



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

ANTONIO ELIAS GOMES ANTONELO

**ESTUDO COMPUTACIONAL DO CONTROLE ENANTIOMÉRICO DA
REAÇÃO DE ACETILAÇÃO DO BISFENOL CATALISADA POR UM
TETRAPEPTÍDEO**

**CAMPINAS
2018**

ANTONIO ELIAS GOMES ANTONELO

**ESTUDO COMPUTACIONAL DO CONTROLE ENANTIOMÉRICO DA
REAÇÃO DE ACETILAÇÃO DO BISFENOL CATALISADA POR UM
TETRAPEPTÍDEO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química
da Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em
Química na área de Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Leandro Martínez

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO ANTONIO ELIAS GOMES ANTONELO E ORIENTADA
PELO PROF. DR. LEANDRO MARTÍNEZ**

**CAMPINAS
2018**

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

An88e	Antonelo, Antonio Elias Gomes, 1988- Estudo computacional do controle enantiomérico da reação de acetilação do bisfenol catalisada por um tetrapeptídeo / Antonio Elias Gomes Antonelo. — Campinas, SP : [s.n.], 2018. Orientador: Leandro Martínez. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. 1. Dinâmica molecular. 2. Síntese assimétrica. 3. Cálculo de energia livre. 4. Peptídeos. I. Martínez, Leandro, 1979-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Computational study of the enantiomeric control of the bisphenol acetylation reaction catalyzed by a tetrapeptide

Palavras-chave em inglês:

Molecular dynamics
Asymmetric synthesis
Free energy calculations
Peptides

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Mestre em Química na área de Físico-Química

Banca examinadora:

Leandro Martínez [Orientador]

Claudio Francisco Tormena

Paula Homem de Mello

Data de defesa: 13-07-2018

Programa de Pós-Graduação: Química

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Leandro Martínez (Orientador)

Profa. Dr. Claudio Francisco Tormena (IQ - Unicamp)

Profa. Dra. Paula Homem de Mello (Universidade Federal do ABC)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do(a) aluno(a).

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pelo(a) aluno(a)
Antonio Elias Gomes Antonelo, aprovada pela Comissão Julgadora em 13 de julho de 2018.

Agradecimentos

Agradeço ao Leandro pela orientação ao longo deste trabalho. Obrigado pela disponibilidade e disposição para discutir as questões relacionados ao projeto.

Gostaria de agradecer profundamente ao Gabriel, que me ajudou muito durante o mestrado. Obrigado pela amizade e ensinamentos.

Agradeço ao pessoal do grupo de pesquisa pelas críticas e sugestões que contribuíram de forma significativa para o trabalho.

Obrigado aos meus amigos da Unicamp, Eduardo, Fernanda e Thalita pela companhia e risadas.

Agradeço ao pessoal da Comissão de Pós-Graduação por me ajudarem a resolver os trâmites legais e agradeço aos funcionários do Instituto de Química pelo acolhimento e simpatia.

Sou muito grato aos meus pais, Adão e Vanda e aos meus irmãos, Bruno e Isabela, por serem uma família incrível e pelo suporte ao longo do mestrado. Agradeço aos animais, Belinha, Bola e Eevee, que sempre me animavam quando eu chegava em casa após um dia de trabalho.

Agradeço à minha namorada, Juliana, pelo apoio fundamental ao longo deste último ano do mestrado. Muito obrigado por sempre estar ao meu lado e me motivar constantemente.

Agradeço à CAPES pelo suporte financeiro.

Resumo

As reações de indução assimétrica são especialmente interessantes para a indústria farmacêutica. Um estudo de pouco mais de duas décadas, mostrou que aproximadamente 56% dos medicamentos da época eram compostos quirais e que por volta de 88% eram administrados na forma de misturas racêmicas. O ambiente assimétrico de receptores celulares e enzimas pode interagir de maneira diferente com cada um dos enantiômeros. Portanto, é importante entender como produzir um enantiômero específico. Neste trabalho, realizou-se a caracterização conformacional do tetrapeptídeo catalisador envolvido numa reação de catálise assimétrica. A reação catalisada pelo tetrapeptídeo estudado consiste na acetilação do bisfenol. Essa reação é incomum pois se trata de uma indução assimétrica com alto rendimento, 80%, e excesso enantiomérico, 95%, sendo que foi realizada a temperatura de -30 °C, em clorofórmio. Outras características marcantes dessa reação são a longa distância entre as hidroxilas enantiotópicas do substrato bisfenólico; e a distância do centro de proquiralidade ao sítio de funcionalização. Isto obriga que o catalisador interaja simultaneamente com o centro de proquiralidade e com a hidroxila que sofre a acetilação. Realizaram-se simulações de dinâmica molecular e observou-se a existência de duas conformações bastante distintas para o tetrapeptídeo catalisador: uma conformação estendida e uma compacta. Não foram observadas transições entre essas conformações nas simulações a temperatura de 243 K (temperatura experimental e otimizada para maior excesso enantiomérico), enquanto que nas temperaturas de 273 K e 300 K ocorreram transições de uma conformação para outra em algumas simulações. Utilizando o método *adaptive biasing force* (ABF), obtiveram-se os perfis de energia livre do tetrapeptídeo, os quais mostraram que as conformações estendida e compacta correspondem aos mínimos de energia e que, a 243 K, a conformação estendida é ligeiramente mais estável que a conformação compacta, enquanto que, a 273 K e 300 K, a conformação compacta é claramente mais estável, sugerindo que a conformação determinante para a enantiosseletividade da reação é a conformação estendida.

Abstract

Asymmetric catalysis reactions are important for the pharmaceutical industry. A review from 1993 reported that about 56% of the drugs at that time were chiral compounds and about 88% were used as racemic mixtures. The asymmetric environment of cell receptors and enzymes might interact in different ways with each enantiomer. Thus, it is important to understand how a specific enantiomer could be synthesized. Here, we performed a conformational characterization of a designed tetrapeptide catalyst that is involved in an asymmetric catalysis reaction. This tetrapeptide catalyzes the acetylation reaction of a bis(phenol). The asymmetric induction reaction is performed in chloroform at 243 K with high yield, 80%, and enantiomeric excess, 95%. Other remarkable characteristics of this reaction are the long distance between the enantiotopic hydroxyls of the bis(phenol) substrate, the distance of the prochiral center to the site of functionalization. The catalyst must simultaneously interact with the prochiral center and the hydroxyl group that undergoes the acetylation. Using molecular dynamics simulations, we observed that the catalytic tetrapeptide adopts two different conformations: an extended conformation and a compact one. No transitions were observed between the conformations in the timescale of conventional simulations at 243 K (experimental temperature optimized for higher enantiomeric excess), whereas at 273 K and 300 K eventual transitions occurred. Using the Adaptive Biasing Force method (ABF), a free-energy profile of the conformations of the peptide was obtained for the three temperatures. The extended and compact conformations corresponded to the energy minima. At 243 K, the extended conformation is slightly more stable than the compact one, but at a higher temperature (273 K and 300 K), the compact conformation is clearly more stable. Our results suggest that the determinant conformation for the enantioselectivity of this reaction is the extended conformation.

Lista de figuras

Figura 1.1. a) Molécula do bromoclorofluormetano e sua imagem especular. b) Ao girar a molécula B em 180° e a comparar com a molécula A, observa-se que elas não são superponíveis, ou seja, o bromoclorofluormetano é quiral ¹	15
Figura 1.2. Esquema de um polarímetro mostrando a propagação da luz, sua polarização e o desvio sofrido quando ela atravessa a amostra opticamente ativa ³	16
Figura 1.3. Equação química representando um exemplo de reação que produz compostos quirais	17
Figura 1.4. a) Equação representando a reação de estudo. b) Tetrapeptídeo catalisador da reação de indução assimétrica.....	19
Figura 1.5. Distâncias do centro de proquiralidade aos oxigênios enantiotópicos e entre os oxigênios enantiotópicos.....	19
Figura 1.6. Mecanismos de reação propostos: a) Catálise nucleofílica; b) Catálise assistida por base	21
Figura 1.7. Fórmula estrutural do tetrapeptídeo catalisador e nomes dos resíduos e porções terminais.....	22
Figura 1.8. Representação do ângulo diedro ϕ entre os dois planos A-B-C e B-C-D ²¹	24
Figura 1.9. Representação dos parâmetros utilizados na modelagem das interações intramoleculares: a) estiramento de ligação, b) deformação angular, c) torção diedral e d) deformação fora do plano (diedros impróprios); e das interações intermoleculares: e) van der Waals e f) eletrostática.	26
Figura 1.10. O algoritmo do método ABF suaviza o perfil de energia livre de forma que amostragem ocorra em uma superfície achatada, cujas barreiras energéticas são menores, possibilitando uma amostragem ampliada.....	33
Figura 1.11. a) Representação da distribuição espacial do solvente (azul) ao redor do soluto (laranja) e b) função de distribuição radial típica.....	34
Figura 2.1. Fragmentação do tetrapeptídeo para parametrização.....	36
Figura 2.2. Resumo do procedimento de obtenção das coordenadas iniciais para as simulações de longa duração.	38

Figura 2.3. Sistemas preparados para as simulações: a) uma molécula de tetrapeptídeo em duas mil moléculas de clorofórmio (omitidas na figura) e b) uma molécula de tetrapeptídeo, uma molécula de bisfenol e duas mil moléculas de clorofórmio (omitidas na figura).....	39
Figura 2.4. Coordenada de reação para as simulações de ABF representada na estrutura tridimensional do tetrapeptídeo catalisador.....	41
Figura 3.1. Tetrapeptídeo catalisador em sua conformação a) compacta e b) estendida.	43
Figura 3.2. Distância entre os átomos de carbono das carbonilas dos resíduos Asn e Ser, $d(\text{Asn} - \text{Ser})$, representada na a) fórmula estrutural, b) estrutura tridimensional compacta e c) estrutura tridimensional estendida.	44
Figura 3.3. Gráfico de $d(\text{Asn} - \text{Ser})$ ao longo das três simulações de $2 \mu\text{s}$ do tetrapeptídeo em clorofórmio à temperatura de 243 K	44
Figura 3.4. Gráfico de $d(\text{Asn} - \text{Ser})$ ao longo das três simulações de $1 \mu\text{s}$ do tetrapeptídeo em clorofórmio à temperatura de 273 K	45
Figura 3.5. Gráfico de $d(\text{Asn} - \text{Ser})$ ao longo das três simulações de $1 \mu\text{s}$ do tetrapeptídeo em clorofórmio à temperatura de 300 K	46
Figura 3.6. Principais ligações de hidrogênio observadas nas simulações a 243 K com o tetrapeptídeo nas conformações a) compacta e b) estendida. Átomos sombreados com a mesmas cores indicam ligações de hidrogênio entre eles.	49
Figura 3.7. Energias intramoleculares do tetrapeptídeo nas temperaturas de a) 243 K , d) 273 K e g) 300 K ; energias intermoleculares entre o tetrapeptídeo e o clorofórmio nas temperaturas de b) 243 K , e) 273 K e h) 300 K ; soma das energias intramoleculares e intermoleculares nas temperaturas de c) 243 K , f) 273 K e i) 300 K	50
Figura 3.8. Energia livre do tetrapeptídeo em clorofórmio em função da distância $d(\text{Ans} - \text{Ser})$ nas temperaturas de 243 K , 273 K e 300 K	53
Figura 3.9. Comparaçao das funções de distribuição de distância mínima (gmd) do tetrapeptídeo em sua conformação compacta e estendida nas temperaturas de 243 K , 273 K e 300 K	56

Figura 3.10. Contribuições dos átomos de hidrogênio e de cloro da molécula de clorofórmio (solvente) para as funções de distribuição de distância mínima (g_{md}) do tetrapeptídeo nas conformações estendida e compacta a 243 K.....	56
Figura 3.11. Interações entre átomos do tetrapeptídeo e átomos de a) hidrogênio e b) de cloro de moléculas de clorofórmio da primeira camada de solvatação.	57
Figura 3.12. Comparaçao entre as contribuições atômicas de hidrogênio e de cloro da molécula de clorofórmio (solvente) para as funções de distribuição de distância mínima (g_{md}) do tetrapeptídeo nas conformações estendida e compacta nas temperaturas de 243 K, 273 K e 300 K.	58
Figura 3.13. Integrais de Kirkwood-Buff (G) do tetrapeptídeo em clorofórmio nas conformações compacta e estendida nas temperaturas de 243 K, 273 K e 300 K.	59
Figura 3.14. Gráfico de $d(\text{Asn} - \text{Ser})$ ao longo das três simulações de 2 μs do tetrapeptídeo e bisfenol em clorofórmio à temperatura de 243 K.....	60
Figura 3.15. Gráfico de $d(\text{Asn} - \text{Ser})$ ao longo das três simulações de 1 μs do tetrapeptídeo e bisfenol em clorofórmio à temperatura de 273 K.....	60
Figura 3.16. Gráfico de $d(\text{Asn} - \text{Ser})$ ao longo das três simulações de 1 μs do tetrapeptídeo e bisfenol em clorofórmio a temperatura de 300 K.....	61
Figura 3.17. a) Interações observadas entre o substrato bisfenólico e o tetrapeptídeo catalisador na simulação 1. b) Distância das interações em função do tempo de simulação na simulação 1.....	65
Figura 3.18. a) Interação observada entre o substrato bisfenólico e o tetrapeptídeo catalisador na simulação 2. b) Distância das interações em função do tempo de simulação na simulação 2.....	65
Figura 3.19. a) Interação observada entre o substrato bisfenólico e o tetrapeptídeo catalisador na simulação 3. b) Distância das interações em função do tempo de simulação na simulação 3.....	66
Figura 3.20. a) Bisfenol ligado ao tetrapeptídeo apenas pelo nitrogênio do anel metilimidazólico e b) bisfenol ligado ao catalisador simultaneamente pelo anel e por outro resíduo.	67

Figura 3.21. Indicação simplificada dos a) diedros da cadeia principal e b) diedros das cadeias laterais do tetrapeptídeo catalisador.....	68
Figura 3.22. Distribuições dos diedros da cadeia principal do tetrapeptídeo catalisador em clorofórmio na triplicata de simulações realizadas à temperatura de 243 K	69
Figura 3.23. Distribuições dos diedros da cadeia principal do tetrapeptídeo catalisador em clorofórmio na triplicata de simulações realizadas à temperatura de 273 K	70
Figura 3.24. Distribuições dos diedros da cadeia principal do tetrapeptídeo catalisador em clorofórmio na triplicata de simulações realizadas à temperatura de 300 K	71
Figura 3.25. Distribuições dos diedros das cadeias laterais do tetrapeptídeo catalisador em clorofórmio na triplicata de simulações realizadas às temperaturas de a) 243 K, b) 273 K e c) 300 K	72
Figura 4.1. Energia livre das conformações estendida e compacta do tetrapeptídeo correspondentes aos mínimos de energia	75

Lista de tabelas

Tabela 3.1. Principais ligações de hidrogênio intramoleculares do tetrapeptídeo na triplicata de simulações a 243 K	48
Tabela 3.2. Médias e desvios padrão da área acessível ao solvente para os tetrapeptídeo na conformação compacta e estendida.	51
Tabela 3.3. Médias e desvios padrão das energias intramoleculares do tetrapeptídeo, intermoleculares entre tetrapeptídeo e clorofórmio e soma das energias intramoleculares e intermoleculares.....	51
Tabela 3.4. Energias livres, constantes de equilíbrio, energias de ativação e distâncias referentes aos perfis de energia das as simulações a 243 K, 273 K e 300 K.....	54
Tabela 3.5. Influência da temperatura no rendimento e no excesso enantiomérico (e.e.) da reação de acetilação do bisfenol ¹²	54
Tabela 3.6. Principais ligações de hidrogênio intramoleculares do tetrapeptídeo em presença do bisfenol a 243 K.....	62
Tabela 3.7. Principais ligações de hidrogênio intermoleculares entre o tetrapeptídeo e o bisfenol a 243 K	64

Sumário

Capítulo 1 – Introdução.....	14
1.1. Estereoquímica	14
1.2. Proquiralidade e indução assimétrica	17
1.3. Indução assimétrica catalisada por um tetrapeptídeo	18
1.4. Simulações de dinâmica molecular.....	22
1.5. O método Adaptive Biasing Force (ABF)	31
1.6. Funções de distribuição de distância mínima e integrais de Kirkwood-Buff.....	33
Capítulo 2 – Metodologia.....	35
2.1. Parametrização das cargas atômicas do tetrapeptídeo, bisfenol e clorofórmio.....	35
2.2. Simulações no vácuo com o tetrapeptídeo em alta temperatura	37
2.3. Preparação dos sistemas para as simulações de longa duração.....	38
2.4. Simulações de longa duração	39
2.5. Simulações de amostragem ampliada: <i>Adaptive Biasing Force</i> (ABF)	41
Capítulo 3 – Resultados e discussão	43
3.1. Tetrapeptídeo em clorofórmio	43
3.2. Tetrapeptídeo em clorofórmio a 243 K – Principais interações intramoleculares	47
3.3. Energias intra e intermoleculares	49
3.4. Perfis de energia livre do tetrapeptídeo em clorofórmio	52
3.5. Estrutura do clorofórmio ao redor do tetrapeptídeo.....	55
3.6. Tetrapeptídeo e bisfenol em clorofórmio.....	59
3.7. Tetrapeptídeo e bisfenol – Principais interações intra e intermoleculares	61
3.8. Caracterização conformacional do tetrapeptídeo	68
Capítulo 4 – Considerações finais e conclusões	74
Bibliografia	77
Anexos	80

Capítulo 1 – Introdução

Neste trabalho, foi realizada, por meio de simulações de dinâmica molecular, a caracterização conformacional do tetrapeptídeo catalisador envolvido numa reação de catálise assimétrica. São apresentados, no início deste capítulo, conceitos fundamentais de estereoquímica (tópico 1.1) e as definições de proquiralidade e indução assimétrica (tópico 1.2). Em seguida, descreve-se a reação de indução assimétrica envolvida neste trabalho, que é catalisada pelo tetrapeptídeo estudado, e se apresentam detalhes estruturais da molécula de tetrapeptídeo (tópico 1.3). São apresentadas nos tópicos 1.4 e 1.5 as técnicas computacionais utilizadas na caracterização conformacional. No último tópico (1.6), descrevem-se resumidamente as ferramentas aplicadas no estudo da estrutura do solvente ao redor do tetrapeptídeo.

1.1. Estereoquímica

É comum representarmos as estruturas das moléculas através de suas fórmulas estruturais, geralmente desenhadas em duas dimensões. Todavia, neste tipo de representação, um aspecto extremamente importante das moléculas é omitido: o arranjo espacial tridimensional dos átomos. A geometria tridimensional das moléculas afeta diretamente suas interações e, por isto, a compreensão do arranjo espacial dos átomos é de fundamental importância para entender como as reações químicas ocorrem. A parte da química concernente ao arranjo espacial dos átomos e às interações decorrentes da geometria tridimensional das moléculas é denominada estereoquímica.

Diferentes compostos podem apresentar as mesmas quantidades de átomos de cada elemento, isto é, as mesmas fórmulas moleculares, mas as suas estruturas químicas podem ser diferentes. Estes compostos são chamados de isômeros. Os isômeros são divididos em duas grandes categorias: os isômeros constitucionais, os quais são diferentes pois os átomos estão conectados de formas diferentes; e os estereoisômeros, moléculas cuja conectividade entre os átomos é a mesma, entretanto, o arranjo espacial dos átomos é diferente. Neste trabalho, interessa-nos esta última categoria apresentada.

Todos os objetos quando colocados em frente a um espelho plano, produzem uma imagem especular que pode ou não ser superponível ao objeto. No caso em que o objeto não é superponível à sua imagem especular, denomina-se este objeto como quiral.

