin, dispostos de forma tal que as colunas correspondem a um dado orbital molecular e, as linhas, às coordenadas dos N elétrons.⁴⁵

$$\Phi_{SD} = \begin{vmatrix} \phi_1(1) & \phi_2(1) & \dots & \phi_N(1) \\ \phi_1(2) & \phi_2(2) & \dots & \phi_N(2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \phi_1(N) & \phi_2(N) & \dots & \phi_N(N) \end{vmatrix}$$

A equação proveniente da substituição de tal função na equação 4 fornece a expressão para a energia de um sistema molecular descrito por uma função de onda eletrônica composta por um determinante de Slater (equação 5). Nela identificam-se termos associados à energia cinética de um elétron e à energia potencial elétron-núcleo, à energia potencial elétron-elétron, bem como à energia potencial núcleo-núcleo V_{nn} . Conforme pode ser visto na equação 5, o termo associado à energia potencial elétron-elétron apresenta-se com um somatório de duas contribuições, denominadas energia de Coulomb J_{ij} e energia de troca K_{ij} , o que é consequência, unicamente, da função de onda escolhida para representar a estrutura eletrônica (um único determinante de Slater).

$$E = \sum_i^N \int \phi_i^*(i) \mathbf{h}_i \phi_i(i) dv + \sum_i^N \sum_{j>i}^N \int \phi_i^*(i) \phi_j^*(j) \mathbf{g}_{ij} \phi_i(i) \phi_j(j) dv - \sum_i^N \sum_{j>i}^N \int \phi_i^*(i) \phi_j^*(j) \mathbf{g}_{ij} \phi_i(j) \phi_j(i) dv + V_{nn}$$

$$E = \sum_i^N \int \phi_i^*(i) \mathbf{h}_i \phi_i(i) dv + \sum_i^N \sum_{j>i}^N \left(\int \phi_i^*(i) \phi_j^*(j) \mathbf{g}_{ij} \phi_i(i) \phi_j(j) dv - \int \phi_i^*(i) \phi_j^*(j) \mathbf{g}_{ij} \phi_i(j) \phi_j(i) dv \right) + V_{nn}$$

$$E = \sum_i^N h_i + \sum_i^N \sum_{j>i}^N (J_{ij} - K_{ij}) + V_{nn} \quad (\text{equação 5})$$

- h_i é uma integral envolvendo um elétron, correspondente à soma da energia cinética do elétron i e das energias de atração entre o elétron e todos os núcleos a

$$h_i = \int \phi_i^*(i) \mathbf{h}_i \phi_i(i) dv$$

- J_{ij} é uma integral envolvendo dois elétrons, denominada integral de Coulomb, correspondente à energia de repulsão clássica entre dois elétrons i e j

$$J_{ij} = \int \phi_i^*(i) \phi_j^*(j) \mathbf{g}_{ij} \phi_i(i) \phi_j(j) dv \quad (\text{equação 6})$$

- K_{ij} é uma integral envolvendo dois elétrons, denominada integral de troca, sem correspondente clássico

$$K_{ij} = \int \phi_i^*(i) \phi_j^*(j) \mathbf{g}_{ij} \phi_i(j) \phi_j(i) dv \quad (\text{equação 7})$$

Utilizando o princípio variacional, a fim de obter a energia mínima, mantendo-se ortonormalizados o conjunto de orbitais moleculares ϕ_i utilizados para a construção da função de onda eletrônica composta por um determinante de Slater, por meio do método dos multiplicadores de Lagrange λ_{ij} , tem-se que a função de Lagrange L deve permanecer inalterada após uma pequena mudança nos orbitais moleculares, ou seja, que a variação da função de Lagrange δL deve ser nula após tal mudança nos orbitais moleculares.

$$L = E - \sum_i^N \sum_{j>i}^N \lambda_{ij} \left(\int \phi_i^*(i) \phi_j(j) dv - \delta_{ij} \right),$$

na qual $\delta_{ij} = 1$ (quando $i = j$) e $\delta_{ij} = 0$ (quando $i \neq j$)

$$\delta L = \delta E - \sum_i^N \sum_{j>i}^N \lambda_{ij} \left(\int \delta \phi_i^*(i) \phi_j(j) dv + \int \phi_i^*(i) \delta \phi_j(j) dv \right)$$

A variação da energia pode ser escrita em termos de operadores de Fock F_i , o que gera, a partir da variação da função de Lagrange tomada como sendo nula, um

conjunto de N equações, uma para cada elétron i, conforme descrito na equação 8. O operador de Fock F_i é um operador associado à energia de um elétron (elétron i), composto pelos operadores energia cinética do elétron i, energia de interação do elétron i com todos os núcleos a e energia de interação do elétron i com todos os outros elétrons j, cuja forma funcional se parece, porém não corresponde exatamente, com a forma funcional do operador hamiltoniano eletrônico, conforme pode ser visto comparando-se as equações 3 e 9.

$$F_i \phi_i(i) = \sum_j^N \lambda_{ij} \phi_j(i) \quad (\text{equação 8})$$

$$F_i = h_i + \sum_j^N (J_j - K_j) \quad (\text{equação 9})$$

- J_j é o operador denominado operador de Coulomb

$$J_j = \int \phi_j^*(i) g_{ij} \phi_j(j) dv$$

- K_j é o operador denominado operador de troca

$$K_j = \int \phi_j^*(j) g_{ij} \phi_i(j) dv$$

O conjunto de N equações apresentado na equação 8 pode ser transformado em uma equação matricial de ordem N, conforme apresentado abaixo:

$$\begin{bmatrix} F_1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & F_2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \ddots & 0 \\ 0 & 0 & 0 & F_N \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \phi_1(1) \\ \phi_2(2) \\ \vdots \\ \phi_N(N) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \lambda_{11} & \lambda_{12} & \dots & \lambda_{1N} \\ \lambda_{21} & \lambda_{22} & \dots & \lambda_{2N} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \lambda_{N1} & \lambda_{N2} & \dots & \lambda_{NN} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \phi_1(1) \\ \phi_2(2) \\ \vdots \\ \phi_N(N) \end{bmatrix}$$

e, a partir de uma operação matricial denominada diagonalização que não modifica a função de onda eletrônica, é possível transformar a matriz dos operadores de Lagrange em uma matriz diagonal.

$$\begin{bmatrix} F_1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & F_2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \ddots & 0 \\ 0 & 0 & 0 & F_N \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \phi'_1(1) \\ \phi'_2(2) \\ \vdots \\ \phi'_N(N) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \varepsilon_1 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & \varepsilon_2 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & \varepsilon_N \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \phi'_1(1) \\ \phi'_2(2) \\ \vdots \\ \phi'_N(N) \end{bmatrix}$$

Dessa forma, a partir da diagonalização, obtém-se um conjunto de N equações de pseudo-autovalor, denominadas equações de Hartree-Fock (equação 10), nas quais os orbitais moleculares $\phi'_i(i)$ são chamados de orbitais canônicos e ε_i são as energias dos respectivos orbitais moleculares, que correspondem aos valores esperados para o operador de Fock F_i na base dos orbitais canônicos.

$$F_i \phi'_i(i) = \varepsilon_i \phi'_i(i) \quad (\text{equação 10})$$

$$\varepsilon_i = \int \phi_i'^*(i) F_i \phi'_i(i) dv$$

As equações de HF são denominadas de “pseudo-autovalor”, pois não são independentes umas das outras, tendo em vista que cada um dos operadores de Fock F_i depende também de todos os outros orbitais canônicos devido aos operadores de Coulomb e de troca e, dessa forma, só podem ser resolvidas por meio de métodos iterativos. Orbitais moleculares que sejam soluções da equação 10 são chamados de orbitais de campo auto-consistente ou orbitais de SCF (*Self-Consistent Field*). A equação 11 apresenta o valor da energia calculada para um sistema molecular de subcamadas fechadas a partir do método de Hartree-Fock (HF).

$$E = \sum_i^N \varepsilon_i - \frac{1}{2} \sum_i^N \sum_j^N (J_{ij} - K_{ij}) + V_{nn} \quad (\text{equação 11})$$

Para sistemas atômicos ou moléculas diatômicas altamente simétricas, a obtenção da energia se dá diretamente por meio da resolução das equações de

Hartree-Fock (equação 10), tendo em vista que são conhecidas as formas funcionais dos orbitais canônicos. Tal obtenção é chamada de “resolução numérica” das equações de Hartree-Fock e o valor da energia assim obtido é chamado de “limite de Hartree-Fock”.

No entanto, para todos os outros sistemas moleculares, os orbitais canônicos são expressos como combinações lineares de M funções gaussianas $\chi_\alpha(i)$ chamadas orbitais atômicos ou funções de base,

$$\phi'_i(i) = \sum_{\alpha}^M c_{\alpha i} \chi_{\alpha}(i) \quad (\text{equação 12})$$

sendo essa aproximação denominada combinação linear de orbitais atômicos ou LCAO (*Linear Combination of Atomic Orbitals*). Isso faz com que o valor obtido para a energia não seja exato, tomando-se como referência o limite de Hartree-Fock. No entanto, quanto maior o número de funções de base utilizadas para expressar os orbitais canônicos, mais próxima do limite de Hartree-Fock torna-se a solução aproximada, sendo que quando M tende ao infinito, a solução tende exatamente ao limite de Hartree-Fock. Utilizando a aproximação LCAO, as equações de Hartree-Fock se tornam:

$$\mathbf{F}_i \sum_{\alpha}^M c_{\alpha i} \chi_{\alpha}(i) = \epsilon_i \sum_{\alpha}^M c_{\alpha i} \chi_{\alpha}(i) \quad (\text{equação 13}),$$

sendo $c_{\alpha i}$ os coeficientes utilizados para a LCAO.

Multiplicando cada uma das equações apresentadas na equação 13, pela esquerda, por cada uma das funções de base utilizadas para a obtenção dos orbitais de SCF e integrando as equações resultantes, obtém-se um conjunto de M equações para cada elétron i, totalizando NM equações denominadas equações de Hartree-Fock-Roothaan⁴⁸,

$$\left\{ \begin{array}{l} \sum_{\alpha}^M \int \chi_1(\mathbf{i}) \mathbf{F}_i \chi_{\alpha}(\mathbf{i}) dv c_{\alpha i} = \sum_{\alpha}^M \int \chi_1(\mathbf{i}) \chi_{\alpha}(\mathbf{i}) dv c_{\alpha i} \varepsilon_i \\ \sum_{\alpha}^M \int \chi_2(\mathbf{i}) \mathbf{F}_i \chi_{\alpha}(\mathbf{i}) dv c_{\alpha i} = \sum_{\alpha}^M \int \chi_2(\mathbf{i}) \chi_{\alpha}(\mathbf{i}) dv c_{\alpha i} \varepsilon_i \\ \vdots \\ \sum_{\alpha}^M \int \chi_M(\mathbf{i}) \mathbf{F}_i \chi_{\alpha}(\mathbf{i}) dv c_{\alpha i} = \sum_{\alpha}^M \int \chi_M(\mathbf{i}) \chi_{\alpha}(\mathbf{i}) dv c_{\alpha i} \varepsilon_i \end{array} \right.$$

que podem ser transformadas em uma equação matricial, conforme apresentado a seguir, sendo

$$\mathbf{F}_{\alpha\beta}(\mathbf{i}) = \int \chi_{\alpha}(\mathbf{i}) \mathbf{F}_i \chi_{\beta}(\mathbf{i}) dv$$

e

$$\mathbf{S}_{\alpha\beta}(\mathbf{i}) = \int \chi_{\alpha}(\mathbf{i}) \chi_{\beta}(\mathbf{i}) dv.$$

A equação matricial apresentada pode ser escrita de forma compacta conforme a equação 14, na qual \mathbf{F} é uma matriz quadrada de dimensão NM denominada matriz de Fock, \mathbf{C} uma matriz de dimensão $NM \times N$ denominada matriz dos coeficientes, \mathbf{S} uma matriz quadrada de dimensão NM denominada matriz de sobreposição ou matriz de *overlap* e ε a matriz quadrada de dimensão N dos valores esperados para os operadores de Fock \mathbf{F}_i .

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

(equação 14),

na qual cada um dos elementos da matriz de Fock se expressa como:

$$F_{\alpha\beta}(\mathbf{i}) = \int \chi_{\alpha}(\mathbf{i}) \mathbf{F}_{\mathbf{i}} \chi_{\beta}(\mathbf{i}) d\mathbf{v}$$

$$F_{\alpha\beta}(\mathbf{i}) = \int \chi_{\alpha}(\mathbf{i}) \left[\mathbf{h}_{\mathbf{i}} + \sum_j^N (\mathbf{J}_j - \mathbf{K}_j) \right] \chi_{\beta}(\mathbf{i}) d\mathbf{v}$$

$$F_{\alpha\beta}(\mathbf{i}) = \int \chi_{\alpha}(\mathbf{i}) \mathbf{h}_{\mathbf{i}} \chi_{\beta}(\mathbf{i}) d\mathbf{v} + \int \chi_{\alpha}(\mathbf{i}) \left[\sum_j^N (\mathbf{J}_j - \mathbf{K}_j) \right] \chi_{\beta}(\mathbf{i}) d\mathbf{v},$$

na qual $h_{\alpha\beta}(\mathbf{i}) = \int \chi_{\alpha}(\mathbf{i}) \mathbf{h}_{\mathbf{i}} \chi_{\beta}(\mathbf{i}) d\mathbf{v}$ é denominado "integral de caroço".

Então:

$$F_{\alpha\beta}(\mathbf{i}) = h_{\alpha\beta}(\mathbf{i}) + \sum_j^N \int \chi_{\alpha}(\mathbf{i}) (\mathbf{J}_j - \mathbf{K}_j) \chi_{\beta}(\mathbf{i}) d\mathbf{v}$$

$$F_{\alpha\beta}(\mathbf{i}) = h_{\alpha\beta}(\mathbf{i}) + \sum_j^N \left(\int \chi_{\alpha}(\mathbf{i}) \mathbf{J}_j \chi_{\beta}(\mathbf{i}) d\mathbf{v} - \int \chi_{\alpha}(\mathbf{i}) \mathbf{K}_j \chi_{\beta}(\mathbf{i}) d\mathbf{v} \right)$$

$$F_{\alpha\beta}(\mathbf{i}) = h_{\alpha\beta}(\mathbf{i}) + \sum_j^N \left(\int \chi_{\alpha}(\mathbf{i}) \Phi_j^*(\mathbf{j}) \mathbf{g}_{\mathbf{ij}} \chi_{\beta}(\mathbf{i}) \Phi_j(\mathbf{j}) d\mathbf{v} - \int \chi_{\alpha}(\mathbf{i}) \Phi_j^*(\mathbf{j}) \mathbf{g}_{\mathbf{ij}} \Phi_j(\mathbf{j}) \chi_{\beta}(\mathbf{i}) d\mathbf{v} \right)$$

$$F_{\alpha\beta}(\mathbf{i}) = h_{\alpha\beta}(\mathbf{i}) + \sum_j^N \left(\int \chi_{\alpha}(\mathbf{i}) \sum_{\gamma}^M c_{\gamma j} \chi_{\gamma}(\mathbf{j}) \mathbf{g}_{\mathbf{ij}} \chi_{\beta}(\mathbf{i}) \sum_{\delta}^M c_{\delta j} \chi_{\delta}(\mathbf{j}) d\mathbf{v} \right. \\ \left. - \int \chi_{\alpha}(\mathbf{i}) \sum_{\gamma}^M c_{\gamma j} \chi_{\gamma}(\mathbf{j}) \mathbf{g}_{\mathbf{ij}} \sum_{\delta}^M c_{\delta j} \chi_{\delta}(\mathbf{j}) \chi_{\beta}(\mathbf{i}) d\mathbf{v} \right)$$

$$F_{\alpha\beta}(i) = h_{\alpha\beta}(i) + \sum_j^N \left(\sum_\gamma^M \sum_\delta^M \int c_{\gamma j} c_{\delta j} \chi_\alpha(i) \chi_\gamma(j) \mathbf{g}_{ij} \chi_\beta(i) \chi_\delta(j) dv \right. \\ \left. - \sum_\gamma^M \sum_\delta^M \int c_{\gamma j} c_{\delta j} \chi_\alpha(i) \chi_\gamma(j) \mathbf{g}_{ij} \chi_\delta(j) \chi_\beta(i) dv \right)$$

$$F_{\alpha\beta}(i) = h_{\alpha\beta}(i) + \sum_j^N \sum_\gamma^M \sum_\delta^M c_{\gamma j} c_{\delta j} \left(\int \chi_\alpha(i) \chi_\gamma(j) \mathbf{g}_{ij} \chi_\beta(i) \chi_\delta(j) dv \right. \\ \left. - \int \chi_\alpha(i) \chi_\gamma(j) \mathbf{g}_{ij} \chi_\delta(j) \chi_\beta(i) dv \right)$$

$$F_{\alpha\beta}(i) = h_{\alpha\beta}(i) + \sum_\gamma^M \sum_\delta^M \sum_j^N c_{\gamma j} c_{\delta j} \left(\int \chi_\alpha(i) \chi_\gamma(j) \mathbf{g}_{ij} \chi_\beta(i) \chi_\delta(j) dv \right. \\ \left. - \int \chi_\alpha(i) \chi_\gamma(j) \mathbf{g}_{ij} \chi_\delta(j) \chi_\beta(i) dv \right)$$

$$F_{\alpha\beta}(i) = h_{\alpha\beta}(i) + \sum_\gamma^M \sum_\delta^M D_{\gamma\delta} \left(\int \chi_\alpha(i) \chi_\gamma(j) \mathbf{g}_{ij} \chi_\beta(i) \chi_\delta(j) dv \right. \\ \left. - \int \chi_\alpha(i) \chi_\gamma(j) \mathbf{g}_{ij} \chi_\delta(j) \chi_\beta(i) dv \right),$$

na qual $D_{\gamma\delta} = \sum_j^N c_{\gamma j} c_{\delta j}$ é denominado matriz densidade.

Finalmente:

$$F_{\alpha\beta}(i) = h_{\alpha\beta}(i) + \sum_{\gamma\delta}^M D_{\gamma\delta} \left(\int \chi_\alpha(i) \chi_\gamma(j) \mathbf{g}_{ij} \chi_\beta(i) \chi_\delta(j) dv \right. \\ \left. - \int \chi_\alpha(i) \chi_\gamma(j) \mathbf{g}_{ij} \chi_\delta(j) \chi_\beta(i) dv \right) \quad (\text{equação 15})$$

A resolução da equação 14, que só é possível por meio de métodos iterativos nos quais os valores dos coeficientes de cada uma das funções de base $\chi_\alpha(i)$ utilizadas para a expansão dos orbitais canônicos $\phi'_i(i)$ são inicialmente estimados, fornece as energias

ε_i dos orbitais de SCF. Em termos práticos, define-se um limite de convergência para a energia do sistema molecular (obtida a partir da equação 11) e o procedimento iterativo para obtenção dos coeficientes e respectivos valores de energia ε_i é sistematicamente repetido até que tal limite seja atingido. Nesse procedimento, os termos energia de Coulomb J_{ij} e energia de troca K_{ij} , definidos nas equações 6 e 7, respectivamente, são obtidos mediante a aproximação LCAO (equação 12), conforme as equações abaixo:

$$J_{ij} = \sum_{\alpha=1}^M \sum_{\gamma=1}^M \sum_{\beta=1}^M \sum_{\delta=1}^M c_{\alpha i} c_{\gamma j} c_{\beta i} c_{\delta j} \int \chi_{\alpha}(i) \chi_{\gamma}(j) \mathbf{g}_{ij} \chi_{\beta}(i) \chi_{\delta}(j) dv$$

$$K_{ij} = \sum_{\alpha=1}^M \sum_{\gamma=1}^M \sum_{\beta=1}^M \sum_{\delta=1}^M c_{\alpha i} c_{\gamma j} c_{\beta i} c_{\delta j} \int \chi_{\alpha}(i) \chi_{\gamma}(j) \mathbf{g}_{ij} \chi_{\delta}(j) \chi_{\beta}(i) dv$$

Por fim, é sabido que a energia calculada a partir do método de Hartree-Fock não é exata, pois considera apenas a energia média de repulsão elétron-elétron. No método de HF, tal energia apresenta-se como um somatório de termos correspondentes à repulsão de cada elétron com todos os outros, assumindo que a distribuição espacial dos mesmos é descrita por um conjunto de orbitais moleculares. E isso é consequência, unicamente, do tipo de função de onda escolhida para a descrição da estrutura eletrônica (um único determinante de Slater), conforme mencionado anteriormente. Assim, o método de HF assume que os elétrons se movem independentemente uns dos outros, ou seja, que não existe correlação eletrônica.

De fato, os métodos de estrutura eletrônica diferem, justamente, na descrição escolhida para representar a estrutura eletrônica, o que dá origem aos diversos métodos de estrutura eletrônica disponíveis. Alguns exemplos são: o método de interação de configurações ou método CI (*Configuration Interaction*), que se utiliza não apenas de um único determinante de Slater, mas de uma combinação linear de determinantes, o método de ligação de valência ou método VB (*Valence Bond*), os métodos baseados na teoria perturbativa de Møller-Plesset ou métodos MP e os métodos baseados na Teoria do Funcional da Densidade ou métodos DFT (*Density Functional Theory*).

4.4) Métodos semi-empíricos

O custo computacional dos métodos *ab initio* é alto, mesmo considerando sistemas de pequenas dimensões e as aproximações assumidas no método de HF. Isso porque, segundo o formalismo matemático dos métodos *ab initio* – nos quais a obtenção da energia se dá por meio de um cálculo de primeiros princípios no qual nenhum dos termos em questão é desprezado nem aproximado, para que seja obtida uma descrição confiável, é necessário utilizar um conjunto de funções de base relativamente extenso para descrever os elétrons do sistema, o que gera um elevado número de integrais envolvendo um e dois elétrons.

Na tentativa de reduzir o custo computacional e tornar viável o cálculo da energia de sistemas moleculares mais extensos, os métodos semi-empíricos (SE) se propõem a fornecer diferentes versões aproximadas da equação obtida para energia, segundo o método de HF (equação 11), através da desconsideração de algumas integrais envolvendo um e dois elétrons e da aproximação do termo energia potencial núcleo-núcleo V_{nn} que, nos métodos SE, é denominado termo de repulsão *core-core*.

Dependendo das integrais que são desprezadas, os métodos SE são classificados como métodos NDDO (*Neglect of Diatomic Differential Overlap*), métodos INDO (*Intermediate Neglect of Differential Overlap*) e métodos CNDO (*Complete Neglect of Differential Overlap*), sendo os métodos NDDO os que desconsideram o menor número de integrais, os métodos CNDO os que desconsideram o maior número de integrais e os métodos INDO intermediários a eles, conforme sugerem os nomes.⁴⁵ O procedimento de aproximação de integrais e do termo de repulsão *core-core* é chamado parametrização e visa corrigir o erro introduzido pela desconsideração de integrais, sendo, justamente, o que dá origem aos diversos métodos SE disponíveis.

No entanto, independente do método SE, todos eles consideram explicitamente apenas os elétrons de valência, que são descritos utilizando-se um número mínimo ou reduzido de funções de base. Em termos práticos, os diversos métodos semi-empíricos disponíveis nada mais são que diferentes parametrizações das diferentes equações provenientes da equação 15 (expressão para o elemento da matriz de Fock), dependendo da aproximação utilizada (NDDO, INDO ou CNDO) e do termo de repulsão *core-core*.

4.4.1) O método MNDO

O método MNDO (*Modified Neglect of Diatomic Overlap*) foi desenvolvido em 1977 e é apresentado na literatura como um dos primeiros métodos SE capazes de fornecer previsões satisfatórias de propriedades moleculares, com um relativamente baixo custo computacional.⁴⁹ O método MNDO pode ser classificado como um método NDDO “modificado”, no sentido de que desconsidera um número menor de integrais do que os métodos NDDO.

Nele, os elementos da matriz de Fock são obtidos por meio da equação 16 e os elétrons de valência são descritos por meio de funções de base s e p, representadas por μ , ν , λ ou σ , que são tomadas como sendo orbitais do tipo Slater.

$$F_{\mu\nu} = h_{\mu\nu} + \sum_{\lambda\sigma}^M D_{\lambda\sigma} \int \mu\nu g_{\lambda\sigma} dv \quad (\text{equação 16})$$

As integrais de caroço são parametrizadas de acordo com as equações 17 e 18, nas quais os subscritos A e B denotam funções de base centradas nos átomos A e B, respectivamente, de modo que a equação 17 corresponde à expressão da integral de caroço quando μ e ν estão centradas em um mesmo átomo e, a equação 18, à expressão da integral quando μ e ν estão centradas em átomos distintos.

$$h_{\mu\nu} = \int \mu_A \left(- \sum_i \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \frac{Z'_A}{R_{iA}} \right) \nu_A dv - \sum_{a \neq A} Z'_a \int \mu_A s_a \nu_A s_a dv \quad (\text{equação 17}),$$

sendo $Z'_a \int \mu_A s_a \nu_A s_a dv$ a energia potencial entre o elétron i e o núcleo a e Z'_A a carga nuclear efetiva do átomo A

$$h_{\mu\nu} = \int \mu_A \nu_B dv \left(\frac{\beta_\mu + \beta_\nu}{2} \right) \quad (\text{equação 18}),$$

sendo β denominado parâmetro de “ressonância atômica”

As integrais de dois elétrons na equação 16 são separadas em integrais de dois elétrons envolvendo um centro (nas quais todas as funções de base em questão estão centradas em um mesmo átomo) e integrais de dois elétrons envolvendo dois centros (nas quais as funções de base estão centradas em dois átomos distintos), sendo que, no método MNDO, tem-se cinco integrais de dois elétrons e um centro e vinte e duas integrais de dois elétrons e dois centros. As integrais de dois elétrons e um centro são calculadas sem aproximações e, as de dois elétrons e dois centros, por meio de aproximações que consideram a interação entre multipolos.

No método MNDO, o termo de repulsão *core-core* é obtido a partir da equação 19, na qual α_A e α_B são parâmetros de ajuste, sendo que termos de repulsão *core-core* envolvendo ligações hidrogênio são obtidos por meio de uma equação específica (equação 20).

$$V_{nn}^{MNDO}(A, B) = Z'_A Z'_B \int s_A s_B s_A s_B dv (1 + e^{-\alpha_A R_{AB}} + e^{-\alpha_B R_{AB}}) \quad (\text{equação 19})$$

$$V_{nn}^{MNDO}(A, H) = Z'_A Z'_H \int s_A s_H s_A s_H dv \left(1 + \frac{e^{-\alpha_A R_{AH}}}{R_{AH}} + e^{-\alpha_B R_{AB}} \right) \quad (\text{equação 20})$$

4.4.2) O método PM6

O método PM6 foi desenvolvido em 2007 por James Stewart e, assim como o método MNDO, é um método SE que tem como base a aproximação NDDO.⁵⁰ Nesse método, os termos de repulsão nuclear para interações específicas, tais como O–H e N–H são calculados através de equações específicas, denominadas correções individuais para a interação *core-core*. No método PM6, a estrutura eletrônica dos elétrons de valência é representada explicitamente por meio de um conjunto de funções de base do tipo Slater, formado por um orbital s, três orbitais p e cinco orbitais d.

Mais especificamente, o método PM6 consiste em um conjunto de parâmetros ótimos para 70 elementos químicos, obtido a partir da minimização de uma função erro. Tal função representa a soma dos quadrados das diferenças entre os valores calculados com o método e os valores tomados como referência, ou seja, obtidos experimentalmente ou calculados utilizando métodos *ab initio* (no caso, HF/6-31G(d), B3LYP/6-31G(d) ou B88-PW91/DZVP), para calores de formação, parâmetros

geométricos, momentos de dipolo e potenciais de ionização de aproximadamente 4.500 espécies, ponderados por um fator apropriado.

O uso de correções individuais para a interação *core-core* e a introdução de orbitais d para a descrição dos elétrons de valência tornam as energias de ligação hidrogênio, obtidas com o método PM6, mais próximas dos respectivos valores de referência. No trabalho de 2007, James Stewart apresentou resultados comparativos de energias de ligação hidrogênio para diferentes sistemas diméricos formados por água (CCSD(T))⁵¹ e para vários outros sistemas diméricos formados por meio do estabelecimento de ligações hidrogênio (B3LYP). Os resultados apresentados mostraram que o método PM6 fornece resultados superiores àqueles obtidos com outros métodos semi-empíricos.

4.5) A Teoria do Funcional da Densidade

A Teoria do Funcional da Densidade (DFT, da sigla em inglês para *Density Functional Theory*) é uma das mais amplamente utilizadas metodologias de Química Teórica. A popularidade desta metodologia se deve a sua capacidade de reproduzir com acurácia propriedades termoquímicas de sistemas variados. A DFT foi desenvolvida nos anos 60, a partir do teorema de Hohenberg e Khon, que diz: “a energia eletrônica do estado fundamental é completamente determinada por sua densidade eletrônica $\rho(\mathbf{r})$ ”.

No entanto, embora tenha sido provado que diferentes densidades eletrônicas fornecem diferentes energias eletrônicas para o estado fundamental, ainda não se conhece a expressão matemática do funcional que relaciona densidade eletrônica e energia eletrônica do estado fundamental. Segundo a DFT, a energia eletrônica E_{DFT} de um sistema molecular se expressa como:

$$E_{\text{DFT}} = T_e[\rho] + E_{\text{ee}}[\rho] + E_{\text{ne}}[\rho],$$

sendo

- $T_e[\rho]$ a energia cinética dos elétrons que compõem o sistema molecular
- $E_{\text{ee}}[\rho]$ a energia de repulsão entre pares de elétrons
- $E_{\text{ne}}[\rho]$ a energia de atração entre pares elétron-núcleo

Em analogia à Teoria de Hartree-Fock, na DFT, o termo de repulsão entre pares de elétrons $E_{ee}[\rho]$ é dividido em duas contribuições, uma de origem clássica (contribuição de Coulomb, $J_{ee}[\rho]$) e outra de origem não-clássica (contribuição de troca, $K_{ee}[\rho]$).⁵² Os funcionais $J_{ee}[\rho]$ e $E_{ne}[\rho]$ são dados pelas seguintes expressões:

$$J_{ee}[\rho] = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \int \int \frac{\rho(\mathbf{r}_i)\rho(\mathbf{r}_j)e^2}{4\pi\epsilon_0|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|} d\mathbf{r}_i d\mathbf{r}_j$$

$$E_{ne}[\rho] = - \sum_{j=1}^N \sum_{i=1}^{N_{at}} \int \frac{Z_i\rho(\mathbf{r}_j)e^2}{4\pi\epsilon_0|\mathbf{R}_i - \mathbf{r}_j|} d\mathbf{r}_j,$$

sendo

- N o número de elétrons que compõem o sistema molecular
- e a carga elétrica elementar, $e = 1,602177 \times 10^{-19} \text{ C}$
- ϵ_0 a permissividade elétrica no vácuo, $\epsilon_0 = 8,854187816 \times 10^{-12} \text{ J}^{-1} \cdot \text{C}^2 \cdot \text{m}$
- N_{at} o número de átomos do sistema
- Z_i o número atômico do átomo i

Utilizando a aproximação de Born-Oppenheimer, a energia total E_T pode ser obtida, então, a partir da expressão a seguir, na qual $E_{nn}(\mathbf{R}_{ij})$ é a energia de repulsão entre pares de núcleos:

$$E_T = E_{DFT} + E_{nn}(\mathbf{R}_{ij})$$

$$E_{nn}(\mathbf{R}_{ij}) = \sum_{i=1}^{N_{at}} \sum_{j>i}^{N_{at}} \frac{Z_i Z_j e^2}{4\pi\epsilon_0 R_{ij}},$$

na qual R_{ij} é a distância entre o par de átomos i e j

De fato, a DFT somente passou a ser utilizável a partir da introdução de orbitais moleculares $\phi_i(\mathbf{r})$ em sua formulação, por Kohn e Sham, dando origem à metodologia

conhecida como KS-DFT.⁵³ Isso é possível dada a relação matemática entre $\rho(\mathbf{r})$ e $\phi_i(\mathbf{r})$.

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

Segundo a KS-DFT, a energia eletrônica $E_{\text{KS-DFT}}$ de um sistema molecular se expressa como:

$$E_{\text{KS-DFT}} = T_{\text{SD}} + J_{\text{ee}}[\rho] + E_{\text{ne}}[\rho] + E_{\text{XC}}[\rho],$$

sendo

- T_{SD} a energia cinética do sistema hipotético composto por elétrons não-interagentes, sendo esta proveniente de um determinante de Slater
- $E_{\text{XC}}[\rho]$ a energia de troca-correlação dos elétrons que compõem o sistema

$$T_{\text{SD}} = -\frac{\hbar}{2m_e} \sum_{j=1}^N \sum_{i=1}^N \int \phi_j^*(\mathbf{r}_i) \nabla_i^2 \phi_j(\mathbf{r}_i) d\mathbf{r}_i,$$

na qual

- $\hbar = h/2\pi$ (sendo h a constante de Planck, $h = 6,6260755 \times 10^{-34} \text{J.s}$)
- m_e é a massa do elétron, $m_e = 9,10939 \times 10^{-31} \text{ kg}$
- ∇_i^2 é o operador laplaciano em coordenadas esféricas para o elétron i

$$E_{\text{XC}}[\rho] = E_{\text{X}} + E_{\text{C}},$$

sendo

- E_{X} a energia de troca entre os elétrons do sistema, $E_{\text{X}} \equiv E_{\text{ee}}[\rho] - J_{\text{ee}}[\rho] = K_{\text{ee}}[\rho]$
- E_{C} a energia de correlação dos elétrons, $E_{\text{C}} \equiv T_{\text{e}}[\rho] - T_{\text{SD}}$

Na DFT, rigorosamente, a energia de troca-correlação é um funcional único das densidades de spin $\rho_\alpha(\mathbf{r})$ e $\rho_\beta(\mathbf{r})$. No entanto, como a forma analítica deste funcional ainda não é conhecida, na prática, têm sido empregadas formas analíticas aproximadas. As formas mais frequentemente empregadas para as energias de troca (E_X) e de correlação de curto alcance (ou dinâmica) (E_C) são apresentadas a seguir, nas quais σ denota spin α ou β e LSDA significa Aproximação de Densidade de Spin Local (LSDA, *Local Spin Density Approximation*).

Em suma, a energia eletrônica do estado fundamental $E_{\text{KD-DFT}}$ de um sistema molecular composto por N elétrons é dada pela expressão:

$$\begin{aligned}
 E_{\text{KS-DFT}} = & -\frac{\hbar}{2m_e} \sum_{j=1}^N \sum_{i=1}^N \int \phi_j^*(\mathbf{r}_i) \nabla_i^2 \phi_j(\mathbf{r}_i) d\mathbf{r}_i \\
 & + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \iint \frac{\rho(\mathbf{r}_i)\rho(\mathbf{r}_j)e^2}{4\pi\epsilon_0|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|} d\mathbf{r}_i d\mathbf{r}_j \\
 & - \sum_{j=1}^N \sum_{i=i}^{N_{\text{at}}} \int \frac{Z_i\rho(\mathbf{r}_j)e^2}{4\pi\epsilon_0|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|} d\mathbf{r}_j + E_{\text{XC}}[\rho]
 \end{aligned} \tag{equação 21}$$

Desde seu surgimento, a DFT tem passado por vários aprimoramentos, sendo a introdução de gradientes da densidade eletrônica – gerando os Métodos Gradiente-Corrigidos (GGA, *Generalized Gradient Approximations*) puros ou híbridos – um dos mais significativos. No entanto, uma deficiência comum a todos os métodos GGA é a incapacidade de descrever a energia de correlação eletrônica de longo alcance (ou estática). Isso, simplesmente, pelo fato de que este termo de correlação é desconsiderado na construção dos funcionais de troca-correlação. A energia de correlação estática é responsável pelas interações dispersivas de van der Waals, fundamentais para a manutenção da estrutura de moléculas tais como DNA e proteínas, para a formação de agregados moleculares diversos e para a interação entre moléculas distintas.

Uma das formas de corrigir esta deficiência baseia-se na adição de um termo empírico de longo alcance à energia calculada segundo a metodologia KS-DFT. A metodologia denominada Teoria do Funcional da Densidade Corrigida para Interações

Dispersivas (DFT-D, *Density Functional Theory Dispersive Corrected*) é uma das mais aplicadas e testadas devido a sua relativa acurácia e baixo custo computacional.⁵⁴ Na presente tese, a correção dispersiva de Grimme⁵⁵ foi utilizada em conexão com o funcional de troca-correlação GGA de Becke⁵⁶, introduzido em 1997.

4.5.1) As equações de Kohn-Sham

Uma vez escolhido o funcional de troca-correlação para um dado sistema molecular, a aplicação do princípio variacional à energia eletrônica $E_{\text{KS-DFT}}$ conduz a um conjunto de equações de pseudo-autovalor denominadas equação de Kohn-Sham.

$$h_i^{\text{KS}} \phi_i(\mathbf{r}_i) = \varepsilon_i \phi_i(\mathbf{r}_i)$$

$$h_i^{\text{KS}} = -\frac{\hbar}{2m_e} \nabla_i^2 + \sum_{j>i}^N \int \frac{\rho(\mathbf{r}_j) e^2}{4\pi\epsilon_0 |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|} d\mathbf{r}_j - \sum_{j=1}^{\text{Nat}} \frac{Z_j e^2}{4\pi\epsilon_0 |\mathbf{R}_j - \mathbf{r}_i|} + V_{\text{XC}}(\mathbf{r}_i)$$

$$V_{\text{XC}}(\mathbf{r}_i) = \frac{\partial E_{\text{XC}}[\rho]}{\partial \rho(\mathbf{r}_i)}$$

A resolução auto-consistente das equações de Kohn-Sham fornece o conjunto de orbitais moleculares $\phi_i(\mathbf{r}_i)$, os quais, substituídos na equação 21, permitem a obtenção da energia eletrônica $E_{\text{KS-DFT}}$.

4.5.2) O funcional B97

Segundo Becke, um dos mais expressivos pesquisadores dedicados à obtenção de funcionais de troca-correlação, a energia de correlação dinâmica entre elétrons de spins paralelos ($E_{C,\alpha\alpha}$ e $E_{C,\beta\beta}$) deve ser tratada separadamente daquela entre elétrons de spins anti-paralelos ($E_{C,\alpha\beta}$).⁵⁷

$$E_X^{\text{GGA}} = \sum_{\sigma} \int e_{X,\sigma}^{\text{LSDA}}(\rho_{\sigma}) g_{X,\sigma}(s_{\sigma}^2) s_{\sigma}^2 d\mathbf{r}$$

$$E_C^{GGA} = \sum_{\sigma\sigma} E_{C,\sigma\sigma}^{GGA} + E_{C,\alpha\beta}^{GGA} = \sum_{\sigma\sigma} \int e_{C,\sigma\sigma}^{\text{LSDA}}(\rho_\sigma) g_{C,\sigma\sigma}(s_\sigma^2) s_\sigma^2 d\mathbf{r} \\ + \int e_{C,\alpha\beta}^{\text{LSDA}}(\rho_\alpha, \rho_\beta) g_{C,\alpha\beta}(s_{\text{avg}}^2) s_{\text{avg}}^2 d\mathbf{r}$$

Nas equações anteriores, os termos $e_{X,\sigma}^{\text{LSDA}}$, $e_{C,\sigma\sigma}^{\text{LSDA}}$ e $e_{C,\alpha\beta}^{\text{LSDA}}$ representam a energia (por volume) de troca dos elétrons de spin σ ⁵⁸, a energia de correlação dinâmica (por volume) entre elétrons de spins paralelos $\sigma\sigma$ ⁵⁹ e a energia de correlação dinâmica (por volume) entre elétrons de spins anti-paralelos $\alpha\beta$ ⁵⁷. Já os termos $g_{X,\sigma}$, $g_{C,\sigma\sigma}$ e $g_{C,\alpha\beta}$ são fatores de correção para os gradientes das densidades de spin s_σ . A LSDA assume que as densidades de spin ρ_α e ρ_β podem ser tratadas através do modelo de gás uniforme de elétrons de Thomas-Fermi, ou seja, que as densidades de spin são funções que variam local e suavemente.

$$e_{X,\sigma}^{\text{LSDA}}(\rho_\sigma) = -\frac{3}{2} \left(\frac{3}{4\pi} \right)^{1/3} \rho_\sigma^{4/3}$$

$$e_{C,\sigma\sigma}^{\text{LSDA}}(\rho_\sigma) = e_C^{\text{LSDA}}(\rho_\sigma, 0)$$

$$e_{C,\alpha\beta}^{\text{LSDA}}(\rho_\alpha, \rho_\beta) = e_C^{\text{LSDA}}(\rho_\alpha, \rho_\beta) - e_C^{\text{LSDA}}(\rho_\alpha, 0) - e_C^{\text{LSDA}}(\rho_\beta, 0)$$

$$s_\sigma = \frac{|\nabla\rho_\sigma|}{\rho_\sigma^{4/3}}$$

$$s_{\text{avg}} = \sqrt{\frac{s_\alpha^2 + s_\beta^2}{2}}$$

O funcional de troca-correlação introduzido por Becke, em 1997, se utiliza da mesma expressão para a energia de correlação dinâmica de um gás uniforme de elétrons $\epsilon_C^{\text{VWN}}(r_s, \xi)$ obtida por Vosko, Wilk e Nusair (VWN), em 1980.⁶⁰ No entanto, ao invés das expressões complicadas obtidas por VWN para os termos $\epsilon_C(r_s, 0)$, $\alpha_C(r_s)$ e $\epsilon_C(r_s, 1)$ que compõem a energia de um gás uniforme de elétrons, Becke se utiliza de expressões

mais simples, obtidas por Perdew e Wang (PW).⁶¹ Na notação utilizada por VWN e PW, $\varepsilon_C^{\text{VWN}}(r_s, \xi)$ denota a energia de correlação dinâmica (por partícula) e as variáveis r_s (raio do volume efetivo ocupado por um elétron) e ξ (polarização de spin) relacionam-se com as densidades de spin ρ_α e ρ_β . A energia de correlação por volume ε_C relaciona-se com a energia de correlação por partícula ε_C através da relação $\varepsilon_C = \rho \varepsilon_C$, na qual ρ denota densidade de spin.

$$\varepsilon_C^{\text{VWN}}(r_s, \xi) = \varepsilon_C(r_s, 0) + \alpha_C(r_s) \left[\frac{f(\xi)}{f''(0)} \right] (1 - \xi^4) + [\varepsilon_C(r_s, 1) - \varepsilon_C(r_s, 0)] f(\xi) \xi^4$$

$$r_s = \left[\frac{3}{4\pi(\rho_\alpha + \rho_\beta)} \right]^{1/3}$$

$$\xi = \frac{\rho_\alpha - \rho_\beta}{\rho_\alpha + \rho_\beta}$$

$$f(\xi) = \frac{[(1 + \xi)^{4/3} + (1 - \xi)^{4/3} - 2]}{(2^{4/3} - 2)}$$

$$G(r_s, A, \alpha_1, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, p) =$$

$$-2A(1 + \alpha_1 r_s) \ln \left\{ 1 + \frac{1}{2A[\beta_1 r_s^{1/2} + \beta_2 r_s + \beta_3 r_s^{3/3} + \beta_4 r_s^{(p+1)}]} \right\}$$

Os termos $\varepsilon_C^{\text{PW}}(r_s, 0)$, $\alpha_C^{\text{PW}}(r_s)$ e $\varepsilon_C^{\text{PW}}(r_s, 1)$ obtidos por Perdew e Wang são provenientes da função multiparamétrica $G(r_s, A, \alpha_1, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, p)$, cujos parâmetros são dados na tabela a seguir.

Tabela 3. Parâmetros do funcional B97.

	$\epsilon_{\text{C}}^{\text{PW}}(\mathbf{r}_s, \mathbf{0})$	$-\alpha_{\text{C}}^{\text{PW}}(\mathbf{r}_s)$	$\epsilon_{\text{C}}^{\text{PW}}(\mathbf{r}_s, \mathbf{1})$
A	0,031091	0,016887	0,015545
α_1	0,082477	0,028829	0,035374
β_1	5,1486	10,357	6,4869
β_2	1,6483	3,6231	1,3083
β_3	0,23647	0,47990	0,15180
β_4	0,20614	0,12279	0,082349
P	0,75	1,00	0,75

Na DFT-D desenvolvida por Grimme, os termos $g_{X,\sigma}(s_\sigma^2)$, $g_{C,\sigma\sigma}(s_\sigma^2)$ e $g_{C,\alpha\beta}(s_{\text{avg}}^2)$ são expandidos em uma série de potências, conforme apresentado nas equações a seguir.

$$g_{X,\sigma}(s_\sigma^2) = \sum_{j=0}^k c_{jX,\sigma} [u_{X,\sigma}(s_\sigma^2)]^j, \quad k = 2$$

$$g_{C,\sigma\sigma}(s_\sigma^2) = \sum_{j=0}^k c_{jC,\sigma\sigma} [u_{C,\sigma\sigma}(s_\sigma^2)]^j, \quad k = 2$$

$$g_{C,\alpha\beta}(s_{\text{avg}}^2) = \sum_{j=0}^k c_{jC,\alpha\beta} [u_{C,\alpha\beta}(s_{\text{avg}}^2)]^j, \quad k = 2$$

Os parâmetros lineares c_j nas equações anteriores são determinados através de um procedimento de minimização via método dos mínimos quadrados, incluindo as respectivas correções dispersivas, enquanto os termos $u(s^2)$ são os mesmos reportados no trabalho de Becke.

$$u_{X,\sigma}(s_\sigma^2) = \frac{\gamma_{X,\sigma} s_\sigma^2}{1 + \gamma_{X,\sigma} s_\sigma^2}, \quad \gamma_{X,\sigma} = 0,004$$

$$u_{C,\sigma\sigma}(s_{\sigma}^2) = \frac{\gamma_{C,\sigma\sigma} s_{\sigma}^2}{1 + \gamma_{C,\sigma\sigma} s_{\sigma}^2}, \quad \gamma_{C,\sigma\sigma} = 0,2$$

$$u_{C,\alpha\beta}(s_{\text{avg}}^2) = \frac{\gamma_{C,\alpha\beta} s_{\text{avg}}^2}{1 + \gamma_{C,\alpha\beta} s_{\text{avg}}^2}, \quad \gamma_{C,\alpha\beta} = 0,006$$

4.5.3) A DFT Corrigida para Interações Dispersivas

Os resultados obtidos com a DFT indicam que a descrição dos termos de troca e correlação que compõem a energia de sistemas moleculares é problemática e insuficiente. Quase a totalidade dos funcionais de troca-correlação gradiente-corrigidos são incapazes de descrever interações dispersivas (tal como reportado nas referências 62, 63 e 64), de modo que este parece ser um efeito proveniente, exclusivamente, da correlação entre os elétrons.

Embora este problema tenha se tornado um dos grandes desafios da DFT, ainda parece ser um grande desafio modificar o esquema de KS para que este seja capaz de contabilizar tais interações. Segundo Grimme, qualquer tentativa não-empírica de introduzir interações dispersivas na DFT forneceria métodos tão complexos quanto os métodos de correlação eletrônica baseados no formalismo de função de onda.⁵⁴ No entanto, a adição de um termo dispersivo empírico E_{disp} da forma C_6R^{-6} (sendo C_6 constantes denominadas coeficientes de dispersão e R as distâncias interatômicas) à energia calculada segundo o método KS-DFT tem demonstrado ser uma saída pragmática para remediar este problema.^{65,66} Esta é a base dos métodos DFT-D, nos quais a energia total de um sistema molecular $E_{\text{DFT-D}}$ é calculada como:

$$E_{\text{DFT-D}} = E_{\text{KS-DFT}} + E_{\text{disp}},$$

sendo $E_{\text{KS-DFT}}$ a energia auto-consistente de Kohn-Sham e

$$E_{\text{disp}} = -s_6 \sum_{i=1}^{N_{\text{at}}-1} \sum_{j=i+1}^{N_{\text{at}}} \frac{C_6^{ij}}{R_{ij}^6} f_{\text{dmp}}(R_{ij}),$$

na qual

- s_6 é um fator de escalonamento dependente do método de DFT escolhido (para o método B97-D, $s_6 = 1,25$)⁵⁵
- C_6^{ij} é o coeficiente de dispersão do par de átomos ij
- R_{ij} é a distância interatômica entre os átomos i e j
- $f_{\text{dmp}}(R_{ij})$ é uma função de amortecimento cujo papel é evitar descontinuidades na energia para distâncias interatômicas inferiores às distâncias de van der Waals

As expressões para C_6^{ij} e $f_{\text{dmp}}(R_{ij})$ são as seguintes:⁵⁵

$$C_6^{ij} = \sqrt{C_6^i C_6^j},$$

sendo C_6^a o coeficiente atômico do átomo a

$$f_{\text{dmp}}(R_{ij}) = \frac{1}{1 + e^{-d(R_{ij}/R_T - 1)}},$$

sendo R_T o somatório dos raios atômicos de van der Waals R_0

Os coeficientes atômicos C_6 e os raios atômicos de van der Waals R_0 para os átomos que compõem o sistema em estudo na presente tese são reportados na tabela a seguir.⁵⁵

Tabela 4. Coeficientes atômicos C_6 e os raios atômicos de van der Waals R_0 para os átomos que compõem o sistema em estudo, nos cálculos B97-D.

Átomo	C_6 (J.nm ⁶ .mol ⁻¹)	R_0 (Å)
C	1,75	1,452
H	0,14	1,001
N	1,23	1,397
O	0,70	1,342
P	7,84	1,705

5. METODOLOGIA

A metodologia utilizada para o estudo da interação dissacarídeo-membrana fosfolipídica demandou a obtenção de um protótipo de membrana fosfolipídica (PMF), uma vez que os dissacarídeos escolhidos para o referido estudo (trealose, maltose e celobiose) já foram descritos em trabalhos anteriores.⁶⁷ O protótipo de membrana fosfolipídica consistiu em um sistema dimérico composto por duas moléculas de 2R,3-dioctanoil-glicero-1-fosforilcolina (DOcPC). A escolha de um sistema dimérico se deu com base no estudo de Hauser e colaboradores, no qual os autores reportam que, em aglomerados cristalinos de fosfolipídios de colina, observa-se a ocorrência de células unitárias formadas por duas moléculas.⁶⁸

Sendo assim, na presente tese, o estudo da interação dissacarídeo-PMF se deu em seis etapas, conforme descrito a seguir:

Etapa 1) seleção do método computacional,

Etapa 2) avaliação das interações dispersivas descritas pelo método,

Etapa 3) obtenção dos sistemas monoméricos,

Etapa 4) obtenção do sistema dimérico (PMF),

Etapa 5) estudo da interação dissacarídeo-PMF e

Etapa 6) comparação com dados experimentais.

Etapa 1) Seleção do método computacional

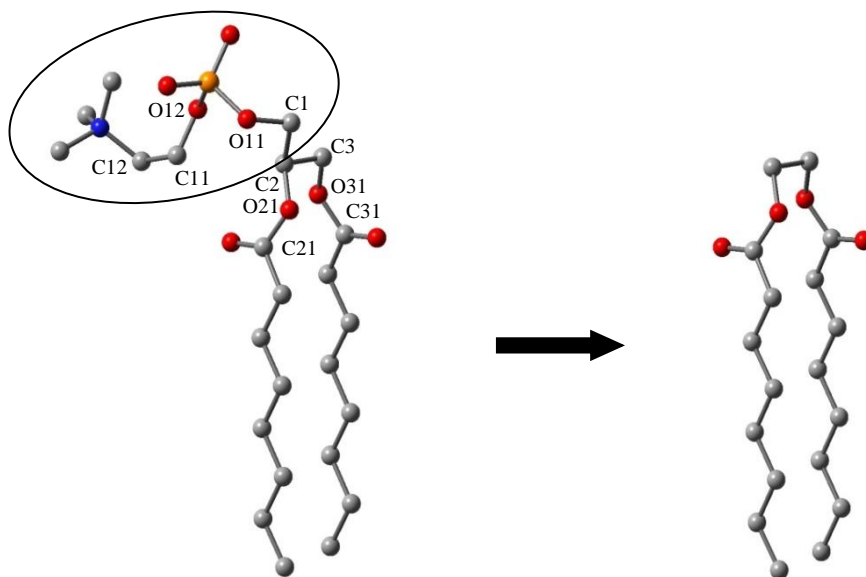
Sabendo que as interações dispersivas são predominantes entre as porções hidrofóbicas dos fosfolipídios, se faz necessário selecionar um método capaz de descrever apropriadamente tal tipo de interação. Dentre os métodos disponíveis que incluem efeito de correlação eletrônica, temos os métodos *ab initio* de alta exatidão, tais como os métodos de *Coupled Cluster* (CC)⁶⁹, e os menos exatos, tais como os métodos baseados na Teoria da Perturbação de Møller-Plesset (MP)⁷⁰, todos eles bastante custosos computacionalmente e proibitivos para sistemas de grandes dimensões, tais como os fosfolipídios. Na complementaridade desses métodos, temos os métodos baseados na Teoria do Funcional da Densidade (DFT), desenvolvida nos anos 60 a partir do teorema de Hohenberg e Kohn.⁷¹

Os métodos baseados na DFT permitem a descrição de sistemas de grandes dimensões em um amplo contexto, com um custo computacional razoável e, segundo Bauschlicher *et alli*⁷² e Martin⁷³, parecem ser menos dependentes do conjunto de funções de base escolhido para a descrição da densidade eletrônica do que alguns métodos modernos baseados em funções de onda. No entanto, o tratamento de interações intermoleculares geralmente é restrito a uma determinada combinação de funcionais e seus respectivos conjuntos de funções de base, uma vez que os métodos são parametrizados para a descrição de sistemas particulares. Além disso, é bem sabido que métodos convencionais da DFT nem sempre são capazes de descrever de maneira correta as interações dispersivas, de modo que uma variedade de métodos para o tratamento de interações dispersivas tem sido desenvolvida. Tais métodos incluem desde o uso de funcionais especializados até o uso de correções empíricas para a energia de dispersão.

Sendo assim, levando em consideração os quesitos “dimensão do sistema em estudo” e “custo computacional”, optou-se por utilizar um método baseado na DFT. Já para a seleção do funcional a ser utilizado na descrição dos sistemas – que deve ser capaz de fornecer resultados geométricos e energéticos coerentes para a porção hidrofóbica, para a porção hidrofílica, bem como para uma molécula inteira de fosfolípido – realizou-se um estudo considerando somente a porção hidrofóbica dos fosfolípidos, admitindo que a descrição da porção hidrofílica realizada em trabalho anterior⁷⁸ não seria significativamente alterada quando na junção das porções hidrofóbica e hidrofílica, para a formação de uma molécula de fosfolípido (DOcPC).

Nesse estudo, uma molécula de dioctanoil-etano (DOcEt) isolada, denominada “mono-8C” (Figura 5), foi tomada como conformação de partida para a construção de sistemas moleculares cujas geometrias foram totalmente otimizadas em quatro níveis de cálculo distintos. A conformação de partida do mono-8C apresentava cadeias carbônicas totalmente estendidas e ângulos diedros θ_4 e ϕ , definidos pelas sequências de átomos O21–C2–C3–O31 e O–C21–C31–O, iguais a 60° e 180° , respectivamente. Conforme pode ser visto na Figura 5, a DOcEt corresponde exatamente à porção hidrofóbica do fosfolípido DOcPC, sendo obtida pela substituição da porção hidrofílica metil-fosforilcolina (MePC) por um átomo de hidrogênio.

Figura 5. DOcPC e DOcEt (mono-8C). Os átomos de hidrogênio foram omitidos para facilitar a visualização.



A construção do primeiro sistema molecular se deu através da adição de dois grupamentos metil à conformação de partida do mono-8C, um em cada cadeia carbônica e mantendo as cadeias totalmente estendidas, gerando o sistema denominado “mono-9C”. Já a construção do segundo sistema molecular se deu através do mesmo procedimento, porém adicionando quatro grupamentos metil (mono-10C). O procedimento citado foi repetido sistematicamente até a obtenção de um sistema contendo dezesseis átomos de carbono em cada cadeia carbônica (mono-16C), totalizando nove sistemas moleculares, incluindo-se o sistema mono-8C.

Os funcionais utilizados foram PBE, B97-1 e HCTH/407, apresentados no trabalho de Johnson e colaboradores como adequados para a descrição de sistemas diméricos homomoleculares e que interagem por meio de forças de van der Waals.⁷⁴ O quarto funcional utilizado foi o funcional de Becke, acrescido de um termo empírico para a energia de dispersão (B97-D). Peverati e Baldrige demonstraram que esse funcional e o conjunto de funções de base cc-pDZV apresentam bom desempenho para a descrição da energia de interação entre sistemas nos quais predominam forças dispersivas.⁷⁵ Todos os cálculos de otimização de geometria foram realizados utilizando o conjunto de funções de base gaussianas de Pople 6-31G(d,p)^{76,77} e o programa computacional GAMESS, em sua versão de 2011, sendo adotados o critério de

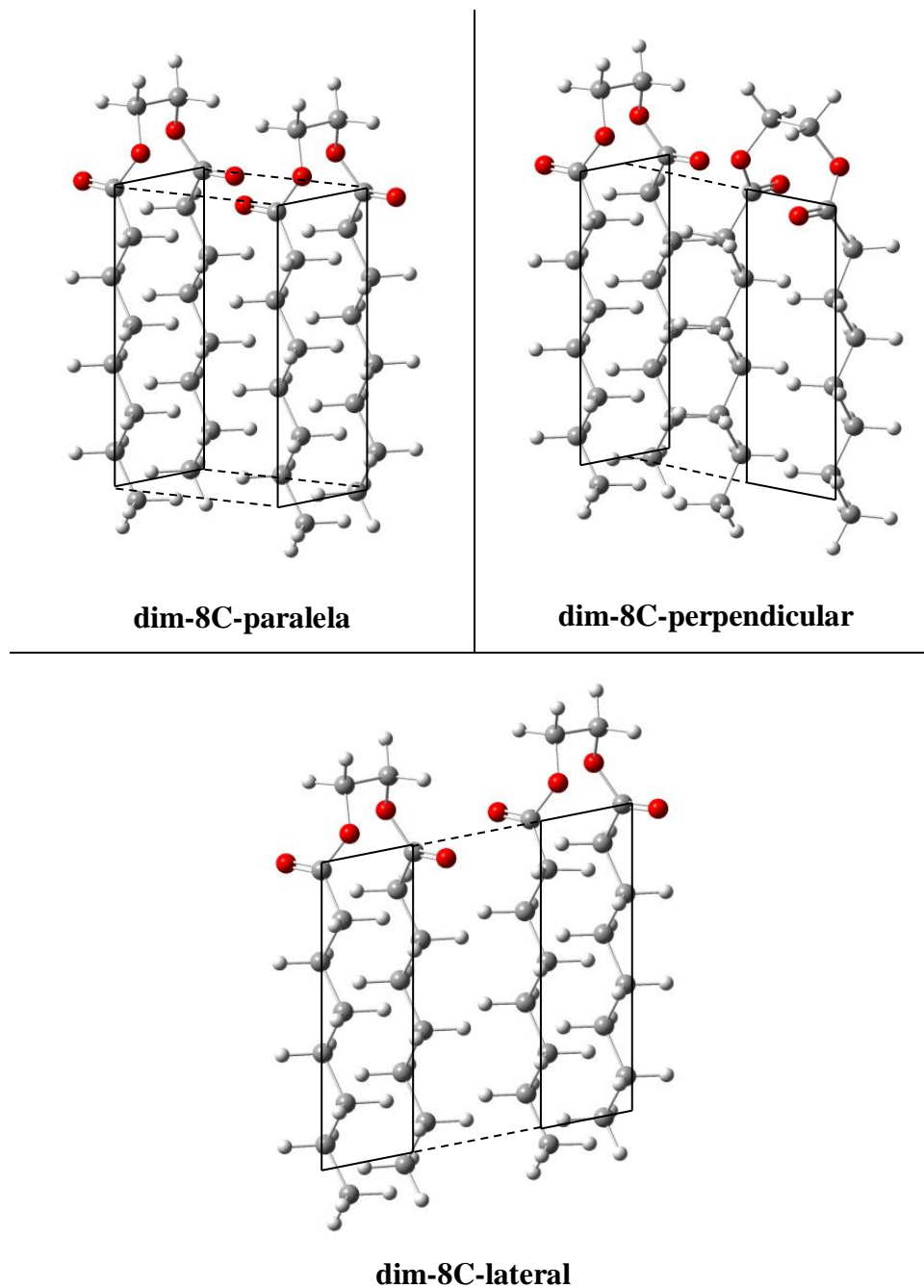
convergência “gradiente máximo = 0,00010 Hartree/Bohr” e o passo de integração numérica padrão do programa.