Um exemplo clássico de objeto quiral é a mão humana. Ao colocar a mão esquerda em frente a um espelho plano, obtemos a sua imagem especular (que é a mão direita), se tentarmos superpor a imagem especular à mão esquerda não conseguiremos, pois elas não são idênticas, caracterizando a mão como um objeto quiral, isto é, a mão não é superponível à sua imagem especular. Da mesma forma, em química, uma molécula é considerada quiral se ela não for superponível, em três dimensões, à sua imagem especular. Uma molécula que é superponível à sua imagem especular é aquiral.

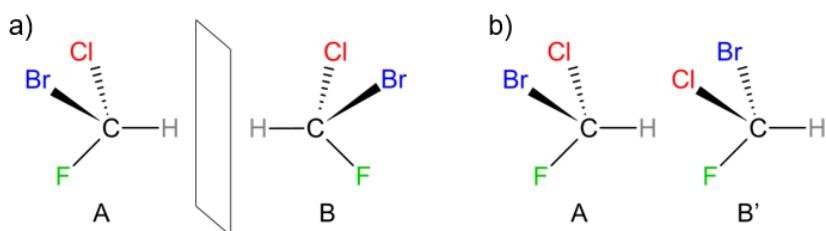


Figura 1.1. a) Molécula do bromoclorofluormetano e sua imagem especular. b) Ao girar a molécula B em 180° e a comparar com a molécula A, observa-se que elas não são superponíveis, ou seja, o bromoclorofluormetano é quiral¹.

As moléculas A e B da Figura 1.1a apresentam a mesma conectividade entre os átomos: carbono central ligado aos átomos de hidrogênio, bromo, cloro e flúor. Portanto, elas são estereoisômeros. Além disso, estes estereoisômeros estão relacionados como uma molécula e sua imagem especular não-superponível e são denominados de enantiômeros. Os estereoisômeros que não são imagens especulares um do outro são chamados de diastereoisômeros, isto é, os diastereoisômeros são estereoisômeros que não são enantiômeros. Nota-se também que as moléculas A e B (Figura 1.1a) são formadas por um carbono tetraédrico ligado a quatro átomos diferentes. Moléculas com um átomo de carbono tetraédrico ligado a quatro átomos ou grupos diferentes são quirais e o átomo de carbono é chamado de carbono assimétrico², comumente assinalado com um asterisco (*) nas fórmulas estruturais.

As substâncias quirais têm a capacidade de rotacionar a luz plano-polarizada e esta habilidade é dada o nome de atividade óptica. A medida da atividade óptica de uma substância é realizada através de um polarímetro. Este equipamento consiste basicamente numa fonte emissora de luz de um determinado comprimento de onda, um

filtro polarizador, um tubo para amostra e um segundo filtro polarizador, também chamado de analisador.

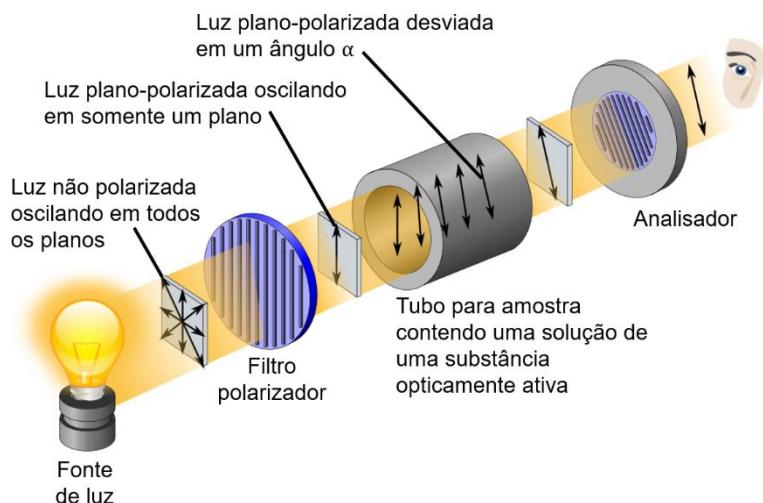


Figura 1.2. Esquema de um polarímetro mostrando a propagação da luz, sua polarização e o desvio sofrido quando ela atravessa a amostra opticamente ativa³.

Como mostrado na Figura 1.2, a luz emitida pela fonte se propaga de tal forma que o campo elétrico oscila em todas as direções. Ao passar pelo filtro polarizador, ele interage com o campo elétrico de modo que a luz emergente contenha apenas um plano de oscilação do campo elétrico. Esta luz plano-polarizada atravessa o tubo contendo a amostra e, se a amostra for quiral e um dos enantiômeros estiver em excesso, apresentará atividade óptica, levando à rotação do plano da luz em um determinado ângulo α , o qual será determinado girando-se o analisador calibrado em graus. Uma amostra que contém quantidades iguais dos enantiômeros é chamada de mistura racêmica e é opticamente inativa. Já uma amostra em que todas as moléculas são do mesmo enantiômero é denominada opticamente pura. Define-se a pureza óptica ou a porcentagem de excesso enantiomérico, como mostrado pela Equação 1.1:

$$\text{Pureza óptica} = \frac{\% \text{ de excesso enantiomérico}}{\% \text{ de um enantiômero}} = \frac{\% \text{ de um enantiômero}}{\% \text{ do outro enantiômero}} - 100 \quad \text{Eq. 1.1}$$

De acordo com a Equação 1.1, uma amostra com 50% de excesso enantiomérico, por exemplo, contém 75% de um enantiômero e 25% do outro¹.

1.2. Proquiralidade e indução assimétrica

Existem reações que podem produzir compostos quirais a partir de reagentes aquirais. Isto é possível nos casos em que, na molécula de reagente, existe alguma característica estrutural que, quando sofre uma modificação, leva a formação de um produto quiral. Um destes casos é reação de epoxidação do propeno, mostrada na Figura 1.5.

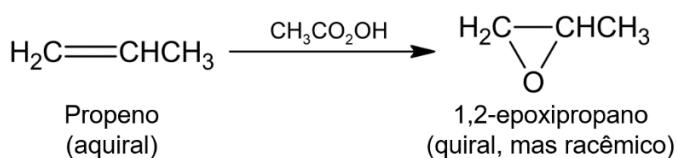


Figura 1.3. Equação química representando um exemplo de reação que produz compostos quirais¹.

A proquiralidade é definida como a propriedade geométrica de um objeto, ou arranjo espacial de átomos, capaz de se tornar quiral em uma única etapa de dessimetriação (modificação de um objeto de tal forma que ocorra a perda de um ou mais elementos de simetria)⁴. No caso da reação representada na Figura 1.3, a dupla ligação da molécula de propeno é uma unidade estrutural pró-quiral e suas faces superior e inferior são chamada de faces pró-quirais. Note que o ataque em uma das faces resulta na formação do enantiômero do composto formado pelo ataque na face oposta, por isto, denominamos a relação entre as duas faces como enantiotópica.

No exemplo de reação mostrado na Figura 1.3, parte-se de reagentes aquirais e se obtém produtos quirais, entretanto, estes produtos formam uma mistura racêmica que, obviamente, é opticamente inativa. Como princípio geral, produtos opticamente ativos não podem ser formados quando substratos opticamente inativos reagem com moléculas também opticamente inativas. Todavia, existem reações em que um estereoisômero é preferencialmente formado em detrimento do outro. Numa reação química, a formação preferencial de um enantiômero ou diastereoisômero em relação ao outro como resultado de uma característica quiral presente no substrato, reagente, catalisador ou ambiente é denominada indução assimétrica⁴.

Entender como ocorrem as reações de indução assimétrica tem se mostrado extremamente importante, uma vez que, através destas reações, é possível obter um

estereoisômero específico. Um levantamento realizado há pouco mais de duas décadas, mostrou que 56% dos medicamentos utilizados na época eram compostos quirais e, destes compostos, 88% eram administrados na forma de misturas racêmicas⁵. Entretanto, o ambiente assimétrico de receptores celulares e enzimas pode interagir de maneira diferente com cada um dos enantiômeros, resultando em diferentes atividades farmacodinâmicas e propriedades farmacocinéticas⁶. Um exemplo é o fármaco ibuprofeno, usado como analgésico e anti-inflamatório, o qual é vendido na forma de uma mistura racêmica. Todavia, apenas o S-ibuprofeno é ativo, enquanto que o R-ibuprofeno pode sofrer inversão quiral para o S-ibuprofeno através da ação de enzimas hepáticas⁷. Outro exemplo, é a talidomida, medicamento que foi usado como sedativo e no tratamento de náuseas em mulheres grávidas entre 1957 e 1961. Durante este período, mais de 10000 bebês sofreram de má formação fetal e o uso do medicamento foi proibido⁸. Entretanto, este fármaco também apresenta outras propriedades clínicas importante e seu uso foi novamente aprovado, em 1998, para o tratamento de lesões leprosas e, em 2006, para o tratamento de mieloma múltiplo⁹. A talidomida também era, e ainda é, administrada sob a forma de mistura racêmica e, inicialmente, acreditava-se que o isômero R era o responsável pelo efeito sedativo¹⁰ enquanto que o isômero S era teratogênico, todavia, a conversão *in vivo* de um enantiômero no outro, através de em equilíbrio ceto-enólico¹¹, faz com seja difícil determinar o efeito farmacológico de cada enantiômero⁷.

1.3. Indução assimétrica catalisada por um tetrapeptídeo

O principal objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização conformacional do tetrapeptídeo catalisador envolvido numa reação de catálise assimétrica descrita por Lewis e colaboradores¹². Além disso, tentou-se observar de que maneira o tetrapeptídeo interagia com o substrato de forma a produzir um enantiômero em excesso. A reação apresenta algumas características peculiares e consiste na acetilação do bisfenol (1, Figura 1.4a) catalisada pelo tetrapeptídeo (3, Figura 1.4b). Esta reação é incomum pois se trata de uma indução assimétrica com alto rendimento, 80%, e excesso enantiomérico, 95%, quando realizada à temperatura de -30 °C em clorofórmio.

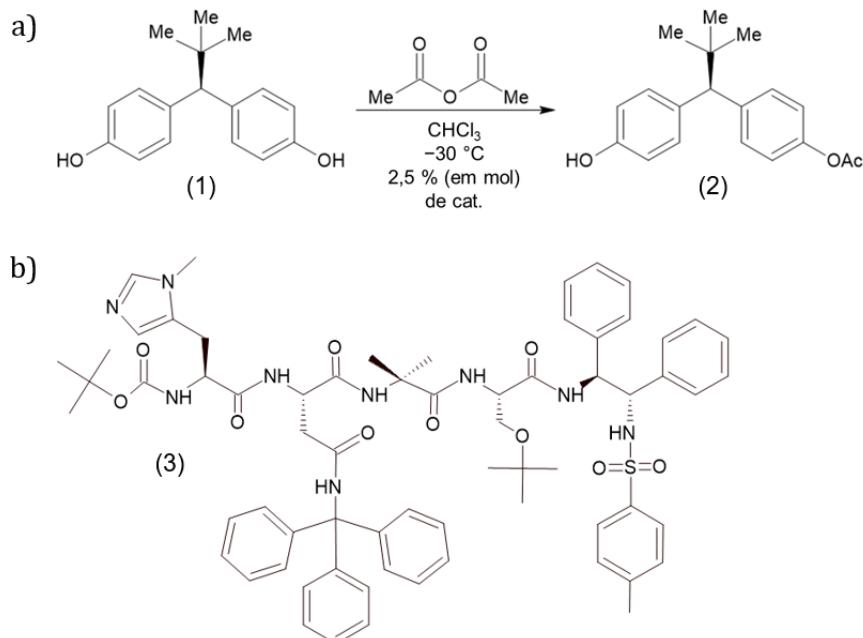


Figura 1.4. a) Equação representando a reação de estudo. b) Tetrapeptídeo catalisador da reação de indução assimétrica.

Outra característica desta reação é a longa distância entre as hidroxilas enantiotópicas do substrato bisfenólico e também a distância do centro de proquiralidade ao sítio de funcionalização (Figura 1.5). Isto obriga que o catalisador interaja simultaneamente com o centro de proquiralidade e com a hidroxila que sofre a acetilação.

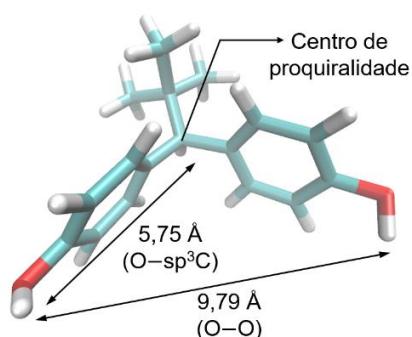


Figura 1.5. Distâncias do centro de proquiralidade aos oxigênios enantiotópicos e entre os oxigênios enantiotópicos.

Após aplicar uma biblioteca de lipases em busca do catalisador ótimo para obtenção do produto bisfenólico monoacetilado e obter resultados insatisfatórios, Lewis e colaboradores¹² sugeriram a utilização de oligopeptídeos como catalisadores. A princípio, foram criadas bibliotecas de hexapeptídeos catalisadores com porções

aromáticas e alifáticas de forma a mimetizar o arranjo presente no substrato bisfenólico. Após algumas etapas de otimização, determinou-se que o número de resíduos do oligopeptídeo para manter a enantiosseletividade da reação poderia ser de quatro resíduos. Desta forma, foram criadas bibliotecas de tetrapeptídeos, as quais foram otimizadas de forma a se obter o tetrapeptídeo representado pela estrutura 3 da Figura 1.6b. Após estas otimizações, foram maximizadas apenas as condições reacionais, determinando-se que a reação teria o maior rendimento e excesso enantiomérico se realizada a -30 °C e em clorofórmio contendo 2,5% (em mol) do catalisador.

O fato de não ser comum a utilização de peptídeos como substituintes de enzimas em reações com indução assimétrica, juntamente com a realização da reação em solvente orgânico, visto que a água é o solvente natural de enzimas, torna essa reação um interessante objeto de estudo. Dessa forma, sua modelagem teórica é útil tanto pela aplicação particular específica quanto para o estudo da ação catalítica de oligopeptídeos em meios não-aquosos. Além disso, o tetrapeptídeo pode ser considerado um sistema modelo para o estudo de centros catalíticos enzimáticos. Lewis e colaboradores¹² propuseram dois mecanismos para a reação baseados na dessimetriação do substrato no estado de transição (Figura 1.6). Os mecanismos propostos mostraram-se de acordo com resultados espectroscópicos experimentais de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e carbono.

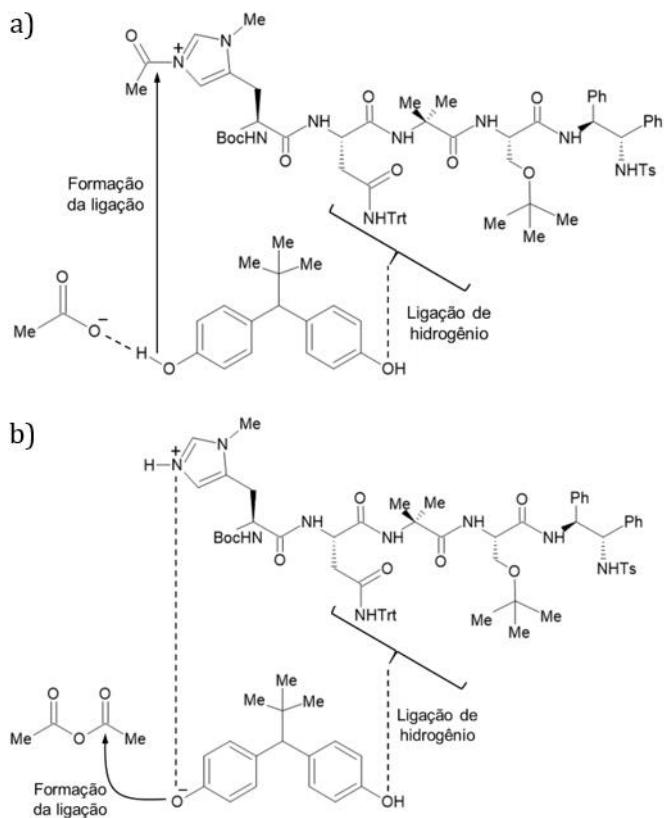


Figura 1.6. Mecanismos de reação propostos: a) Catálise nucleofílica; b) Catálise assistida por base¹².

O tetrapeptídeo catalisador possui quatro resíduos principais, sendo que dois deles apresentam grupos protetores, e duas porções terminais. Os resíduos principais são a 1-metilistidina (ou π -metilistidina), Pmh, no qual está localizado o anel metilimidazólico, a asparagina com um grupo trilitil, Asn(Trt), o ácido isobutírico, Aib e a serina com um grupo terc-butil, Ser(t-Bu). A porção amino terminal é um grupo terc-butoxicarbonil, Boc, e a porção carboxi terminal é o volumoso grupo difeniletlenodiamina(tosil), Dpd(Tos). A Figura 1.7 mostra a fórmula estrutural do tetrapeptídeo catalisador juntamente com a indicação e o nome dos resíduos principais e porções terminais.

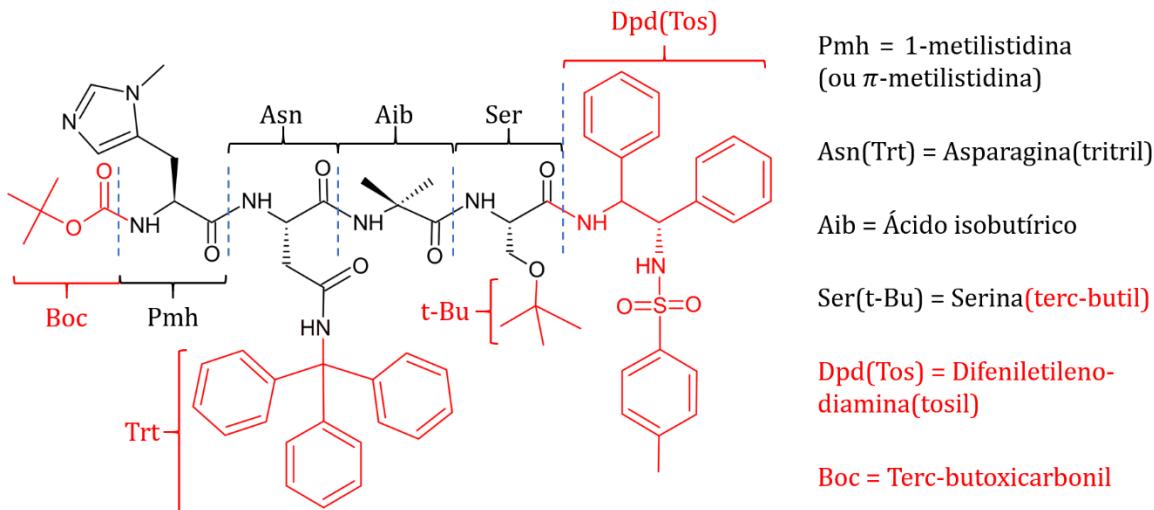


Figura 1.7. Fórmula estrutural do tetrapeptídeo catalisador e nomes dos resíduos e porções terminais.

Neste trabalho, investigamos as conformações preferenciais do tetrapeptídeo catalisador as interações entre o substrato bisfenólico e o tetrapeptídeo.