Etapa 2) Avaliação das interações dispersivas

A fim de avaliar o comportamento das energias de interação obtidas utilizando-se o funcional selecionado, foram construídos dímeros distintos, através da aproximação de dois monômeros iguais totalmente otimizados (mono-8C), em três formas de aproximação diferentes, a saber: paralela, perpendicular e lateral. Ambos os dímeros tiveram suas geometrias totalmente otimizadas, gerando os sistemas denominados dim-8C-paralela, dim-8C-perpendicular e dim-8C-lateral, que foram utilizados como geometrias de partida para a avaliação de sistemas moleculares de complexidade crescente. Os monômeros aproximados paralelamente foram construídos de modo a favorecer a interação entre quatro cadeias carbônicas. Os monômeros aproximados perpendicularmente foram construídos de modo a favorecer a interação entre três cadeias carbônicas. Finalmente, os monômeros aproximados lateralmente foram construídos de modo a favorecer a interação entre duas cadeias carbônicas, conforme pode ser visto na Figura 6.

A seguir, foram adicionados quatro grupamentos metil, um em cada cadeia carbônica, às geometrias otimizadas dos sistemas dim-8C-paralela, dim-8C-perpendicular e dim-8C-lateral, gerando dímeros contendo nove átomos de carbono em cada uma das cadeias carbônicas, cujas geometrias foram totalmente otimizadas. O referido procedimento foi repetido sequencialmente, para as três orientações de aproximação, até que fossem obtidos dímeros contendo dezesseis átomos de carbono em cada uma das cadeias carbônicas. Todos os cálculos de otimização de geometria foram realizados através do programa computacional GAMESS, em sua versão de 2011, utilizando-se o critério de convergência e o passo de integração numérica padrões do programa, o funcional B97-D e o conjunto de funções de base de Dunning, cc-pDZV.

Figura 6. Geometrias de partida para os dímeros de orientação paralela, perpendicular e lateral. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para facilitar a visualização.



Os cálculos das energias de interação foram feitos desconsiderando-se o erro de superposição das funções bases, tendo em vista que o objetivo desse estudo foi avaliar os perfis das energias de interação obtidas em nível B97-D/cc-pDZV, em função do tamanho e da quantidade de cadeias carbônicas efetivamente interagentes (diferentes orientações de aproximação). A equação utilizada para o cálculo das energias de interação é apresentada a seguir.

$$\Delta E_{\text{inter}} = |E_{\text{dímero}} - 2E_{\text{monômero}}| \quad (\text{equação 22})$$

- ΔE_{inter} é a energia de interação entre os monômeros
- $E_{\text{dímero}}$ é a energia do dímero
- $E_{\text{monômero}}$ é a energia do respectivo monômero

Cabe destacar que, segundo a definição, energia de interação é a energia associada à formação de um sistema complexo a partir da interação de dois ou mais monômeros, exatamente como descrito na equação 22. Dessa forma, se faz necessário esclarecer por que os dímeros considerados na presente etapa não foram obtidos a partir de seus respectivos monômeros, visto que os mesmos já tinham sido investigados na etapa 1 desse trabalho (seleção do método computacional).

De fato, a densidade de mínimos na superfície de energia potencial de um determinado sistema molecular cresce exponencialmente com o número de variáveis (ou número de átomos)⁵², de modo que a obtenção de um determinado ponto estacionário depende fortemente da escolha da estrutura de partida. Sendo assim, é preciso refletir sobre o quão diferentes podem ser os dímeros obtidos conforme descrito anteriormente (crescimento sistemático e sequencial das cadeias carbônicas) e aqueles que seriam obtidos pela aproximação de seus respectivos monômeros.

O problema da obtenção de pontos estacionários em uma superfície de energia potencial densa tal como a dos sistemas biológicos pode ser minimizado se as estruturas de partida escolhidas forem constituídas por fragmentos previamente otimizados. Neste caso, considerando os dímeros com nove átomos de carbono, por exemplo, são duas as possibilidades: partir dos respectivos monômeros otimizados ou do dímero otimizado contendo oito átomos de carbono. Em ambos os casos, as principais coordenadas de otimização são aquelas relacionadas à distância entre os monômeros, pois as possibilidades conformacionais de cada uma dessas unidades são limitadas. Isso se deve à natureza dos monômeros, que são compostos por duas cadeias carbônicas acíclicas, saturadas e totalmente estendidas unidas a um fragmento contendo dois átomos de carbono.

Diante do que acaba de ser exposto, acredita-se que os dímeros obtidos através do crescimento sistemático e sequencial das cadeias carbônicas de dímeros mais simples são equivalentes àqueles que seriam obtidos pela aproximação dos respectivos

monômeros, de modo que o cálculo da energia de interação conforme a equação 22, mesmo quando não se parte dos respectivos monômeros, continua sendo válido. No entanto, em termos de custo computacional, fica claro que a otimização de um dímero cujas distâncias entre os monômeros já tenham sido previamente otimizadas é menos custosa do que aquela na qual se parte dos monômeros correspondentes, mesmo que já otimizados. Dessa forma, para o referido estudo, escolheu-se “crescer os dímeros”, e não “aproximar os monômeros”.

Etapa 3) Obtenção dos sistemas monoméricos

No presente trabalho, a terminologia “sistema monomérico” se refere às conformações mais estáveis para uma molécula isolada de DOcPC. Com o objetivo de obter essas conformações, foram construídas diferentes estruturas de partida para a DOcPC, cujas geometrias foram totalmente otimizadas segundo o método computacional B97-D/cc-pDZV. Nessa etapa, também se utilizou o conjunto de funções de base de Dunning, cc-pDZV, a fim de refinar a descrição energética dos conformeros analisados, conforme sugerido por Peverati e Baldrige.⁷⁵ A construção das estruturas de partida se deu através da ligação de uma molécula de MePC e uma molécula de DOcEt, em três orientações distintas, definidas pelo valor do ângulo diedro θ_1 (O11–C1–C2–C3), que pode ser 60° , 180° e -60° , conforme a Figura 4.

Nesse processo, foram consideradas as conformações mais estáveis, a 25°C e 1 atm, para a MePC e a conformação estável obtida para o sistema mono-8C (DOcEt), descrito na Etapa 1. A obtenção das conformações mais estáveis para a MePC se deu através de cálculos de otimização de geometria seguidos por cálculos para a determinação das frequências vibracionais, em nível B97-D/cc-pDZV, utilizando o programa GAMESS 2011 e tomando como estruturas de partida as conformações cujas populações de Boltzmann são maiores que 1%, segundo Soares e da Silva.⁷⁸

Além disso, foram tomadas as 14 conformações mais estáveis para a 2R,3-ditetradecanoil-glicero-1-fosforilcolina, apresentadas no trabalho de Krishnamurthy e colaboradores.⁷⁹ A fim de comparar o conjunto de conformações estáveis obtido para a DOcPC, utilizando o procedimento supracitado, e o conjunto de conformações apresentado no referido trabalho, as conformações reportadas pelos autores foram totalmente otimizadas utilizando a metodologia B97-D/cc-pDZV e o

programa GAMESS 2011. Cabe esclarecer que, a fim de tornar possível a comparação, as geometrias de partida em questão (apresentadas por Krishnamurthy e colaboradores) tiveram suas cadeias carbônicas reduzidas em seis átomos de carbono, gerando sistemas com oito átomos de carbono correspondentes aos sistemas monoméricos tratados na tese.

Etapa 4) Obtenção do sistema dimérico

Os sistemas diméricos foram construídos a partir das conformações mais estáveis de DOcPC (sistemas monoméricos). Na verdade, foram consideradas a conformação mais estável e todas as outras cujas energias apresentaram-se menores ou iguais a 2,0 kcal/mol, em relação à conformação de mais baixa energia.

A construção dos sistemas diméricos se deu por meio da aproximação de dois sistemas monoméricos iguais, sendo que os valores dos parâmetros geométricos da cadeia α de uma das moléculas do sistema dimérico inicialmente gerado foram invertidos, a fim de obter uma célula unitária formada por duas moléculas cujas conformações das cabeças fosfolipídicas fossem imagens especulares uma da outra. A “inversão” dos valores de α se deu da seguinte maneira: para $\alpha < 0^\circ$, somou-se ao valor do respectivo ângulo diedro o valor de 2α , enquanto que para $\alpha > 0^\circ$, subtraiu-se o valor de 2α .

A aproximação dos sistemas monoméricos foi feita de modo que ambas as unidades monoméricas pudessem interagir entre si por meio de interações eletrostáticas e dispersivas. Segundo esse critério, foram considerados dois tipos de sistemas diméricos: um no qual os sistemas monoméricos foram dispostos de forma a aproximar paralelamente os planos das cadeias carbônicas e outro no qual os sistemas foram dispostos de forma a aproximar lateralmente esses planos.

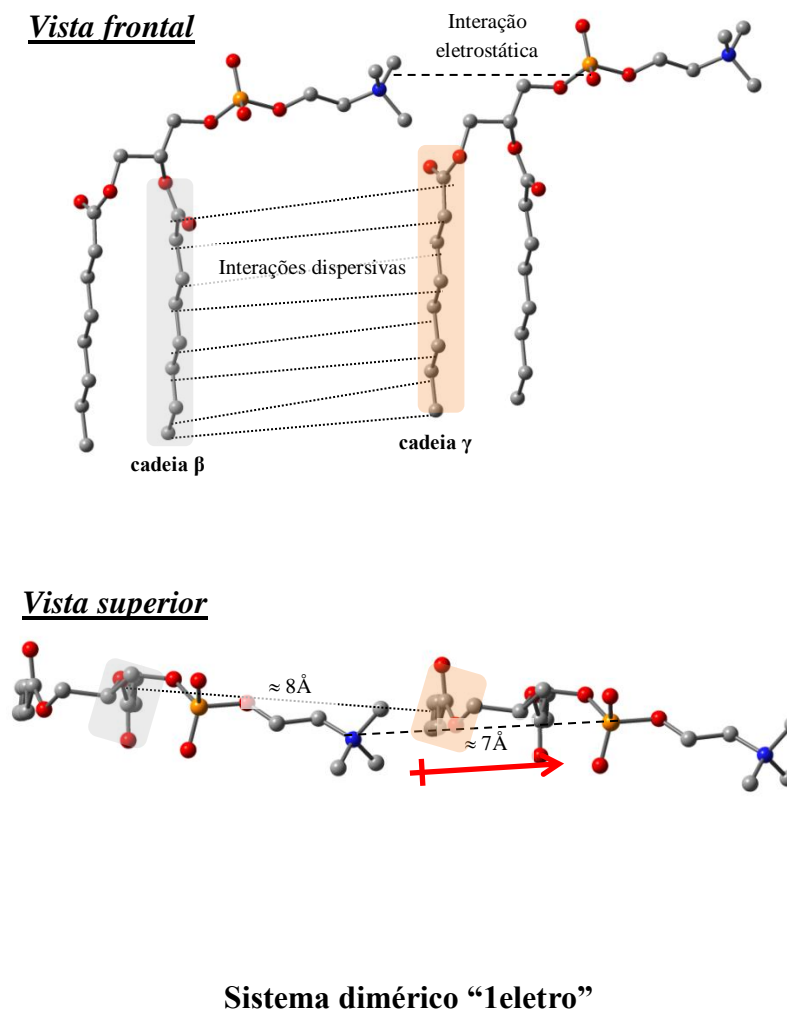
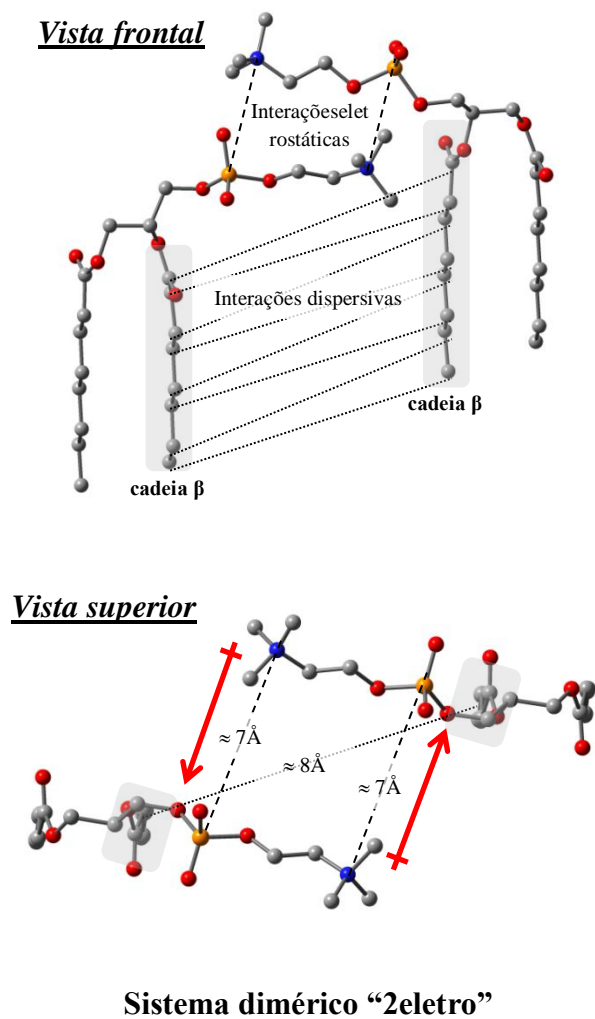
Nessa etapa, diferentemente da situação descrita na Etapa 2, os sistemas diméricos construídos dispendo-se as cadeias carbônicas perpendicularmente entre si não foram considerados, uma vez que tal orientação não favorece o estabelecimento de interações eletrostáticas entre as cabeças fosfolipídicas. Além disso, independentemente da forma de aproximação dos planos das cadeias carbônicas, destaca-se que havia possibilidade de interação efetiva apenas entre duas das quatro cadeias carbônicas, de modo que os sistemas diméricos diferiam entre si apenas pelo número de interações

eletrostáticas possíveis de serem estabelecidas, conforme pode ser visto na Figura 7. Por conta disso, os sistemas diméricos foram identificados em função do número de interações eletrostáticas: sistemas diméricos “2 eletro” ou “1 eletro”, ou seja, nos quais se identificavam duas interações ou uma interação eletrostática, respectivamente.

Posto isso, é importante mencionar que, nessa etapa, identificou-se a necessidade de se ter parâmetros geométricos de referência para construção dos sistemas diméricos. Considerando a menor distância possível entre os sistemas monoméricos, sem que houvesse sobreposição de átomos, as distâncias entre os átomos de P e N (d_{P-N}) foram ajustadas para aproximadamente 7,0 Å e a distância entre as cadeias carbônicas efetivamente interagentes (d_{C-C}) foi ajustada para aproximadamente 8,0 Å. Dessa forma, tais distâncias foram selecionadas como parâmetros geométricos de referência para a construção das geometrias de partida dos sistemas diméricos considerados.

Após a construção dos sistemas diméricos, os mesmos tiveram suas geometrias otimizadas, utilizando o método semi-empírico denominado PM6⁵⁰ e o programa Gaussian 2009. Então, muito embora a metodologia DFT B97-D/cc-pDZV tenha sido selecionada para o estudo do sistema de interesse (sistema dimérico composto por duas moléculas de DOcPC), o tratamento desse sistema utilizando a referida metodologia mostrou-se totalmente impraticável, considerando os recursos computacionais disponíveis. Diante disso, mesmo sabendo das possíveis implicações decorrentes dessa considerável mudança de método, o entendimento de que a avaliação da metodologia proposta para abordagem do problema de interesse (interação dissacarídeo-PMF) poderia ocorrer mesmo com uma descrição teórica do sistema menos precisa, permitiu que o estudo continuasse a ser desenvolvido. Tudo com a consciência de que, muito provavelmente, os resultados obtidos com o novo método precisariam, num segundo momento, ser refinados.

Figura 7. Representação dos tipos de sistemas diméricos considerados. A fim de facilitar a visualização, os valores dos parâmetros geométricos das cadeias α de ambas as moléculas foram mantidos iguais e os átomos de hidrogênio foram omitidos. As distâncias representadas correspondem às distâncias de partida médias para os sistemas e, as setas cortadas, aos vetores momento de dipolo.



Etapa 5) Estudo da interação dissacarídeo-PMF

Conforme mencionado no início da seção “Metodologia”, o estudo da referida interação envolveu a análise de sistemas complexos formados por uma molécula de dissacarídeo e por um sistema dimérico formado por duas moléculas de DOcPC. As moléculas de dissacarídeo que foram consideradas correspondem às conformações mais estáveis para uma molécula de trealose, para uma molécula de maltose e para uma molécula de celobiose, quando isoladas, a 25°C e sob pressão de 1 atm.⁶⁷ Tais dissacarídeos foram considerados por serem os mais representativos em se tratando da classe dos dissacarídeos formados por duas unidades de D-glicose, excluindo-se a isomaltose.

Dada a assimetria das moléculas que compõem os sistemas complexos em questão, seria possível obter as mais variadas geometrias para o estudo da interação dissacarídeo-membrana, de modo que foi necessário estabelecer um protocolo para a criação das estruturas de partida a serem consideradas, que será descrito a seguir.

Uma vez selecionado o sistema dimérico a ser considerado no estudo da interação dissacarídeo-protótipo de membrana fosfolipídica (Etapa 4), tomou-se um ponto próximo às cabeças fosfolipídicas, que foi usado como ponto de referência para o posicionamento das moléculas de dissacarídeo. O ponto de referência escolhido foi o ponto médio entre os átomos de nitrogênio “N1” e “N2” dos sistemas monoméricos que constituem o sistema dimérico. Para marcação desse ponto utilizou-se um “átomo fantasma”, denominado “X”, e os sistemas monoméricos foram denominados “sistema monomérico 1” e “sistema monomérico 2”, sendo o sistema monomérico 1 aquele cujos parâmetros geométricos da cadeia α não foram modificados para a construção do sistema dimérico.

Para a construção dos sistemas complexos, inicialmente, as moléculas de dissacarídeo foram posicionadas a 18 Å de distância do átomo X, com os anéis glicosídicos voltados para baixo, tomando-se como referência o átomo de oxigênio da ligação glicosídica, denominado “O”. Tal forma de aproximação foi denominada “baixo”. A distância O–X foi escolhida como parâmetro para definir a distância de aproximação entre o dissacarídeo e o protótipo de membrana fosfolipídica. A seguir, o eixo da ligação entre os carbonos da ligação glicosídica (C1–C1’, no caso da trealose e C1–C4’, para maltose e celobiose) foi alinhado ao eixo da ligação N1–N2, de forma que

cada um dos anéis glicosídicos interagisse com apenas uma das cabeças fosfolipídicas do sistema dimérico. Para a trealose, C1 refere-se ao anel glicosídico no qual os grupamentos hidroxila encontram-se todos no sentido anti-horário e C1' ao anel cujos grupamentos hidroxila encontram-se no sentido horário.⁶⁷

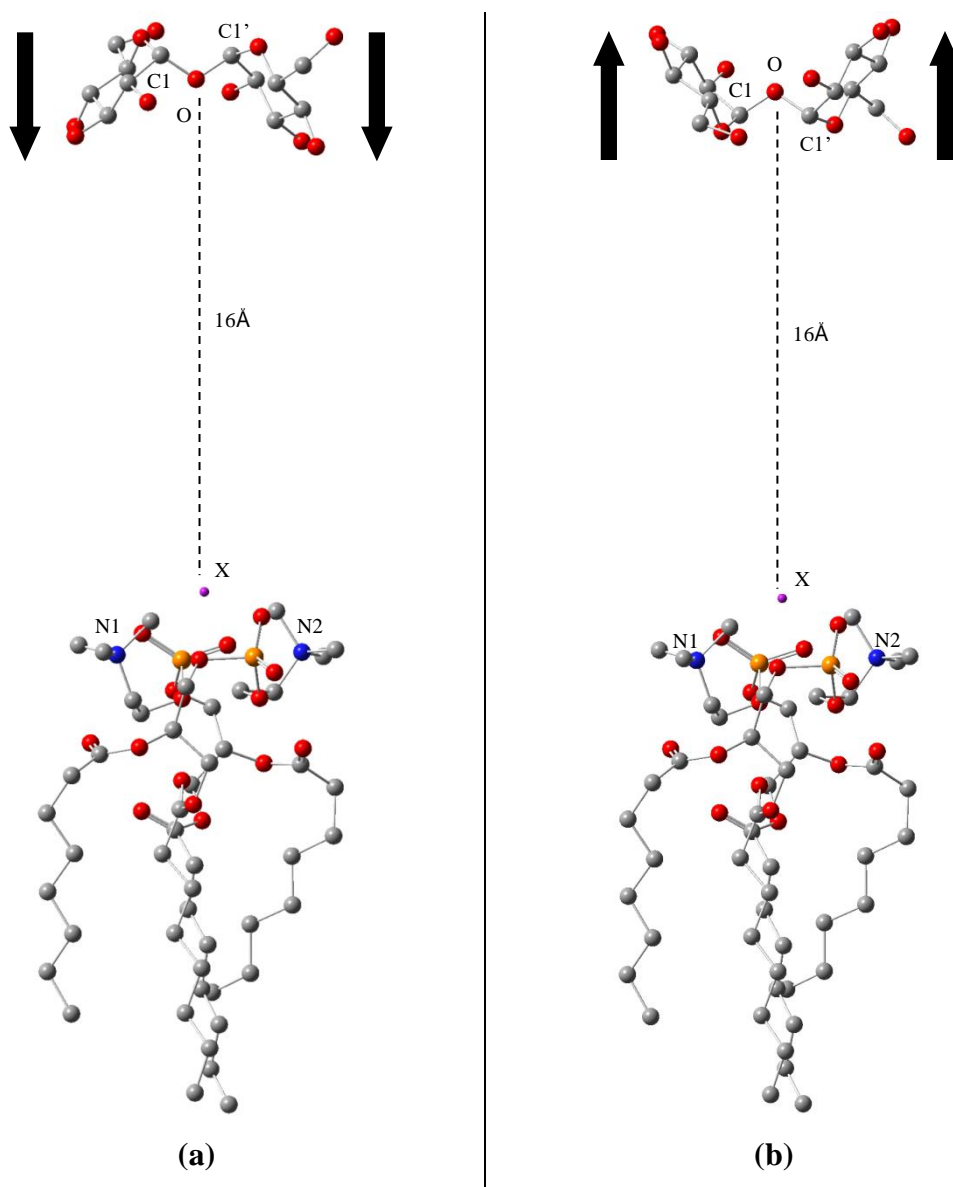
Na sequência, o ângulo plano N1–X–O1 foi ajustado em 90° e o ângulo diedro C12–N1–X–O em aproximadamente 180°, de modo que o eixo da “ligação” O–X ficasse alinhado ao eixo das cadeias carbônicas do sistema dimérico. Por fim, o átomo X foi reposicionado a 2 Å de distância em relação à posição inicial, a fim de que o mesmo não permanecesse no domínio relativo às cabeças fosfolipídicas. Dessa forma, a distância de 16 Å foi tomada como distância de aproximação inicial entre os dissacarídeos e o protótipo de membrana fosfolipídica. A Figura 8 mostra as geometrias iniciais de um dos sistemas complexos considerados, obtidas através das formas de aproximação denominadas “baixo” e “cima”, sendo que nessa última os anéis glicosídicos encontram-se voltados para cima, em relação às cabeças fosfolipídicas do sistema dimérico.

A fim de avaliar como varia a energia de interação dos sistemas complexos em função da distância de aproximação entre os dissacarídeos e o protótipo de membrana fosfolipídica, tais energias foram calculadas para diferentes distâncias de aproximação O–X, que variaram de 16 Å até 2 Å, em intervalos de 2 Å, utilizando-se a metodologia PM6 e o programa Gaussian 2009. Os valores obtidos foram utilizados para a construção de curvas de energia de interação, que tiveram como objetivo indicar as distâncias de aproximação ótimas entre os dissacarídeos e o protótipo de membrana fosfolipídica. Nos casos em que o intervalo mencionado não possibilitou a identificação de pelo menos um ponto de energia mínima, ampliou-se o mesmo para valores menores que 2 Å.

A manutenção das distâncias de aproximação foi garantida por meio da fixação das coordenadas de átomos selecionados, o que foi feito de três maneiras distintas e na sequência a seguir: primeiramente, mantendo as coordenadas dos átomos de oxigênio da ligação glicosídica e X fixadas, depois, mantendo as coordenadas dos átomos de carbono da ligação glicosídica e X fixadas e, por último, mantendo as coordenadas dos átomos de carbono opostos aos carbonos da ligação glicosídica e X fixadas. Dessa forma, foram construídas três curvas de energia de interação para cada sistema complexo, que foram denominadas “Oglico”, “Cglico” e “Copt”, respectivamente,

sendo que a principal diferença entre elas são os graus de liberdade conformacional e translacional conferidos ao dissacarídeo, que foram diminuídos quando se considera a sequência apresentada.

Figura 8. Geometrias de partida de um dos sistemas complexos com trealose considerados. Sistema complexo obtido através da forma de aproximação “baixo” **(a)** e da forma de aproximação “cima” **(b)**.



A construção de três curvas de energia de interação distintas para cada sistema complexo teve como objetivo obter um conjunto maior de estruturas de partida a serem analisadas, de modo que uma amostragem conformacional mais representativa pudesse ser realizada. Finalmente, considerando cada uma das curvas de energia de interação, os sistemas complexos de mais baixa energia foram totalmente otimizados.

Na sequência, considerou-se a segunda forma de aproximação denominada “cima”, cujos sistemas complexos foram obtidos a partir dos respectivos sistemas “baixo” mediante uma rotação de 180° ao longo do eixo que liga os átomos de carbono da ligação glicosídica dos dissacarídeos, seguida de um ajuste para as distâncias O–X, a fim de obter os valores considerados para a construção das curvas de energia de interação. Da mesma forma que para os sistemas “baixo”, foram construídas três curvas de energia de interação para cada sistema “cima” e, a partir delas, foram obtidas as conformações mais estáveis para os respectivos sistemas complexos.

Por fim, cabe mencionar que os cálculos de energia de interação foram feitos paralelamente, ou seja, partindo-se sempre da mesma geometria, e que as coordenadas dos átomos que constituem as porções hidrofóbicas dos fosfolipídios (“fragmentos” DOcEt, Figura 5) foram mantidas fixadas, de forma que somente a molécula de dissacarídeo e as porções hidrofílicas dos fosfolipídios (“fragmentos” MePC, Figura 5) tiveram suas geometrias otimizadas.

Os cálculos da energia de interação dissacarídeo-protótipo de membrana fosfolipídica ($\Delta E_{\text{inter}}^{\text{comp}}$) para cada distância de aproximação foram feitos a partir da seguinte expressão, que leva em consideração a energia do sistema complexo e as energias dos sistemas interagentes isolados, ou seja, afastados por uma distância infinita.

$$\Delta E_{\text{inter}}^{\text{comp}} = E_{\text{complexo}} - (E_{\text{dissacarídeo}} + E_{\text{protótipo}}) \quad (\text{equação 23})$$

- E_{complexo} é a energia do sistema complexo
- $E_{\text{dissacarídeo}}$ é a energia do dissacarídeo
- $E_{\text{protótipo}}$ é a energia do sistema dimérico tomado como PMF

Etapa 6) Comparação com resultados experimentais

Tendo em vista que são muitas as possibilidades de metodologias teóricas a serem empregadas para a descrição de um dado sistema físico, se faz necessário determinar qual delas é a mais adequada ou, pelo menos, fornece resultados minimamente satisfatórios. Assim, em trabalhos teóricos, a etapa de comparação com dados experimentais é fundamental e consiste na comparação entre valores e/ou

tendências observadas para propriedades características do sistema, obtidas teoricamente e experimentalmente. Tal comparação permite concluir se a metodologia empregada é satisfatória para a descrição do sistema.

No presente trabalho, a etapa de comparação com dados experimentais consistiu em verificar a existência de alguma correspondência entre os resultados teóricos obtidos e os resultados experimentais disponíveis na literatura para a frequência de estiramento assimétrico (PO_2^-) do grupo fosfato de fosfolipídios e para a constante de acoplamento de spin heteronuclear ($^3J_{\text{C1,H1}'}$) ao longo da ligação glicosídica da trealose, isso considerando sistemas interagentes, ou seja, nos quais a interação dissacarídeo-fosfolipídio estava presente. Cabe destacar que tais propriedades podem fornecer informações a respeito da especificidade da interação dissacarídeo-fosfolipídio, bem como da geometria assumida pelo dissacarídeo na interação e por isso se prestam a essa etapa de comparação com dados experimentais.

Conforme apresentado na seção Revisão da Literatura, o sinal correspondente à frequência de estiramento assimétrico PO_2^- dos grupos fosfato é notadamente modificado quando se comparam fosfolipídios secos puros e fosfolipídios secos misturados com carboidratos. Isso permite concluir que, considerando a interação carboidrato-fosfolipídio, existem interações específicas envolvendo os grupos fosfato dos fosfolipídios. Dessa forma, acredita-se que uma comparação entre valores teóricos e experimentais pode ser útil para a análise do tipo de interação dissacarídeo-fosfolipídio presente nos sistemas obtidos.

Além disso, a literatura apresenta valores experimentais para a constante de acoplamento de spin $^3J_{\text{C1,H1}'}$ ao longo da ligação glicosídica da trealose, considerando o dissacarídeo em água contendo aglomerados fosfolipídicos. Tendo em vista que tais valores são fortemente dependentes da geometria do dissacarídeo, acredita-se que a comparação entre resultados teóricos e experimentais possa ser importante para verificar uma possível concordância no que diz respeito aos parâmetros geométricos assumidos pelo dissacarídeo quando na interação com fosfolipídios.

Para obtenção das frequências e absorvidades molares características do estiramento assimétrico do grupo fosfato, foram calculadas as frequências vibracionais no infravermelho do PMF isolado e de todos os sistemas interagentes compostos pelos dissacarídeos trealose, celobiose e maltose e o PMF. Tudo considerando o método semi-empírico PM6 e utilizando-se o programa Gaussian 2009. Para obtenção da constante de

acoplamento de spin heteronuclear entre os átomos de carbono C1 e hidrogênio H1' da ligação glicosídica da trealose, utilizou-se a correlação de Karplus apresentada no trabalho de Tvaroška e colaboradores, conforme a equação 24 abaixo.⁸⁰

$${}^3J_{C1,H1'} = 5,7\cos^2\Phi_H - 0,6\cos\Phi_H + 0,5 \quad (\text{equação 24}),$$

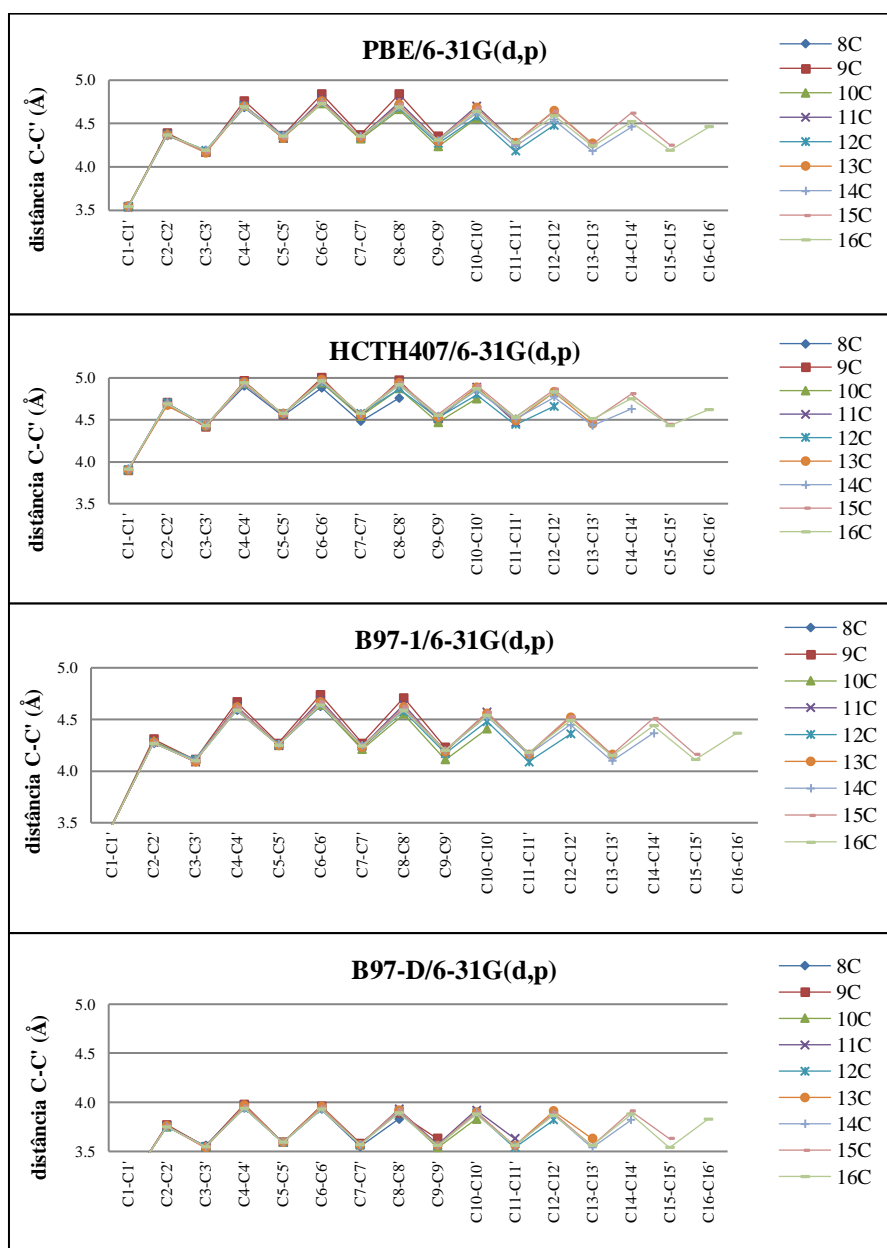
na qual Φ_H é o valor do ângulo diedro formado ao longo das ligações glicosídicas da trealose, definido pela sequência de átomos $\Phi_H = C1-O-C1'-H1'$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Etapa 1) Seleção do método computacional

A seguir, são apresentadas as distâncias entre átomos de carbono adjacentes para os monômeros provenientes do DOcEt, nos quatro níveis de cálculo considerados.

Figura 9. Distâncias entre os átomos de carbono adjacentes dos sistemas mono-8C, mono-9C, mono-10C ... e mono-16C utilizando diferentes métodos.

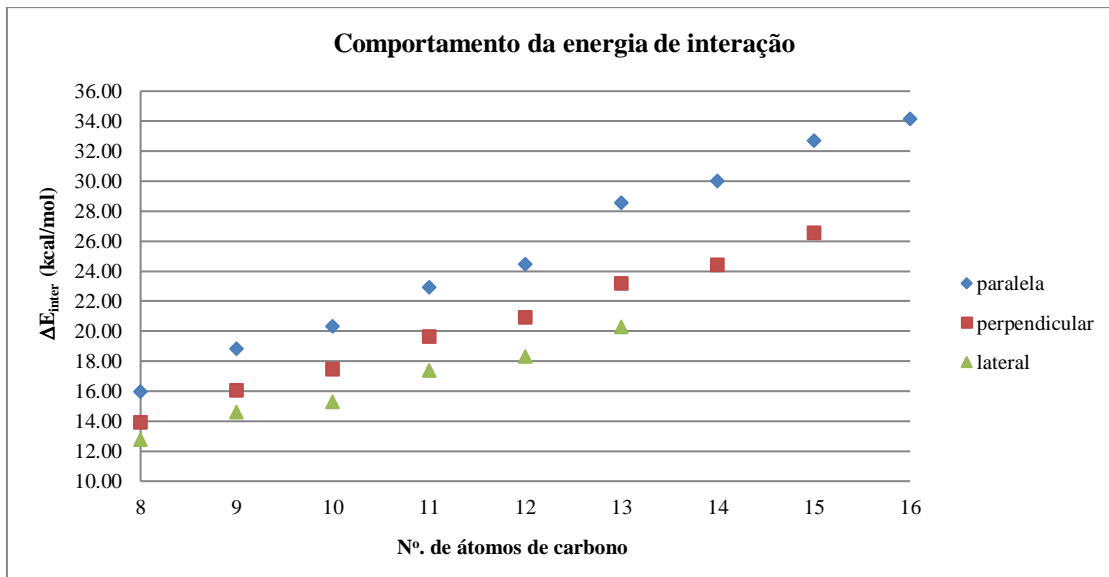


Conforme pode ser visto na Figura 9, as distâncias entre átomos de carbono adjacentes nos monômeros variam entre 3,0 e 5,0 Å, dependendo da metodologia computacional utilizada, sendo as menores distâncias obtidas com o nível de cálculo B97-D/6-31G(d,p). Adotando um critério de escolha geométrico, mas que obviamente se relaciona com a intensidade com que a metodologia descreve as interações dispersivas, a metodologia DFT que emprega o funcional gradiente-corrigido contendo a correção dispersiva de Grimme (B97-D) foi selecionado para a descrição dos sistemas em estudo.

Etapa 2) Avaliação das interações dispersivas

A Figura 10 a seguir apresenta o perfil da energia de interação entre os dímeros considerados, em função do número de átomos de carbono nas cadeias carbônicas e do tipo de aproximação entre os monômeros.

Figura 10. Energias de interação, em kcal/mol, para os dímeros com orientação paralela, perpendicular e lateral.



Conforme mencionado na Etapa 2 da seção Metodologia, a avaliação de diferentes formas de aproximação entre os monômeros teve como objetivo verificar se o método escolhido seria capaz de descrever o comportamento já conhecido das forças dispersivas. Uma vez que os sistemas analisados (dímeros paralelos, dímeros perpendiculares e dímeros laterais) correspondem à interação entre quatro, três e duas

cadeias carbônicas, respectivamente, conforme pode ser visto na Figura 10, o nível de cálculo B97-D/cc-pDZ descreve de maneira satisfatória o comportamento das forças dispersivas. De fato, as energias de interação calculadas para os dímeros paralelos são maiores que as calculadas para os dímeros perpendiculares, que são maiores que as calculadas para os dímeros laterais.

Etapa 3) Obtenção dos sistemas monoméricos

A fim de analisar se a descrição obtida por Soares e da Silva em nível B3LYP/6-31G(d,p) para a porção hidrofílica MePC⁷⁸ se mantém quando na utilização da metodologia B97-D/cc-pDZV, as seis conformações mais estáveis para esse sistema foram tomadas como estruturas de partida em cálculos de otimização de geometria seguidos por cálculos para a determinação das frequências vibracionais, utilizando o funcional B97-D. As conformações estáveis obtidas e suas respectivas abundâncias relativas são apresentada a seguir.

Tabela 5. Conformações estáveis para aMePC, a 25°C e 1 atm, segundo os níveis de cálculo B3LYP/6-31G(d,p)⁷⁸ e B97-D/cc-pDZV. Ângulos diedros em graus.

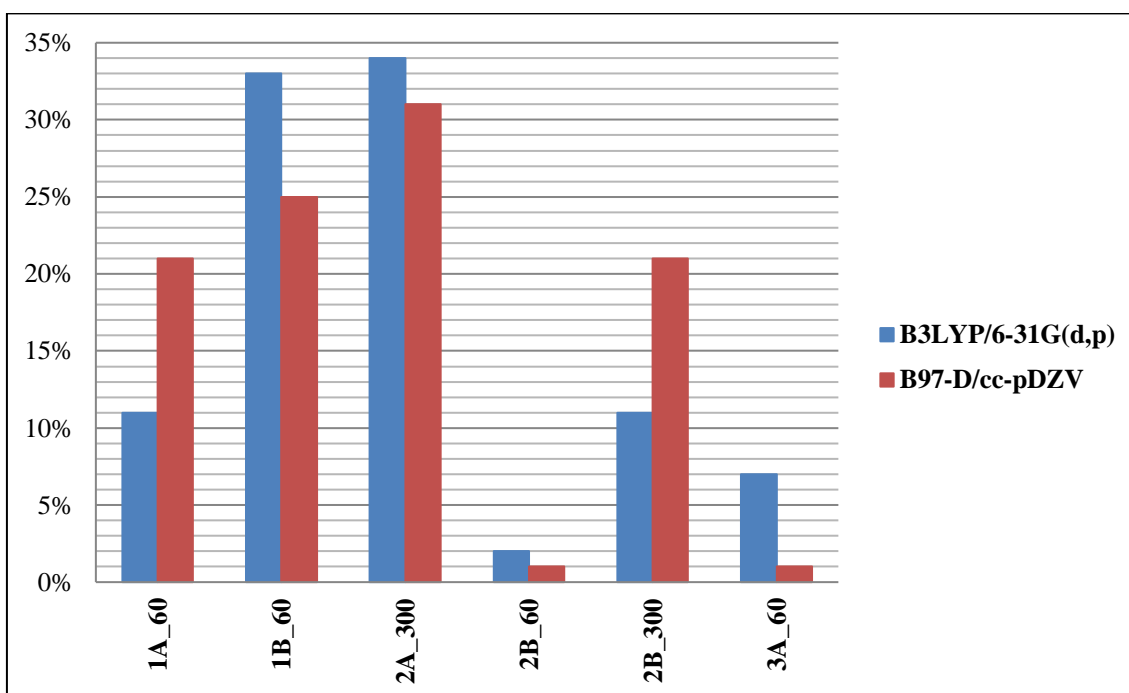
Confômero	B3LYP/6-31G(d,p)				B97-D/cc-pDZV			
	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$
1A_60	73	-125	-108	66	70	-125	-108	65
1B_60	-77	-112	-111	64	-70	-108	-111	65
2A_300	76	113	111	-64	72	107	111	-65
2B_60	-73	155	49	65	-71	153	46	63
2B_300	-73	125	108	-66	-70	125	108	-64
3A_60	76	-167	-122	65	75	-165	-120	65

Analisando as descrições geométricas obtidas quando na utilização de ambas as metodologias B3LYP/6-31G(d,p) e B97-D/cc-pDZV, pode-se concluir que não existem variações significativas, sendo a maior variação observada de +7°, para o ângulo diedro $\alpha 2$, do confômero 1B_60.

Já quando se comparam as descrições energéticas, pode-se concluir que os efeitos responsáveis pela estabilidade conformacional da porção hidrofílica MePC não

são contabilizados da mesma maneira, o que se reflete nos diferentes valores de população de Boltzmann obtidos a partir de ambos os métodos, conforme pode ser visto na Figura 11. No entanto, cabe destacar que, muito embora os valores absolutos para as populações de Boltzmann não se mantenham, a abundância relativa entre os confôrmeros se mantém, de modo que os confôrmeros mais abundantes em nível B3LYP/6-31G(d,p) continuam sendo mais abundantes em nível B97-D/cc-pDZV.

Figura 11. Populações de Boltzmann para as conformações da MePC nos níveis B3LYP/6-31G(d,p) e B97-D/cc-pDZV.



A partir dos resultados de abundância relativa obtidos para a porção hidrofílica MePC, em nível B97-D/cc-pDZV, foram consideradas as conformações com população de Boltzmann maior que 1% e, a partir dessas, os sistemas monoméricos foram gerados, conforme descrito na Etapa 3 da seção Metodologia.

A nomenclatura utilizada para designar os diferentes sistemas monoméricos é composta por três partes: a primeira leva em consideração a conformação da porção hidrofílica MePC, a segunda o valor de partida do ângulo diedro θ_1 e, a terceira, é composta pela abreviação DOcEt. A Tabela 6 a seguir apresenta os parâmetros geométricos dos sistemas monoméricos otimizados, bem como as energias relativas.

Comparando os resultados das tabelas 5 e 6, podemos concluir que a ligação entre MePC e DOcEt para a formação dos sistemas monoméricos não afeta consideravelmente os parâmetros geométricos da porção hidrofílica MePC. Os parâmetros geométricos que apresentam maiores variações são os ângulos diedros próximos à ligação MePC–DOcEt, ou seja, os ângulos diedros α_2 e α_3 . No entanto, tais variações são bem discretas; para α_2 : $+9^\circ$ para os confôrmeros 2B_300-180-DOcEt e 1B_60-300-DOcEt e para α_3 : $+5^\circ$ para o confôrmero 1B_60-180-DOcEt e -5° para o confôrmero 2B_300-180-DOcEt. Já os parâmetros geométricos α_4 e α_5 são praticamente idênticos quando se comparam a MePC e os sistemas monoméricos correspondentes aos fosfolipídios completos, apresentando variações máximas de $\pm 2^\circ$.

Além disso, pode-se perceber que a conformação da porção hidrofílica MePC praticamente se mantém inalterada, independente do ângulo diedro θ_1 . Isso pode ser facilmente percebido comparando-se as linhas de mesma cor, na Tabela 6. No entanto, tais mudanças conformacionais provenientes dos diferentes valores de θ_1 são suficientes para causar variações de energia. Pode-se demonstrar que a ordem de estabilidade, considerando uma mesma conformação para a porção hidrofílica e diferentes valores de θ_1 , é: $\approx 60^\circ > \approx -60^\circ > \approx 180^\circ$, ou seja, as conformações cujos ângulos diedros $\theta_1 \approx 60^\circ$ são mais estáveis que aquelas que apresentam $\theta_1 \approx -60^\circ$, que são mais estáveis que as que apresentam $\theta_1 \approx 180^\circ$.

Por fim, pode-se concluir que a conformação da porção hidrofóbica DOcEt também é praticamente inalterada quando ligada à porção hidrofílica MePC, o que sugere que ambas as porções se comportam com certo grau de independência, por conta de suas naturezas distintas. Com base nos resultados apresentados na Tabela 6, pode-se concluir que os valores ótimos para os ângulos diedros θ_1/θ_2 – que definem a orientação relativa entre as porções polar e apolar dos protótipos de fosfolipídios estudados – são: $\approx 60^\circ/180^\circ$, $\approx -60^\circ/60^\circ$ e $\approx 180^\circ/-60^\circ$.

Tabela 6. Conformações estáveis para uma molécula isolada de DOcPC, segundo o método B97-D/cc-pDZV. Ângulos diedros em graus e energia relativa em kcal/mol.

Confômero	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\theta 1$	$\theta 2$	$\theta 3$	$\theta 4$	ϕ	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\gamma 3$	$\gamma 4$	ΔU_{eq}
1A_60-60-DOcEt*	180	72	-124	-108	66	64	-178	180	63	180	141	164	-171	171	-95	162	-175	173	0
1B_60-60-DOcEt	-160	-72	-115	-109	66	61	178	178	62	180	143	164	-170	171	-96	164	-175	174	0,03
2A_300-60-DOcEt	169	72	113	111	-64	61	-179	178	61	179	143	165	-168	-176	-97	166	-169	175	0,02
2B_300-60-DOcEt	-158	-69	121	109	-65	62	180	179	62	180	143	165	-171	172	-96	164	-173	173	0,17
1A_60-180-DOcEt	177	69	-125	-107	67	171	-71	180	61	179	141	168	-169	173	-96	164	-169	174	2,01
1B_60-180-DOcEt	-170	-65	-107	-113	63	173	-69	176	58	177	143	170	-165	174	-95	165	-170	176	1,21
2A_300-180-DOcEt	170	77	109	112	-63	174	-68	178	60	177	139	180	-166	-177	-96	162	-168	-176	1,66
2B_300-180-DOcEt	-174	-64	120	110	-65	173	-69	175	57	175	141	171	-165	174	-96	164	-168	176	1,62
1A_60-300-DOcEt	170	65	-125	-108	65	-53	66	179	60	176	139	168	-162	177	-98	167	-168	177	1,43
1B_60-300-DOcEt	-179	-68	-110	-112	63	-50	69	-177	63	178	141	164	-169	174	-100	164	-169	174	1,04
2A_300-300-DOcEt	167	76	113	111	-64	-51	67	-177	63	174	140	165	-169	174	-97	165	-171	174	0,54
2B_300-300-DOcEt	-173	-77	127	109	-64	-54	64	-177	64	-179	141	165	-170	173	-98	164	-172	174	1,45

*O valor de referência para a energia total é -1940,526045 u.a.

Tendo em vista que, em um estudo conformacional, o objetivo é obter todas as conformações estáveis para um determinado sistema molecular e a estabilidade relativa entre elas, por mais trabalhoso e desafiador que seja, é importante considerar o maior número de estruturas de partida possível. Diante disso, as conformações de menor energia obtidas por Krishnamurthy e colaboradores (cujas geometrias de partida foram obtidas de dados experimentais), em 2008⁷⁹, foram tomadas como estruturas de partida e totalmente otimizadas, tal como descrito na Etapa 3 da seção Metodologia. A Tabela 7 apresenta os dados referentes às geometrias otimizadas.

Comparando o conjunto de conformações apresentado na Tabela 6 (B97-D/cc-pDZV) com o conjunto de quatorze conformações apresentado na referência 79 (obtido em nível revPBELYP-D/pDZV, Tabela 7) pode-se perceber que existem discrepâncias tanto geométricas como energéticas, dependendo da metodologia utilizada para o tratamento do referido sistema. Tais discrepâncias geométricas referem-se exclusivamente à porção hidrofóbica dos fosfolipídios, mais especificamente a três parâmetros geométricos relativos à conformação do fragmento denominado “body” (ângulos diedros ϕ , β_3 e γ_1). Segundo a nomenclatura de Krishnamurthy e colaboradores, a porção hidrofílica dos fosfolipídios é denominada fragmento “head”, enquanto a porção hidrofóbica é caracterizada pelos fragmentos “neck” e “body”, correspondentes ao glicerol e às cadeias carbônicas que compõem os fosfolipídios, respectivamente.

Dentre as três possibilidades conformacionais para a porção “body” (B_{A1} , B_{A2} e B_{B1}), encontradas pelos autores, somente a possibilidade B_{A1} foi encontrada como de menor energia em nível B97-D/cc-pDZV. Nesse nível, as possibilidades B_{A2} e B_{B1} dão lugar a possibilidades conformacionais similares, porém que diferem nos valores de pelo menos um dos ângulos diedros ϕ , β_3 e γ_1 , conforme mencionado anteriormente. Dessa forma, o conjunto de quatorze conformações de menor energia em nível revPBELYP-D/pDZV não corresponde ao conjunto de conformações de menor energia em nível B97-D/cc-pDZV, pois oito conformações diferem significativamente em pelo menos um de seus parâmetros geométricos ótimos. A Tabela 8 a seguir apresenta os valores ótimos dos referidos parâmetros geométricos, em função de método utilizado.

Tabela 7. Conformações de menor energia para a DOcPC, partindo-se das geometrias otimizadas apresentadas por Krishnamurthy e colaboradores⁷⁹, segundo a metodologia B97-D/cc-pDZV. Ângulos diedros em graus e energia relativa em kcal/mol. O sufixo “8C” foi adicionado à nomenclatura original a fim de salientar a redução das cadeias carbônicas, de quatorze para oito átomos de carbono.

Confôrmero	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\theta 1$	$\theta 2$	$\theta 3$	$\theta 4$	ϕ	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\gamma 3$	$\gamma 4$	ΔU_{eq}
H1N1B _{A1} (T1)-8C	-91	78	66	121	-69	169	-73	173	56	59	143	175	-128	63	77	-176	-63	-177	2,19
H1N1B _{A2} (T1)-8C	-94	81	62	120	-71	170	-72	174	57	177	142	168	-166	176	-97	166	-168	176	2,72
H1N1B _{B1} (T1)-8C	-83	83	62	121	-69	168	-73	64	-55	-59	151	164	21	-176	92	-163	170	-168	3,16
H1N2B _{A2} (T1)-8C	-109	90	49	123	-70	-53	65	176	57	176	137	172	-168	173	-99	163	-163	176	1,47
H1N3B _{A1} (T1)-8C*	-94	99	51	122	-70	77	-166	176	59	64	143	175	-133	69	77	-174	-67	-177	0,00
H2N2B _{A2} (T1)-8C	112	167	43	48	69	-64	55	168	50	171	142	172	-160	178	-95	169	-162	178	1,86
H2N3B _{A1} (T1)-8C	91	-170	49	47	69	69	-173	175	58	67	146	180	-135	69	81	-170	-63	-176	0,49
H1N1B _{A1} (T2)-8C	-93	78	66	119	-71	169	-73	172	55	60	141	177	-146	70	80	-168	-161	-173	3,42
H1N1B _{A2} (T2)-8C	-93	80	64	119	-72	171	-71	-177	65	-175	138	171	172	166	-100	173	-112	-172	4,31
H1N2B _{B1} (T2)-8C	-90	82	59	120	-71	169	-71	57	-61	-58	149	177	-45	-180	99	-163	-173	-168	4,35
H1N1B _{A2} (T2)-8C	-108	92	44	121	-71	-55	62	173	54	147	80	-169	-156	175	-104	160	-85	-173	1,72
H1N3B _{A1} (T2)-8C	-91	97	51	124	-69	79	-163	173	56	59	141	176	-147	70	82	-171	-157	-179	1,08
H2N2B _{A2} (T2)-8C	113	170	43	47	69	-65	54	174	56	175	128	179	-179	168	-100	174	-95	-174	3,45
H2N3B _{A1} (T2)-8C	96	-166	43	45	69	77	-164	174	54	59	144	179	-150	70	83	-168	-160	178	1,48

*O valor de referência para a energia total é -1940,536137u.a.

Tabela 8. Parâmetros geométricos discrepantes para as conformações da DOcPC.

Confômero	revPBELYP-D/pDZV	B97-D/cc-pDZV
H1N1B_{A2}(T1)	$\beta_3 = 145 \pm 5$ $\gamma_1 = 110 \pm 5$	$\beta_3 = -166$ $\gamma_1 = -97$
H2N2B_{A2}(T1)	$\beta_3 = 145 \pm 5$ $\gamma_1 = 110 \pm 5$	$\beta_3 = -160$ $\gamma_1 = -95$
H1N2B_{A2}(T1)	$\gamma_1 = 110 \pm 5$	$\gamma_1 = -99$
H1N2B_{A2}(T2)	$\gamma_1 = 110 \pm 5$	$\gamma_1 = -104$
H1N1B_{A2}(T2)	$\gamma_1 = 110 \pm 5$	$\gamma_1 = -100$
H2N2B_{A2}(T2)	$\gamma_1 = 110 \pm 5$	$\gamma_1 = -100$
H1N1B_{B1}(T1)	$\phi = 60$	$\phi = -59$
H1N1B_{B1}(T2)	$\phi = 60$	$\phi = -58$

No que se refere às energias relativas dos confôrmeros, podemos notar que as quatorze conformações estáveis em nível B97-D/cc-pDZV diferem entre si por um valor médio de 2 kcal/mol, sendo que as conformações T1 são mais estáveis que as conformações T2. Segundo a terminologia utilizada por Krishnamurthy e colaboradores, os confôrmeros T1 (“tail 1”) apresentam cadeias carbônicas dispostas em planos paralelos, enquanto que os confôrmeros T2 (“tail 2”) apresentam suas cadeias carbônicas em planos perpendiculares. Já em nível revPBELYP-D/pDZV, os confôrmeros diferem entre si por menos de 1 kcal/mol.⁷⁹

Tomando o conjunto de 26 conformações estáveis para a DOcPC obtido no presente trabalho (Tabela 9), podemos concluir que as conformações H1N3BA1(T1)-8C e H2N3BA1(T1)-8C são as mais estáveis, diferindo entre si por menos de 0,5 kcal/mol, isso quando se considera somente a energia total do sistema, sem a correção de energia de ponto zero. Tais conformações são geometricamente análogas, exceto no que se refere aos parâmetros geométricos das cabeças fosfolipídicas.

De fato, ao considerar o conjunto de conformações obtido por Krishnamurthy e colaboradores, em 2008, ou seja, pouco tempo antes do início do presente trabalho, foi possível ampliar o conjunto de estruturas a serem analisadas. Isso no que diz respeito ao que denominamos sistema monomérico. Nesse processo, as conformações mais estáveis foram obtidas a partir do conjunto apresentado pelos referidos autores e estão destacadas em cinza, na Tabela 7 e na Tabela 9. No entanto, comparando as conformações dos sistemas em questão com as conformações mais estáveis obtidas e validadas para a MePC, em 2009⁷⁸, pode-se concluir que nenhuma das conformações

mais estáveis apresenta parâmetros geométricos similares àqueles que foram encontrados para a MePC, que corresponde estruturalmente às cabeças fosfolipídicas de colina.

Tabela 9. Energias relativas (ΔU_{eq}), em kcal/mol, dos confôrmeros que compõem o conjunto de conformações estáveis obtido para o sistema monomérico DOcPC.

Confôrmero	ΔU_{eq}
1A_60_60-DOcEt	6,33
1B_60_60-DOcEt	6,36
2A_300_60-DOcEt	6,35
2B_300_60-DOcEt	6,50
1A_60_180-DOcEt	8,34
1B_60_180-DOcEt	7,55
2A_300_180-DOcEt	7,99
2B_300_180-DOcEt	7,95
1A_60_300-DOcEt	7,77
1B_60_300-DOcEt	7,37
2A_300_300-DOcEt	6,87
2B_300_300-DOcEt	7,78
H1N1B_{A1}(T1)_8C	2,19
H1N1B_{A2}(T1)-8C	2,72
H1N1B_{B1}(T1)_8C	3,16
H1N2B_{A2}(T1)_8C	1,47
H1N3B_{A1}(T1)_8C*	0,00
H2N2B_{A2}(T1)_8C	1,86
H2N3B_{A1}(T1)_8C	0,49
H1N1B_{A1}(T2)_8C	3,42
H1N1B_{A2}(T2)_8C	4,31
H1N2B_{B1}(T2)_8C	4,35
H1N1B_{A2}(T2)_8C	1,72
H1N3B_{A1}(T2)_8C	1,08
H2N2B_{A2}(T2)_8C	3,45
H2N3B_{A1}(T2)_8C	1,48

*O valor de referência para a energia total é -1940,536137 u.a.

Desde a década de 80, sabe-se que as conformações das cabeças fosfolipídicas apresentam-se como imagens especulares umas das outras e que são praticamente independentes das porções hidrofóbicas dos fosfolipídios.⁶⁸ Sendo assim, considerando um dado conjunto de conformações para uma determinada cabeça fosfolipídica, seria possível, teoricamente, obter sistemas monoméricos com as mesmas cabeças fosfolipídicas, porém com diferentes valores de energia, dependendo da conformação da porção hidrofóbica. Diante disso, parece que o procedimento adotado para a construção dos sistemas monoméricos no presente trabalho (junção das cabeças fosfolipídicas de colina mais estáveis com uma porção hidrofóbica de DOcEt na qual as interações dispersivas estão maximizadas, ou seja, na qual as cadeias carbônicas estão totalmente estendidas, mono-8C) gerou sistemas moleculares estáveis, porém de mais alta energia. Isso pode ter acarretado a não obtenção das conformações mais estáveis para os sistemas monoméricos, o que mais uma vez destaca o desafio de um estudo conformacional, principalmente para um sistema anfipático como esse, no qual o resultado final depende fortemente das estruturas de partida consideradas.

No entanto, mesmo diante da fragilidade dos resultados obtidos, decidiu-se continuar com as sete conformações mais estáveis que foram encontradas para o sistema monomérico. Tal decisão foi tomada com base na hipótese da presente tese, na qual se busca investigar se os dissacarídeos interagem de maneira diferenciada com as cabeças fosfolipídicas. Dessa forma, mesmo tomando sistemas diméricos construídos a partir de sistemas monoméricos nos quais as conformações mais estáveis para a cabeça fosfolipídica de colina não estariam sendo consideradas, seria possível comparar a mesma interação dissacarídeo-protótipo de membrana fosfolipídica e, com isso, avaliar a metodologia proposta.

Sendo assim, considerando o critério “energia relativa menor ou igual a 2,00 kcal/mol, em relação ao conformero de mais baixa energia”, foram selecionadas as seguintes conformações para o sistema monomérico: H1N2B_{A2}(T1)_8C, H1N3B_{A1}(T1)_8C, H2N2B_{A2}(T1)_8C, H2N3B_{A1}(T1)_8C, H1N1B_{A2}(T2)_8C, H1N3B_{A1}(T2)_8C e H2N3BA1(T2)_8C, que foram utilizadas para a construção dos respectivos sistemas diméricos.

Etapa 4) Obtenção dos sistemas diméricos

A Tabela 10 a seguir apresenta os resultados obtidos em nível PM6 para cada um dos quatorze sistemas diméricos que foram construídos a partir dos sistemas monoméricos selecionados. A notação utilizada para identificar os sistemas diméricos é a mesma utilizada para os sistemas monoméricos, exceto pelo fato de que, para esses últimos, utiliza-se o número “2” como prefixo, a fim de indicar a presença de duas moléculas de DOcPC. Além disso, utiliza-se a terminologia “2eletro” ou “1eletro”, entre parênteses, para indicar o tipo de sistema dimérico correspondente, conforme definido na Etapa 3 da seção Metodologia.

Considerando o parâmetro geométrico de referência para a construção dos sistemas diméricos d_{P-N} , observaram-se desvios (Δd_{P-N}) negativos em torno de 3 Å, para ambos os tipos de sistemas diméricos, que indicam que as cabeças fosfolipídicas se aproximam quando na formação dos sistemas diméricos. Já quando se consideram as distâncias médias entre átomos de carbono de cadeias adjacentes, $\langle d_{C-C} \rangle$, observaram-se desvios (Δd_{C-C}) positivos e mais pronunciados, sendo que três sistemas diméricos apresentaram desvios maiores que 10 Å. Tais resultados sugerem a predominância de forças repulsivas entre as cadeias carbônicas para os sistemas em questão e revelam que a metodologia PM6 descreve como estáveis conformações nas quais são observados grandes distanciamentos entre as cadeias carbônicas.