1.4. Simulações de dinâmica molecular

Atualmente, as técnicas experimentais para observação de sistemas atômicos e moleculares estão muito avançadas. Em 2009, pesquisadores da IBM obtiveram, usando microscopia de força atômica, a imagem de uma molécula do hidrocarboneto aromático pentaceno com resolução na escala de 5 Å¹³. Além disso, técnicas como a cristalografia de raios X e a ressonância magnética nuclear (RMN) fornecem informações estruturais importantíssimas, principalmente para sistemas biomoleculares. Entretanto, ainda não é simples obter informações dinâmicas com resolução atômica destes sistemas através de técnicas experimentais. Nesse contexto, as simulações de dinâmica molecular surgem como ferramentas para o estudo do comportamento dinâmico do sistemas químicos e bioquímicos.

Simulados classicamente, os sistemas consistem em um modelo em que cada átomo é representado por uma partícula pontual com carga elétrica e massa, sendo que estes átomos estão sujeitos às interações intra e intermoleculares. Além disso, as simulações de dinâmica molecular necessitam de um conjunto de coordenadas e velocidade iniciais e de uma função de energia potencial, que define como ocorrerão as

interações entre os átomos¹⁴. A evolução temporal do sistema simulado é obtida através das equações do movimento de Newton.

Nas simulações de dinâmica molecular, as interações eletrônicas não são consideradas de forma explícita, assim, nesse tipo de simulação, não ocorre o rompimento ou a formação de ligações químicas e nem fenômenos como a ressonância eletrônica. Apesar disso, as propriedades quânticas da matéria são incluídas implicitamente nos parâmetros das funções que descrevem a energia potencial do sistema. O conjunto de parâmetros e equações que representam as interações intra e intermoleculares e fornece a energia potencial do sistema é denominado campo de força. Atualmente, existem diversos campos de força utilizados nas simulações de sistema bioquímicos como CHARMM¹⁵, AMBER^{16,17}, GROMOS¹⁸, OPLS¹⁹ e GAFF²⁰. Estes campos incorporam em sua forma funcional tanto as interações intramoleculares ($V_{\text{ligações}}$, $V_{\text{ângulos}}$, V_{diedros} e $V_{\text{imprópios}}$) quanto as interações intermoleculares ($V_{\text{van der Waals}}$ e $V_{\text{eletrostático}}$), dessa forma, podemos representar o potencial total (V_{total}) como mostrado na Equação 1.3:

$$V_{\text{total}} = V_{\text{ligações}} + V_{\text{ângulos}} + V_{\text{diedros}} + V_{\text{imprópios}} + V_{\text{van der Waals}} + V_{\text{eletrostático}} \quad \text{Eq. 1.3}$$

Os estiramentos das ligações covalentes e as deformações angulares são bem representadas por potenciais harmônicos (Equações 1.4 e 1.5) para as simulações em temperaturas comuns de sistemas bioquímicos, nas quais não ocorrem grandes deslocamentos ao redor das distâncias e ângulos de equilíbrio.

$$V_{\text{ligações}} = k_r(r - r_0)^2 \quad \text{Eq. 1.4}$$

$$V_{\text{ângulos}} = k_\theta(\theta - \theta_0)^2 \quad \text{Eq. 1.5}$$

Na Equação 1.4, k_r é a constante de força, r é a distância entre os átomos ligados covalentemente e r_0 é a distância de equilíbrio. Da mesma forma, na Equação 1.5, k_θ é a constante de força, θ é ângulo formado por três átomos ligados e θ_0 é o ângulo de equilíbrio.

O terceiro termo (da esquerda para a direita) do lado direito da Equação 1.3 refere-se às torções dos ângulos diedros. Quando temos uma molécula com quatro átomos ligados covalentemente, como os átomos A, B, C e D da molécula da Figura 1.8, podemos definir dois planos, cada um composto por três átomos, sendo que dois destes átomos são comuns aos dois planos. No caso da molécula da Figura 1.8, os planos são definidos pelos átomos A-B-C e B-C-D e os átomos em comum aos dois planos são os átomos B e C. O ângulo diedro é definido como o ângulo ϕ entre os dois planos, A-B-C e B-C-D, e reflete a rotação da ligação B-C.

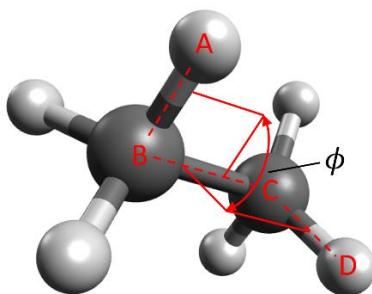


Figura 1.8. Representação do ângulo diedro ϕ entre os dois planos A-B-C e B-C-D²¹.

Uma vez que os diedros representam as rotações das ligações químicas, eles estão diretamente relacionados com a rigidez e com as mudanças conformacionais das estruturas moleculares e, portanto, a correta modelagem destes ângulos é muito importante para que as simulações mimetizem de forma fiel a dinâmica das moléculas e macromoléculas. Para representar o potencial associado às torções diedrais, normalmente é utilizada a função periódica cosseno, como mostrado na Equação 1.6, ou em casos mais complexos, uma soma de cossenos²¹.

$$V_{\text{diedros}} = k_{\phi} [1 + \cos(n\phi - \delta)] \quad \text{Eq. 1.6}$$

Na Equação 1.6, k_{ϕ} é a constante de força; n é a multiplicidade, que define o número de mínimos e máximos entre 0 e 2π ; ϕ é o valor do ângulo diedro e δ é o valor do ângulo de fase.

Além disso, para os átomos ligados covalentemente, é usado mais um potencial que representa as deformações fora do plano, denominadas de diedros impróprios. Este potencial é necessário para manter a planaridade de anéis aromáticos e de algumas

ligações envolvendo átomos com hibridização sp^2 , como a ligação peptídica, e é descrito por uma função harmônica (Equação 1.7):

$$V_{\text{impróprios}} = k_\omega (\omega - \omega_0)^2 \quad \text{Eq. 1.7}$$

em que, k_ω é a constante de força, ω o valor do ângulo diedro impróprio e ω_0 é o valor de equilíbrio do diedro impróprio.

Em relação às interações intermoleculares, utiliza-se um potencial de Lennard-Jones (Equação 1.8) para representar as interações de van der Waals entre dois átomos i e j não ligados:

$$V_{\text{van der Waals}} = 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad \text{Eq. 1.8}$$

Nesta equação, ε_{ij} é a profundidade do poço de energia potencial referente à interação entre os átomos i e j ; σ_{ij} é a distância na qual o potencial intermolecular entre os átomos i e j é nulo, esta distância corresponde aproximadamente à soma dos raios de van der Waals do par de átomos envolvidos; e r_{ij} é a distância de separação entre os dois átomos i e j . No potencial de Lennard-Jones, o termo r_{ij}^{-12} está associado às interações repulsivas de curto alcance devido à sobreposição das nuvens eletrônicas, enquanto que o termo r_{ij}^{-6} reflete as interações atrativas de longo alcance (interações entre dipolos instantâneos). Estes termos combinados produzem um potencial característico que é muito repulsivo a curtas distâncias, atrativo a longas distâncias e que possui um mínimo.

Já as interações eletrostáticas são representadas por um potencial de Coulomb (Equação 1.9), no qual dois átomos i e j , separados por uma distância r_{ij} , com cargas parciais q_i e q_j , respectivamente, interagem entre si de acordo com a equação:

$$V_{\text{eletrostático}} = k_{el} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad \text{Eq. 1.9}$$

em que $k_{el} = 1/4\pi\varepsilon_0$, sendo ε_0 a constante de permissividade do vácuo.

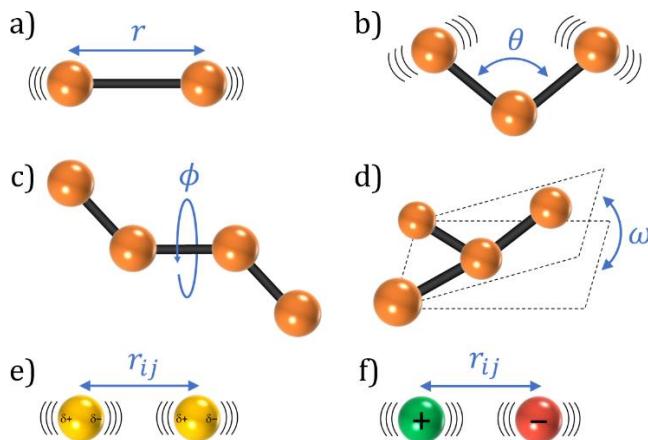


Figura 1.9. Representação dos parâmetros utilizados na modelagem das interações intramoleculares: a) estiramento de ligação, b) deformação angular, c) torção diedral e d) deformação fora do plano (diedros impróprios); e das interações intermoleculares: e) van der Waals e f) eletrostática.

Todas as equações mostradas anteriormente envolvem uma série de parâmetros, como constantes de forças, distâncias de equilíbrio, ângulos de equilíbrio, cargas, entre outros (Figura 1.9). Estes parâmetros podem ser obtidos experimentalmente, através de análises espectroscópicas, por exemplo, e através de cálculos de estrutura eletrônica. Esta etapa de parametrização geralmente não é trivial e é fundamental para que as simulações reproduzam de maneira satisfatória as propriedades dos sistemas simulados.

Além da definição do campo de força parametrizado, para realizar as simulações de dinâmica molecular, também são necessárias coordenadas e velocidades iniciais. Para proteínas, geralmente as coordenadas iniciais são obtidas do *Protein Data Bank* (PDB)²², que é um banco de estruturas tridimensionais de proteínas e ácidos nucleicos obtidas por análises de cristalografia de raios X, RMN e, mais recentemente, microscopia crioeletrônica. A solvatação e a adição de íons ao sistema podem ser feitas de várias maneiras e completam o sistema a ser simulado. Já as velocidades iniciais são comumente definidas aleatoriamente a partir da distribuição de probabilidades de Maxwell-Boltzmann para a temperatura de simulação.

Definidas as posições e velocidades iniciais do sistema e a função de energia potencial, pode-se calcular a força que atua em cada átomo do sistema através do gradiente do potencial e, portanto, obter a aceleração de cada partícula:

$$\vec{F}_i(t) = -\nabla V_{total}[\vec{r}_i(t)] \quad \text{Eq. 1.10}$$

$$\vec{a}_i(t) = \frac{\vec{F}_i(t)}{m_i} \quad \text{Eq. 1.11}$$

O potencial depende somente das posições dos átomos e a força atuante em cada átomo é alterada continuamente conforme os átomos mudam de posição. Isto significa que os movimentos dos átomos estão acoplados uns aos outros, caracterizando um problema de muitos corpos, cuja solução analítica não é possível obter. A fim de contornar esta situação, a integração das equações de movimento é realizada utilizando métodos de diferenças finitas. Neste método, a integração é dividida em curtos intervalos de tempo fixo Δt , mais comumente denominados de passo de tempo, os quais são da ordem de tempo dos movimentos moleculares mais rápidos, isto é, da ordem de femtosegundos. Então, calcula-se a força atuante em cada átomo no tempo t e, consequentemente, obtém-se as acelerações de cada partícula do sistema. Uma vez calculadas as acelerações no instante de tempo t , podem-se obter as velocidades dos átomos no instante de tempo posterior $t + \Delta t$. Dessa forma, também são obtidas as posições neste novo instante de tempo. Assume-se que a força atuante nos átomos é constante ao longo do passo de tempo Δt . Então, recalculam-se o potencial, as acelerações, as velocidades e as posições²³. A propagação deste ciclo gera a trajetória da simulação ao longo do tempo.

Em dinâmica molecular, há uma série de algoritmos de integração das equações do movimento que aplicam métodos de diferenças finitas e, em todos eles, as posições, velocidades e acelerações são aproximadas por expansões de Taylor. Um dos algoritmos mais conhecidos é o algoritmo *Verlet*, o qual usa as posições e acelerações no tempo t juntamente com as posições no tempo anterior $t - \Delta t$ para calcular as posições no instante posterior $t + \Delta t$. Sendo assim, consideram-se as seguintes equações para as posições nos instantes de tempo $t - \Delta t$ e $t + \Delta t$:

$$\vec{r}(t - \Delta t) = \vec{r}(t) - \vec{v}(t)\Delta t + \frac{1}{2}\vec{a}(t)\Delta t^2 \quad \text{Eq. 1.12}$$

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t)\Delta t + \frac{1}{2}\vec{a}(t)\Delta t^2 \quad \text{Eq. 1.13}$$

Ao somar as duas equações anteriores, obtemos que a posição no instante $t + \Delta t$ é dada por:

$$\vec{r}(t + \Delta t) = 2\vec{r}(t) - \vec{r}(t - \Delta t) + \vec{a}(t)\Delta t^2 \quad \text{Eq. 1.14}$$

Note que as velocidades não aparecem de forma explícita neste algoritmo, contudo, elas podem ser calculadas por uma aproximação linear:

$$\vec{v}(t) = \frac{\vec{r}(t + \Delta t) - \vec{r}(t - \Delta t)}{2\Delta t} \quad \text{Eq. 1.15}$$

O algoritmo *Verlet* possui algumas desvantagens, umas delas é o fato de as velocidades não aparecem explicitamente, isto faz com que elas estejam disponíveis apenas após o cálculo das posições para o instante de tempo subsequente. Além disso, como o algoritmo *Verlet* utiliza o instante de tempo precedente para calcular as posições, em $t = 0$ é necessário aplicar outro método para calculá-las, uma vez que as posições no tempo anterior ao primeiro passo de simulação não são conhecidas²³. Uma alternativa para obter é $\vec{r}(t - \Delta t)$ é aplicar uma expansão de Taylor, como mostrado na equação a seguir:

$$\vec{r}(0 - \Delta t) = \vec{r}(0) - \vec{v}(0)\Delta t + \frac{1}{2}\vec{a}(0)\Delta t^2 \quad \text{Eq. 1.16}$$

Uma das variações do algoritmo *Verlet* é o algoritmo *Leap-frog*, o qual utiliza as seguintes relações para calcular as posições e velocidades:

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t + \Delta t/2)\Delta t \quad \text{Eq. 1.17}$$

$$\vec{v}(t + \Delta t/2) = \vec{v}(t - \Delta t/2) + \vec{a}(t)\Delta t \quad \text{Eq. 1.18}$$

A implementação do algoritmo *Leap-frog* é feita da seguinte maneira: primeiramente, calculam-se as velocidades $\vec{v}(t + \Delta t/2)$ usando as velocidades no instante $t - \Delta t/2$ e as acelerações no tempo t . Então, usando a Equação 1.17, as posições $\vec{r}(t + \Delta t)$ são computadas a partir das velocidades calculadas previamente no tempo $t + \Delta t/2$ e das posições o tempo t . A clara vantagem deste algoritmo em relação ao algoritmo *Verlet* é que as velocidades aparecem explicitamente, entretanto, o algoritmo *Leap-frog* tem como ponto fraco o fato de que as posições e velocidades não são sincronizadas²³.

O algoritmo que fornece as posições, velocidade e acelerações no mesmo instante de tempo sem que haja problemas de precisão nos cálculos é o algoritmo *velocity Verlet*, o qual é o mais utilizado nas simulações modernas. Neste algoritmo, as posições dos átomos são calculadas por uma expansão de Taylor de segunda ordem (Equação 1.19) e as velocidades são determinadas somando-se as velocidades do tempo t com as médias das acelerações nos tempos t e $t + \Delta t$ (Equação 1.20).

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t)\Delta t + \frac{\vec{a}(t)\Delta t^2}{2} \quad \text{Eq. 1.19}$$

$$\vec{v}(t + \Delta t) = \vec{v}(t) + \frac{\vec{a}(t)\Delta t}{2} + \frac{\vec{a}(t + \Delta t)\Delta t}{2} \quad \text{Eq. 1.20}$$

Na prática, o algoritmo *velocity-Verlet* é implementado de tal forma a armazenar apenas um vetor de velocidades por passo de simulação. Para isso, após os cálculos das acelerações no tempo t , as velocidades são computadas em um instante intermediário $t + \Delta t/2$ de acordo com a Equação 1.21:

$$\vec{v}(t + \Delta t/2) = \vec{v}(t) + \frac{\vec{a}(t)\Delta t}{2} \quad \text{Eq. 1.21}$$

Então, estas velocidades são usadas para calcular as posições no instante $t + \Delta t$, como mostrado na Equação 1.22:

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t + \Delta t/2)\Delta t \quad \text{Eq. 1.22}$$

Substituindo a Equação 1.21 na Equação 1.22, obtemos a Equação 1.19. Uma vez que estas novas posições são calculadas, o potencial, que é função apenas das posições dos átomos, é recalculado e são obtidas as forças e, consequentemente, as acelerações no instante $t + \Delta t$. Assim, é possível calcular as velocidades no instante $t + \Delta t$ da seguinte forma²³:

$$\vec{v}(t + \Delta t) = \vec{v}(t + \Delta t/2) + \frac{\vec{a}(t + \Delta t)\Delta t}{2} \quad \text{Eq. 1.23}$$

A substituição da Equação 1.21 na Equação 1.23, resulta na Equação 1.20. Dessa forma, completa-se um ciclo de cálculos de propagação da trajetória das simulações.

Apesar dos algoritmos explicados anteriormente serem simples, eles são eficientes, estáveis e possuem duas propriedades importantes para serem aplicados em simulações de dinâmica molecular: serem reversíveis no tempo e conservarem o volume no espaço de fases²¹.

Independente de qual algoritmo é aplicado nas simulações, o passo tempo constitui um parâmetro de controle importante. A redução da duração do passo de tempo aumenta a precisão da trajetória obtida, todavia, um número maior de passos será necessário para explorar um mesmo espaço de fases em relação ao caso em que se usa um passo de tempo maior. Já a utilização de um passo de tempo muito grande gera flutuações de energia e pode tornar a simulação instável²¹. Assim, deve-se encontrar um passo de tempo adequado de tal forma que o espaço de fases seja amostrado satisfatoriamente e não ocorram instabilidades que interrompam a simulação. No caso de simulações de moléculas, o passo de tempo deve ser suficientemente pequeno para abranger os estiramentos mais rápidos, os quais costumam envolver átomos de hidrogênio. Entretanto, estas vibrações pouco influenciam em muitas propriedades a serem observadas, então, uma estratégia comumente utilizada é inserir restrições que mantêm fixos os comprimentos de ligações envolvendo átomos de hidrogênio, desta forma é possível aplicar maiores passos de tempo e, consequentemente, simulações com maior duração de tempo para o mesmo custo computacional¹⁴.

1.5. O método Adaptive Biasing Force (ABF)

O objetivo do método *Adaptive Biasing Force* (ABF) é melhorar a eficiência de simulações de dinâmica molecular nas quais o perfil de energia livre é amostrado de maneira ineficiente devido à presença de barreiras energéticas que não são superadas na temperatura em que as simulações ocorrem. Uma característica importante deste método é que, como a força média atuante ao longo da coordenada da reação é a quantidade ajustada adaptativamente, não há necessidade do conhecimento prévio da superfície de energia livre²⁴.

O ABF está englobado em um conjunto de técnicas denominado de Integração Termodinâmica, cuja abordagem consiste em calcular as derivadas da energia livre em relação a um parâmetro de ordem, que pode ser definido como uma coordenada de reação, e depois integrá-las. Segundo esta técnica de cálculo de energia livre, a diferença de energia entre dois estados 1 e 2 é calculada como mostrado a seguir:

$$G(\xi_2) - G(\xi_1) = \int_{\xi_1}^{\xi_2} \frac{dG}{d\xi} d\xi \quad \text{Eq. 1.24}$$

em que a derivada da energia livre em respeito à coordenada de reação ($dG/d\xi$) pode ser computada pela seguinte equação:

$$\frac{dG}{d\xi} = \left\langle \frac{\partial H}{\partial \xi} \right\rangle_{\xi} \quad \text{Eq. 1.25}$$

na qual H corresponde à Hamiltoniana do sistema e o subscrito ξ significa que a média é calculada para um valor fixo de coordenada de reação²⁵⁻²⁷.