Em se tratando da descrição energética dos quatorze sistemas diméricos obtidos e tomando como critério de estabilidade apenas a energia total para o sistema em equilíbrio e sem correções vibracionais, segundo a metodologia PM6, o sistema dimérico 2H1N3BA1(T1)-8C(2eletro) é o mais estável, conforme pode ser visto na Tabela 10, sendo todos os outros confôrmeros muito menos estáveis do que ele, exceto o confôrmero 2H1N3BA1(T2)-8C(2eletro). Dessa forma, considerando o mesmo critério que foi estabelecido para a seleção dos sistemas monoméricos estáveis e que seriam considerados para a etapa seguinte do trabalho (energia relativa menor ou igual a 2,00 kcal/mol, em relação ao confôrmero de mais baixa energia), apenas dois dos sistemas diméricos apresentados na Tabela 10 seriam considerados para a próxima etapa do trabalho, os confôrmeros 2H1N3BA1(T1)-8C(2eletro) e 2H1N3BA1(T2)-8C(2eletro).

Tabela 10. Energia total relativa, em kcal/mol, para os quatorze sistemas diméricos considerados, utilizando a metodologia PM6.

Confômero	<d_{P-N}>	Δd_{P-N}	<d_{C-C}>	Δd_{C-C}	ΔU_{eq}
2H1N2BA2(T1)-8C(2eletro)	5	-3	11	3	7,97
2H1N3BA1(T1)-8C(2eletro)*	5	-3	4	-4	0,00
2H2N2BA2(T1)-8C(2eletro)	6	-2	6	-2	17,04
2H2N3BA1(T1)-8C(2eletro)	5	-2	5	-3	6,09
2H1N1BA2(T2)-8C(2eletro)	5	-3	15	7	11,52
2H1N3BA1(T2)-8C(2eletro)	5	-2	5	-3	0,88
2H2N3BA1(T2)-8C(2eletro)	5	-2	5	-3	4,87
2H1N2BA2(T1)-8C(1eletro)	4	-3	5	-3	29,55
2H1N3BA1(T1)-8C(1eletro)	4	-3	7	-2	5,47
2H2N2BA2(T1)-8C(1eletro)	5	-2	5	-3	24,82
2H2N3BA1(T1)-8C(1eletro)	4	-3	8	0	17,43
2H1N1BA2(T2)-8C(1eletro)	4	-3	6	-2	28,92
2H1N3BA1(T2)-8C(1eletro)	5	-2	16	8	10,45
2H2N3BA1(T2)-8C(1eletro)	4	-3	7	-1	24,11

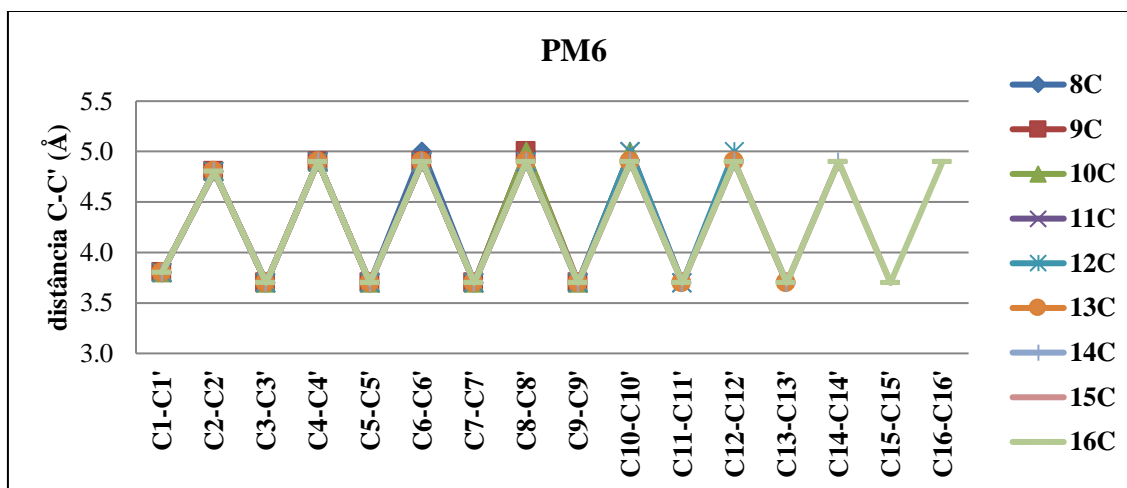
*O valor de referência para a energia total é -1,602971 u.a. <d_{P-N}> e <d_{C-C}> são as distâncias médias, em Angstrom, entre os átomos de P e N e entre os átomos de carbono de cadeias carbônicas adjacentes. Δd_{P-N} e Δd_{C-C} são as variações das distâncias médias, considerando os sistemas diméricos e os sistemas monoméricos correspondentes, definidas como: Δd_i = <d_i>_{sist.dim.} - <d_i>_{sist.mono.}

Comparando apenas as variações dos parâmetros geométricos escolhidos como referência para a construção dos sistemas diméricos (Δd_{P-N} e Δd_{C-C}), temos que o confômero 2H1N3BA1(T1)-8C(2eletro) apresenta monômeros mais próximos entre si do que o confômero 2H1N3BA1(T2)-8C(2eletro), tal como pode ser visto nas linhas destacadas em cinza na Tabela 10. Ou seja, apesar de terem energias próximas, os confômeros não convergiram para o mesmo mínimo de energia, logo, são sistemas moleculares distintos. No entanto, visando reduzir o número de sistemas a serem avaliados, decidiu-se prosseguir apenas com o sistema dimérico mais estável, 2H1N3BA1(T1)-8C(2eletro), que foi tomando como protótipo de membrana fosfolipídica para o estudo da interação dissacarídeo-membrana.

Conforme mencionado na seção Metodologia, a todo momento estava-se ciente das possíveis implicações decorrentes da necessidade de mudança do método originalmente escolhido para tratamento do sistema. Diante do fato de que o método

PM6 descreve como estáveis sistemas diméricos nos quais as cadeias carbônicas apresentam-se demasiadamente afastadas, foi realizada uma avaliação das interações dispersivas descritas pela metodologia PM6, tal como realizado na Etapa 2. A Figura 12 mostra os resultados dessa avaliação.

Figura 12. Distâncias entre os átomos de carbono adjacentes nos sistemas mono-8C, mono-9C, mono-10C ... e mono-16C utilizando o método PM6.



Conforme pode ser visto na Figura 12, as distâncias entre átomos de carbono adjacentes variam entre 3,5 e 5,0 Å. Comparando esses resultados aos resultados obtidos utilizando-se a metodologia B97-D (Figura 9), não se observam diferenças significativas, sendo, inclusive, o perfil para tais distâncias exatamente o mesmo quando se comparam ambas as metodologias. Dessa forma, parece que, para sistemas diméricos nos quais as interações dispersivas são dominantes, tais como os que foram gerados pelo crescimento do sistema mono-8C, as descrições das interações dispersivas obtidas utilizando-se os métodos B97-D e PM6 são correspondentes. No entanto, para sistemas diméricos nos quais hajam outras interações intermoleculares além das dispersivas – tais como os sistemas diméricos de interesse, formados por duas moléculas anfipáticas de DOcPC, não é possível dizer se a correspondência se verifica.

A fim de ter algum elemento que forneça ao menos uma possibilidade de resposta para o questionamento levantado anteriormente (se existe alguma correspondência entre os sistemas diméricos PM6 e aqueles que seriam obtidos em nível B97-D), foi feito um estudo avaliando o efeito da mudança de método sobre os sistemas monoméricos B97-D. Nesse estudo, as conformações dos sistemas

monoméricos B97-D foram reotimizadas, utilizando a metodologia PM6. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 11, a seguir.

A partir da comparação entre as Tabelas 7 e 11, podemos concluir que os parâmetros geométricos da cadeia α são os que menos se alteram quando se comparam as descrições dos sistemas monoméricos obtidas com as metodologias B97-D e PM6, seguidos dos parâmetros geométricos da cadeia θ . No entanto, é possível perceber significativa discrepância entre os parâmetros geométricos das cadeias carbônicas β e γ . Esses resultados indicam que as descrições das interações eletrostáticas obtidas com ambas as metodologias são correspondentes – e isso é extremamente importante devido à hipótese da presente tese, mas que a descrição das interações dispersivas não.

Além disso, pode-se concluir que a descrição energética obtida com ambos os métodos não é correspondente, tendo em vista que, considerando o critério de seleção estabelecido para a escolha dos sistemas monoméricos importantes, nem todos os sete confôrmeros importantes em nível B97-D apresentaram-se como tal em nível PM6, pois dois dos sete apresentaram energia superior a 2,00 kcal/mol em relação ao confôrmero de mais baixa energia. No entanto, dada a ínfima diferença de energia entre o confôrmero mais estável e o segundo mais estável, em nível PM6 (destacados em cinza, na Tabela 11), ambos os métodos apresentaram o confôrmero H1N3B_{A1}(T1)-8C como sistema monomérico mais estável. Os parâmetros geométricos ótimos para o referido confôrmero são praticamente os mesmos considerando ambos os métodos, conforme pode ser visto comparando as linhas pontilhadas nas Tabelas 7 e 11.

Tabela 11. Conformações estáveis para a DOcPC (PM6). Ângulos diedros em graus e energia relativa (ΔU_{eq}) em kcal/mol.

Confômero	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\theta 1$	$\theta 2$	$\theta 3$	$\theta 4$	ϕ	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\gamma 3$	$\gamma 4$	ΔU_{eq}
H1N2B_{A2}(T1)-8C	-127	83	32	114	-78	-32	82	171	56	159	108	-174	-118	-176	-110	175	-132	-177	2,31
H1N3B_{A1}(T1)-8C	-102	91	53	117	-81	90	-154	173	60	68	147	173	-110	64	78	-168	-57	-179	0,02
H2N2B_{A2}(T1)-8C	101	-178	30	62	66	-49	66	-176	67	162	107	178	-123	-176	-118	174	-129	-177	1,89
H2N3B_{A1}(T1)-8C	90	-166	41	58	67	69	-175	175	63	79	150	-176	-148	72	80	-166	-59	175	1,72
H1N1B_{A2}(T2)-8C	-110	91	34	117	-75	-43	71	179	62	153	71	-163	-168	-176	-108	176	-130	-177	4,70
H1N3B_{A1}(T2)-8C*	-120	90	53	116	-81	92	-153	173	60	60	140	173	-126	66	80	-171	-150	-174	0,00
H2N3B_{A1}(T2)-8C	91	-156	35	55	67	98	-144	175	59	59	138	179	-125	63	72	-168	-144	-171	0,44

*O valor de referência para a energia total é -0,772490 u.a.

Dessa forma, admitindo que uma correspondência entre sistemas monoméricos possa resultar em uma correspondência entre sistemas diméricos e que o sistema monomérico mais estável forneça o sistema dimérico mais estável, tal como ocorrido em nível PM6 (vide Tabelas 10 e 11), acredita-se que o sistema dimérico mais estável (2H1N3B_{A1}(T1)-8C(2eletro)), obtido em nível PM6, seja correspondente ao sistema dimérico que seria obtido, em nível B97-D. No entanto, tal afirmação não deve ser vista como fundamental, tendo em vista que, com a necessidade de mudança de método, os resultados provenientes do estudo com PM6 acabam sendo, de antemão, muito mais importantes para avaliar a viabilidade e a coerência da metodologia proposta (Etapas 1 a 6, descritas no início da seção Metodologia) do que para trazer informações quantitativas a respeito da interação que se deseja estudar.

Etapa 5) Estudo da interação dissacarídeo-PMF

Diante do critério estabelecido para a escolha das conformações dos dissacarídeos trealose, maltose e celobiose a serem consideradas para a construção dos sistemas complexos em questão (população de Boltzmann maior que 1%), segundo da Silva e colaboradores, são nove as possibilidades, conforme apresentado na Tabela 12. Os ângulos diedros apresentados na Tabela 12 a seguir são definidos da seguinte forma: $\Phi = O5-C1-O-C1'$ e $\Psi = C1-O-C1'-O5'$ (para a trealose), $\Phi = O5-C1-O-C4'$ e $\Psi = C1-O-C4'-C5'$ (para a maltose e celobiose), $\omega_\phi = O5-C5-C6-O6$ e $\omega_\psi = O5'-C5'-C6'-O6'$ (para todos os dissacarídeos).

Inicialmente, é importante mencionar que, para o cálculo das energias de interação dos sistemas complexos (ΔE_{int}^{comp}), foi necessário obter as conformações estáveis para os dissacarídeos em questão, segundo a metodologia PM6. Isso porque as conformações dos dissacarídeos utilizadas para a construção dos sistemas foram obtidas através de metodologias distintas daquela utilizada para o estudo dos sistemas complexos. Dessa forma, as nove conformações dos dissacarídeos selecionadas foram tomadas como geometrias de partida e otimizadas utilizando-se a metodologia PM6. A Tabela 13 a seguir apresenta os parâmetros geométricos ótimos e as energias relativas para cada uma das conformações.

Tabela 12. Conformações mais estáveis para uma molécula de trealose, uma molécula de maltose e uma molécula de celobiose, isoladas, a 25°C e sob pressão de 1 atm.⁶⁷ Ângulos diedros em graus, energias relativas sem correção de energia de ponto zero (ΔU_{eq}) em kcal/mol e populações de Boltzmann (π) em porcentagem. Conformações da trealose e da celobiose: HF/6-31G(d,p), maltose: B3LYP/6-31+G(d,p).

Conformações da trealose						
	Φ	Ψ	ω_ϕ	ω_ψ	ΔU_{eq}	π
<i>A_gggt</i>	92	73	-57	71	0	19
<i>A_ggtg</i>	75	81	-65	-178	0,51	45
<i>A_gtgg</i>	74	77	59	-78	1,32	19
<i>A_gttg</i>	67	76	68	-178	1,32	14
Conformações da maltose						
	Φ	Ψ	ω_ϕ	ω_ψ	ΔU_{eq}	π
<i>A_tggg</i>	108	-139	-178	-58	0,10	36
<i>A_tggt</i>	108	-139	-178	61	0	43
<i>G_gtgg</i>	104	-135	65	-65	4,15	11
Conformações da celobiose						
	Φ	Ψ	ω_ϕ	ω_ψ	ΔU_{eq}	π
<i>C_gggg</i>	-69	-128	-60	-60	0,38	20
<i>C_gtgg</i>	-95	-167	60	-60	0	62

Comparando as tabelas 12 e 13, pode-se concluir que as descrições geométricas obtidas para todos os dissacarídeos são correspondentes, no que se refere aos parâmetros geométricos da ligação glicosídica (ângulos diedros Φ e Ψ). No entanto, observam-se discrepâncias significativas para os ângulos diedros ω dos grupos hidroximetilênicos, exceto para as conformações *A_gggt*, *G_gtgg* e *C_gtgg*. Em relação ao ordenamento energético das conformações, têm-se resultados bem discrepantes para o dissacarídeo trealose, uma vez que a conformação mais estável segundo a metodologia HF (*A_gggt*) é a menos estável segundo a metodologia PM6. Já para a maltose, observam-se resultados correspondentes para as metodologias B3LYP e PM6, sendo a conformação *G_gtgg* a de mais alta energia em ambas as metodologias (≈ 4 kcal/mol em relação à conformação de mais baixa energia). Por fim, para o dissacarídeo celobiose, diferentemente da trealose, se observa manutenção do

ordenamento energético, porém a diferença de energia entre as conformações é bem maior segundo a descrição HF do que segundo a descrição PM6.

Tabela 13. Conformações estáveis para trealose, maltose e celobiose, no vácuo, sem correção de energia de ponto zero (PM6).

Conformações da trealose					
	Φ	Ψ	ω_ϕ	ω_ψ	ΔU_{eq}
<i>A_gggt</i>	96	70	-61	73	3,67
<i>A_ggtg*</i>	59	90	-130	177	0
<i>A_gtgg</i>	65	98	104	-83	1,18
<i>A_gttg</i>	54	89	102	177	1,91
Conformações da maltose					
	Φ	Ψ	ω_ϕ	ω_ψ	ΔU_{eq}
<i>A_tggg*</i>	97	-115	174	-55	0
<i>A_tggt</i>	95	-119	146	114	0,34
<i>G_gtgg</i>	107	-111	64	-65	4,36
Conformações da celobiose					
	Φ	Ψ	ω_ϕ	ω_ψ	ΔU_{eq}
<i>C_gggg</i>	-86	-125	84	150	3,08
<i>C_gtgg*</i>	-80	-154	77	-59	0

*As energias dos confôrmeros de referência são: -0,797250 u.a. para a trealose, -0,795909 u.a. para a maltose e -0,792756u.a. para a celobiose.

Etapa 5.1) Sistemas complexos com trealose

Conforme descrito no item 5 da seção “Metodologia”, foram construídos oito sistemas complexos com trealose, divididos em dois conjuntos de quatro conformações cada, que consideraram diferentes formas de aproximação entre o dissacarídeo e o sistema dimérico: uma aproximação com os anéis glicosídicos voltados para baixo e outra com os anéis voltados para cima, em relação às cabeças fosfolipídicas do sistema dimérico. Tais formas de aproximação foram denominadas “baixo” e “cima”, respectivamente. Dessa forma, a nomenclatura utilizada para a identificação dos sistemas complexos tem a seguinte sintaxe: trea(conformação)-SD-forma de aproximação, sendo SD uma abreviação para “sistema dimérico”. A seguir são

apresentadas as três curvas de energia de interação construídas (“Oglico”, “Cglico” e “Copt”), considerando a forma de aproximação “baixo” (Figura 13) e a forma de aproximação “cima” (Figura 14).

Analisando os resultados apresentados nas Figuras 13 e 14, é possível organizar a tabela a seguir (Tabela 14), que reporta as distâncias de aproximação O–X ótimas entre trealose e o protótipo de membrana fosfolipídica, em função das formas de aproximação entre o dissacarídeo e o protótipo considerados. Cabe destacar que nos três tipos de curvas de energia de interação que foram construídas somente parte das geometrias dos sistemas complexos foi otimizada, conforme descrito na seção “Metodologia”. Dessa forma, o termo “distância ótima”, em se tratando das curvas de energia de interação em questão, refere-se à distância de partida a ser tomada para a análise dos sistemas complexos considerados que, a princípio, poderia ser qualquer.

Conforme apresentado na Tabela 14, de uma maneira geral, as distâncias O–X ótimas entre trealose e o protótipo de membrana fosfolipídica encontram-se no intervalo de 2,0 Å a 4,0 Å, independente da forma de aproximação considerada. As energias relativas dos respectivos sistemas complexos totalmente otimizados são apresentadas na Tabela 15. É importante mencionar que, para um sistema de grandes dimensões como o que está sendo considerado, lidar com um número significativo de geometrias de partida (três para cada sistema complexo) é uma tarefa desafiadora. No entanto, conforme mencionado no item 2 da seção “Metodologia”, a densidade de mínimos na superfície de energia potencial de um determinado sistema molecular cresce exponencialmente com o número de graus de liberdade conformacionais, de modo que a obtenção de um determinado ponto estacionário depende fortemente da escolha da estrutura de partida. Dessa forma, considerar um número significativo de geometrias de partida é fundamental para a qualidade da análise conformacional que está sendo realizada.

Figura 13. Curvas de energia de interação “baixo” para os sistemas complexos com trealose. ΔE_{inter}^{comp} em kcal/mol. Distâncias em Angstroms.

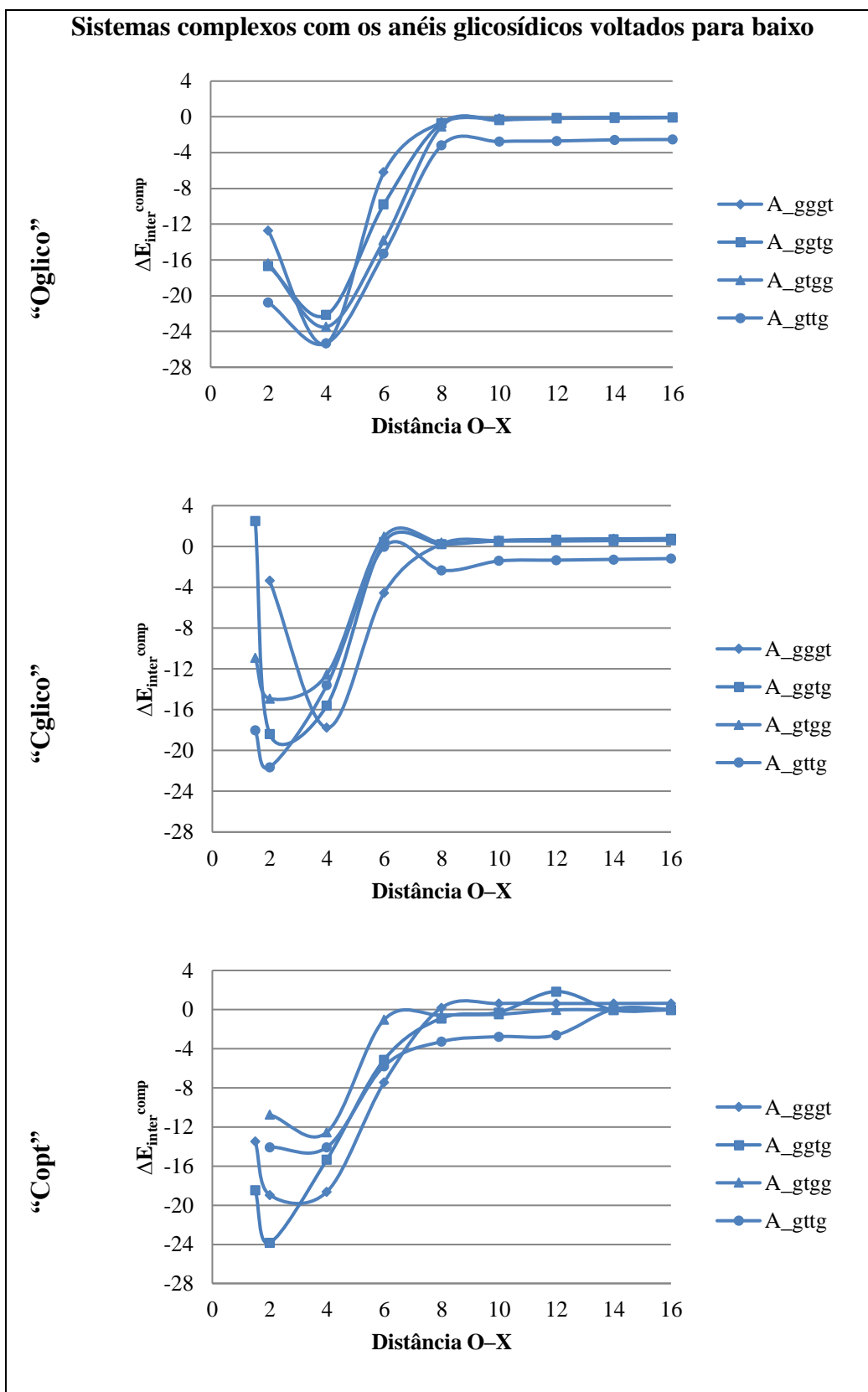


Figura 14. Curvas de energia de interação “cima” para os sistemas complexos com trealose. ΔE_{inter}^{comp} em kcal/mol. Distâncias em Angstroms.

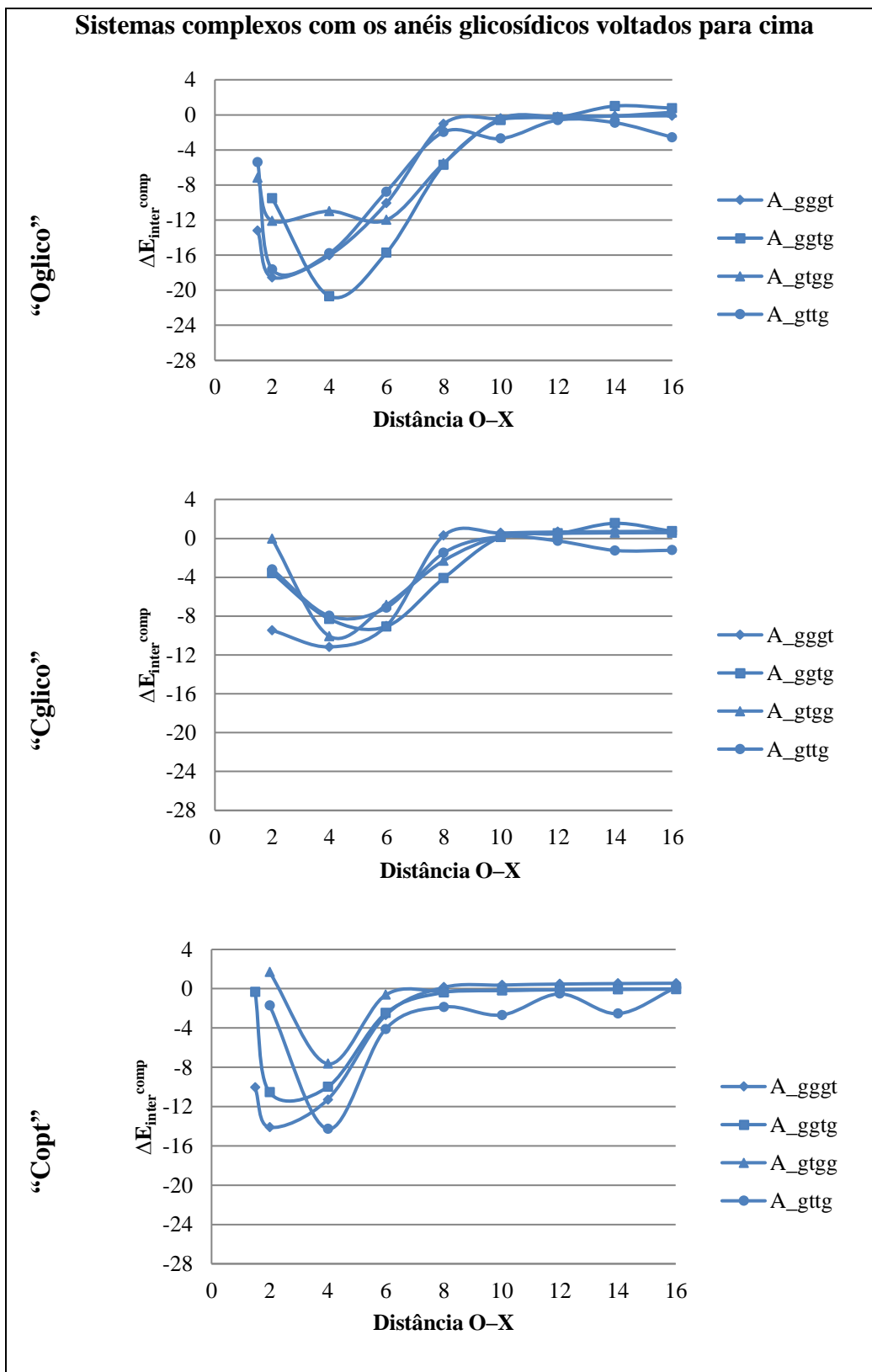


Tabela 14. Distâncias O–X ótimas entre trealose e o protótipo de membrana fosfolipídica, em Angstroms, considerando os oito sistemas complexos estudados, em função da forma de aproximação dissacarídeo-protótipo de membrana fosfolipídica e do tipo de curva de energia de interação.

Curva de energia de interação	Forma de aproximação dissacarídeo-protótipo de membrana fosfolipídica							
	Baixo				Cima			
	<i>A_gggt</i>	<i>A_ggtg</i>	<i>A_gtgg</i>	<i>A_gttg</i>	<i>A_gggt</i>	<i>A_ggtg</i>	<i>A_gtgg</i>	<i>A_gttg</i>
Oglico	4,0	4,0	4,0	4,0	2,0	4,0	2,0 e 6,0	2,0
Cglico	4,0	2,0	2,0	2,0	4,0	6,0	4,0	4,0
Copt	2,0	2,0	4,0	4,0	2,0	2,0	4,0	4,0

Tabela 15. Energias relativas dos sistemas complexos da Tabela 14, totalmente otimizados, em kcal/mol.

Curva de energia de interação	Forma de aproximação dissacarídeo-protótipo de membrana fosfolipídica							
	Baixo				Cima			
	<i>A_gggt</i>	<i>A_ggtg</i>	<i>A_gtgg</i>	<i>A_gttg</i>	<i>A_gggt</i>	<i>A_ggtg</i>	<i>A_gtgg</i>	<i>A_gttg</i>
Oglico	4,98	5,24	0	7,22	0	0	8,02 e 1,94	0,94
Cglico	6,30	8,02	4,16	0	0,42	0	0	0,94
Copt	0	0	1,31	29,70	1,02	6,05	10,21	0

*As energias dos conformêros de referência são: -2,450085 u.a. e -2,428619 u.a. (trea-(*A_gggt*)-SD-baixo e trea-(*A_gggt*)-SD-cima), -2,458950 u.a. e -2,431206 u.a. (trea(*A_ggtg*)-SD-baixo e trea(*A_ggtg*)-SD-cima), -2,444663 u.a. e -2,439423 u.a. (trea-(*A_gtgg*)-baixo e trea-(*A_gtgg*)-cima) e -2,451650 u.a. e -2,438813 u.a. (trea-(*A_gttg*)-baixo e trea-(*A_gttg*)-cima).

Considerando as três estruturas de partida que foram tomadas para cada sistema complexo, pode-se concluir, inicialmente, que existe somente uma conformação mais estável para cada sistema complexo considerado, segundo a metodologia empregada na presente tese. Daí, foi gerado um conjunto de oito conformações estáveis. Isso pode ser visto pelos altos valores de energia relativa em cada uma das colunas da Tabela 15, exceto para os sistemas complexos *trea(A_gggt)*-SD-cima. Dessa forma, a fim de comparar a estabilidade relativa dos sistemas complexos em função das formas de aproximação, bem como suas respectivas energias de interação, organizou-se a Tabela 16, na qual estão presentes somente os sistemas complexos mais estáveis.

Tabela 16. Conformações estáveis para os oito sistemas complexos com trealose, considerando ambas as formas de aproximação “baixo” e “cima”. Os valores de energia relativa (ΔU_{eq}) e de energia de interação (ΔE_{inter}^{comp}) estão em kcal/mol.

Conformação	ΔU_{eq}	ΔE_{inter}^{comp}
<i>trea(A_gggt)</i>-SD-baixo	0	-34,96
<i>trea(A_gggt)</i>-SD-cima	13,47	-21,49
<i>trea(A_ggtg)</i>-SD-baixo	0	-36,85
<i>trea(A_ggtg)</i>-SD-cima	17,41	-19,44
<i>trea(A_gtgg)</i>-SD-baixo	0	-29,07
<i>trea(A_gtgg)</i>-SD-cima	3,29	-25,78
<i>trea(A_gttg)</i>-SD-baixo	0	-34,18
<i>Trea(A_gttg)</i>-SD-cima	8,05	-26,13

Analisando os resultados da Tabela 16, pode-se concluir que os sistemas complexos “baixo” são mais estáveis que os sistemas complexos “cima”, de modo que, considerando o conjunto analisado, existem quatro conformações representativas para o sistema complexo trealose-protótipo de membrana fosfolipídica, cujas energias relativas e de interação são apresentadas na Tabela 17 a seguir.

Tabela 17. Conformações mais estáveis para os sistemas complexos com trealose. Valores de energia relativa (ΔU_{eq}) e de energia de interação (ΔE_{int}^{comp}) em kcal/mol.

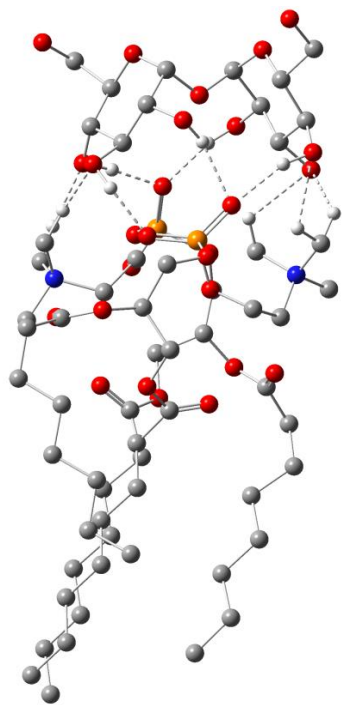
Conformação	ΔU_{eq}	ΔE_{int}^{comp}
trea(A_gggt)-SD-baixo	5,56	-34,96
trea(A_ggtg)-SD-baixo	0	-36,85
trea(A_gtgg)-SD-baixo	8,96	-29,07
trea(A_gttg)-SD-baixo	4,58	-34,18

A Figura 15 mostra as conformações representativas para o sistema complexo trealose-protótipo de membrana fosfolipídica (Tabela 17), nas quais se identificam duas formas de interação entre o dissacarídeo e as cabeças fosfolipídicas do protótipo de membrana fosfolipídica, ambas classificadas como ligações-hidrogênio, levando-se em consideração apenas critérios geométricos. São elas: ligações-hidrogênio entre átomos de hidrogênio das hidroxilas dos dissacarídeos e átomos de oxigênio não esterificados do grupo fosfato ($\sim OPO_2O\sim$)⁻ que compõem as cabeças fosfolipídicas e ligações-hidrogênio entre átomos de oxigênio das hidroxilas dos dissacarídeos e átomos de hidrogênio do grupo trimetil amônio ($\sim N(CH_3)_3$)⁺ que compõem as cabeças fosfolipídicas. Segundo a literatura, a segunda forma de interação já foi observada para uma variedade de sais contendo o íon trimetil amônio^{81,82}. A Tabela 18 apresenta as formas de interação identificadas em cada um dos sistemas complexos em questão.

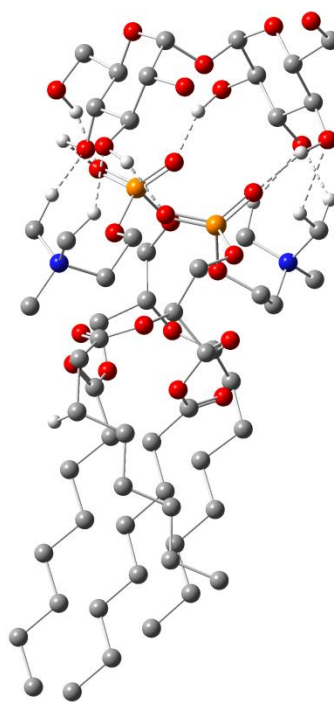
De acordo com os resultados apresentados na Tabela 18, pode-se dizer que todas as ligações-hidrogênio estabelecidas entre a trealose e o protótipo de membrana fosfolipídica são equivalentes, uma vez que apresentam distâncias médias iguais a 2,0 Å.

Considerando os sistemas complexos mais representativos, foram comparadas as conformações estáveis para o dissacarídeo isolado e nos respectivos sistemas complexos. Tal comparação permite verificar o quanto a geometria do dissacarídeo foi alterada devido à presença do protótipo de membrana fosfolipídica, tal como em estudos anteriores⁶⁷, nos quais se comparou a influência da solvatação sobre a geometria de tais sistemas. A Figura 16 a seguir mostra os principais parâmetros geométricos que definem a conformação de dissacarídeos.

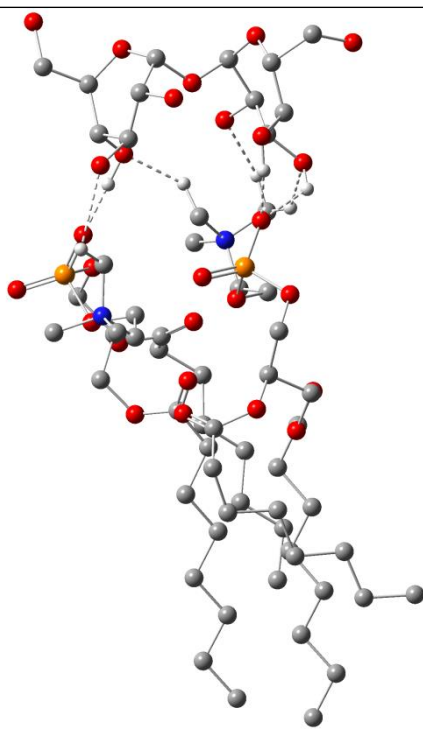
Figura 15. Sistemas complexos com trealose mais representativos: trea(A_gggt)-SD-baixo (a), trea(A_ggtg)-SD-baixo (b), trea(A_gtgg)-SD-baixo (c) e trea(A_gttg)-SD-baixo (d).



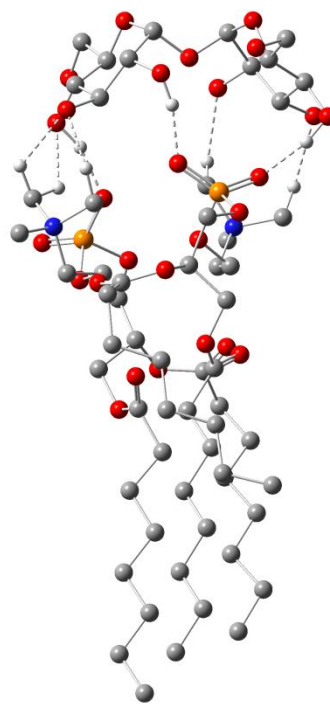
(a)



(b)



(c)



(d)

Tabela 18. Formas de interação e respectivas distâncias das ligações-hidrogênio estabelecidas entre trealose e o protótipo de membrana fosfolipídica, considerando os sistemas complexos mais representativos. Distâncias de ligação em Angstroms.

Sistema complexo trea(A_gggt)-SD-baixo			
Anel Φ		Anel Ψ	
Forma de interação	Distância	Forma de interação	Distância
$\sim\text{OH}_{(C2)}\dots\text{O1}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{-}_2}$	2,1	$\sim\text{OH}_{(C2')}\dots\text{O1}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{-}_1}$	1,9
$\sim\text{OH}_{(C3)}\dots\text{O2}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{-}_2}$	1,8	$\sim\text{OH}_{(C3')}\dots\text{H1}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_2}$	2,6
$\sim\text{OH}_{(C3)}\dots\text{H1}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_1}$	2,0	$\sim\text{OH}_{(C3')}\dots\text{H2}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_2}$	2,2
$\sim\text{OH}_{(C4)}\dots\text{O1}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{-}_1}$	1,7	$\sim\text{OH}_{(C4')}\dots\text{O1}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{-}_2}$	2,0
$\sim\text{OH}_{(C4)}\dots\text{H2}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_1}$	2,1	$\sim\text{OH}_{(C4')}\dots\text{H3}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_2}$	2,3

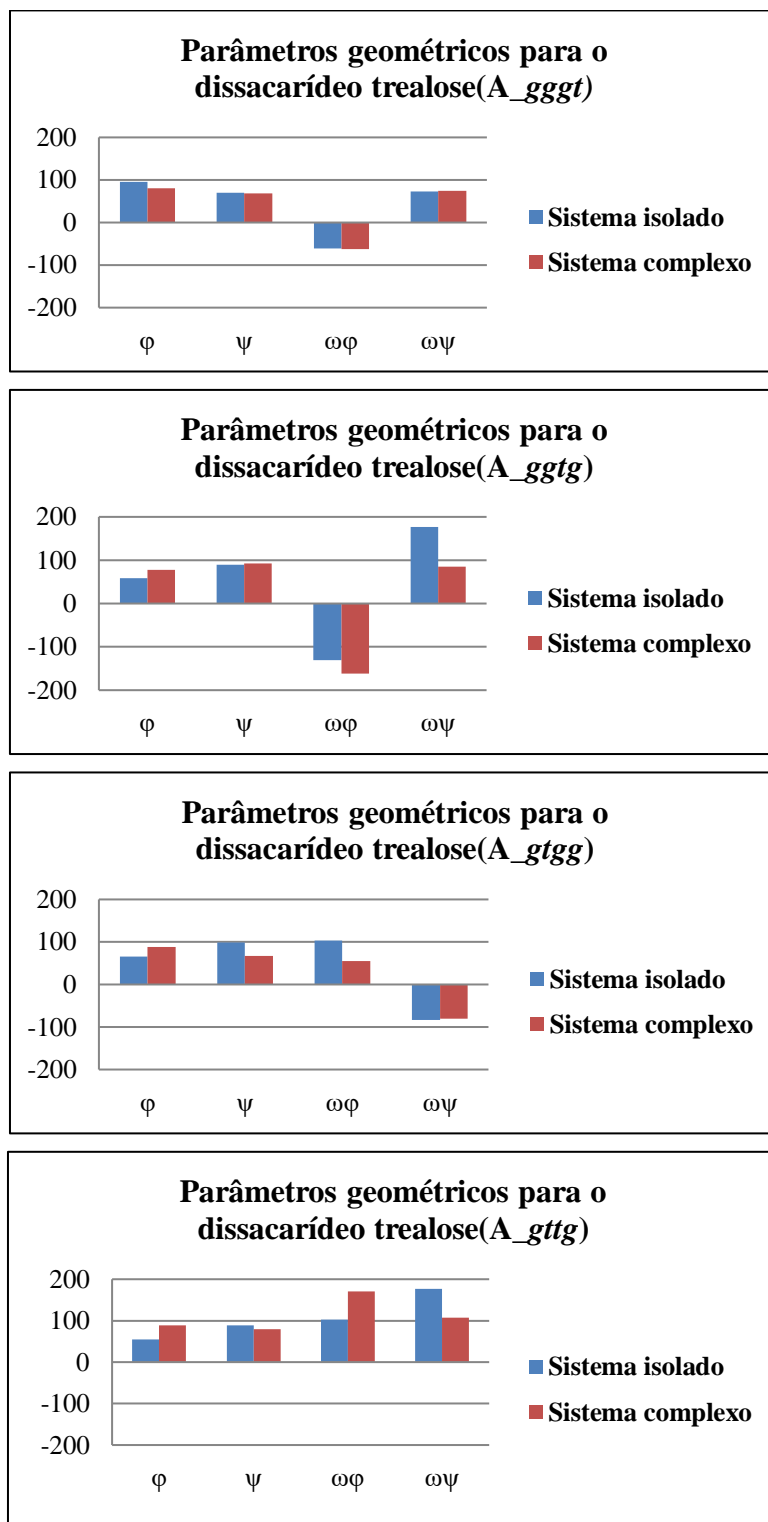
Sistema complexo trea(A_ggtg)-SD-baixo			
Anel Φ		Anel Ψ	
Forma de interação	Distância	Forma de interação	Distância
$\sim\text{OH}_{(C3)}\dots\text{O2}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{-}_2}$	1,9	$\sim\text{OH}_{(C2')}\dots\text{O2}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{-}_1}$	1,7
$\sim\text{OH}_{(C3)}\dots\text{H1}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_1}$	2,0	$\sim\text{OH}_{(C3')}\dots\text{H1}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_2}$	2,2
$\sim\text{OH}_{(C4)}\dots\text{O1}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{-}_1}$	2,0	$\sim\text{OH}_{(C3')}\dots\text{H2}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_2}$	2,1
$\sim\text{OH}_{(C4)}\dots\text{H2}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_1}$	2,0	$\sim\text{OH}_{(C4')}\dots\text{O1}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{-}_2}$	1,9
$\sim\text{OH}_{(C6)}\dots\text{O1}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{-}_1}$	1,8	$\sim\text{OH}_{(C4')}\dots\text{H3}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_2}$	2,3

Sistema complexo trea(A_gtgg)-SD-baixo			
Anel Φ		Anel Ψ	
Forma de interação	Distância	Forma de interação	Distância
$\sim\text{OH}_{(C3)}\dots\text{H1}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_1}$	2,5	$\sim\text{OH}_{(C2')}\dots\text{H2}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_2}$	2,2
$\sim\text{OH}_{(C4)}\dots\text{O1}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{-}_1}$	1,7	$\sim\text{OH}_{(C3')}\dots\text{O1}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{-}_2}$	1,9
$\sim\text{OH}_{(C4)}\dots\text{H1}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_2}$	2,1	$\sim\text{OH}_{(C3')}\dots\text{H3}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_2}$	2,0
		$\sim\text{OH}_{(C4')}\dots\text{O1}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{-}_2}$	1,8

Sistema complexo trea(A_gttg)-SD-baixo			
Anel Φ		Anel Ψ	
Forma de interação	Distância	Forma de interação	Distância
$\sim\text{OH}_{(C2)}\dots\text{O2}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{-}_2}$	1,8	$\sim\text{OH}_{(C2')}\dots\text{H1}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_2}$	2,2
$\sim\text{OH}_{(C3)}\dots\text{H1}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_1}$	1,1	$\sim\text{OH}_{(C3')}\dots\text{H2}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_2}$	2,3
$\sim\text{OH}_{(C3)}\dots\text{H2}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_1}$	2,3	$\sim\text{OH}_{(C4')}\dots\text{O1}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{-}_2}$	1,8
$\sim\text{OH}_{(C4)}\dots\text{O1}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{-}_1}$	1,7		
$\sim\text{OH}_{(C4)}\dots\text{H3}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_1}$	2,2		

Os subscritos “1” e “2” utilizados nos grupos fosfato e trimetil amônio têm como objetivo diferenciá-los, uma vez que o protótipo de membrana fosfolipídica consiste em um sistema dimérico composto por duas moléculas de DOcPC. Dessa forma, $(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{-}_i$ e $(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_i$ correspondem aos grupos fosfato e trimetil amônio que compõem o sistema monomérico *i*.

Figura 16. Ângulos diedros, em graus, que definem a orientação relativa dos anéis monossacarídicos (Φ e Ψ) e dos grupos hidroximetilênicos (ω_ϕ e ω_ψ) para as conformações mais estáveis do dissacarídeo trealose, considerando o sistema isolado e os sistemas complexos “aneis p/baixo”.



Analisando a Figura 16, podemos perceber que, de uma maneira geral, os ângulos glicosídicos da trealose são pouco alterados pela presença do protótipo de membrana fosfolipídica, tal como foi observado em estudos anteriores, quando na comparação do sistema isolado e do sistema solvatado.⁶⁷ Isso indica que efeitos intramoleculares parecem ser determinantes para a estabilidade conformacional desse dissacarídeo, o que faz com que o mesmo se comporte como um sistema extremamente rígido, no sentido de que o ambiente externo parece ter pouca influência sobre o valor assumido por seus ângulos glicosídicos, que são os parâmetros geométricos mais importantes e que definem a orientação relativa entre os anéis de glicose.

Etapa 5.2) Sistemas complexos com maltose

Foram construídos seis sistemas complexos com maltose, três para cada forma de aproximação (“baixo” e “cima”). A nomenclatura utilizada para a identificação dos sistemas complexos tem a seguinte sintaxe: malto(conformação)-SD-forma de aproximação. A seguir são apresentadas as curvas de energia de interação para os sistemas complexos formados a partir da interação do dissacarídeo maltose com o protótipo de membrana fosfolipídica (Figuras 17 e 18).

Analisando os resultados apresentados nas figuras 17 e 18, é possível organizar a seguinte tabela (Tabela 19), que reporta as distâncias de aproximação O–X ótimas entre o dissacarídeo e o protótipo de membrana fosfolipídica.

Conforme apresentado na Tabela 19, de uma maneira geral, as distâncias O–X ótimas entre maltose e o protótipo de membrana encontram-se no intervalo de 2,0 Å a 4,0 Å. As energias relativas dos respectivos sistemas complexos totalmente otimizados são apresentadas na Tabela 20.

Considerando as três estruturas de partida que foram tomadas para cada sistema complexo, pode-se concluir, inicialmente, que existe somente uma conformação mais estável para cada sistema complexo, segundo a metodologia empregada na presente tese, gerando um conjunto de seis conformações estáveis. Isso pode ser visto pelos altos valores de energia relativa em cada uma das colunas da Tabela 20. A fim de comparar a estabilidade relativa dos sistemas complexos em função das formas de aproximação, bem como suas respectivas energias de interação, organizou-se a Tabela 21, na qual estão presentes somente os sistemas complexos mais estáveis considerando cada uma das formas de aproximação propostas.

Analisando os resultados da Tabela 21, pode-se concluir que os sistemas complexos “baixo” são mais estáveis que os sistemas complexos “cima”. Assim, considerando o conjunto de conformações analisado, existem três conformações representativas para o sistema complexo maltose-protótipo de membrana fosfolipídica. As energias relativas e de interação são apresentadas na Tabela 22 a seguir.

A Figura 19 mostra as conformações representativas para o sistema complexo maltose-protótipo de membrana fosfolipídica (Tabela 22), nas quais se também identificam duas formas de interação entre o dissacarídeo e as cabeças fosfolipídicas do protótipo de membrana fosfolipídica, ambas classificadas como ligações-hidrogênio.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 23, pode-se dizer que todas as ligações-hidrogênio estabelecidas entre a maltose e o protótipo de membrana fosfolipídica são equivalentes, uma vez que apresentam distâncias médias iguais a 2,0 Å.

Além disso, considerando os sistemas complexos mais representativos, foram comparadas as conformações estáveis para o dissacarídeo isolado e nos respectivos sistemas complexos. Tal comparação permite verificar o quanto a geometria do dissacarídeo se altera devido à presença do protótipo de membrana fosfolipídica, tal como realizado em estudos anteriores, quando se analisou a influência da solvatação sobre a geometria de dissacarídeos isolados.⁶⁷ A Figura 20 a seguir mostra os principais parâmetros geométricos que definem a conformação de dissacarídeos.

Nesse momento, cabe mencionar que uma comparação muito interessante a ser feita é a da influência dos dissacarídeos sobre a geometria do PMF, principalmente no que diz respeito às distâncias entre as porções apolares dos fosfolipídios. Isso porque se acredita que a ancoragem do dissacarídeo garante aos fosfolipídios a manutenção do distanciamento característico do estado líquido-cristalino, mesmo na ausência de água e, dessa forma, a viabilidade desses agregados em processos de criopreservação e liofilização. Logo, tal comparação nos permitiria verificar se metodologia que foi proposta é capaz de simular a influência dos dissacarídeos sobre a manutenção da estrutura do PMF.

No entanto, tal comparação não foi feita no presente estudo. Primeiramente, porque esse não era um dos objetivos, nesse primeiro momento, mas sim o estudo das interações específicas dissacarídeo-fosfolipídeo. E, posteriormente, devido à necessidade de mudança de metodologia, a fim de dar andamento ao trabalho, conforme mencionado anteriormente.

Figura 17. Curvas de energia de interação “baixo” para os sistemas complexos com maltose.
 ΔE_{inter}^{comp} em kcal/mol. Distâncias em Angstroms.

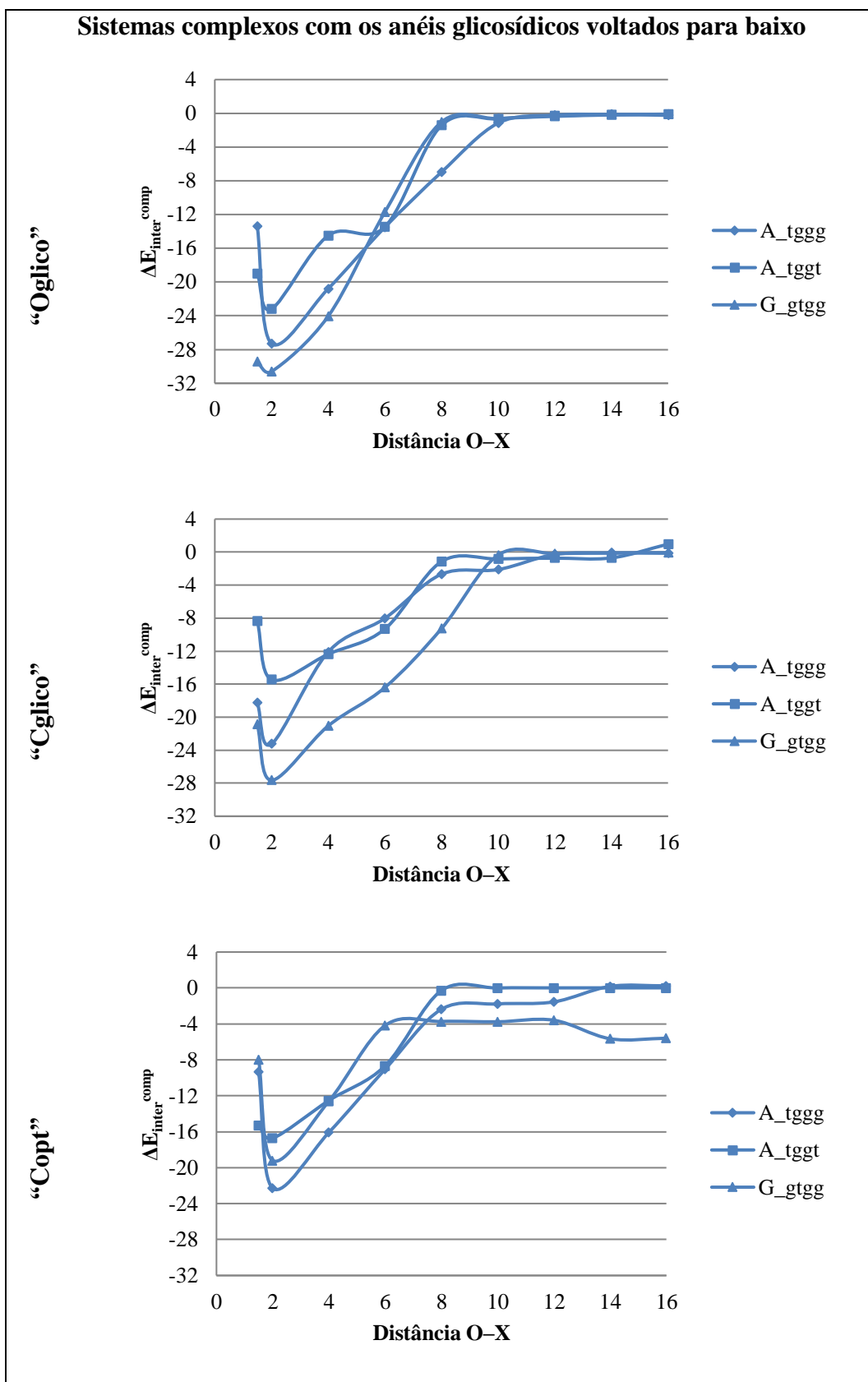


Figura 18. Curvas de energia de interação “cima” para os sistemas complexos com maltose. ΔE_{inter}^{comp} em kcal/mol. Distâncias em Angstroms.

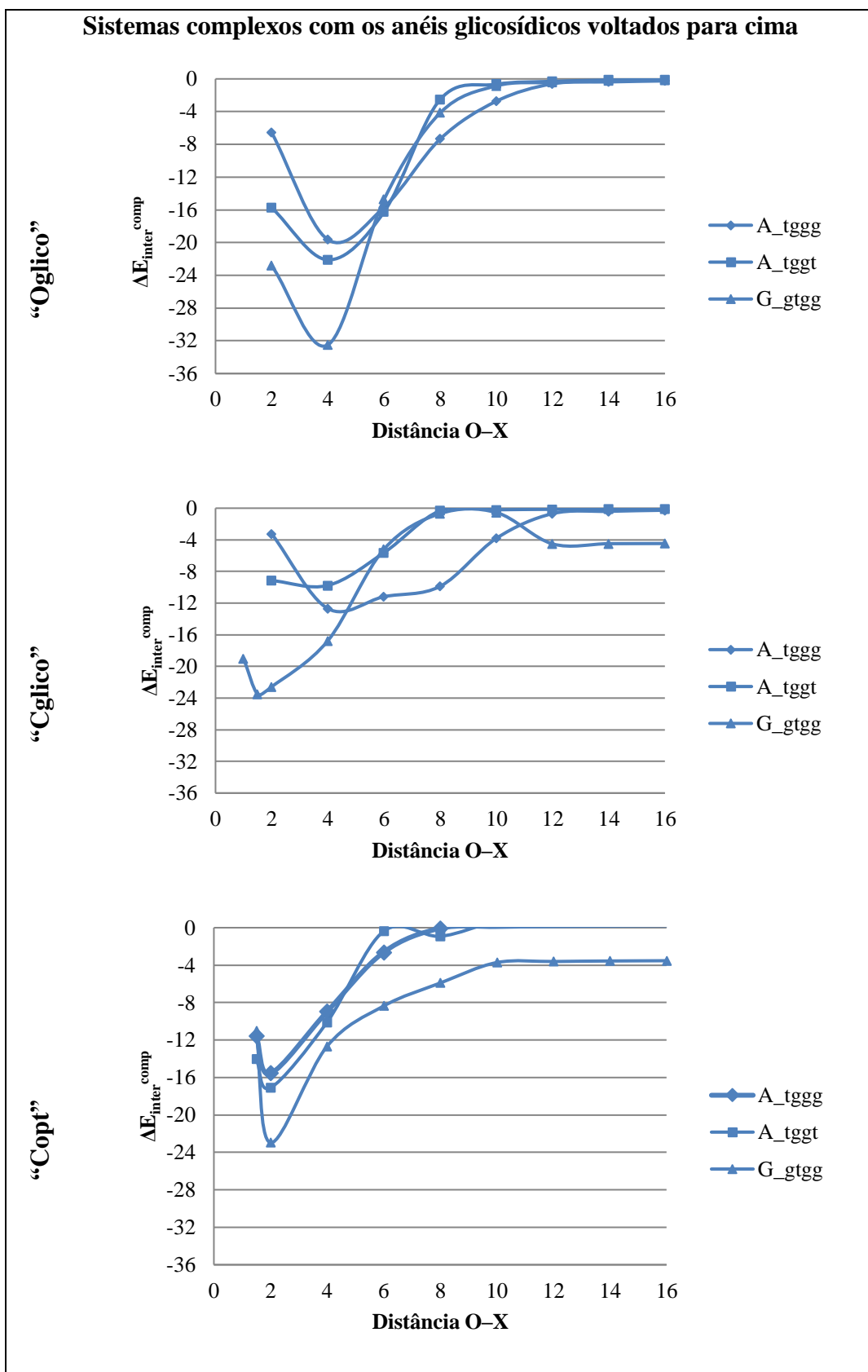


Tabela 19. Distâncias O–X ótimas entre maltose e o protótipo de membrana fosfolipídica, em Angstroms, considerando os seis sistemas complexos estudados.

Curva de energia de interação	Forma de aproximação dissacarídeo-protótipo de membrana					
	Baixo			Cima		
	A_tggg	A_tggt	G_gtgg	A_tggg	A_tggt	G_gtgg
Oglico	2,0	2,0	2,0	4,0	4,0	4,0
Cglico	2,0	2,0	2,0	4,0	4,0	1,5
Copt	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

Tabela 20. Energias relativas dos sistemas complexos da Tabela 19, totalmente otimizados, em kcal/mol.

Curva de energia de interação	Forma de aproximação dissacarídeo-protótipo de membrana					
	Baixo			Cima		
	A_tggg	A_tggt	G_gtgg	A_tggg	A_tggt	G_gtgg
Oglico	0	4,50	8,62	0	3,21	0
Cglico	0	3,42	0	6,02	7,70	9,37
Copt	43,08	0	2,50	3,50	0	7,21

Energias de referência: -2,449644 u.a. e -2,438111 u.a. (malto(A_tggg)-baixo e malto(A_tggg)-cima), -2,451084 u.a. e -2,434668 u.a. (malto(A_tggt)-baixo e malto(A_tggt)-cima) e -2,453812 u.a. e -2,446936 u.a. (malto(G_gtgg)-baixo e malto(G_gtgg)-cima).

Tabela 21. Conformações estáveis para os seis sistemas complexos com maltose, considerando ambas as formas de aproximação “baixo” e “cima”. Os valores de energia relativa (ΔU_{eq}) e de energia de interação (ΔE_{inter}^{comp}) estão em kcal/mol.

Confômero	ΔU_{eq}	ΔE_{inter}^{comp}
malto(A_tggg)-SD-baixo	0	-31,86
malto(A_tggg)-SD-cima	7,24	-24,62
malto(A_tggt)-SD-baixo	0	-33,10
malto(A_tggt)-SD-cima	10,30	-22,80
malto(G_gtgg)-SD-baixo	0	-38,83
malto(G_gtgg)-SD-cima	4,31	-34,51

Tabela 22. Conformações mais estáveis para os sistemas complexos com maltose. Valores de energia relativa (ΔU_{eq}) e de energia de interação (ΔE_{int}^{comp}) em kcal/mol.

Confôrmere	ΔU_{eq}	ΔE_{int}^{comp}
malto(A_tggg)-SD-baixo	2,61	-31,86
malto(A_tggt)-SD-baixo	1,71	-33,10
malto(G_tggt)-SD-baixo	0	-38,83

Figura 19. Sistemas complexos com maltose mais representativos: malto(A_tggg)-SD-baixo (a), malto(A_tggt)-SD-baixo (b) e malto(G_tggt)-SD-baixo (c).