A energia livre ao longo de uma coordenada de reação pode ser interpretada como um potencial correspondente à força média atuante ao longo desta coordenada, este potencial é denominado potencial da força média (PMF)²⁴. Tomando a coordenada de reação como uma coordenada atômica x_1 , temos que:

$$\frac{dG}{dx_1} = \left\langle \frac{\partial H}{\partial x_1} \right\rangle_{x_1} = \left\langle \frac{\partial U}{\partial x_1} \right\rangle_{x_1} = -\langle \vec{F}_1 \rangle_{x_1} \quad \text{Eq. 1.26}$$

em que \vec{F}_1 é a força na coordenada atômica x_1 ; dG/dx_1 é a força atuante em x_1 ; e $G(x_1)$ pode ser considerado o PMF para a coordenada x_1 ²⁵⁻²⁷.

Dessa forma, é possível obter o perfil de energia livre a partir do cálculo da força média. Entretanto, em uma simulação de dinâmica molecular comum, a amostragem seria ineficiente caso existissem altas barreiras energéticas ao longo da coordenada de reação ξ . O algoritmo do método ABF aplica uma força adicional ao sistema a fim de aumentar a eficiência da amostragem, essa força leva a uma amostragem uniforme ao longo da coordenada de reação. Para fazer isso, calcula-se uma estimativa da força média ao longo de cada coordenada amostrada, a qual fornece uma estimativa da derivada da energia livre. A estimativa da força média é obtida calculando-se a média temporal das forças instantâneas que atuam ao longo da coordenada de reação. Isto é feito dividindo-se a coordenada ξ em pequenos intervalos iguais $\Delta\xi$, nos quais as forças são acumuladas com o decorrer da simulação. Então, a aproximação da força média, $\langle \vec{F}_\xi(N, k) \rangle_\xi$, em um intervalo k após N passos de simulação é dada pela média de todas as forças amostradas nesse intervalo:

$$\langle \vec{F}_\xi(N, k) \rangle_\xi = \frac{1}{N^k} \sum_{n=1}^{N^k} \vec{F}_{\xi_n} \quad \text{Eq. 1.27}$$

em que, N^k é o número de forças amostradas no intervalo k depois de N passos e \vec{F}_{ξ_i} corresponde à i -ésima força amostrada neste intervalo. Ao mesmo tempo que essa força é calculada, o algoritmo ABF aplica uma força externa com mesmo módulo e direção oposta, anulando, no caso ideal, a força média²⁵⁻²⁷.

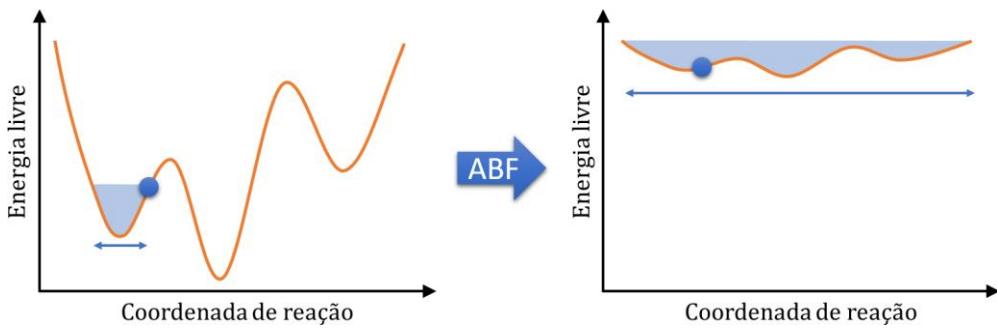


Figura 1.10. O algoritmo do método ABF suaviza o perfil de energia livre de forma que amostragem ocorra em uma superfície achatada, cujas barreiras energéticas são menores, possibilitando uma amostragem ampliada.

Se a força média for bem estimada, o sistema explora uma superfície de energia praticamente plana (suavizada) e o movimento passa a ser difusivo ao longo da coordenada da reação (Figura 1.10), sendo que a energia livre corresponde à integral da força externa aplicada.

1.6. Funções de distribuição de distância mínima e integrais de Kirkwood-Buff

Funções de distribuição radiais (RDF) são importantes para a descrição da estrutura molecular de meios condensados. Essas funções descrevem como a densidade de partículas de um sistema varia com distância em relação à uma partícula de referência. Assim, pode-se utilizar as funções de distribuição radial para estudar como um solvente se estrutura ao redor de um soluto (Figura 1.11). Podemos interpretar essas funções como sendo a razão entre a densidade de probabilidade de encontrar um determinado sítio do solvente a uma distância r do soluto, na presença do soluto, $\rho_{(r)}$, e a densidade de probabilidade de encontrar esse mesmo sítio na mesma distância na ausência do soluto, $\rho_{(r)}^*$. A partir de simulações de dinâmica molecular, podemos estimar essas probabilidades como sendo o número médio de sítios do solvente no volume definido por uma casca esférica definida por distâncias r e $r + dr$ na presença do soluto, $\langle N_{(r,r+dr)} \rangle$, e o número médio de sítios do solvente em uma distribuição aleatória com densidade igual à do solvente na ausência do soluto, $\langle N_{(r,r+dr)}^* \rangle$ (Equação 1.28)²⁷.

$$g(r) = \frac{\rho_{(r)}}{\rho_{(r)}^*} = \frac{\langle N_{(r,r+dr)} \rangle}{\langle N_{(r,r+dr)}^* \rangle} \quad \text{Eq. 1.28}$$

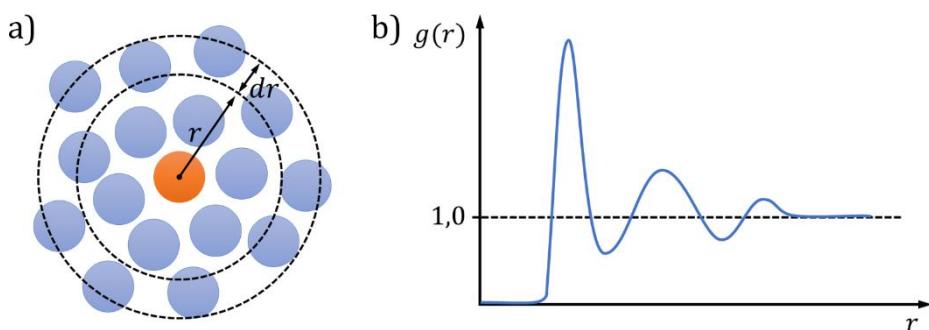


Figura 1.11. a) Representação da distribuição espacial do solvente (azul) ao redor do soluto (laranja) e b) função de distribuição radial típica.

Para estudar a solvatação de solutos estruturalmente complexos, as funções de distribuição radial não são convenientes, pois dependem muito das formas das moléculas de soluto e de solvente. Assim, neste trabalho, utilizaram-se as funções de distribuição de distância-mínima (g_{md}), as quais, ao invés de usar as distâncias entre os centros de massa do soluto e do solvente, tomam como parâmetro a menor distância entre átomos do solvente e átomos da superfície do soluto. Essas funções são mais adequadas para a análise da solvatação de solutos com formatos irregulares como o tetrapeptídeo estudado, como demonstrado em um trabalho recente do grupo²⁸.

Além das funções de distribuição de distância mínima, também foram calculadas as integrais de Kirkwood-Buff (KBI). A teoria de soluções de Kirkwood-Buff relaciona a estrutura microscópica das soluções com suas propriedades termodinâmicas. Comumente, as KBI são calculadas utilizando-se as funções de distribuição radial, todavia, aqui, essas integrais foram calculadas usando-se as funções de distribuição de distância mínima. Ao analisar as integrais, podemos avaliar se o solvente é preferencialmente sofreu acumulação ou depleção das vizinhanças do peptídeo.

As funções de distribuição de distância mínima e as integrais de Kirkwood-Buff foram calculadas utilizando o módulo *gmd* do pacote *MDAnalysis*²⁹, desenvolvido no grupo.

Capítulo 2 – Metodologia

Neste capítulo, são descritos os métodos e procedimentos adotados ao longo do projeto. A parametrização das cargas das moléculas envolvidas nas simulações é descrita resumidamente no tópico 2.1. O procedimento usado na obtenção de coordenadas iniciais das simulações de longa duração é mostrado no tópico 2.2 e a preparação dos sistemas para essas simulações é descrito no tópico 2.3. Os detalhes e etapas das simulações de longa duração e das simulações de amostragem ampliada são apresentados nos tópicos 2.4 e 2.5, respectivamente.

2.1. Parametrização das cargas atômicas do tetrapeptídeo, bisfenol e clorofórmio

Antes de realizar as simulações, foi necessário fazer a parametrização das cargas atômicas do tetrapeptídeo catalisador e do substrato bisfenólico. Cada campo de força possui um conjunto de cargas para os resíduos mais comuns, todavia, para resíduos não comuns, como os presentes no tetrapeptídeo simulado neste trabalho, fez-se necessária a obtenção das cargas atômicas que representam o potencial eletrostático molecular.

Primeiramente, separaram-se os resíduos principais e as porções terminais do tetrapeptídeo, conforme mostrado na Figura 2.1. Isso foi feito da seguinte forma: a partir de um arquivo no formato *pdb* do tetrapeptídeo (criado pelo ex-aluno de iniciação científica Iago Teixeira de Souza e Silva), dividiu-se a molécula em seis porções menores, sendo duas porções os resíduos carboxi e amino terminais (CAPC e CAPN) e as outras quatro porções os resíduos principais do tetrapeptídeo (AA1, AA2, AA3 e AA4), adicionando-se grupos acetil e N-metil nas ligações rompidas. Então, obtiveram-se os arquivos no formato *pdb* referentes a cada um desses resíduos.

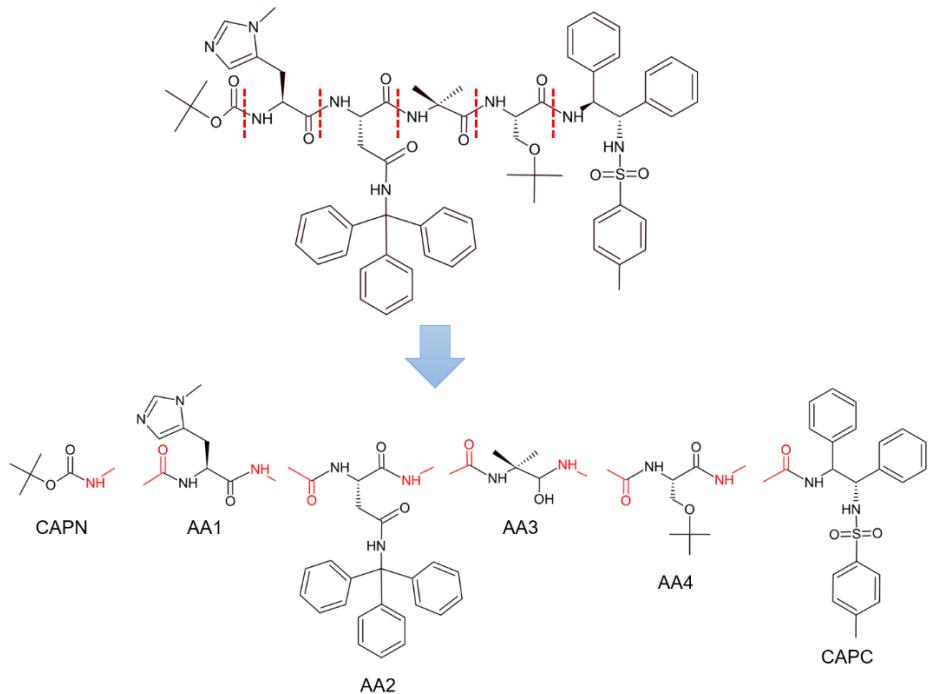


Figura 2.1. Fragmentação do tetrapeptídeo para parametrização.

O campo de força utilizado na parametrização foi o *General Amber Force Field (GAFF, versão 2.1)*²⁰. Assim, constantes de força, distância de equilíbrios, ângulos de equilíbrio e parâmetros de van der Waals do tetrapeptídeo simulado foram determinados por analogia aos existentes no campo de força, considerando os tipos de átomos como referência. Já as cargas de dos átomos foram calculadas através do *R.E.D. Server Development/PyRED*³⁰⁻³³, que consiste num serviço online destinado a obtenção de cargas atômicas e construção de bibliotecas de campos de força para novas moléculas ou fragmentos de moléculas. Para isso, forneceu-se ao servidor as coordenadas espaciais dos átomos (arquivos no formato *pdb*), os parâmetros (menos as cargas) do campo de força *GAFF* e os métodos e programa utilizados na obtenção do potencial eletrostático, na otimização da geometria e no ajuste das cargas. Todos os cálculos de estrutura eletrônica foram feitos utilizando o programa *GAUSSIAN*³⁴. Para a otimização de geometria foi utilizado o método *DFT* com o funcional híbrido *B3LYP* e a base 6-31+G(d) e para o cálculo do potencial eletrostático foi aplicado o método *Hartree-Fock* com a base 6-31+G(d), conforme protocolo padrão estabelecido para parametrização do *GAFF*²⁰. O ajuste para obter as cargas pontuais que reproduzem o potencial eletrostático calculado foi feito utilizando o modelo *RESP (Restrained Electrostatic Potencial)*³⁰. Após esse processo, foram obtidos arquivos com os parâmetros, tanto os determinados por analogia quanto

as cargas ajustadas, e com a conectividade dos átomos. Finalmente, usando o programa *LEaP* do pacote *Amber Tools*³⁵ e os arquivos com parâmetros e conectividade dos átomos, obtiveram-se os arquivos de parâmetros, topologia e coordenadas necessários para iniciar as simulações de dinâmica molecular.

A parametrização das cargas atômicas do substrato bisfenólico foi realizada de maneira semelhante, mas sem a necessidade de se fragmentar a molécula. Enquanto que os parâmetros e as cargas atômicas para a molécula de clorofórmio foram obtidos da literatura³⁶.

2.2. Simulações no vácuo com o tetrapeptídeo em alta temperatura

Esperava-se amostrar suficientemente bem as conformações do tetrapeptídeo catalisador e as interações entre o tetrapeptídeo e o bisfenol através de simulações de dinâmica molecular de longa duração em diferentes temperaturas (sendo umas delas a temperatura experimental da reação), descritas do tópico 2.4. A fim de garantir que não houvesse correlação estrutural entre as conformações iniciais do tetrapeptídeo catalisador nas simulações de longa duração, realizaram-se simulações do tetrapeptídeo no vácuo em alta temperatura (800 K).

As simulações de dinâmica molecular do tetrapeptídeo no vácuo em alta temperatura foram realizadas usando o pacote *AMBER*³⁵ com o campo de força *GAFF*²⁰. Como etapa preliminar, foi construído um sistema com apenas a molécula do tetrapeptídeo no vácuo, sendo que os arquivos de parâmetros, topologia e coordenadas iniciais foram obtidos através do *LEaP*³⁵. Este sistema foi submetido a três etapas: minimização, aquecimento e produção.

A etapa inicial de minimização ocorreu com 4000 ciclos, sendo os 2000 primeiros ciclos aplicando o método do gradiente e os 2000 últimos utilizando gradientes conjugados.

A segunda etapa, o aquecimento, foi realizada com passo de tempo de 1 fs e tempo total de 1,4 ns, sendo que, nos primeiros 0,4 ns o sistema sofreu um aquecimento gradual de 0 a 800 K e no 1 ns restante foi mantido a 800 K.

Na produção, o tetrapeptídeo foi mantido a 800 K por 15 ns, sendo que o passo de tempo também foi de 1 fs. Da trajetória resultante da simulação de produção, foram obtidas aleatoriamente, usando o *VMD*³⁷, três conjuntos de coordenadas, os quais foram

usadas como coordenadas iniciais para cada uma das três simulações de longa duração (Figura 2.2).

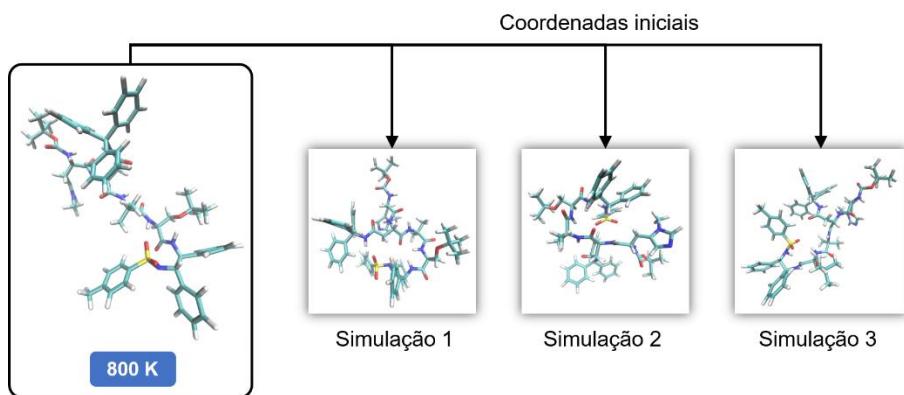


Figura 2.2. Resumo do procedimento de obtenção das coordenadas iniciais para as simulações de longa duração.

2.3. Preparação dos sistemas para as simulações de longa duração

Experimentalmente, a reação foi realizada na proporção estequiométrica de anidrido acético, bisfenol e tetrapeptídeo de aproximadamente 42:20:1 (em número de mols), respectivamente. Lewis e colaboradores realizaram análises de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C para a mistura do tetrapeptídeo catalisador com o substrato bisfenólico na proporção em número de mols de 1:1 em CDCl_3 e observaram a perda de degenerescência dos anéis aromáticos, sugerindo a formação de um complexo entre o substrato e o catalisador¹². Isso indica que a quiralidade do complexo depende somente da interação entre o tetrapeptídeo catalisador e o bisfenol. Com base nessa observação experimental, optamos em realizar as simulações sem a presença do anidrido acético nos sistemas.

Para realização das simulações de longa duração foram preparados dois sistemas, cada um deles com três coordenadas iniciais diferentes obtidas da simulação do tetrapeptídeo no vácuo a 800 K. Ambos os sistemas consistiam em uma caixa cúbica com lado de 61,30 Å e duas mil moléculas de clorofórmio. A diferença entre eles é que em um deles havia apenas uma molécula de tetrapeptídeo e no outro sistema havia uma molécula de tetrapeptídeo e uma de substrato bisfenólico (Figura 2.3).

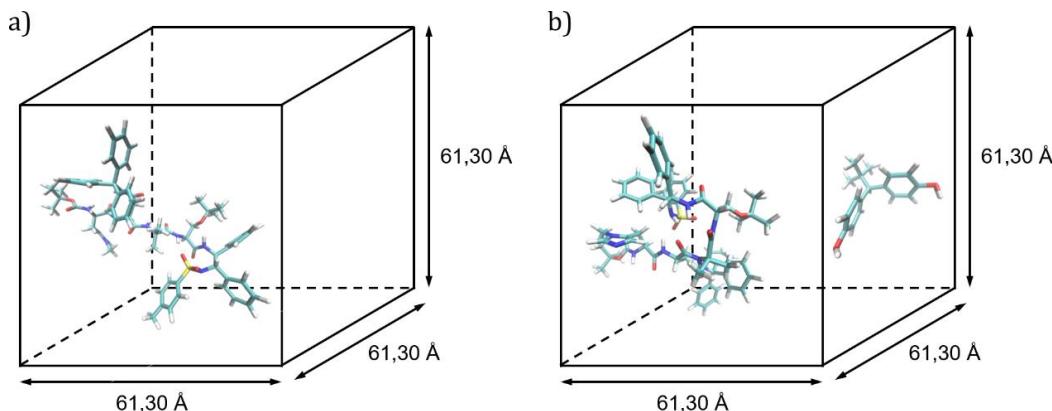


Figura 2.3. Sistemas preparados para as simulações: a) uma molécula de tetrapeptídeo em duas mil moléculas de clorofórmio (omitidas na figura) e b) uma molécula de tetrapeptídeo, uma molécula de bisfenol e duas mil moléculas de clorofórmio (omitidas na figura).

Os dois sistemas foram construídos utilizando o programa *Packmol*³⁸ e os arquivos de topologia e parâmetros foram gerados através do *LEaP*³⁵.

2.4. Simulações de longa duração

Todas as simulações de dinâmica molecular descritas neste tópico foram realizadas usando o pacote *AMBER*³⁵ com o campo de força *GAFF*²⁰. Os sistemas com o tetrapeptídeo em clorofórmio e com o tetrapeptídeo e bisfenol em clorofórmio foram submetidos às seguintes etapas, sendo que foram feitas triplicatas de cada etapa para cada uma das temperaturas de 243,15 K, 273,15 K e 300,15 K:

- Minimização – Esta etapa foi feita a fim de eliminar contatos não desejados entre os átomos, como sobreposições que causariam tensões no sistema. Todos os sistemas foram minimizados em 4000 ciclos, de tal forma que nos 2000 primeiros ciclos aplicou-se o método do gradiente e nos 2000 últimos utilizou-se gradientes conjugados;
- NVT com restrições – O objetivo desta etapa foi ajustar a temperatura do sistema e permitir a relaxação do solvente. Nestas simulações mantiveram-se constantes o número de partículas, volume e temperatura e aplicaram-se restrições aos átomos do tetrapeptídeo e do bisfenol no espaço Cartesiano utilizando um potencial harmônico. Foram aplicadas condições periódicas de contorno e o *cutoff* para o cálculo das interações de van der Waals foi de 8,0 Å. As interações eletrostáticas

foram calculadas utilizando o método PME (*Particle Mesh Ewald*). O tempo total de simulação foi 0,1 ns com passo de tempo de 2 fs; a temperatura foi controlada através da dinâmica de Langevin com frequência de colisão de 2 ps^{-1} ; e foi aplicado o algoritmo SHAKE para restringir os comprimentos de ligações envolvendo átomos de hidrogênio.

- NPT com restrições – Esta etapa foi realizada a fim de se ajustar a pressão e a densidade dos sistemas. Mantiveram-se constantes o número de partículas, pressão e temperatura e aplicaram-se restrições aos átomos do tetrapeptídeo e do bisfenol no espaço Cartesiano utilizando um potencial harmônico. Da mesma forma que na etapa NVT com restrições, foram aplicadas condições periódicas de contorno e o *cutoff* para o cálculo das interações de van der Waals foi de 8,0 Å. As interações eletrostáticas foram calculadas utilizando o método PME. O tempo total de simulação foi 0,1 ns com passo de tempo de 2 fs; a temperatura foi controlada através da dinâmica de Langevin com frequência de colisão de 2 ps^{-1} ; o controle de pressão (mantida em 1 bar) foi feito através de um barostato de Berendsen com tempo de relaxação de 5 ps; e foi aplicado o algoritmo SHAKE para restringir os comprimentos de ligações envolvendo átomos de hidrogênio.
- NPT – Nesta etapa, foram retiradas as restrições sobre os átomos de tetrapeptídeo e do bisfenol a fim de que todo o sistema se equilibrasse. As simulações foram feitas com número de partículas, pressão e temperatura constantes por um tempo total de 20 ns. Todos os outros parâmetros foram exatamente iguais aos da etapa NPT com restrições.
- Produção – As simulações de produção foram realizadas com o número de partículas, pressão e temperatura constantes (*ensemble* NPT) e todos os parâmetros de simulação foram rigorosamente iguais aos da etapa NPT anterior, com exceção apenas para o tempo total de simulação. As simulações a temperatura de 243,15 K (temperatura experimental) tiveram duração total de 2 μs. Já as simulações a 273,15 K e 300,15 K tiveram duração total de 1 μs.

Em todas as etapas, temperatura, volume, pressão e densidade foram monitorados de forma a verificar qualquer possível irregularidade ao longo das simulações. As análises das simulações foram feitas usando-se os programas *VMD*³⁷, *MDAnalysis*²⁹ e *Amber Tools*³⁵.

2.5. Simulações de amostragem ampliada: *Adaptive Biasing Force* (ABF)

Utilizando o programa *NAMD*³⁹ e o campo de força *GAFF*²⁰, foram realizadas simulações do tipo *Adaptive Biasing Force* (ABF) em três diferentes temperaturas, 243,15 K (temperatura experimental), 273,15 K e 300,15 K. Neste tipo de simulação, obtiveram-se perfis de energia livre em relação a uma coordenada de reação, a qual foi definida como a distância entre os átomos de carbono das carbonilas da cadeia principal dos resíduos Asn e Ser (Figura 2.4). Foi escolhida essa distância como coordenada, pois ela também foi utilizada como parâmetro para avaliar as diferentes conformações do tetrapeptídeo.

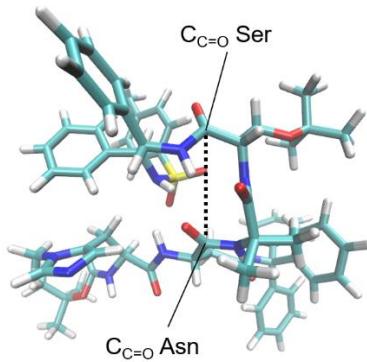


Figura 2.4. Coordenada de reação para as simulações de ABF representada na estrutura tridimensional do tetrapeptídeo catalisador.

Estas simulações foram realizadas inicialmente por um tempo total de 300 ns e posteriormente de, aproximadamente, 150 ns em 150 ns, sempre avaliando os perfis de energia e comparando-os a fim de verificar se a convergência tinha sido atingida. Os tempos totais de simulação para as temperaturas de 243,15 K, 273,15 K e 300,15 K foram, 2250 ns, 2250 ns e 3134 ns, respectivamente.

Todas as simulações foram feitas com passo de tempo de 2,0 ps e *cutoff* de 12,0 Å para os cálculos de interações eletrostáticas (usando PME) e de van der Waals. O controle de temperatura foi realizado por dinâmica de Langevin com coeficiente de fricção de 5,0 ps^{-1} e o controle de pressão foi feito usando o método de Nosé-Hoover (com pistão externo acoplado) juntamente com dinâmica de Langevin. A pressão foi mantida em 1 bar, o período de oscilação do pistão foi de 200 fs e o tempo de amortecimento foi de 100 fs. Em todas as simulações, a largura do intervalo da coordenada de reação foi de 0,1 Å e os limites inferior e superior das coordenadas de reação estão mostrados no Anexo

1. Os potenciais de contorno inferior e superior utilizaram constantes de força de 50 kcal/mol. A estimativa inicial da força média foi determinada após 500 amostras da força instantânea atuante ao longo da coordenada de reação.

Capítulo 3 – Resultados e discussão

Este capítulo está dividido em oito subtópicos. O tópico 3.1 apresenta importantes resultados das simulações convencionais de longa duração do tetrapeptídeo. As interações intramoleculares do tetrapeptídeo são descritas no segundo tópico (3.2). No tópico 3.3, são mostradas as energias intramoleculares do tetrapeptídeo e as energias intermoleculares entre o tetrapeptídeo e o clorofórmio. Os principais resultados deste trabalho são mostrados no tópico 3.4, no qual são apresentados os perfis de energia livre do tetrapeptídeo catalisador. A estrutura do solvente ao redor do tetrapeptídeo é analisada no quinto tópico (3.5). Os tópicos 3.6 e 3.7 apresentam os resultados das simulações convencionais de longa duração do tetrapeptídeo e bisfenol e as interações intermoleculares entre eles, respectivamente. No último tópico (3.8), é descrita a análise conformacional do tetrapeptídeo catalisador.

3.1. Tetrapeptídeo em clorofórmio

Inicialmente, estudamos a dinâmica conformacional do tetrapeptídeo a 243 K, que consiste na condição experimental ótima. Simulações de 2 μ s foram realizadas. Essas simulações mostraram a existência de duas conformações diferentes do tetrapeptídeo: em uma destas conformações, o catalisador apresentou uma estrutura compacta (Figura 3.1a), enquanto que na outra conformação, sua estrutura parece estendida (Figura 3.1b).

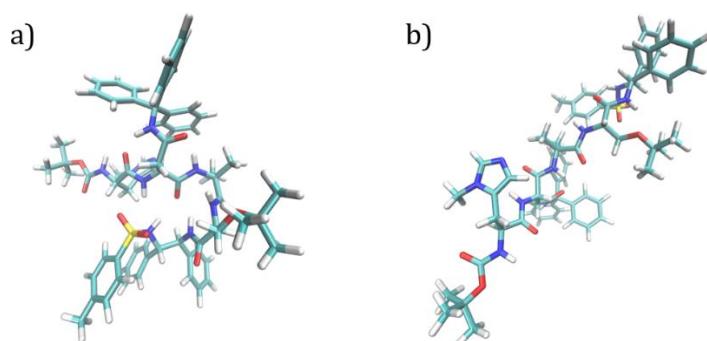


Figura 3.1. Tetrapeptídeo catalisador em sua conformação a) compacta e b) estendida.

Para caracterizar quantitativamente as duas conformações e o comportamento do catalisador ao longo das simulações, definiu-se como parâmetro para

analisar a abertura e fechamento do tetrapeptídeo a distância entre os átomos de carbono das carbonilas da cadeia principal dos resíduos Asn e Ser, $d(\text{Asn} - \text{Ser})$, (Figura 3.2).

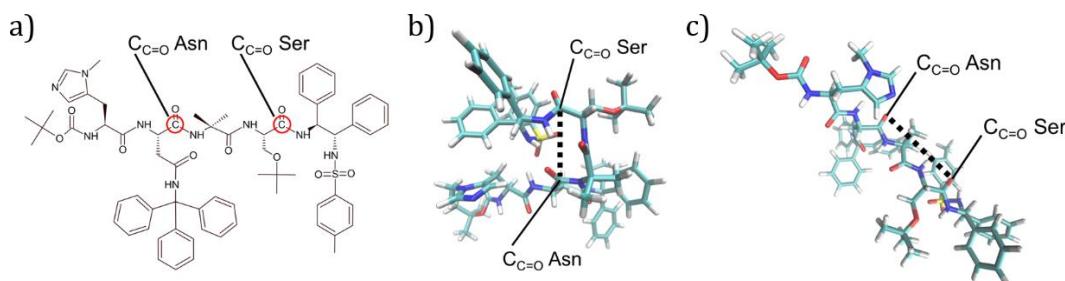


Figura 3.2. Distância entre os átomos de carbono das carbonilas dos resíduos Asn e Ser, $d(\text{Asn} - \text{Ser})$, representada na a) fórmula estrutural, b) estrutura tridimensional compacta e c) estrutura tridimensional estendida.

O gráfico da Figura 3.3 mostra como $d(\text{Asn} - \text{Ser})$ varia ao longo dos 2 μs de simulação a 243 K. É possível observar que, tanto na simulação 1 quanto simulação 2, o tetrapeptídeo manteve-se em sua conformação compacta durante todo o tempo de simulação, sendo que as distâncias médias entre os carbonos das carbonilas dos resíduos Asn e Ser foram 4,77 Å e 4,74 Å para as simulações 1 e 2, respectivamente.

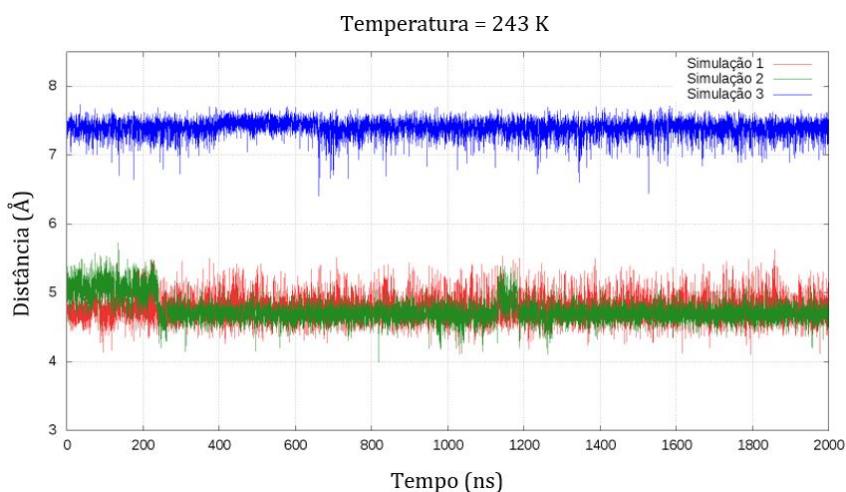


Figura 3.3. Gráfico de $d(\text{Asn} - \text{Ser})$ ao longo das três simulações de 2 μs do tetrapeptídeo em clorofórmio à temperatura de 243 K.

Diferentemente das simulações 1 e 2, ao longo de toda a simulação 3 o tetrapeptídeo manteve-se em sua conformação estendida, com uma $d(\text{Asn} - \text{Ser})$ média de 7,40 Å. Esses resultados indicam que mesmo simulações extensas não permitem uma

amostragem conformacional do tetrapeptídeo na temperatura de 243 K, uma vez que não são observadas transições entre as conformações compacta e estendida.

A fim de tentar observar a transição entre as conformações do tetrapeptídeo, foram realizadas triplicatas de simulações com 1 μ s de duração nas temperaturas de 273 K (Figura 3.4) e 300 K (Figura 3.5).

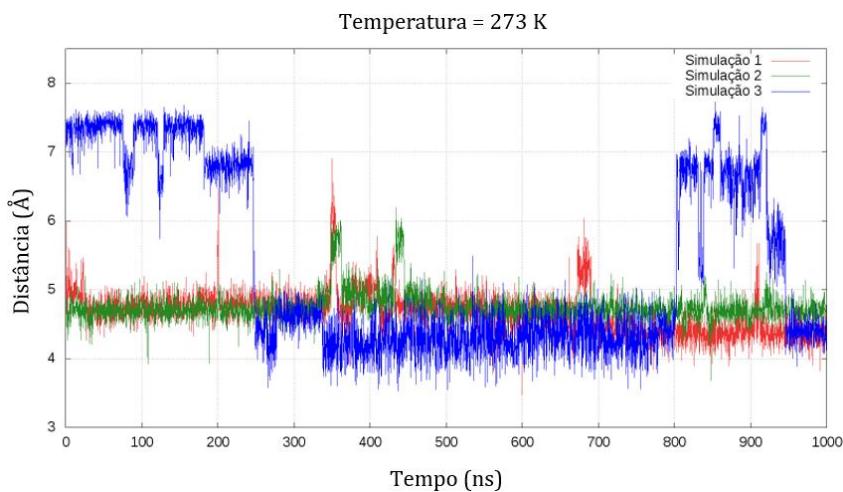


Figura 3.4. Gráfico de $d(\text{Asn} - \text{Ser})$ ao longo das três simulações de 1 μ s do tetrapeptídeo em clorofórmio à temperatura de 273 K.

A 273 K, nas simulações 1 e 2 o peptídeo manteve sua conformação compacta ao longo de praticamente todo o tempo de simulação. Entretanto, a simulação 3 foi iniciada com o catalisador em sua conformação estendida, a qual é mantida até aproximadamente 250 ns, quando uma transição para a conformação compacta foi observada. Essa conformação se manteve até ao redor de 800 ns, quando, novamente, o catalisador assumiu a conformação estendida. Por sua vez, o tetrapeptídeo se manteve nessa conformação estendida até aproximadamente 950 ns e, mais uma vez, mudou para a conformação compacta, na qual permaneceu até o final da simulação.

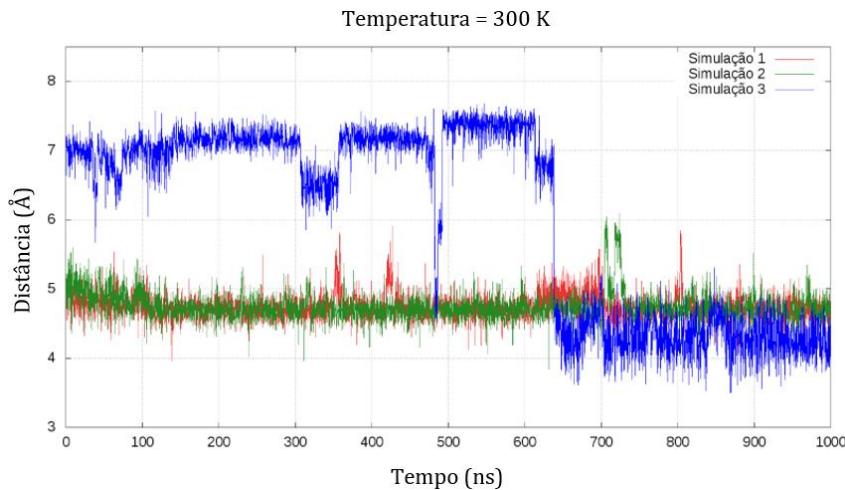


Figura 3.5. Gráfico de $d(\text{Asn} - \text{Ser})$ ao longo das três simulações de 1 μs do tetrapeptídeo em clorofórmio à temperatura de 300 K.

Nas simulações 1 e 2 realizadas à temperatura de 300 K, o tetrapeptídeo catalisador manteve sua estrutura compacta por praticamente toda a simulação, da mesma forma que aconteceu nas simulações 1 e 2 a 273 K. Já na simulação 3, o catalisador manteve sua conformação estendida até aproximadamente 640 ns de simulação. Nesse instante, foi observada a transição para a conformação compacta, a qual permaneceu a até o final da simulação.

Estas simulações em três diferentes temperaturas, 243 K (temperatura experimental), 273 K e 300 K, mostraram a existência de duas conformações bastante distintas do tetrapeptídeo catalisador. Notou-se que, a 243 K, transições conformacionais não foram observadas, enquanto que a 273 K e 300 K foi possível observar foi possível observar algumas transições esporádicas entre as duas conformações. É importante notar, ainda, que não foram observadas conformações de natureza intermediária entre a compacta e a estendida, indicando que a coordenada de reação escolhida efetivamente distingue as duas estruturas de maior relevância do peptídeo.

Deve-se atentar para o fato de que em todas as simulações realizadas, a amostragem é bastante limitada, apesar dos longos tempos de simulação. Dessa forma, não é possível chegar em alguma conclusão em relação à estabilidade relativa entre as conformações.

3.2. Tetrapeptídeo em clorofórmio a 243 K - Principais interações intramoleculares

A duração das ligações de hidrogênio intramoleculares do tetrapeptídeo catalisador foi quantificada usando o programa *cpptraj* do AMBER³⁵. Dessa forma, foi possível observar quais átomos interagiam entre si nas conformações estendida e compacta.

Na simulação 1 a 243 K, na qual o tetrapeptídeo manteve-se em sua conformação compacta, nota-se que três das quatro ligações de hidrogênio mais persistentes envolviam átomos do resíduo Asn(Trt) (Simulação 1, Tabela 3.1). Na ligação que se conservou por mais tempo, o oxigênio da carbonila da cadeia lateral do resíduo Asn(Trt) atuou como acceptor do hidrogênio do grupo amino do resíduo Aib. Já na segunda ligação mais duradoura, é o átomo de oxigênio da carbonila do grupo carboxílico do resíduo Asn(Trt) que atuou como acceptor de um dos hidrogênios da função diamina do grupo carboxi-terminal Dpd(Tos), sendo que o outro hidrogênio da diamina também interagiu por mais da metade do tempo de simulação com o átomo de oxigênio da carbonila do resíduo Aib. Além disso, observa-se que um dos oxigênios do grupo tosil do substituinte terminal Dpd(Tos) atuou como acceptor na ligação com o hidrogênio do grupo amino da cadeia principal do resíduo Asn(Trt).