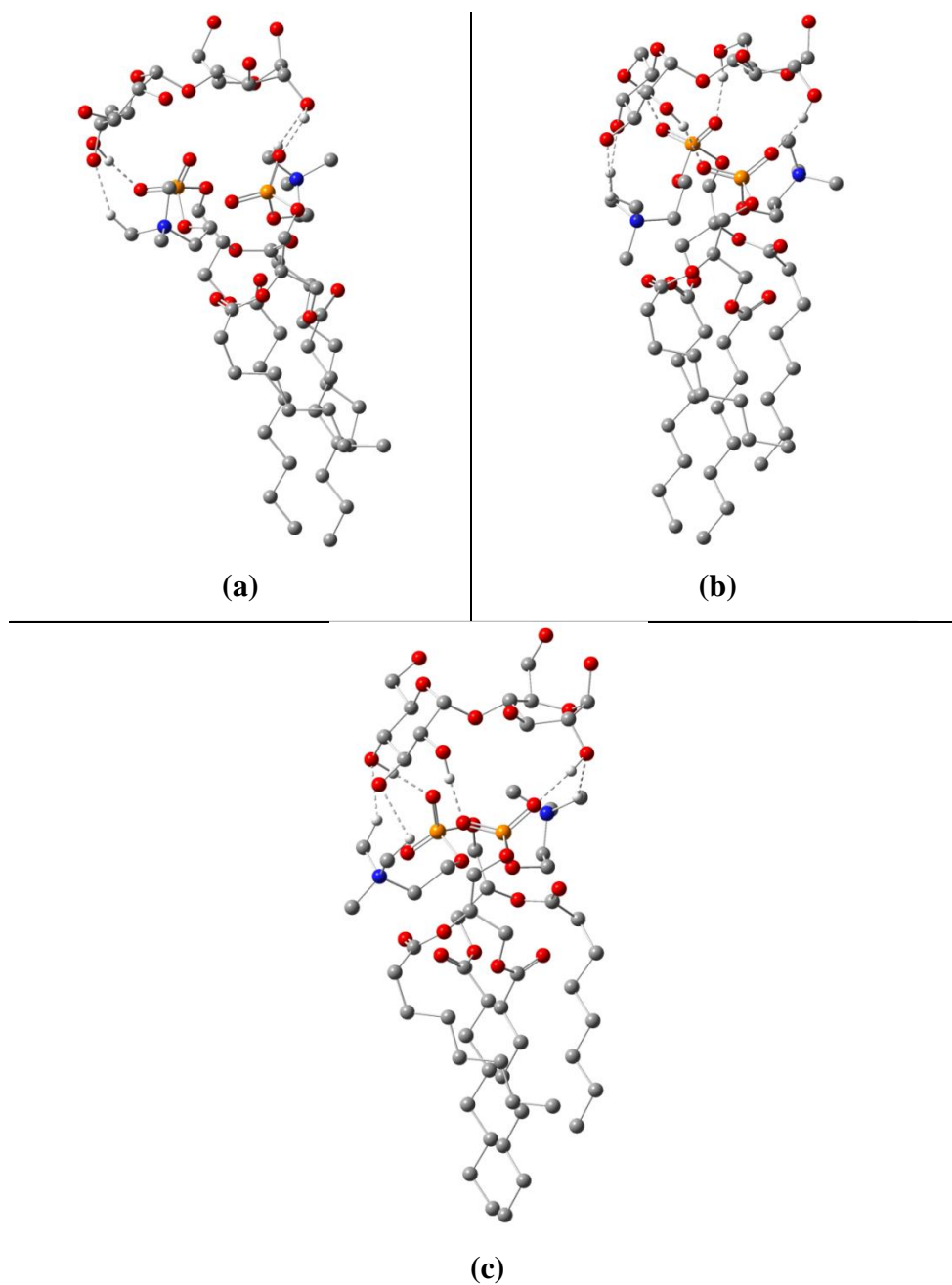
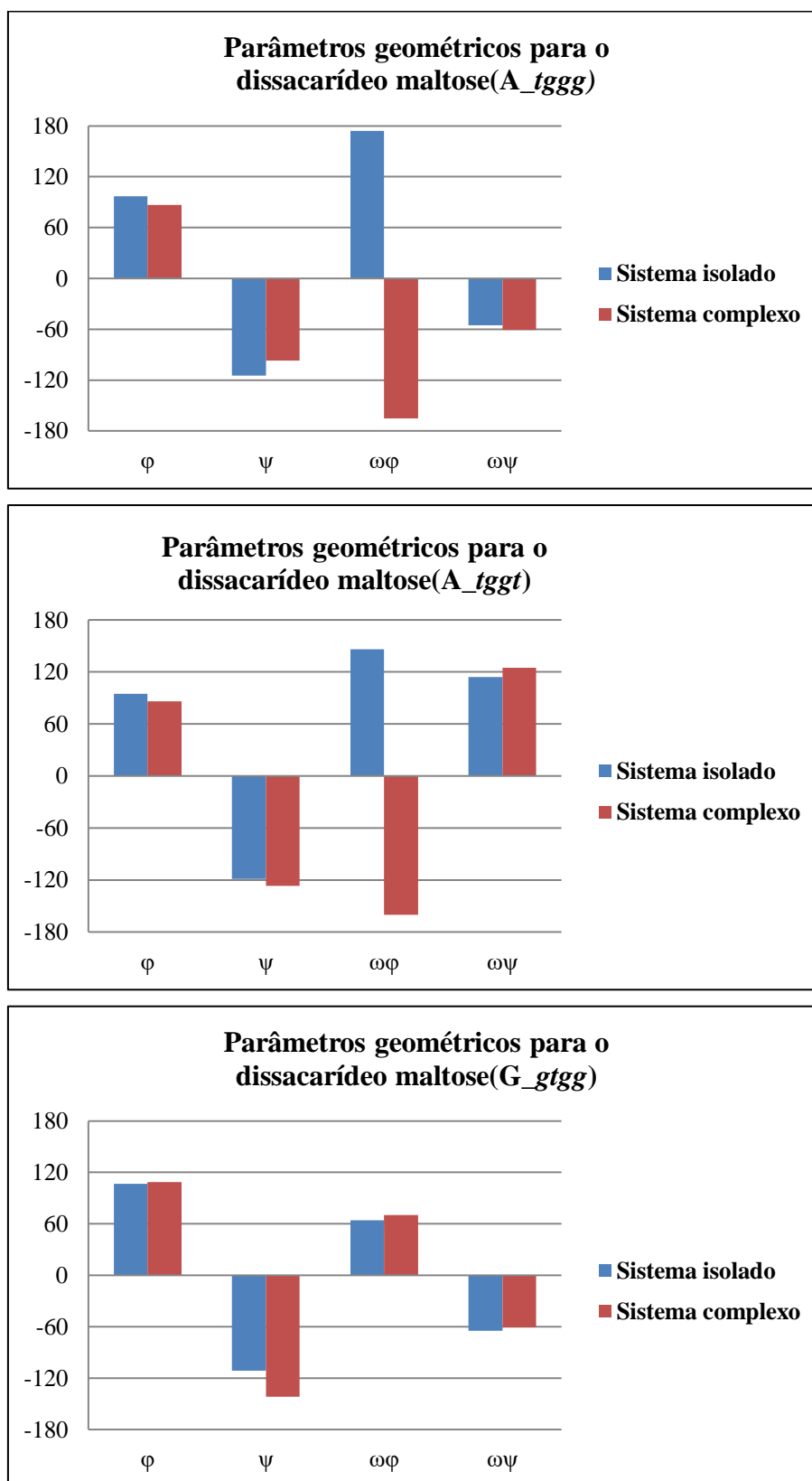


Tabela 23. Formas de interação e respectivas distâncias das ligações-hidrogênio estabelecidas entre maltose e o protótipo de membrana fosfolipídica, considerando os sistemas complexos mais representativos. Distâncias de ligação em Angstroms.

Sistema complexo malto(A_tggg)-SD-baixo			
Anel Φ		Anel Ψ	
Forma de interação	Distância	Forma de interação	Distância
$\sim\text{OH}_{(\text{C}4)}\dots\text{H1}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_1}$	2,2	$\sim\text{OH}_{(\text{C}2')}\dots\text{O1}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{\ddagger}_2}$	1,8
$\sim\text{OH}_{(\text{C}6)}\dots\text{O1}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{\ddagger}_1}$	1,7	$\sim\text{OH}_{(\text{C}2')}\dots\text{H1}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\ddagger}_2}$	2,1
Sistema complexo malto(A_tggt)-SD-baixo			
Anel Φ		Anel Ψ	
Forma de interação	Distância	Forma de interação	Distância
$\sim\text{OH}_{(\text{C}2)}\dots\text{O2}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{\ddagger}_2}$	1,7	$\sim\text{OH}_{(\text{C}2')}\dots\text{O1}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{\ddagger}_2}$	1,9
$\sim\text{OH}_{(\text{C}3)}\dots\text{H1}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_1}$	2,4	$\sim\text{OH}_{(\text{C}2')}\dots\text{H1}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\ddagger}_2}$	2,2
$\sim\text{OH}_{(\text{C}4)}\dots\text{O1}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{\ddagger}_1}$	1,7		
$\sim\text{OH}_{(\text{C}4)}\dots\text{H2}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_1}$	2,4		
Sistema complexo malto(G_tggt)-SD-baixo			
Anel Φ		Anel Ψ	
Forma de interação	Distância	Forma de interação	Distância
$\sim\text{OH}_{(\text{C}2)}\dots\text{O2}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{\ddagger}_2}$	1,7	$\sim\text{OH}_{(\text{C}2')}\dots\text{O1}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{\ddagger}_2}$	1,9
$\sim\text{OH}_{(\text{C}3)}\dots\text{H1}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_1}$	2,4	$\sim\text{OH}_{(\text{C}2')}\dots\text{H1}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\ddagger}_2}$	2,2
$\sim\text{OH}_{(\text{C}4)}\dots\text{O1}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{\ddagger}_1}$	1,7		
$\sim\text{OH}_{(\text{C}4)}\dots\text{H2}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_1}$	2,4		

Os subscritos “1” e “2” utilizados nos grupos fosfato e trimetil amônio têm como objetivo diferenciá-los, uma vez que o protótipo de membrana fosfolipídica consiste em um sistema dimérico composto por duas moléculas de DOcPC. Dessa forma, $(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)^{\ddagger}_1$ e $(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)^{\dagger}_1$ correspondem aos grupos fosfato e trimetil amônio que compõem o sistema monomérico i.

Figura 20. Ângulos diedros, em graus, que definem a orientação relativa dos anéis monossacarídicos (Φ e Ψ) e dos grupos hidroximetilênicos (ω_ϕ e ω_ψ) para as conformações mais estáveis do dissacarídeo maltose, considerando o sistema isolado e os sistemas complexos “aneis p/baixo”.



Analisando a Figura 20, podemos perceber que, segundo a metodologia PM6, os ângulos glicosídicos da maltose também não são bruscamente modificados quando na presença do protótipo de membrana fosfolipídica. No entanto, os ângulos diedros dos grupos metilênicos são bastante modificados. Tal resultado não se desvia totalmente do que foi encontrado em estudos anteriores, quando se avaliou o efeito da solvatação sobre a geometria da maltose.⁶⁷ Comparando os resultados obtidos para a maltose (Figura 20) com os resultados obtidos para a trealose (Figura 16), novamente, parece que a estabilidade conformacional do dissacarídeo trealose é em grande parte dependente de efeitos intramoleculares, o que o torna um sistema rígido e isso talvez possa ser associado às suas propriedades diferenciadas.

Etapa 5.3) Sistemas complexos com celobiose

Foram construídos dois sistemas complexos com celobiose do tipo “baixo”. A nomenclatura utilizada para a identificação dos sistemas complexos tem a seguinte sintaxe: celo(conformação)-SD,baixo. Cabe salientar que, para esse dissacarídeo, avaliou-se somente a forma de aproximação “baixo”, tendo em vista que a forma de aproximação “cima” mostrou-se menos estável nos estudos realizados anteriormente (trelose e isomaltose). A seguir são apresentadas as curvas de energia de interação para os sistemas complexos formados a partir da interação do dissacarídeo celobiose com o protótipo de membrana fosfolipídica (Figura 21).

Analisando os resultados apresentados na Figura 21, é possível organizar a seguinte tabela (Tabela 24), que reporta as distâncias de aproximação O–X ótimas entre o dissacarídeo e o protótipo de membrana fosfolipídica, em função dos tipos de curvas de energia de interação considerados.

Conforme apresentado na Tabela 24, as distâncias O–X ótimas entre celobiose e o protótipo de membrana encontram-se no intervalo de 2,0 Å a 4,0 Å. As energias relativas dos respectivos sistemas complexos totalmente otimizados são apresentadas na Tabela 25.

Considerando as três estruturas de partida que foram tomadas para cada sistema complexo, pode-se concluir, inicialmente, que existe somente uma conformação mais estável para cada sistema complexo considerado. A fim de comparar as respectivas energias de interação, organizou-se a Tabela 26, na qual estão presentes somente os sistemas complexos mais estáveis.

Figura 21. Curvas de energia de interação para os sistemas complexos com celobiose (“baixo”).
 $\Delta E_{\text{inter}}^{\text{comp}}$ em kcal/mol. Distâncias em Angstroms.

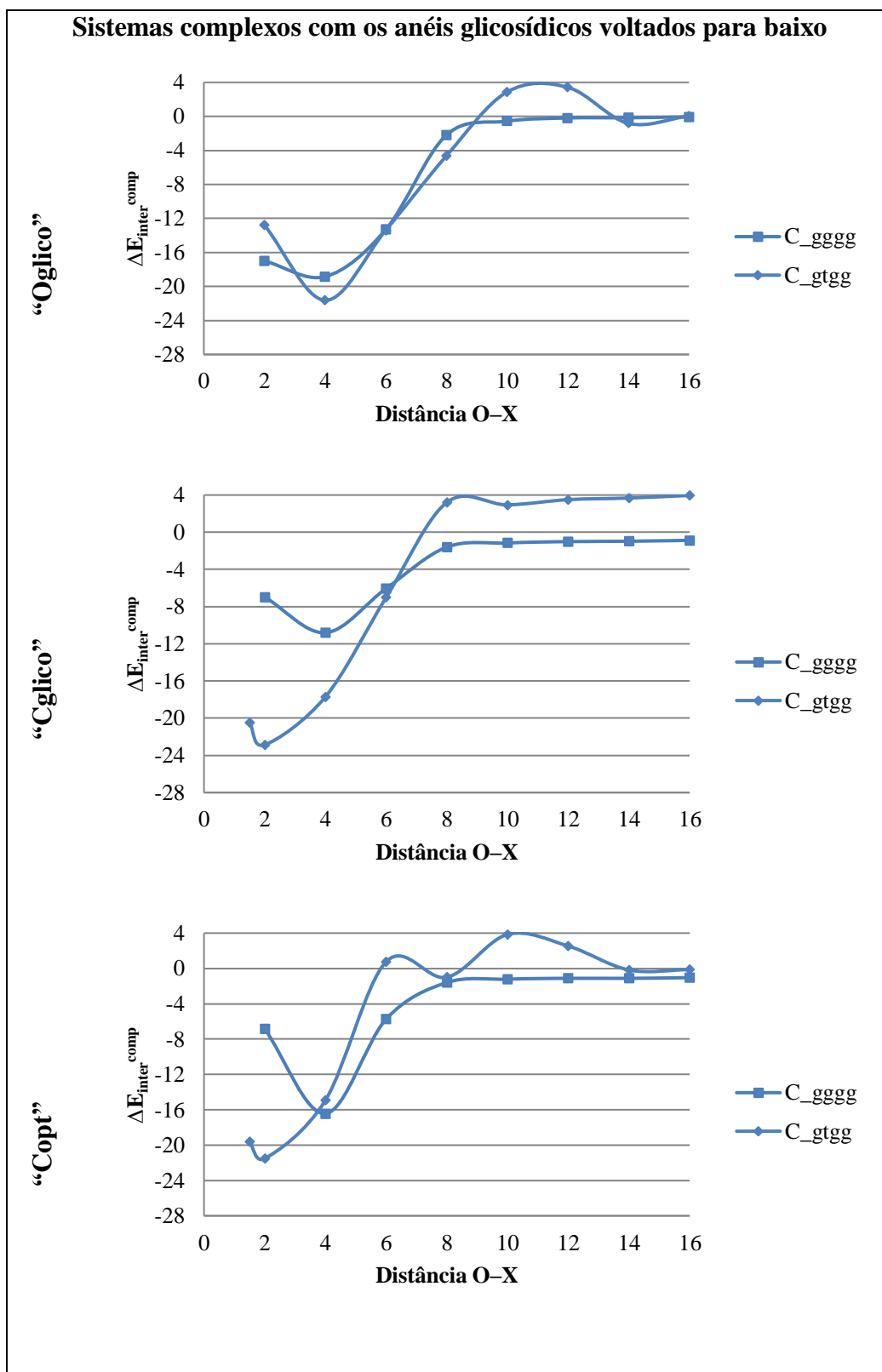


Tabela 24. Distâncias O–X ótimas entre celobiose e o protótipo de membrana fosfolipídica, em Angstroms, considerando os dois sistemas complexos estudados, em função do tipo de curva de energia de interação.

Curva de energia de interação	C_gggg	C_gtgg
Oglico	4,0	4,0
Cglico	4,0	2,0
Copt	4,0	2,0

Tabela 25. Energias relativas dos sistemas complexos reportados na Tabela 24, totalmente otimizados, em kcal/mol.

Curva de energia de interação	C_gggg	C_gtgg
Oglico	13,06	0,40
Cglico	6,19	0
Copt	0	0

As energias dos sistemas de referência são -2,433962u.a. (C_gggg) e -2,435813u.a. (C_gtgg).

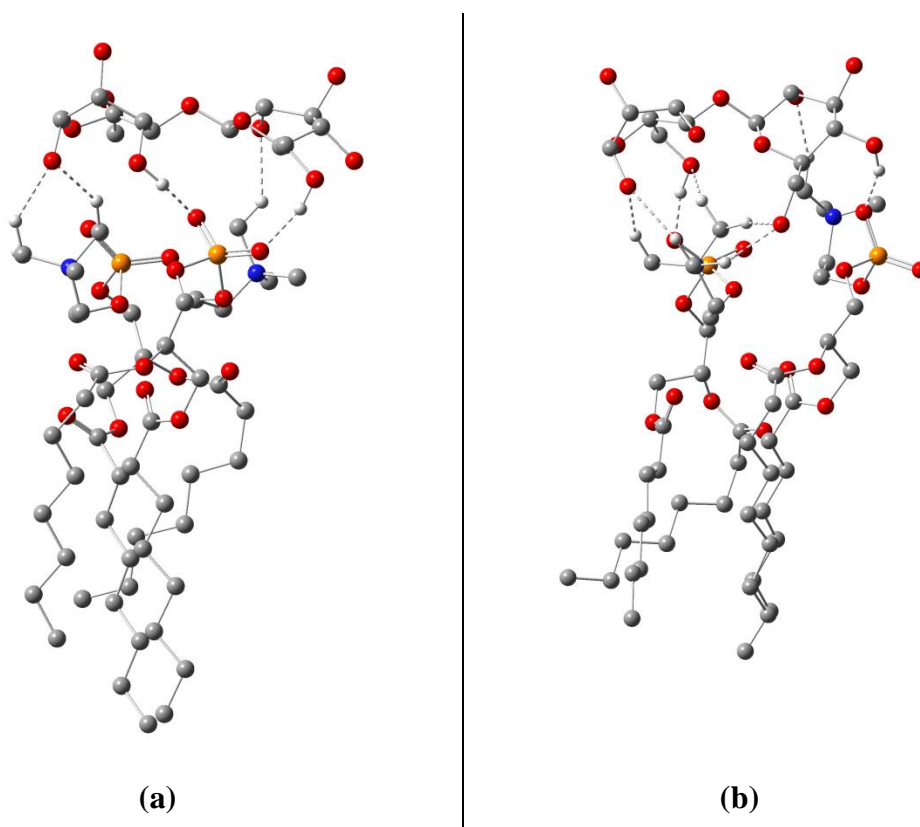
Tabela 26. Conformações estáveis para os dois sistemas complexos com celobiose. Valores de energia relativa (ΔU_{eq}) e de energia de interação (ΔE_{inter}^{comp}) em kcal/mol.

Conformação	ΔU_{eq}	ΔE_{inter}^{comp}
celo(C_gggg)-SD-baixo	1,16	-27,08
celo(C_gtgg)-SD-baixo	0	-25,15

Analisando os resultados da Tabela 26, pode-se concluir que ambas as conformações são representativas para o sistema complexo celobiose-protótipo de membrana fosfolipídica. A Figura 22 mostra tais conformações, nas quais também se identificam duas formas de interação entre o dissacarídeo e as cabeças fosfolipídicas do protótipo de membrana fosfolipídica, ambas classificadas como ligações-hidrogênio.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 27, pode-se dizer que todas as ligações-hidrogênio estabelecidas entre a celobiose e o protótipo de membrana fosfolipídica são equivalentes, uma vez que apresentam distâncias médias iguais a 2,0 Å.

Figura 22. Sistemas complexos com celobiose: celo(C_ggg)-SD-baixo (a) e celo(C_gtg)-SD-baixo (b).



Além disso, considerando os sistemas complexos mais representativos, foram comparadas as conformações estáveis para o dissacarídeo isolado e nos respectivos sistemas complexos. Tal comparação permite verificar o quanto a geometria do dissacarídeo se altera devido à presença do protótipo de membrana fosfolipídica e também foi feita em estudos anteriores, porém comparando o efeito da solvatação sobre a geometria do dissacarídeo.⁶⁷

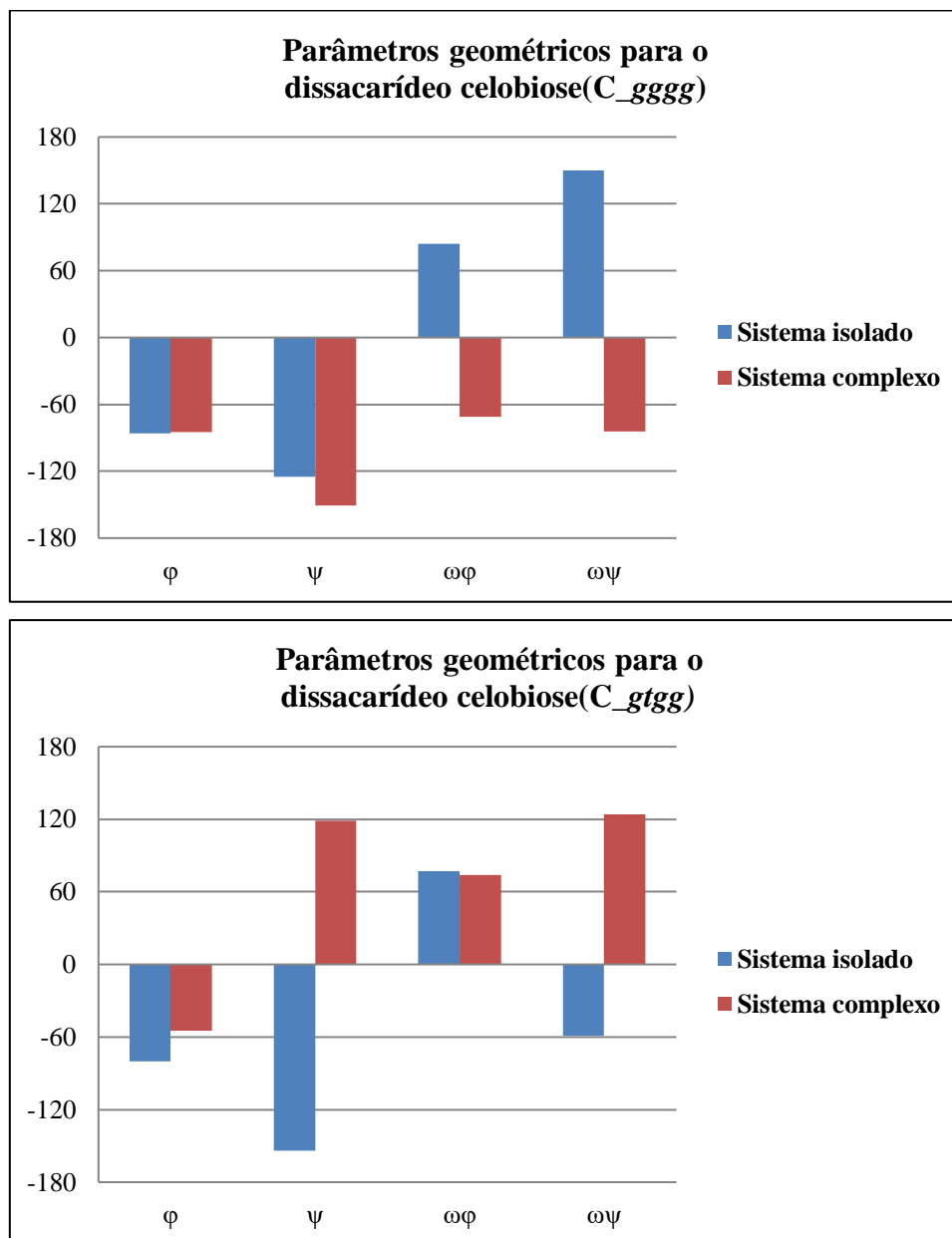
A Figura 23 a seguir mostra os principais parâmetros geométricos que definem a conformação de dissacarídeos. Nela, constatamos que as variações nos ângulos glicosídicos, bem como nos ângulos diedros correspondentes aos grupos hidroximetilênicos, são muito mais pronunciadas para a celobiose do que para os dissacarídeos trealose e maltose. Isso concorda com os estudos anteriormente realizados e, dessa forma, também segundo a metodologia PM6, a geometria da trealose parece ser mais rígida do que a da maltose, que parece ser mais rígida do que a da celobiose.

Tabela 27. Formas de interação e respectivas distâncias das ligações-hidrogênio estabelecidas entre celobiose e o protótipo de membrana fosfolipídica, considerando os sistemas complexos mais representativos. Distâncias de ligação em Angstroms.

Sistema complexo celo(C_gggg)-SD-baixo			
Anel Φ		Anel Ψ	
Forma de interação	Distância	Forma de interação	Distância
$\sim\text{OH}_{(C2)}\dots\text{H1}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)_1^+}$	2,2	$\sim\text{OH}_{(C1')}\dots\text{H1}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)_2^+}$	2,1
$\sim\text{OH}_{(C6)}\dots\text{O1}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)_1^-}$	1,9	$\sim\text{OH}_{(C1')}\dots\text{H2}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)_2^+}$	2,4
		$\sim\text{OH}_{(C3')}\dots\text{O2}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)_1^-}$	1,7
Sistema complexo celo(C_gtgg)-SD-baixo			
Anel Φ		Anel Ψ	
Forma de interação	Distância	Forma de interação	Distância
$\sim\text{OH}_{(C2)}\dots\text{H1}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)_1^+}$	2,1	$\sim\text{OH}_{(C1')}\dots\text{H3}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)_2^+}$	2,1
$\sim\text{OH}_{(C4)}\dots\text{O1}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)_1^-}$	1,7	$\sim\text{OH}_{(C1')}\dots\text{H4}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)_2^+}$	2,1
$\sim\text{OH}_{(C6)}\dots\text{H1}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)_2^+}$	2,0	$\sim\text{OH}_{(C6')}\dots\text{O1}_{(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)_2^-}$	1,7
$\sim\text{OH}_{(C6)}\dots\text{H2}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)_2^+}$	2,2	$\sim\text{OH}_{(C6')}\dots\text{H5}_{(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)_2^+}$	2,2

Os subscritos “1” e “2” utilizados nos grupos fosfato e trimetil amônio têm como objetivo diferenciá-los, uma vez que o protótipo de membrana fosfolipídica consiste em um sistema dimérico composto por duas moléculas de DOcPC. Dessa forma, $(\sim\text{OPO}_2\text{O}\sim)_1^-$ e $(\sim\text{N}(\text{CH}_3)_3)_1^+$ correspondem aos grupos fosfato e trimetil amônio que compõem o sistema monomérico i.

Figura 23. Ângulos diedros, em graus, que definem a orientação relativa dos anéis glicosídicos (Φ e Ψ) e dos grupos hidroximetilênicos (ω_ϕ e ω_ψ) para as conformações mais estáveis do dissacarídeo celobiose, considerando o sistema isolado e os sistemas complexos “aneis p/baixo”.



Diante do conjunto de resultados obtidos, organizamos os dados relativos às energias de interação dissacarídeo-PMF na Tabela 28 a seguir. Na verdade, buscamos relacionar à variação dos ângulos glicosídicos (figuras 16, 20 e 23) à intensidade da interação dissacarídeo-PMF (tabelas 17, 22 e 26), isso considerando os sistemas mais estáveis em cada caso. Nesse momento, fizemos uma mudança de nomenclatura, a fim de facilitar a identificação dos sistemas tomados como modelo para a interação em questão. Tal mudança envolveu a alteração da nomenclatura dos conformeros dos

dissacarídeos, seguindo a ordem numérica na qual os mesmos foram apresentados nas tabelas 17, 22 e 26, e a mudança do sufixo referente ao protótipo de membrana fosfolipídica, que foi alterado de “SD-baixo” para PMF.

Tabela 28. Energias de interação e variação dos ângulos diedros glicosídicos para os sistemas mais estáveis quando se considera o dissacarídeo isolado e o dissacarídeo ancorado ao protótipo de membrana fosfolipídica (dissacarídeo-PMF). n_{ligH} é o número de ligações hidrogênio identificadas nos sistemas.

Sistema complexo mais estável	$\Delta E_{\text{interação}}$ (kcal/mol)	$\Delta\Phi$ (graus)	$\Delta\Psi$ (graus)	n_{ligH}
Trealose(2)-PMF	-36,85	-15	-2	10
Maltose(3)-PMF	-38,83	2	-31	6
Celobiose(2)-PMF	-25,15	-3	183	8

Conforme pode ser constatado por meio dos dados da Tabela 28, a energia de interação entre trealose e o PMF apresenta um valor intermediário àqueles apresentados pela maltose e pela celobiose. Tais resultados para as energias de interação sugerem que a interação estabelecida entre trealose e o PMF é favorável, porém reversível, diferentemente da interação estabelecida entre maltose e o protótipo, que, por ser mais intensa, demandaria uma maior energia para ser desfeita. Na contramão do dissacarídeo maltose, está o dissacarídeo celobiose que, devido à baixa energia de interação, parece estabelecer com o PMF interações favoráveis, porém facilmente reversíveis. Tais resultados talvez possam ser associados com a capacidade da trealose “ligar-se ou desligar-se” das bicamadas fosfolipídicas quando as mesmas são desidratadas e reidratadas, o que poderia favorecer a manutenção da estrutura de tais agregados.