Tabela 3.1. Principais ligações de hidrogênio intramoleculares do tetrapeptídeo na triplicata de simulações a 243 K.

Simulação Conformação	Aceptor	Hidrogênio do doador	Porcentagem de tempo (%)
1 Compacta	O _{C=O} lateral Asn(Trt)	H _N Aib	81,52
	O _{C=O} Asn(Trt)	H _{N2} Dpd(Tos)	68,87
	O _{C=O} Aib	H _{N1} Dpd(Tos)	52,02
	O _{S2} Dpd(Tos)	H _N Asn(Trt)	14,19
	Outras interações		< 10,00
2 Compacta	O _{C=O} Asn(Trt)	H _{N2} Dpd(Tos)	63,98
	O _{C=O} lateral Asn(Trt)	H _N Aib	62,69
	O _{C=O} Asn(Trt)	H _{N1} Dpd(Tos)	57,26
	O _{C=O} Aib	H _{N1} Dpd(Tos)	15,28
	O _{S2} Dpd(Tos)	H _N Asn(Trt)	14,02
	Outras interações		< 10,00
3 Estendida	O _{C=O} Ser(t-Bu)	H _{N2} Dpd(Tos)	69,72
	O _{lateral} Ser(t-Bu)	H _{N1} Dpd(Tos)	41,11
	Outras interações		< 10,00

Como visto pelo gráfico da Figura 3.4, na simulação 2, assim como na simulação 1, o catalisador também permaneceu em sua conformação compacta ao longo de todo tempo de simulação. Quatro das cinco ligações de hidrogênio mais persistentes nessa simulação envolviam os mesmos átomos das interações observadas na simulação 1, sendo que os átomos que participaram como aceitores foram os oxigênios das cadeias principal e lateral do resíduo Asn(Trt), o oxigênio da carbonila do resíduo Aib e um dos oxigênios do grupo tosil do substituinte carboxi-terminal Dpd(Tos), enquanto que os hidrogênios envolvidos nas ligações foram os átomos ligados aos nitrogênios da função diamina do grupo Dpd(Tos) e os hidrogênios dos grupos amino dos resíduos Aib e Asn(Trt).

Já na simulação 3, na qual o tetrapeptídeo permaneceu na conformação estendida durante todo o tempo de simulação, observam-se, de acordo com a Tabela 3.1, duas ligações de hidrogênio intramoleculares predominantes. Numa delas, o oxigênio da carbonila na cadeia principal do resíduo Ser(t-Bu) atuou como acceptor e na outra é o oxigênio da cadeia lateral deste mesmo resíduo que agiu como acceptor. Os átomos de hidrogênio envolvidos nestas ligações foram os ligados aos nitrogênios do grupo diamino do substituinte carboxi-terminal Dpd(Tos).

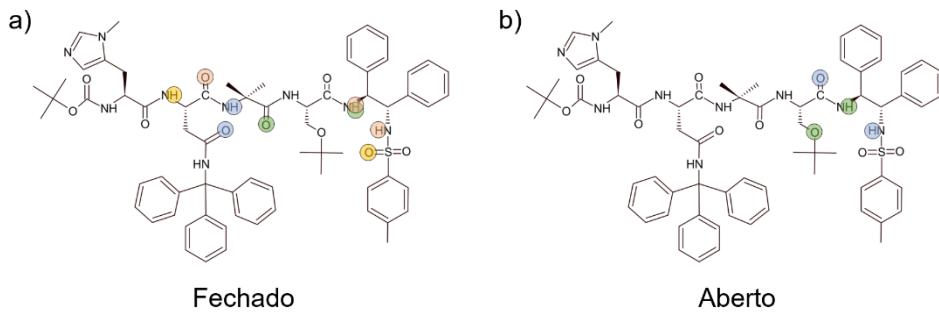


Figura 3.6. Principais ligações de hidrogênio observadas nas simulações a 243 K com o tetrapeptídeo nas conformações a) compacta e b) estendida. Átomos sombreados com a mesmas cores indicam ligações de hidrogênio entre eles.

Portanto, pode-se notar que os resíduos que mais interagem quando o tetrapeptídeo está na conformação compacta são Asn(Trt), Aib e o grupo carboxi-terminal Dpd(Tos). No tetrapeptídeo na conformação estendida, as duas principais ligações ocorrem entre o resíduo Ser(t-Bu) e o substituinte terminal Dpd(Tos). A Figura 3.6 mostra os átomos envolvidos nas principais ligações de hidrogênio para as estruturas compacta e estendida.

3.3. Energias intra e intermoleculares

Para caracterizar as interações intra e intermoleculares do tetrapeptídeo foram calculadas as energias intramoleculares do tetrapeptídeo, as energias intermoleculares entre o tetrapeptídeo e o clorofórmio e a soma dessas energias. Estes cálculos foram feitos através da extensão *NAMDEnergy* do VMD³⁷.

As Figuras 3.7a, 3.7d e 3.7g e a Tabela 3.3 mostram as energias intramoleculares do tetrapeptídeo. Nota-se que, em todas as temperaturas, as interações intramoleculares do tetrapeptídeo em sua conformação compacta são sempre menores do que em sua conformação estendida. Como mostrado na Tabela 3.1 e na Figura 3.6, as interações intramoleculares do tetrapeptídeo a 243 K revelam que, na conformação compacta, o catalisador apresentou um número maior de ligações de hidrogênio do que na conformação estendida. Isso é consistente com a diminuição da energia da conformação compacta em relação à conformação estendida, como observado nos gráficos da Figura 3.7 e na Tabela 3.3. Portanto, as interações intramoleculares contribuem para a estabilização relativa da conformação compacta do peptídeo.

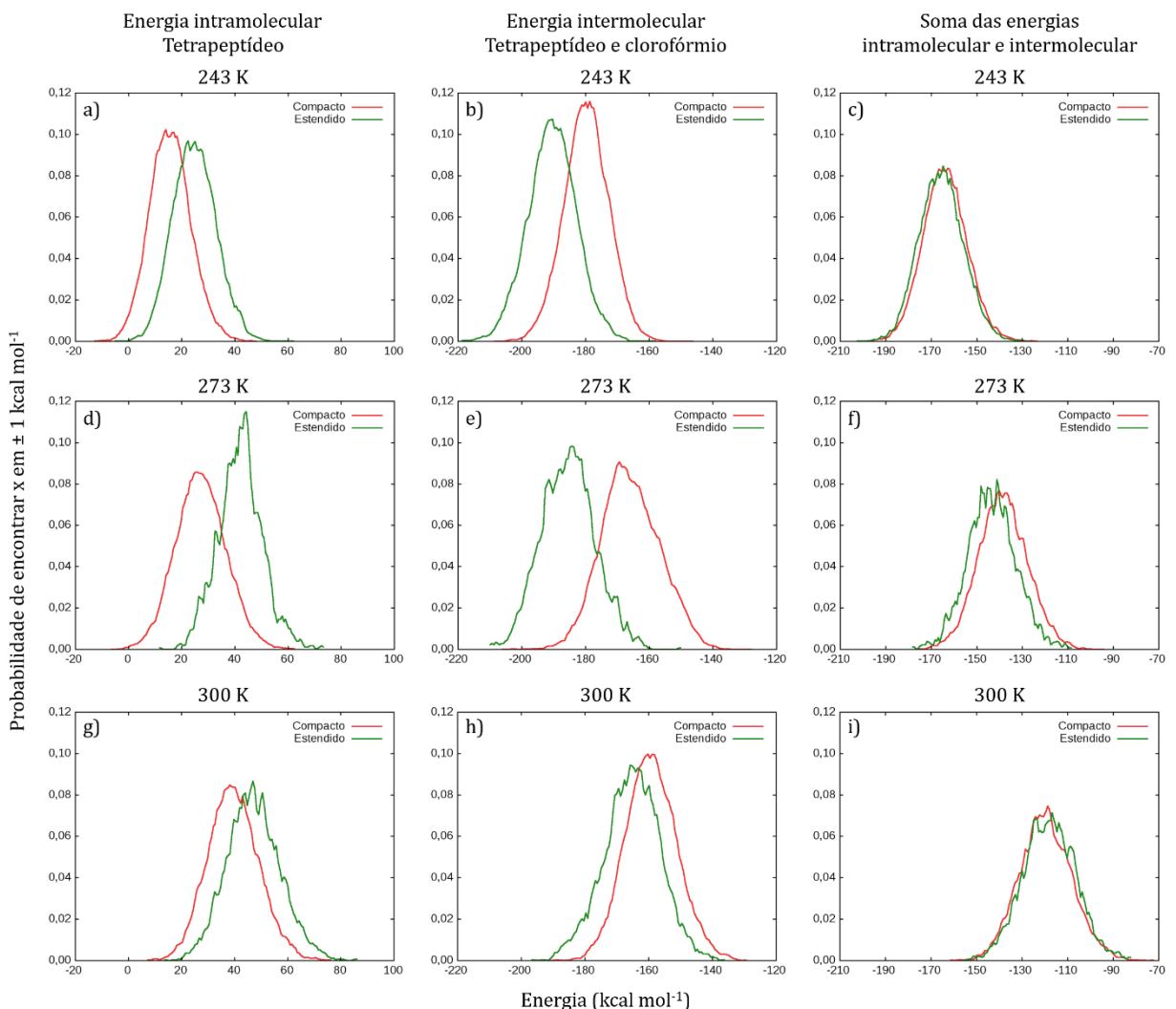


Figura 3.7. Energias intramoleculares do tetrapeptídeo nas temperaturas de a) 243 K, d) 273 K e g) 300 K; energias intermoleculares entre o tetrapeptídeo e o clorofórmio nas temperaturas de b) 243 K, e) 273 K e h) 300 K; soma das energias intramoleculares e intermoleculares nas temperaturas de c) 243 K, f) 273 K e i) 300 K.

As energias de interação intermoleculares entre o tetrapeptídeo catalisador e o solvente são mostradas nas Figuras 3.7b, 3.7e e 3.7h e na Tabela 3.3. Percebe-se que, nas três diferentes temperaturas, as interações entre o tetrapeptídeo e o solvente são mais favoráveis quando o tetrapeptídeo está em sua conformação estendida. Esse comportamento é o contrário do observado para as energias intramoleculares da molécula de tetrapeptídeo.

Tabela 3.2. Médias e desvios padrão da área acessível ao solvente para os tetrapeptídeo na conformação compacta e estendida.

Conformação	Área superficial acessível ao solvente (\AA^2)	
	Média	Desvio padrão
Compacta	1044,57	24,51
Estendida	1096,85	27,25

A área superficial acessível ao solvente (*solvent-accessible surface area, SASA*) da conformação estendida é maior que a SASA da conformação compacta (Tabela 3.2). No geral, em uma maior área acessível ao solvente ocorrem mais interações intermoleculares, o que é consistente com a diminuição de energia das interações intermoleculares observada para a conformação estendida em relação à compacta.

Tabela 3.3. Médias e desvios padrão das energias intramoleculares do tetrapeptídeo, intermoleculares entre tetrapeptídeo e clorofórmio e soma das energias intramoleculares e intermoleculares.

Energias	Temperatura (K)	Energia da conformação (kcal mol^{-1})			
		Estendida		Compacta	
		Média	Desvio	Média	Desvio
Intramoleculares Tetrapeptídeo	243	24,87	8,09	15,75	7,76
	273	42,05	8,34	27,31	9,38
	300	47,13	10,00	39,56	9,54
Intermoleculares Tetrapeptídeo e clorofórmio	243	-190,41	7,62	-179,66	6,99
	273	-185,36	8,45	-165,76	9,14
	300	-165,22	8,79	-159,14	8,09
Soma das energias intramoleculares e intermoleculares	243	-165,54	9,71	-163,92	9,66
	273	-143,31	10,66	-138,45	10,79
	300	-118,08	11,54	-119,58	11,48

A soma das energias intramoleculares do tetrapeptídeo e as energias intermoleculares entre o tetrapeptídeo e o solvente é mostrada nas Figuras 3.7c, 3.7f e 3.7i e na Tabela 3.3. Percebe-se que praticamente não há diferença entre as energias para as conformações estendida e compacta. Isto é, as diferenças de energia das interações intramoleculares entre as conformações estendida e compacta são, dentro da precisão das simulações, compensadas pelas diferenças de energia das interações intermoleculares.

3.4. Perfis de energia livre do tetrapeptídeo em clorofórmio

Foram observadas duas conformações diferentes do catalisador e, através das simulações de dinâmica molecular clássica, não foi possível determinar sua estabilidade relativa. Portanto, para determinar a estabilidade relativa das conformações do tetrapeptídeo foram necessários métodos de amostragem ampliada. Aqui, optamos por usar o método *Adaptive Biasing Force* (ABF). Como explicado no Tópico 1.5, no método ABF, é necessário definir uma coordenada de reação sobre a qual será construído o perfil de energia livre. Nas simulações de dinâmica molecular mostramos que a distância entre os átomo de carbono das carbonilas das cadeias principais dos resíduos Asn e Ser, $d(\text{Asn} - \text{Ser})$ (Figura 3.2), permitia avaliar claramente a abertura e fechamento do tetrapeptídeo. Assim, utilizou-se esse mesmo parâmetro como coordenada de reação para a obtenção dos perfis de energia livre.

Os perfis de energia livre foram obtidos através de várias simulações. Na primeira dessas simulações, varreu-se por completo a coordenada de reação, começando em 3,5 Å e terminando em 8,0 Å. Assim, foi obtido um primeiro perfil. Então, procedeu-se realizando simulações em pequenas “janelas” da coordenada de reação, como de 3,5 Å a 5,0 Å, 5,0 Å a 6,5 Å, e assim por diante, aumentando a amostragem conformacional nessas “janelas”. Em cada uma dessas simulações, comparou-se o perfil de energia obtido em relação ao anterior. Isso foi feito para verificar a convergência dos perfis. Considerou-se que a convergência era atingida quando o perfil não se alterasse mais com o aumento da amostragem.

A Figura 3.8 mostra os perfis de energia livre obtidos para as simulações nas temperaturas de 243 K, 273 K e 300 K. Os perfis nas diferentes temperaturas são semelhantes e são totalmente consistentes com as observações qualitativas obtidas das simulações convencionais: nota-se a presença de dois mínimos de energia, um mínimo correspondente à conformação compacta, ao redor de 4,5 Å, e outro referente à conformação estendida do tetrapeptídeo catalisador, em 7,4 Å. Conforme observa-se na Figura 3.8 e na Tabela 3.4, as posições dos mínimos referentes às estruturas compacta e estendida variam muito pouco nas diferentes temperaturas. Para a conformação compacta, os mínimos se localizam em 4,7 Å, 4,4 Å e 4,6 Å para as temperaturas 243 K, 273 K e 300 K, respectivamente, enquanto que para a conformação estendida, em todas as temperaturas, os mínimos se localizam em 7,4 Å. Nota-se ainda que os mínimos

referentes à conformação compacta nas temperaturas de 273 K e 300 K são ligeiramente mais largos do que o mínimo da conformação compacta a 243 K.

As simulações convencionais revelaram a presença de duas conformações: uma compacta e uma estendida, e o principal resultado obtido dos perfis de energia está relacionado à estabilidade relativa das duas conformações. A temperatura de 243 K, a estrutura estendida do catalisador é mais estável que a estrutura compacta, enquanto que, com o aumento da temperatura para 273 K e 300 K, isso se inverte, sendo a conformação compacta claramente mais estável que a conformação estendida.

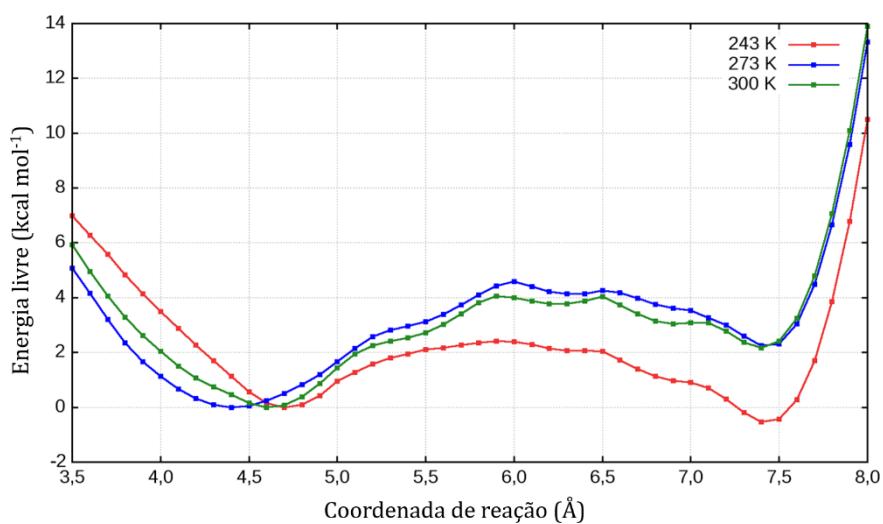


Figura 3.8. Energia livre do tetrapeptídeo em clorofórmio em função da distância d(Ans – Ser) nas temperaturas de 243 K, 273 K e 300 K.

A partir dos perfis de energia, obtiveram-se os dados mostrados na Tabela 3.4. As constantes de equilíbrio foram calculadas considerando o equilíbrio entre as conformações compacta e estendida, $\text{Compacta} \rightleftharpoons \text{Estendida}$, aplicando a seguinte equação:

$$K = \frac{[E]}{[C]} = \exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right) \quad \text{Eq. 3.1}$$

na qual $[E]$ é a concentração do tetrapeptídeo na conformação estendida, $[C]$ é a concentração do tetrapeptídeo na conformação compacta, ΔG é a energia livre, R é a constante universal dos gases ideais e T é a temperatura.

Tabela 3.4. Energias livres, constantes de equilíbrio, energias de ativação e distâncias referentes aos perfis de energia das simulações a 243 K, 273 K e 300 K.

Temperatura (K)	ΔG (kcal mol ⁻¹)*	K ($\frac{[E]}{[C]}$)	$E_{at} C \rightarrow E$ (kcal mol ⁻¹)	$E_{at} E \rightarrow C$ (kcal mol ⁻¹)	$d_{\text{mín. compacto}}$ (Å)	$d_{\text{mín. estendido}}$ (Å)
243	-0,5	2,8	2,4	2,9	4,7	7,4
273	2,2	0,017	4,6	2,4	4,4	7,4
300	2,2	0,025	4,1	1,9	4,6	7,4

*Para o cálculo da energia livre, definiu-se o estado inicial como sendo a conformação compacta e o estado final como sendo a conformação estendida.

Os dados da Tabela 3.4 mostram que a variação de energia livre (ΔG) para a mudança da conformação compacta para estendida ($C \rightarrow E$) do tetrapeptídeo em clorofórmio a 243 K é levemente negativa, -0,5 kcal mol⁻¹, enquanto que esta mesma variação de energia livre é positiva, 2,2 kcal mol⁻¹, para o catalisador a 273 K e a 300 K.

Tabela 3.5. Influência da temperatura no rendimento e no excesso enantiomérico (e.e.) da reação de acetilação do bisfenol¹².

Hexapeptídeo	i	i+1	i+2	i+3	i+4	i+5	Mono (acetato) (%)	e.e. (%)
							Reações a 4 °C	
1	Pmh	Asn(Trt)	Aib	Ser(t-Bu)	DTyr(t-Bu)	Phe	24,8	56
2	Pmh	Asn(Trt)	Aib	Ser(t-Bu)	DPhen	Phe	24,1	52
3	Pmh	His(Trt)	Aib	Ser(t-Bu)	DPhen	Phe	21,9	51
4	Pmh	Asn(Trt)	Leu	Ser(t-Bu)	DTyr(t-Bu)	Phe	26,4	51
5	Pmh	Asn(Trt)	Leu	Thr(t-Bu)	DTyr(t-Bu)	Phe	23,3	51
6	Pmh	Asn(Trt)	Leu	Ser(t-Bu)	DPhen	Phe	11,7	51
Reações a -20 °C								
7	Pmh	Asn(Trt)	Aib	Ser(t-Bu)	DTyr(t-Bu)	Phe	71,9	79
8	Pmh	His(Trt)	Aib	Ser(t-Bu)	DPhen	Phe	73,5	78
9	Pmh	Asn(Trt)	Aib	Thr(t-Bu)	DPhen	Phe	53,5	78
10	Pmh	Asn(Trt)	Aib	Ser(t-Bu)	DPhen	Phe	74,8	77
11	Pmh	Asn(Trt)	Leu	Ser(t-Bu)	DPhen	Phe	62,8	70
12	Pmh	Asn(Trt)	Leu	Ser(t-Bu)	DTyr(t-Bu)	Phe	73,2	68

Durante o processo de otimização do catalisador, Lewis e colaboradores¹² perceberam experimentalmente que a diminuição da temperatura da reação de -4 °C para -20 °C para os diferentes hexapeptídeos resultava em um aumento da faixa rendimento

de 11,7-26,4% para 53,5-74,8% e da faixa de excesso enantiomérico (e.e.) de 51-56% para 68-79% (Tabela 3.5).

A temperatura de 243 K, obteve-se uma constante de equilíbrio $K = 2,8$, enquanto que a 273 K e 300 K, obtiveram-se $K = 0,017$ e $K = 0,025$, respectivamente. Ou seja, nas temperaturas de 273 e 300 K, a população de moléculas do tetrapeptídeo na conformação compacta é muito maior que a de moléculas do catalisador na conformação estendida. Já na temperatura de 243 K, isto se inverte, sendo que a população de moléculas na conformação estendida é quase três vezes maior que a população de tetrapeptídeo na conformação compacta. Isto mostra que a diminuição da temperatura leva a um aumento da população do tetrapeptídeo na conformação estendida em relação à conformação compacta, o que, juntamente com o fato de que a diminuição da temperatura aumenta o rendimento e o excesso enantiomérico, sugere que a conformação estendida deve ser a responsável pela alta atividade enantioseletiva.

Quanto à energia de ativação necessária para a mudança da conformação compacta para estendida, nota-se que para as temperaturas mais altas, 273 K e 300 K, as energias são maiores, $4,6 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $4,1 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectivamente, do que para a mudança na temperatura de 243 K, cuja energia necessária é de $2,4 \text{ kcal mol}^{-1}$. Já em relação à energia de ativação para a mudança da conformação estendida para compacta ($E \rightarrow C$), percebe-se que a tendência é a diminuição desta energia com o aumento da temperatura, sendo $2,9 \text{ kcal mol}^{-1}$, $2,4 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $1,9 \text{ kcal mol}^{-1}$ para as temperaturas de 243 K, 273 K e 300 K, respectivamente.

3.5. Estrutura do clorofórmio ao redor do tetrapeptídeo

A fim de avaliar a estrutura do solvente ao redor do tetrapeptídeo em sua conformação, calcularam-se, utilizando o programa MDAnalysis²⁹, as funções de distribuição de distância mínima (g_{md})²⁸ e as integrais de Kirkwood-Buff (G) para o tetrapeptídeo em clorofórmio em suas conformações compacta e estendida nas três diferentes temperaturas: 243 K, 273 K e 300 K.

Na Figura 3.9 são mostradas as funções de distribuição de distância mínima (g_{md}) para as conformações compacta e estendida do tetrapeptídeo para as três diferentes temperaturas. Nota-se que o perfil das funções é muito semelhante para as três temperaturas, sendo constituídas por pico intenso ao redor de $3,0 \text{ \AA}$ e um pequeno ombro

em aproximadamente 2,4 Å. Percebe-se, pelos *insets* nos gráficos da Figura 3.14, que as densidades em 2,4 Å em torno da conformação compacta são ligeiramente menores que em torno da conformação estendida, independentemente da temperatura. Já os picos em 3,0 Å se sobrepõem exatamente nas duas conformações.

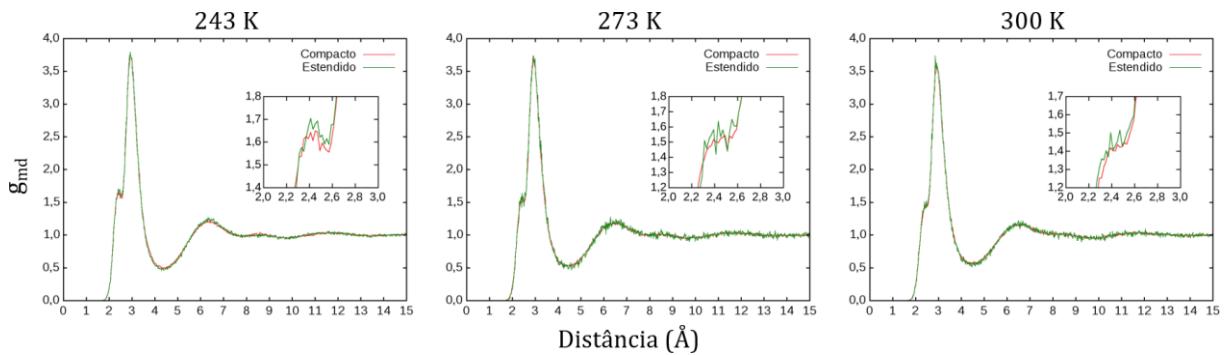


Figura 3.9. Comparação das funções de distribuição de distância mínima (g_{md}) do tetrapeptídeo em sua conformação compacta e estendida nas temperaturas de 243 K, 273 K e 300 K.

As funções de distribuição mostradas nas Figuras 3.9 podem ser decompostas nas contribuições de cada átomo da molécula de solvente. Dessa forma, é possível avaliar a que distância cada átomo da molécula de solvente interage com a superfície do soluto. Como exemplo, as contribuições atômicas das funções de distribuição para o tetrapeptídeo na conformação compacta e estendida a 243 K são mostradas na Figura 3.10.

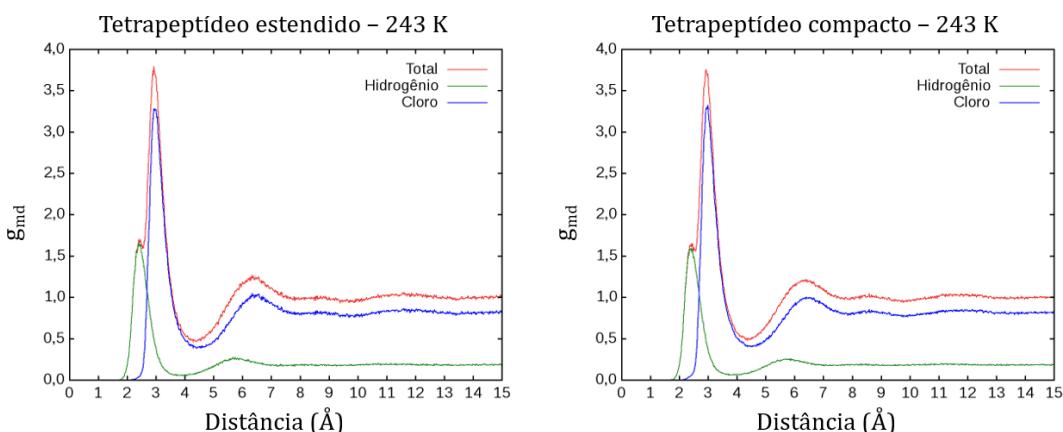


Figura 3.10. Contribuições dos átomos de hidrogênio e de cloro da molécula de clorofórmio (solvente) para as funções de distribuição de distância mínima (g_{md}) do tetrapeptídeo nas conformações estendida e compacta a 243 K.

É possível observar que as funções de distribuição das contribuições atômicas são muito parecidas tanto para o tetrapeptídeo na conformação estendida ou compacta. Nas três diferentes temperaturas, 243 K, 273 K e 300 K, as funções de distribuição também são muito similares, como mostrado no Anexo 01. Através das contribuições atômicas, percebe-se claramente que o ombro, em 2,4 Å, observado nas funções de distribuição totais, corresponde à distância referente às interações dos átomos de hidrogênio das moléculas de clorofórmio da primeira camada de solvatação, enquanto que o pico maior, ao redor de 3,0 Å, reflete as interações do peptídeo com átomo de cloro. A Figura 3.11 mostra algumas distâncias entre átomos de hidrogênio e de cloro da molécula de clorofórmio e os átomos do tetrapeptídeo e ilustra como as funções de distribuição de distância mínima refletem a estrutura da primeira da camada de solvatação.

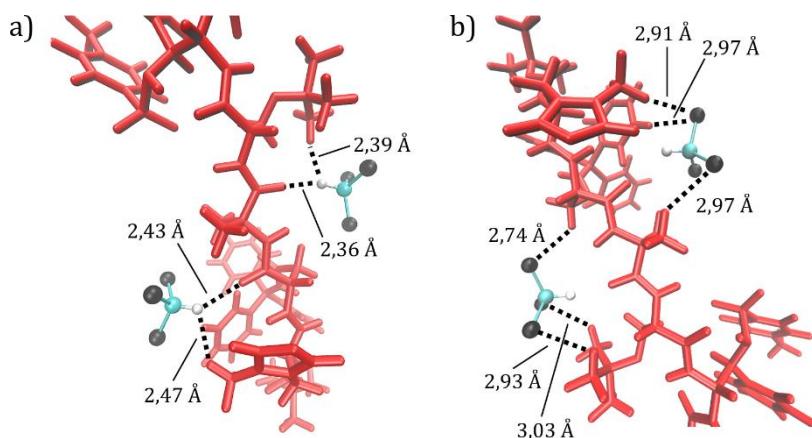


Figura 3.11. Interações entre átomos do tetrapeptídeo e átomos de a) hidrogênio e b) de cloro de moléculas de clorofórmio da primeira camada de solvatação.

A Figura 3.12 mostra a comparação entre as contribuições atômicas dos átomos de hidrogênio e de cloro da molécula de clorofórmio para o tetrapeptídeo em suas conformações estendida e compacta nas diferentes temperaturas. Ao observar os *insets* dos gráficos das distribuições dos átomos de hidrogênio, nota-se que as densidades ao redor de 2,4 Å, referentes às conformações compactas do catalisador, são menores do que as densidades em relação às conformações estendidas. Já as curvas das distribuições referentes aos átomos de cloro são iguais para as conformações estendida e compacta nas três diferentes temperaturas. Isto é, as pequenas diferenças observadas nas funções de distribuição mostradas na Figura 3.9 ocorrem pois, para a conformação compacta do

tetrapeptídeo, a densidade de átomos de hidrogênio, a uma distância de 2,4 Å da superfície do catalisador, é ligeiramente menor do que a densidade de hidrogênios para a conformação estendida. Ainda nos gráficos da Figura 3.12, nota-se que, com o aumento da temperatura, ocorre uma ligeira diminuição das intensidades dos picos tanto para o hidrogênio quanto para o cloro, indicando que a densidade destes átomos ao redor do tetrapeptídeo diminui. Isto pode ser interpretado como uma pequena desestruturação da primeira camada de solvatação devida à elevação da temperatura.

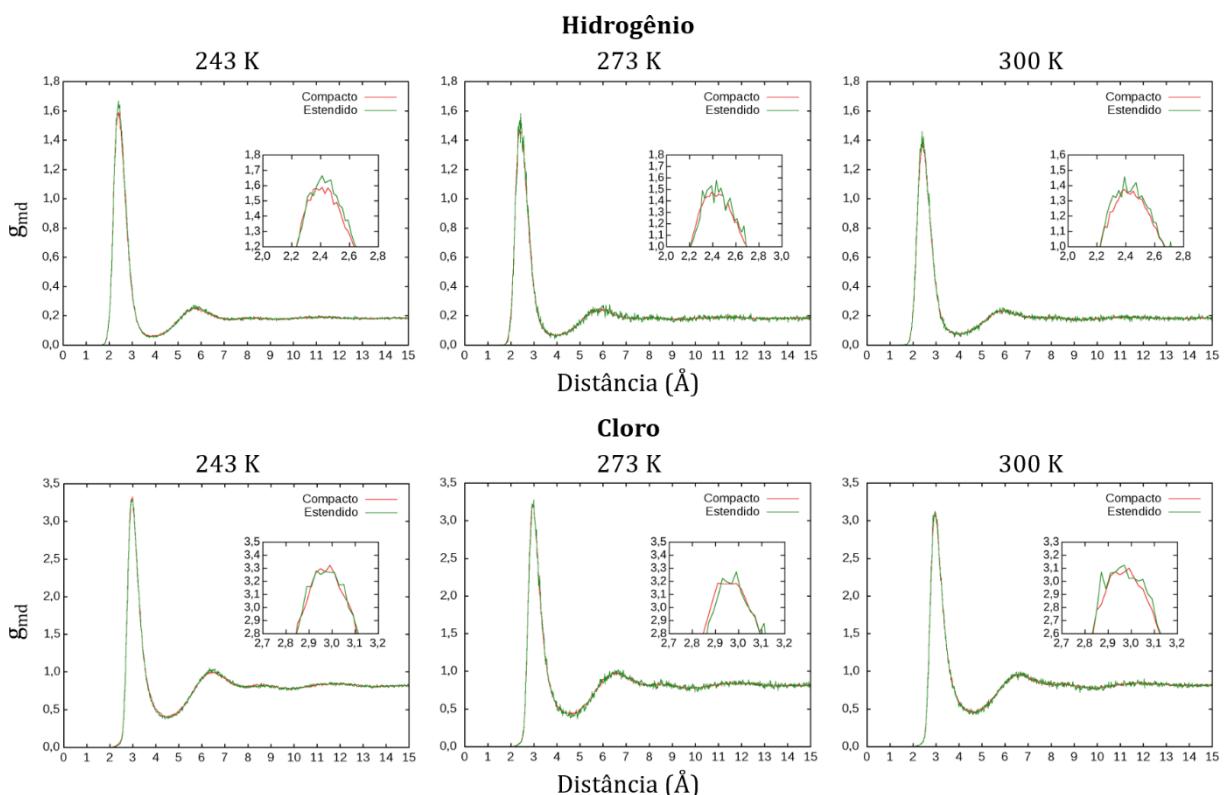


Figura 3.12. Comparaçāo entre as contribuições atômicas de hidrogēnio e de cloro da molécula de clorofórmio (solvente) para as funções de distribuição de distância mínima (g_{md}) do tetrapeptídeo nas conformações estendida e compacta nas temperaturas de 243 K, 273 K e 300 K.

Na Figura 3.13 são mostradas as integrais de Kirkwood-Buff para o tetrapeptídeo nas conformações estendida e compacta. As integrais de Kirkwood-Buff são bastante similares para as conformações estendida e compacta. Isto já era esperado, uma vez que as funções de distribuição de distância mínima também são muito parecidas.

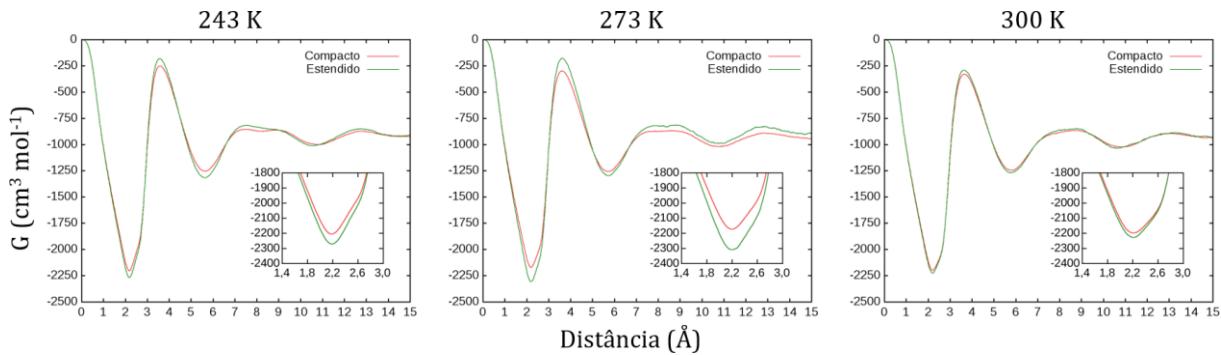


Figura 3.13. Integrais de Kirkwood-Buff (G) do tetrapeptídeo em clorofórmio nas conformações compacta e estendida nas temperaturas de 243 K, 273 K e 300 K.

Todas as integrais nas diferentes temperaturas são negativas, o que indica que o clorofórmio é excluído da vizinhança do tetrapeptídeo. Os *insets* nos gráficos da Figura 3.13 mostram que, em distâncias curtas, a curva referente à conformação estendida é um pouco mais negativa do que a curva corresponde à conformação compacta, refletindo o ligeiro aumento de densidade de hidrogênios nas funções de distribuição, principalmente nas temperaturas de 243 K e 273 K.

3.6. Tetrapeptídeo e bisfenol em clorofórmio

Foram realizadas simulações do tetrapeptídeo catalisador junto com o substrato bisfenólico. A distância entre os átomos de carbono das carbonilas da cadeia principal dos resíduos Asn e Ser, $d(\text{Asn} - \text{Ser})$, (Figura 3.2) foi avaliada nestas simulações a fim de verificar se houve mudança de conformação do tetrapeptídeo.

A Figura 3.14 mostra que, assim como nas simulações com apenas o tetrapeptídeo em clorofórmio, o catalisador não alterou sua conformação ao longo das três simulações. Nas simulações 1 e 3, o tetrapeptídeo manteve-se em suas conformações compacta e estendida, respectivamente, ao longo dos 2 μs de simulação. Na simulação 2, em torno dos primeiros 100 ns de simulação, o catalisador assumiu uma conformação intermediária entre a compacta e a estendida com uma distância $d(\text{Asn} - \text{Ser})$ de aproximadamente de 6 Å e, depois desse período, o tetrapeptídeo assumiu a conformação compacta e assim se manteve até o final da simulação.

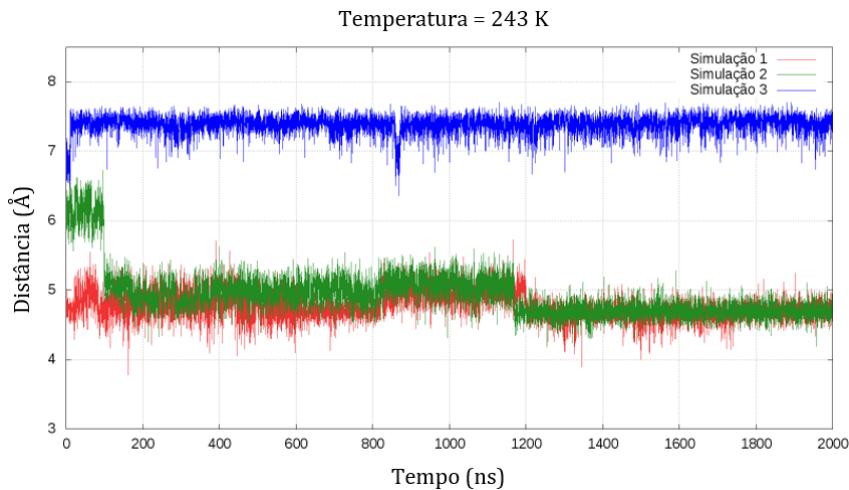


Figura 3.14. Gráfico de $d(\text{Asn} - \text{Ser})$ ao longo das três simulações de $2\ \mu\text{s}$ do tetrapeptídeo e bisfenol em clorofórmio à temperatura de $243\ \text{K}$.