Além disso, podemos perceber que a trealose é o dissacarídeo que apresenta a menor variação nos valores de seus ângulos glicosídicos quando na formação do sistema interagente, o que pode ser compreendido como uma característica muitíssimo particular desse sistema e que permitiria o estabelecimento de interações bastante específicas e direcionadas pela conformação do dissacarídeo. Tais interações talvez sejam fundamentais para a manutenção do espaçamento entre os fosfolipídios e, com isso, da estrutura de bicamadas fosfolipídicas, o que, de fato, tornaria esse dissacarídeo bastante particular, como parece ser o mesmo.

Outra observação que pode ser feita é que o valor da energia de interação não está diretamente relacionado ao número de ligações hidrogênio estabelecidas entre os

dissacarídeos e as cabeças polares dos fosfolipídios. Muito embora o número de ligações hidrogênio estabelecidas entre maltose e o PMF seja o menor de todos, o valor da energia de interação maltose-PMF é o maior de todos. Isso nos leva a suspeitar que a energia de interação dissacarídeo-fosfolipídio pode ser decomposta em dois termos: um associado às ligações hidrogênio dissacarídeo-cabeças polares e outro associado às interações dispersivas entre as cadeias carbônicas das porções apolares.

Etapa 6) Comparação com dados experimentais

Nesse momento, cabe destacar o que foi mencionado por Grdadolnik e Hadži, em 1998. Segundo os autores, a interação de carboidratos com vesículas fosfolipídicas ocorreria através da ligação de um anel piranosídico a duas moléculas de fosfolipídio, o que foi concluído através de estudos de espectroscopia no infravermelho.⁸³ A afirmação dos autores parece ser confirmada pelos resultados da presente tese, inclusive pelo fato de que, além de interações com os grupos fosfato, há de se considerar a possibilidade de interações com o grupo trimetil amônio, sendo que, segundo os autores, tais interações são dependentes da natureza do anel glicosídico (não-redutor *versus* redutor). De fato, os autores até mencionaram a possibilidade de tais interações, porém concluíram o trabalho afirmando que as interações específicas estabelecidas entre os carboidratos e os fosfolipídios seriam todas equivalentes entre si, uma vez que as variações observadas para os diferentes espectros de absorção foram muito próximas entre si.

Dados experimentais resultam de um conjunto de dados relativos às contribuições individuais de cada conformação estável para uma determinada substância. Então, claramente, a conclusão dos autores reforça a importância de estudos teóricos para a interpretação de determinados dados experimentais. Particularmente, os dados que são extremamente sensíveis às possíveis interações específicas entre substâncias, como é o caso de dados espectroscópicos.

Na tentativa de estudar a hipótese de “substituição de água”, conforme já mencionado na seção Metodologia, buscamos obter, teoricamente, valores para a frequência de estiramento assimétrico (PO_2^-) do grupo fosfato dos fosfolipídios do PMF e valores para a constante de acoplamento de spin heteronuclear ($^3J_{\text{C1,H1}}$) ao longo da ligação glicosídica da trealose, isso considerando os sistemas interagentes, ou seja, nos quais a interação dissacarídeo-fosfolipídio estava presente.

Os cálculos das frequências vibracionais para o PMF e para os sistemas interagentes formados pelos dissacarídeos e o PMF permitiram a identificação de bandas correspondentes ao estiramento assimétrico (PO_2^-) dos grupos fosfato do PMF. Considerando o PMF e os respectivos sistemas interagentes mais estáveis, foram identificadas as seguintes bandas: 1229,66 – 1351,83 cm^{-1} (para o PMF), 1158,25 – 1338,65 cm^{-1} (para o sistema interagente Trealose(2)-PMF), 1154,81 – 1382,37 cm^{-1} (para o sistema interagente Maltose(3)-PMF) e 1141,18 – 1383,80 cm^{-1} (para o sistema interagente Celobiose(2)-PMF).

Os resultados obtidos para os intervalos de número de onda correspondentes à banda de estiramento assimétrico (PO_2^-) mostram que, em todos os casos, há deslocamento para menores números de onda quando se compara o PMF isolado e os correspondentes sistemas interagentes (vide Tabela 29). Tais resultados são compatíveis com o estudo realizado na década de 80 por Crowe e colaboradores. Nesse trabalho, os autores relacionaram a capacidade de interagir dos carboidratos com tais deslocamentos.

No entanto, segundo o trabalho de Crowe e colaboradores, a capacidade de interagir efetivamente garantindo a manutenção de agregados fosfolipídicos em processos de criopreservação e liofilização só é verificada quando o deslocamento da banda de estiramento assimétrico dos grupos fosfato ocorre simultaneamente com a redução da intensidade da banda em questão. Isso porque o estabelecimento de interações específicas entre carboidratos e grupos fosfato acarreta na redução da absorvância correspondente ao estiramento assimétrico das ligações (PO_2^-).

Além da identificação do intervalo correspondente à banda de deslocamento assimétrico, os cálculos realizados permitiram visualizar cada um dos modos vibracionais contidos nas bandas e, dessa forma, foi possível identificar as vibrações de maiores absorvâncias molares ϵ em cada caso, que foram utilizadas para avaliar a influência do dissacarídeo sobre a intensidade do estiramento assimétrico (PO_2^-). A Tabela 29 apresenta os números de onda $\tilde{\nu}$ correspondentes às vibrações de maiores absorvâncias molares ϵ e a relação entre as respectivas absorvâncias e a absorvância molar do PMF ϵ_0 . A razão $\frac{\epsilon}{\epsilon_0}$ foi tomada como sendo correspondente à razão entre as intensidades do estiramento assimétrico no sistema interagente e no PMF isolado.

Tabela 29. Números de onda, absorvidades molares e absorvidades molares relativas, considerando a absorvidade molar da vibração do PMF como valor de referência.

Sistema	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)	ϵ (km ² .mol ⁻¹)	$\frac{\epsilon}{\epsilon^0}$
PMF	1249	340	1
Trealose(2)-PMF	1232	198	0,58
Maltose(3)-PMF	1228	270	0,79
Celobiose(2)-PMF	1220	266	0,78

Os resultados apresentados na Tabela 29 mostram que a trealose é o dissacarídeo que provoca maior redução na intensidade do estiramento assimétrico (PO₂⁻), tendo em vista que a absorvidade molar no sistema interagente corresponde à apenas 58% da absorvidade molar no PMF isolado. No trabalho de Crowe e colaboradores, utilizado como referência na presente tese, os autores demonstraram que a trealose foi o carboidrato que provocou maior redução na intensidade e associaram isso à maior capacidade protetora do dissacarídeo em processos de criopreservação e liofilização. Então, segundo a associação feita pelos autores, os resultados apresentados na Tabela 29 sugerem que a trealose interage com fosfolipídeos de maneira mais efetiva que a maltose e a celobiose e que esses últimos interagem de modo similar entre si.

Os resultados observados para a maltose e para a celobiose apresentados na Tabela 29 mostram que ambos os dissacarídeos interagem de maneira similar com o PMF, contrariando o que foi observado para as energias de interação (Tabela 28). Tal resultado sugere que não só as interações com grupos fosfato devem ser consideradas para avaliar as possíveis interações dissacarídeo-fosfolipídeo, mas também as interações com grupos trimetil-amônio, tal como apresentado nas tabelas 18, 23 e 27. Porém, como não foram encontrados dados que se prestassem à comparação com os resultados de espectroscopia no infravermelho obtidos teoricamente na presente tese, nossa avaliação restringiu-se à comparação dos sinais relativos ao estiramento assimétrico no grupo fosfato.

Tendo em vista que se dispõe da constante de acoplamento de spin heteronuclear a três ligações para os átomos de carbono e hidrogênio das ligações glicosídicas da trealose ³J_{Cl,H1} em sistemas compostos por trealose e agregados fosfolipídios de colina, com o objetivo de confirmar minimamente a geometria do modelo que foi obtido para o sistema trealose-PMF, foram comparadas as constantes de

acoplamento obtidas teoricamente para a trealose com o valor obtido experimentalmente e apresentado no trabalho de Kapla e colaboradores, em 2015 (${}^3J_{C1,H1'} = 3,18$ Hz). A Tabela 30 apresenta os valores obtidos teoricamente para as constantes, bem como os respectivos valores de população de Boltzmann para cada um dos sistemas interagentes. As constantes de acoplamento teóricas foram obtidas a partir da correlação de Karplus apresentada na equação 24.

Tabela 30. Ângulos diedros da ligação glicosídica, valores das respectivas constantes de acoplamento ${}^3J_{C1,H1'}$ e populações de Boltzmann para os sistemas interagentes trealose-PMF.

Sistemas interagentes	Φ_H (graus)	Ψ_H (graus)	${}^3J_{C1,H1'}(\Phi_H)$ (Hz)	${}^3J_{C1,H1'}(\Psi_H)$ (Hz)	$\langle {}^3J_{C1,H1'} \rangle$ (Hz)
Trealose(1)-PMF (2%)	-47,10	-34,40	6,80	6,65	6,72
Trealose(2)-PMF (96%)	-23,1	-38,20	1,90	4,36	3,13
Trealose(3)-PMF (0)	-49,70	-27,20	4,06	2,08	3,07
Trealose(4)-PMF (2%)	-34,70	-24,10	6,68	1,69	4,18

No caso da trealose, temos dois valores possíveis para Φ_H em cada um dos sistemas interagentes, correspondentes aos ângulos diedros definidos por: $\Phi_H = H1-C1-O-C1'$ e $\Psi_H = C1-O-C1'-H1'$.

Com os valores obtidos para as populações de Boltzmann dos sistemas trealose-PMF, podemos fazer a média ponderada pelos valores de população das constantes de acoplamento encontradas, o que nos permite uma melhor comparação com o resultado experimental apresentado no trabalho de Kapla e colaboradores. A média ponderada fornece o valor de 3,22 Hz para a constante de acoplamento de spin $C1,H1'$, que muito bem se compara com o valor de 3,18 Hz obtido experimentalmente. Sendo assim, mesmo diante de toda a limitação apresentada no estudo realizado, parece que a metodologia utilizada fornece sistemas trealose-PMF minimamente comparáveis, em termos geométricos, aos sistemas reais formados pela interação da trealose com agregados fosfolipídicos, pelo menos no que se refere à conformação do dissacarídeo.

7. CONCLUSÕES

1^a) Foram identificados dois tipos de interações principais entre todos os dissacarídeos e o PMF: interações com grupos fosfato e interações com grupos trimetilamônio das cabeças fosfolipídicas. Assim, uma comparação entre os efeitos da presença de dissacarídeos sobre ambos os sinais, e não somente sobre o sinal relativo ao estiramento assimétrico da ligação $\sim\text{OPO}^-$ dos grupos fosfato, faz-se necessária para confirmar um possível padrão de interações específicas diferenciado para a trealose.

2^a) O protocolo criado para a obtenção dos sistemas complexos tomados como modelo da interação dissacarídeo-membrana fosfolipídica gerou sistemas para os quais o valor da energia de interação não está diretamente relacionado ao número de ligações hidrogênio estabelecidas entre os dissacarídeos e as cabeças polares dos fosfolipídios. Assim, apesar da interação dissacarídeo-PMF ocorrer especificamente com as porções polares dos fosfolipídios, existe forte indício de que a energia de interação pode ser decomposta em um termo correspondente às ligações hidrogênio que se estabelecem com as porções polares dos fosfolipídios e um termo correspondente às interações dispersivas que se estabelecem entre as porções apolares dos fosfolipídios.

3^a) O presente estudo apresenta indícios de que o método semi-empírico PM6 pode ser adequado para descrever as interações intramoleculares que definem a conformação da trealose nos sistemas trealose-membrana fosfolipídica. Isso porque o método semi-empírico PM6 foi capaz de reproduzir teoricamente o valor obtido experimentalmente para a constante de acoplamento de spin $^3J_{\text{C1,H1}}$ para a trealose em aglomerados fosfolipídicos. Tal concordância confirma a geometria obtida teoricamente para a trealose nos sistemas complexos, tendo em vista que a constante de acoplamento $^3J_{\text{C1,H1}}$ está diretamente relacionada aos valores dos ângulos diedros glicosídicos, que são os parâmetros geométricos mais importantes para a conformação de dissacarídeos.

4^a) Da mesma forma, há indícios de que o método semi-empírico PM6 pode ser adequado para descrever as interações intermoleculares presentes nos sistemas trealose-membrana fosfolipídica. O método semi-empírico PM6 foi capaz de reproduzir teoricamente o comportamento observado experimentalmente para o sinal correspondente ao estiramento assimétrico da ligação $\sim\text{OPO}^-$ dos grupos fosfato em

um sistema dimérico formado por duas moléculas de DOcPC isoladas e em um sistema complexo formado pelo sistema dimérico e uma molécula do dissacarídeo trealose, que foi tomado como protótipo da interação dissacarídeo-membrana fosfolipídica.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Em face do que acaba de ser exposto, é importante mencionar a capacidade singular dos estudos de modelagem molecular no que diz respeito à identificação de possíveis interações específicas entre sistemas moleculares. Tais estudos constituem importantes ferramentas potencialmente capazes de contribuir para o entendimento do mecanismo de interação entre sistemas moleculares, permitindo uma melhor e mais completa interpretação de resultados experimentais e, até mesmo, a correção de algumas interpretações. Dessa forma, com o objetivo de ampliar e refinar os resultados teóricos obtidos a partir do presente estudo, tem-se as seguintes perspectivas futuras:

- 1) Incluir o estudo da interação iso-maltose-PMF ($\alpha 1 \rightarrow 6$).
- 2) Considerar o erro de superposição de conjunto de base (Basis Set Superposition Error, BSSE) nos cálculos da energia de interação dissacarídeo-PMF.
- 3) Realizar a análise dos orbitais de ligação naturais (Natural Bond Analysis, NBO) nos sistemas complexos obtidos.
- 4) Analisar o efeito da interação dissacarídeo-PMF sobre a conformação das porções apolares dos fosfolipídios.
- 5) Obter os espectros experimentais de absorção no infra-vermelho para agregados fosfolipídicos de colina desidratados e desidratados na presença de dissacarídeos.
- 6) Obter experimentalmente as constantes de acoplamento de spin a três ligações $^3J_{C1,H1}$ para todos os dissacarídeos considerados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ JAIN, M. K.; VAGNER, R. C. **Introduction to Biological Membranes**. John Wiley & Sons, 1980.
- ² LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M. P.; ZIPURSKY, L.; DARNELL, J. **Molecular Cell Biology**. 5th ed. W. H. Freeman and Company, 2005.
- ³ BERG, J. M.; CLARKE, N.N.; STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L. **Biochemistry**. W. H. Freeman and Company, 2002.
- ⁴ ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 4th ed. Garland Science, 2002.
- ⁵ ZHANG, M.; OLDENHOF, H.; SYDYKIV, B.; BIGALK, J.; SIEME, H.; WOLKERS, W. F. Freeze-drying of mammalian cells using trehalose: preservation of DNA integrity. **Scientific Reports**, v. 7, p. 6198. 2017.
- ⁶ TERO, R.; FUKUMOTO, K.; MOTEGI, T.; YOSHIDA, M.; NIWANO, M.; HIRANO-IWATA, A. Formation of Cell Membrane Component Domains in Artificial Lipid Bilayer. **Scientific Reports**, v. 7, p. 17905. 2017.
- ⁷ DANIELLI, J.F.; DAVSON, H. A contribution to the theory of permeability of thin films. **Journal of Cellular Physiology**, v. 5, p. 495-508. 1935.
- ⁸ SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes: Cell membranes are viewed as two-dimensional solutions of oriented globular proteins and lipids. **Science**, v. 175, p. 720-731. 1972.
- ⁹ SIMONS, K.; IKONEN, E. Functional rafts in cell membranes. **Nature**, v. 387, p. 569-572. 1997.
- ¹⁰ BROWN, D. A.; LONDON, E. Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 240, p. 1-7. 1997.
- ¹¹ LINGWOOD, D.; SIMONS, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. **Science**, v. 327, p. 46-50. 2010.

- ¹² NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. 6th ed. W. H. Freeman and Company, 2012.
- ¹³ CASARES, D.; ESCRIBÁ, P. V.; ROSSELLÓ, C. A. Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 2167. 2019.
- ¹⁴ KOYNOVA, R.; TENCHOV, B. **Phase Transitions and Phase Behavior of Lipids**. In: ROBERTS, G. C. K. Encyclopedia of Biophysics. Springer, 2013, 1841-1854.
- ¹⁵ MUELLER, P.; RUDIN, D. O.; TIEN, H. T.; WESCOTT, W. C. Reconstitution of Cell Membrane Structure *in vitro* and its Transformation into an Excitable System. **Nature**, v. 194, p. 979-980. 1962.
- ¹⁶ METZLER, D. E. **Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells**. 2nd ed. Academic Press, 2003.
- ¹⁷ VANCE, J. E.; VANCE, D. **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes**. 4th ed. Elsevier, 2002.
- ¹⁸ ROTHMAN J. E.; LENARD, J. Membrane asymmetry. **Science**, v. 195, p. 743-753. 1977.
- ¹⁹ WIENER, M. C.; WHITE, S. H. Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. III. Complete structure. **Biophysical Journal**, v. 61, p. 434-447. 1992.
- ²⁰ KARPLUS, M. J. Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments. **The Journal of Chemical Physics**, v. 30, p. 11. 1959.

- ²¹ RAMSEY, N. F. Electron Coupled Interactions between Nuclear Spins in Molecules. **Physical Review**, v. 91, p. 303. 1953.
- ²² COXON, B. Model parameters for the analysis of skew conformations of carbohydrates by p.m.r. spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 13, p. 321-330. 1970.
- ²³ GUSCHLBAUER, W. Conformational analysis of ribonucleosides from proton-proton coupling constants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 610, p. 47-55. 1980.
- ²⁴ LÖHR, F.; BLÜMEL, M.; SCHMIDT, J. M.; RÜTERJANS, H. Application of H(N)CA,CO-E.COSY experiments for calibrating the ϕ angular dependences of vicinal couplings $J(C'_{i-1}, H_i^{\alpha})$, $J(C'_{i-1}, C_i^{\beta})$ and $J(C'_{i-1}, C_i)$ in proteins. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 10, 107-118. 1997.
- ²⁵ PASSEY, R. F.; FAIRBAIRN, D. The conversion of fat to carbohydrate during embryonation of ascaris eggs. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 35, p. 511-525. 1957.
- ²⁶ SUSSMAN, A. S.; LINGAPPA, B. T. Role of Trehalose in Ascospores of *Neurospora Tetrasperma*. **Science**, v.130, p. 1343. 1959.
- ²⁷ DUTRIEU, J. Variations du trehalose au cours de l'embryogenese Chez *Bombyx Mori* et de la metamorphose Chez *Calliphora Erythrocephala*. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Académie des Sciences**, v. 252, p. 347. 1961.
- ²⁸ MADIN, K. A. C.; CROWE, J. H. Anhydrobiosis in nematodes: carbohydrate and lipid metabolism during dehydration. **Journal of Experimental Zoology**, v. 193, p. 335-342. 1975.
- ²⁹ CLEGG, J. S. Free glycerol in dormant cysts of the brine shrimp *Artemia salina*, and its disappearance during development. **The Biological Bulletin**, v. 123, p. 295-301. 1962.
- ³⁰ DUTRIEU, J. Observations biochimiques et physiologiques sur le développement d'*Artemia salina* Leach. **Archives de Zoologie Expérimentale et Générale**, v. 99, p. 3-128. 1960.

- ³¹ CROWE, J. H. Anhydrobiosis: An Unsolved Problem. **The American Naturalist**, v. 105, p. 563-573. 1971.
- ³² CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; JACKSON, S. A. Preservation of Structural and Functional Activity in Lyophilized Sarcoplasmic Reticulum. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 220, p. 477-484. 1983.
- ³³ CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; MOURADIAN, R. Stabilization of Biological Membranes at Low Water Activities. **Cryobiology**, v. 20, p. 346-356. 1983.
- ³⁴ CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; CHAPMAN, D. Preservation of Membranes in Anhydrobiotic Organisms: the Role of Trehalose. **Science**, v. 223, p. 701-703. 1984.
- ³⁵ CROWE, L. M.; MOURADIAN, R.; CROWE, J. H.; JACKSON, S. A.; WOMERSLEY, C. Effects of carbohydrates on membrane stability at low water activities. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 769, 141-150. 1984.
- ³⁶ LUZZATI, V.; HUSSON, F. The structure of the liquid-crystalline phases of lipid-water systems. **The Journal of Cell Biology**, v. 12, p. 207-219. 1962.
- ³⁷ CROWE, L. M.; CROWE, J. H. Hydration-Dependent Hexagonal Phase Lipid in a Biological Membrane. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 217, p. 582-587. 1982.
- ³⁸ CROWE, L. M.; CROWE, J. H.; CHAPMAN, D. Interaction of carbohydrates with dry dipalmitoylphosphatidylcholine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 236, p. 289-296. 1985.
- ³⁹ GREEN, J. L.; ANGELL, C. A. Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 93, p. 2880-2882. 1989.
- ⁴⁰ KOSTER, K. L.; WEBB, M. S.; BRYANT, G.; LYNCH, D. V. Interactions between soluble sugars and POPC (1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine) during dehydration: vitrification of sugars alters the phase behavior of the phospholipid. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1193, p. 143-150. 1994.

- ⁴¹ CROWE, J. H.; LESLIE, S. B.; CROWE, L. M. Is vitrification sufficient to preserve liposomes during freeze-drying? **Cryobiology**, v. 31, p. 355-366. 1994.
- ⁴² CROWE, L. M.; REID, D. S.; CROWE, J. H. Is Trehalose Special for Preserving Dry Biomaterials? **Biophysical Journal**, v. 71, p. 2087-2093. 1996.
- ⁴³ ALBERTORIO, F.; CHAPA, V. A.; CHEN, X.; DIAZ, A. J.; CREMER, P.S. The α,α -(1 \rightarrow 1) Linkage of Trehalose Is Key to Anhydrobiotic Preservation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, p. 10567-10574. 2007.
- ⁴⁴ KAPLA, J.; ENGSTRÖM, O.; STEVENSSON, B.; WOHLERT, J.; WIDMALM, G.; MALINIAK, A. Molecular dynamics simulations and NMR spectroscopy studies of trehalose-lipid bilayer systems. **Physical Chemistry and Chemical Physics**, v. 17, p. 22438-22447. 2015.
- ⁴⁵ CRAMER, C. J. **Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models**. 2nd ed. John Wiley & Sons, 2004.
- ⁴⁶ SZABO, A.; OSTLUND, N. S. **Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory**. Dover Publications, 1996.
- ⁴⁷ ATKINS, P. W.; FRIEDMAN, R. S. **Molecular Quantum Mechanics**. 5th ed. Oxford University Press, 2010.
- ⁴⁸ LEACH, A. R. **Molecular Modelling: Principles and Applications**. 2nd ed. Prentice Hall, 2001.
- ⁴⁹ DEWAR, M. J. S.; THIEL, W. **Ground states of molecules. 38. The MNDO method. Approximations and parameters**. *Journal of the American Chemical Society*, v. 99, p. 4899-4907. 1977.
- ⁵⁰ STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semi-empirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **Journal of Molecular Modeling**, v. 13, p. 1173-1213. 2007.
- ⁵¹ TSCHUMPER, G.S.; LEININGER, M. L.; HOFFMAN, B. C.; VALEEV, E. F.; SCHAEFER, H. F.; QUACK, M. Anchoring the water dimer potential energy surface

with explicitly correlated computations and focal point analyses. **Journal of Chemical Physics**, v. 116, p. 690-701. 2002.

⁵² JENSEN, F. **Introduction to Computational Chemistry**. John Wiley & Sons, 1999.

⁵³ KOHN, W.; SHAM, L. S. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. **Physical Reviews**, v. 140, p. A1133-A1138. 1965.

⁵⁴ GRIMME, S. Accurate description of van der Waals complexes by density functional theory including empirical corrections. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, p. 1463-1473. 2004.

⁵⁵ GRIMME, S. Semiempirical GGA-type density functional constructed with a long-range dispersion correction. **Journal of Computational Chemistry**, v. 27, p. 1787-1799. 2006.

⁵⁶ BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry. V. Systematic optimization of exchange-correlation functionals. **Journal of Chemical Physics**, v. 107, p. 8554-8560. 1997.

⁵⁷ BECKE, A. D. Correlation energy of an inhomogeneous electron gas: A coordinate-space model. **Journal of Chemical Physics**, v. 88, p. 1053-1062. 1988.

⁵⁸ DIRAC, P. A. M. Exchange phenomena in the Thomas atom. **Proceedings of the Cambridge Philosophical Society**, v. 26, p. 376-385. 1930.

⁵⁹ STOLL, H.; GOLKA, E.; PREUSS, H. Correlation energies in the spin-density functional formalism. **Theoretica Chimica Acta**, v. 55, p. 29-41. 1980.

⁶⁰ VOSKO, S. H.; WILK, L.; NUSAIR, M. Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies from local spin density calculations: a critical analysis. **Canadian Journal of Physics**, v. 58, p. 1200-1211. 1980.

⁶¹ PERDEW, J. P.; WANG, Y. Accurate and simple analytic representation of the electron-gas correlation energy. **Physical Review B**, v. 45, p. 13244-13249. 1992.

⁶² ALEM, M.; TOZER, D. J. Helium dimer dispersion forces and correlation potentials in density functional theory. **Journal of Chemical Physics**, v. 117, p. 11113-11120. 2002.

- ⁶³ ZIMMERLI, U.; PARRINELLO, M.; KOUMOUTSAKOS, P. Dispersion corrections to density functionals for water aromatic interactions. **Journal of Chemical Physics**, v. 120, p. 2693-2699. 2004.
- ⁶⁴ TSUZUKI, S.; LUETHI, H. P. Interaction energies of van der Waals and hydrogen bonded systems calculated using density functional theory: Assessing the PW91 model. **Journal of Chemical Physics**, v. 114, p. 3949-3957. 2001.
- ⁶⁵ WU, Q.; YANG, W. Empirical correction to density functional theory for van der Waals interactions. **Journal of Chemical Physics**, v. 116, p. 515-524. 2002.
- ⁶⁶ WU, X.; VARGAS, M. C.; NAYAK, S.; LOTRICH, V.; SCOLES, G. Towards extending the applicability of density functional theory to weakly bound systems. **Journal of Chemical Physics**, v. 115, p. 8748-8757. 2001.
- ⁶⁷ DA SILVA, C. O.; MENEZES, A. O.; COELHO, A. V.; DE OLIVEIRA, V. P.; SOARES, C. S. **Quantum mechanical calculations on carbohydrates: What they can tell us?** In: VERLI, H. Strategies for the Determination of Carbohydrates Structure and Conformation. Transworld Research Network, 2010.
- ⁶⁸ HAUSER, H.; PASCHER, I.; PEARSON, R. H.; SUNDELL, S. Preferred conformation and molecular packing of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 650, p. 21-51. 1981.
- ⁶⁹ BARTLETT, R. J. Coupled-cluster approach to molecular structure and spectra: a step toward predictive quantum chemistry. **Journal of Physical Chemistry**, v. 93, p. 1697-1708. 1989.
- ⁷⁰ MOLLER, C.; PLESSET, M. S. Note on an Approximation Treatment for Many-Electron Systems. **Physical Review**, v. 46, p. 618-622. 1934.
- ⁷¹ HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous Electron Gas. **Physical Reviews**, v. 136, p. B864-B871. 1964.
- ⁷² BAUSCHLICHER, C. W., Jr.; RICCA, A.; PARTRIDGE, H.; LANGHOFF, S. R. **Chemistry by Density Functional Theory**. In: CHANG, D. P. Recent Advances in Density Functional Methods, part II. World Scientific, 1997.

- ⁷³ MARTIN, J. M. L. **Some observations and cases studies on basis set convergence in Density Functional Theory.** In: GEERLINGS, P.; DEPROFT, F.; LANGENAEKER, W. *Density Functional Theory: a bridge between Chemistry and Physics.* Vrije Universiteit Brussel, 2000.
- ⁷⁴ JOHNSON, E. R.; WOLKOW, R. A.; DILABIO, G. A. Application of 25 density functionals to dispersion-bound homomolecular dimers. **Chemical Physics Letters**, v. 394, p. 334-338. 2004.
- ⁷⁵ PEVERATI, R.; BALDRIDGE, K. K. Implementation and performance of DFT-D with respect to basis set and functional for study of dispersion interactions in nanoscale aromatic hydrocarbons. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, p. 2030-2048. 2008.
- ⁷⁶ DITCHFIELD, R.; HEHRE, W. J.; POPLER, J. A. Self Consistent Molecular Orbital Methods. IX. An Extended Gaussian Type Basis for Molecular Orbital Studies of Organic Molecules. **Journal of Chemical Physics**, v. 54, p. 724-728. 1971.
- ⁷⁷ HEHRE, W. J.; DITCHFIELD, R.; POPLER, J. A. Self-Consistent Molecular Orbital Methods. XII. Further Extensions of Gaussian-Type Basis Sets for Use in Molecular Orbital Studies of Organic Molecules. **Journal of Chemical Physics**, v. 56, p. 2257-2261. 1972.
- ⁷⁸ SOARES, C. S.; da SILVA, C. O. Conformational study of methylphosphocholine: a prototype for phospholipid headgroups in membranes. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 29, p. 82-92. 2010.
- ⁷⁹ KRISHNAMURTY, S.; STEFANOV, M.; MINEVA, T.; BÉGU, S.; DEVOISSELLE, J. M.; GOURSOT, A.; ZHU, R.; SALAHUB, D. R. Density Functional Theory-Based Conformational Analysis of a Phospholipid Molecule (Dimyristoyl Phosphatidylcholine). **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, p. 13433-13442. 2008.
- ⁸⁰ TVAROŠKA, I.; TARAVEL, F. R.; UTILLE, J. P.; CARVER, J. P. Quantum mechanical and NMR spectroscopy studies on the conformations of the hydroxymethyl and methoxymethyl groups in aldohexosides. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 353-367. 2002.

⁸¹ HARMON, K. H.; GENNICK, I.; MADEIRA, S. L. Hydrogen bonding. IV. Correlation of infrared spectral properties with C-H...X hydrogen bonding and crystal habit in tetramethylammonium ion salts. **Journal of Physical Chemistry**, v. 78, p. 2585-2591. 1974.

⁸² KABISCH, G. Raman spectra and crystal structure of polycrystalline tetramethylammonium salts. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 9, p. 279-285. 1980.

⁸³ GRDADOLNIK, J.; HADŽI, D. FT infrared and Raman investigation of saccharide-phosphatidylcholine interactions using novel structure probes. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 54, p. 1989-2000. 1998.