Por sua vez, apenas em uma das simulações (Figura 3.15) a $273\ \text{K}$ foi possível observar a mudança de conformação. Nessa simulação, o tetrapeptídeo partiu da conformação compacta e assim permaneceu por aproximadamente $100\ \text{ns}$. Nesse instante, houve a mudança para a conformação estendida, a qual se manteve até o final da simulação. Nas outras simulações, o catalisador manteve sua conformação compacta ao longo toda a simulação.

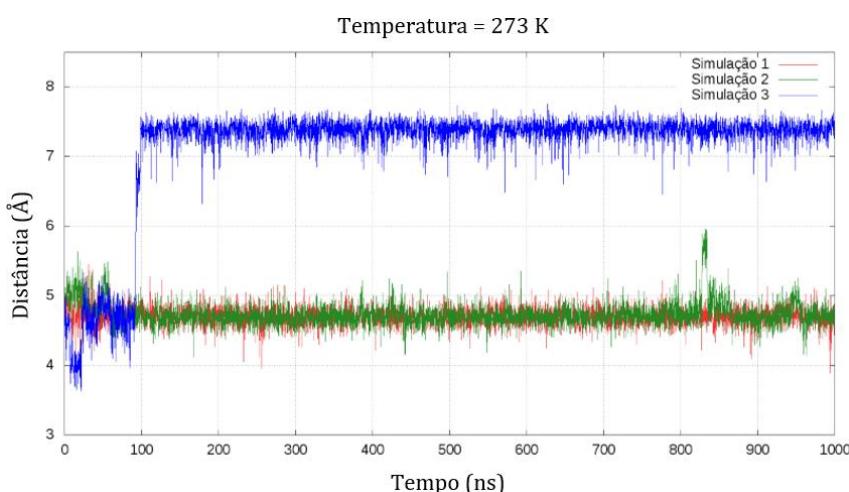


Figura 3.15. Gráfico de $d(\text{Asn} - \text{Ser})$ ao longo das três simulações de $1\ \mu\text{s}$ do tetrapeptídeo e bisfenol em clorofórmio à temperatura de $273\ \text{K}$.

As simulações do tetrapeptídeo e do bisfenol em clorofórmio a $300\ \text{K}$ (Figura 3.16) mostraram algumas transições entre as conformações estendida e compacta do

catalisador. Na simulação 1, o tetrapeptídeo iniciou a simulação na conformação compacta e permaneceu nesta conformação por todo o tempo. Já na simulação 2, o catalisador iniciou a simulação em sua conformação estendida e assim permaneceu até por volta de 300 ns, quando mudou para a conformação compacta e se manteve assim até o final da simulação. Por fim, na simulação 3, o tetrapeptídeo se manteve na conformação compacta até, aproximadamente, 330 ns. Nesse instante mudou para a conformação estendida e, em torno de 400 ns, houve nova mudança para a conformação compacta, a qual permaneceu até o fim da simulação.

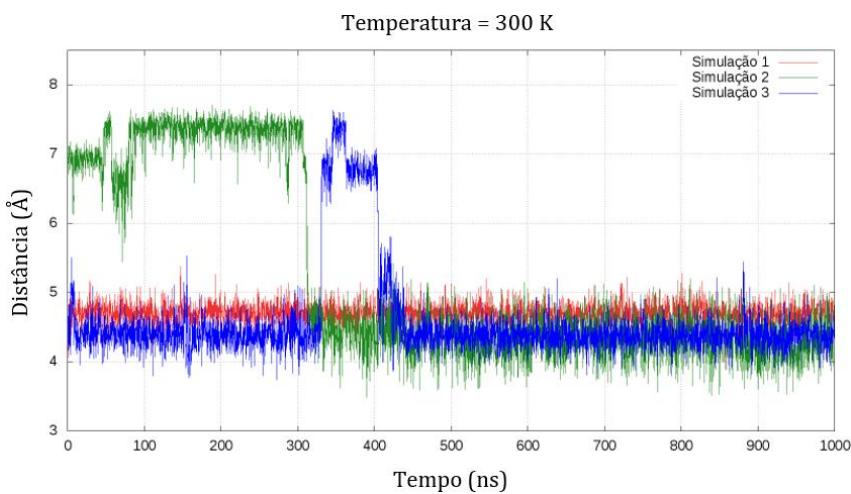


Figura 3.16. Gráfico de $d(\text{Asn} - \text{Ser})$ ao longo das três simulações de 1 μs do tetrapeptídeo e bisfenol em clorofórmio a temperatura de 300 K.

Em todas as simulações observaram-se interações do bisfenol com o tetrapeptídeo catalisador (as quais serão descritas no subtópico a seguir). É possível que essas interações afetem a dinâmica conformacional do tetrapeptídeo. Entretanto, nas simulações realizadas, não foi possível observar claramente em que extensão isso acontece.

3.7. Tetrapeptídeo e bisfenol – Principais interações intra e intermoleculares

As principais ligações de hidrogênio intramoleculares do tetrapeptídeo nas simulações em presença do bisfenol foram basicamente as mesmas observadas nas simulações do tetrapeptídeo na ausência do substrato bisfenólico. Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 3.6. Nas simulações 1 e 2, com o catalisador em sua conformação compacta, as principais ligações de hidrogênio envolveram, como átomos

aceptores, os oxigênios das carbonilas das cadeias principal e lateral do resíduo Asn(Trt), enquanto que os hidrogênios envolvidos foram do grupo diamino do resíduo Dpd(Tos) e do grupo amino da cadeia principal do resíduo Aib. Outra interação que ocorreu durante bastante tempo durante as simulações envolveu o átomo de oxigênio da carbonila do resíduo Aib e um dos hidrogênios do grupo diamino do resíduo Dpd(Tos). Na simulação 1, notaram-se algumas ligações que não apareceram em outras simulações, como a ligação entre o oxigênio da carbonila do resíduo Pmh e o hidrogênio do grupo amino do resíduo Aib e também a interação entre o oxigênio do grupo amino-terminal Boc e o hidrogênio do grupo amino do resíduo Ser(t-Bu).

Tabela 3.6. Principais ligações de hidrogênio intramoleculares do tetrapeptídeo em presença do bisfenol a 243 K.

	Simulação Conformação	Aceptor	Hidrogênio do doador	Porcentagem de tempo (%)
1 Compacta	O _{C=O} Asn(Trt)	H _{N2} Dpd(Tos)	55,79	
	O _{C=O} lateral Asn(Trt)	H _N Aib	46,69	
	O _{C=O} Aib	H _{N1} Dpd(Tos)	41,31	
	O _{C=O} Asn(Trt)	H _{N1} Dpd(Tos)	31,48	
	O _{C=O} Pmh	H _N Aib	21,15	
	O _{C=O} Ser(t-Bu)	H _{N2} Dpd(Tos)	20,84	
	O _{S2} Dpd(Tos)	H _N Asn(Trt)	18,01	
	O _{C=O} Boc	H _N Ser(t-Bu)	15,95	
2 Compacta	O _{C=O} Asn(Trt)	H _N lateral Asn(Trt)	11,07	
	Outras interações			< 10,00
	O _{C=O} lateral Asn(Trt)	H _N Aib	62,66	
	O _{C=O} Aib	H _{N1} Dpd(Tos)	48,68	
	O _{C=O} Ser(t-Bu)	H _{N2} Dpd(Tos)	40,31	
	O _{C=O} Asn(Trt)	H _{N2} Dpd(Tos)	31,53	
	O _{C=O} Asn(Trt)	H _{N1} Dpd(Tos)	27,82	
	O _{S1} Dpd(Tos)	H _N Pmh	12,12	
3 Estendida	Outras interações			< 10,00
	O _{C=O} Ser(t-Bu)	H _{N2} Dpd(Tos)	66,70	
	O _{lateral} Ser(t-Bu)	H _{N1} Dpd(Tos)	40,33	
	O _{C=O} Asn(Trt)	H _N lateral Asn(Trt)	22,13	
	Outras interações			< 10,00

Além disso, nas simulações 1 e 2, com o tetrapeptídeo na conformação compacta, observaram-se interações nas quais os átomos de oxigênio do grupo tosil do resíduo Dpd(Tos) atuaram como átomos aceptores nas ligações de hidrogênio.

Na simulação 3, em que o tetrapeptídeo estava na conformação estendida, as principais ligações envolveram os átomos de oxigênio da carbonila e o oxigênio da cadeia lateral do resíduo Ser(t-Bu) e os hidrogênios do grupo diamino do resíduo Dpd(Tos). Além disso, observou-se uma interação entre o átomo de oxigênio da carbonila da cadeia principal do resíduo Asn(Trt) e átomo de hidrogênio do grupo amino da cadeia lateral deste mesmo resíduo. Essa interação também foi notada na simulação 1, como o tetrapeptídeo na conformação compacta.

Em relação às interações intermoleculares, em todas as simulações, tanto com o tetrapeptídeo catalisador na conformação compacta quanto na conformação estendida, foram observadas interações entre os hidrogênios das hidroxilas do bisfenol ($H_{1\ O-H}$ Bph e $H_{2\ O-H}$ Bph) e átomos de nitrogênio e oxigênio dos resíduos do tetrapeptídeo (Tabela 3.7). Nas simulações 1 e 2, com o catalisador na conformação compacta, os principais átomos aceptores das ligações de hidrogênio foram o nitrogênio da dupla ligação do anel metilimidazólico do resíduo Pmh e o oxigênio da carbonila do resíduo Ser(t-Bu). Na simulação 2, observou-se também uma interação envolvendo o átomo de oxigênio da carbonila do grupo protetor Boc. Já na terceira simulação, na qual o tetrapeptídeo encontrava-se na conformação estendida, observaram-se ligações nas quais os átomos doadores eram os oxigênios do grupo tosil do resíduo Dpd(Tos), o oxigênio da carbonila do resíduo Aib, o oxigênio da carbonila da cadeia principal do resíduo Asn(Trt) e o nitrogênio do anel do resíduo Pmh.

Tabela 3.7. Principais ligações de hidrogênio intermoleculares entre o tetrapeptídeo e o bisfenol a 243 K.

Simulação Conformação	Aceptor	Hidrogênio do doador	Porcentagem de tempo (%)
1 Compacta	N _{anel} Pmh	H ₂ O-H Bph	31,55
	O _{C=O} Ser(t-Bu)	H ₁ O-H Bph	18,27
	O _{C=O} Ser(t-Bu)	H ₂ O-H Bph	15,49
	Outras interações		< 10,00
2 Compacta	O _{C=O} Ser(t-Bu)	H ₂ O-H Bph	20,51
	O _{C=O} Boc	H ₁ O-H Bph	20,37
	N _{anel} Pmh	H ₁ O-H Bph	12,41
	Outras interações		< 10,00
3 Estendida	O _{C=O} Aib	H ₁ O-H Bph	20,73
	O _{S1} Dpd(Tos)	H ₂ O-H Bph	17,97
	O _{C=O} Asn(Trt)	H ₂ O-H Bph	16,36
	N _{anel} Pmh	H ₁ O-H Bph	14,22
	O _{C=O} Aib	H ₂ O-H Bph	12,87
	O _{S2} Dpd(Tos)	H ₂ O-H Bph	12,73
	Outras interações		< 10,00

As interações entre o bisfenol e o tetrapeptídeo, tanto para a conformação compacta quanto para a estendida, ocorreram algumas vezes envolvendo apenas um dos hidrogênios das hidroxilas do bisfenol e outras vezes envolvendo os dois hidrogênios das hidroxilas simultaneamente, sendo que um interagia no sítio de transferência de próton e o outro interagia ancorando em algum átomo do tetrapeptídeo. Isso está de acordo com o mecanismo proposto por Lewis e colaboradores¹², no qual o catalisador desempenha um papel bifuncional.

Na simulação 1, observou-se o ancoramento do bisfenol ao tetrapeptídeo através da interação de um dos hidrogênios de uma das hidroxilas do substrato com o átomo de oxigênio da carbonila do resíduo Ser(t-Bu). Ao mesmo tempo, o outro hidrogênio da outra hidroxila do bisfenol interagia com o nitrogênio do anel metilimidazólico do resíduo Pmh (Figura 3.17a). Esta interação aconteceu por aproximadamente 400 ns (Figura 3.17b) e o substrato bisfenólico, interagindo nesta posição, levaria à formação do produto observado experimentalmente em excesso, cuja configuração do carbono assimétrico é a R. Contudo, não se observa nenhuma orientação

específica do grupo terc-butil do substrato bisfenólico que justificaria a enantiosseletividade.

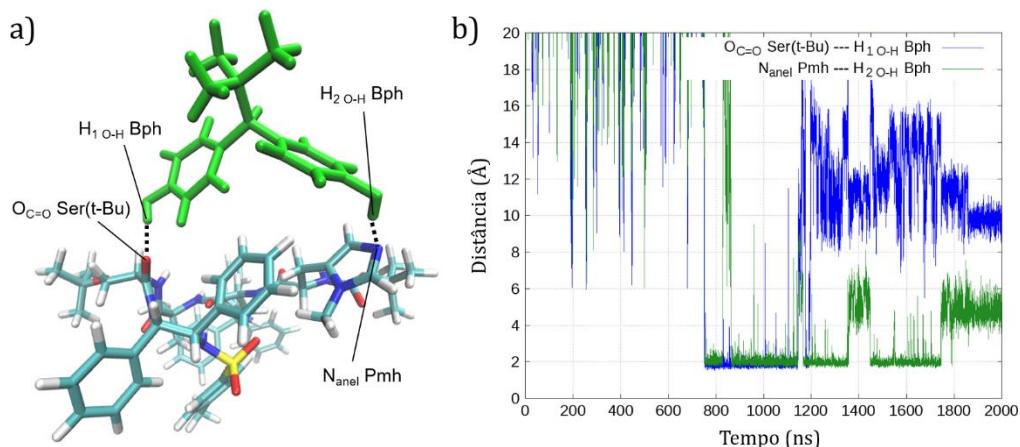


Figura 3.17. a) Interações observadas entre o substrato bisfenólico e o tetrapeptídeo catalisador na simulação 1. b) Distância das interações em função do tempo de simulação na simulação 1.

Já na simulação 2, foi possível notar uma interação na qual o bisfenol ancorou ao tetrapeptídeo de tal forma que os hidrogênios das hidroxilas se ligaram aos oxigênios das carbonilas dos resíduos Boc e Ser(t-Bu) (Figura 3.18a), sendo que o anel metilimidazólico não participava da interação. Essa interação permaneceu por cerca de 450 ns (Figura 3.18b). Nessas duas simulações, o catalisador se encontrava em sua conformação compacta.

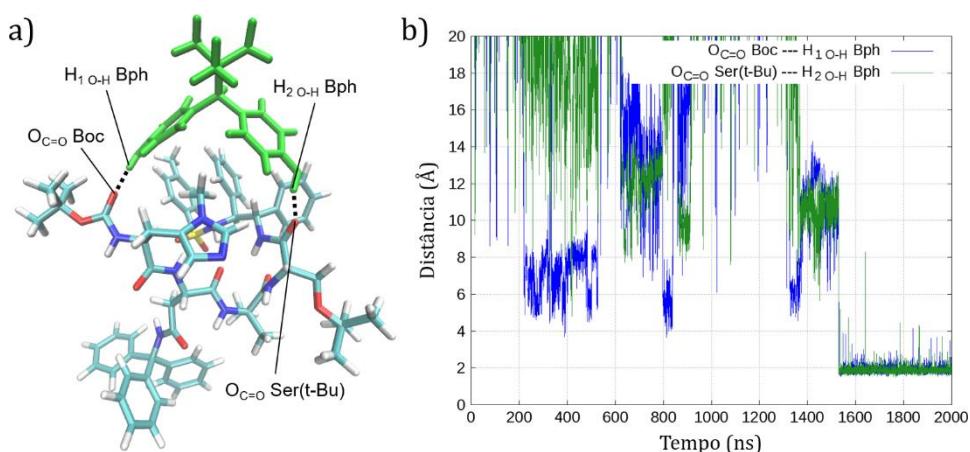


Figura 3.18. a) Interação observada entre o substrato bisfenólico e o tetrapeptídeo catalisador na simulação 2. b) Distância das interações em função do tempo de simulação na simulação 2.

Na simulação 3, na qual o catalisador permaneceu na conformação estendida, notou-se uma interação que ocorreu entre um dos hidrogênios das hidroxilas do substrato bisfenólico e os oxigênios do grupo tosil do resíduo Dpd(Tos) (Figura 3.19a), enquanto que o hidrogênio da outra hidroxila interagia com o nitrogênio do anel metilimidazólico do resíduo Pmh. O ancoramento do bisfenol nessa posição não produziria o enantiômero observado experimentalmente. Entretanto, não se nota qualquer interação específica entre o grupo terc-butil e o catalisador que levaria à produção de um enantiômero em excesso em relação ao outro.

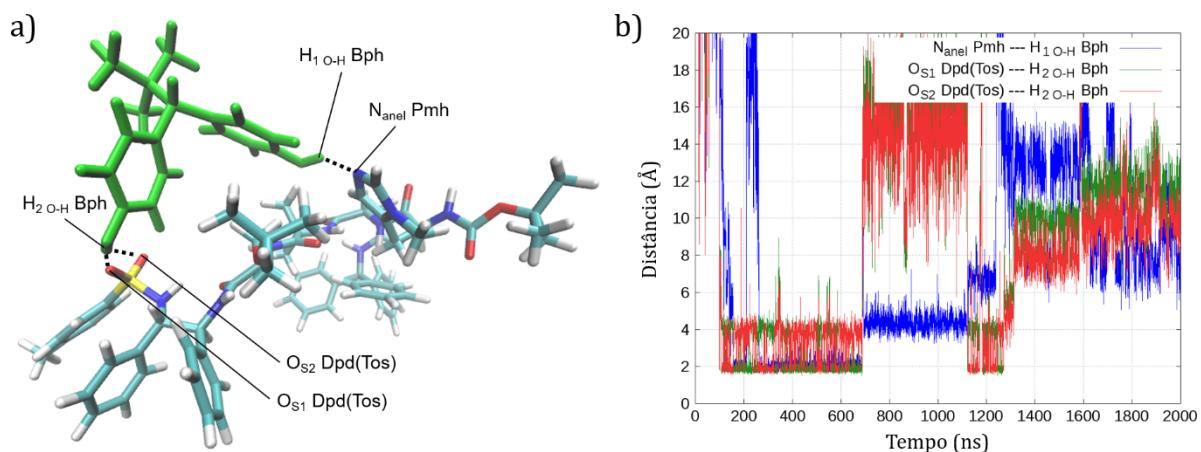


Figura 3.19. a) Interação observada entre o substrato bisfenólico e o tetrapeptídeo catalisador na simulação 3. b) Distância das interações em função do tempo de simulação na simulação 3.

Em nenhuma das interações descritas anteriormente foi possível observar como o substituinte no carbono assimétrico do substrato bisfenólico interage com o tetrapeptídeo para levar à formação do produto acetilado em excesso enantiomérico. Todavia, observaram-se os ancoramentos do bisfenol ao tetrapeptídeo como esperado teoricamente e as conformações do bisfenol ao ancorar no catalisador parecem estar de acordo com a proposição de que o substituinte do carbono pró-quiral interage através de efeitos estéricos com os anéis fenólicos de tal forma a induzir uma conformação em que os anéis do bisfenol encontram-se aproximadamente perpendiculares entre si⁴⁰.

Nas simulações realizadas na temperatura experimental, 243 K, também se optou em analisar as interações entre o bisfenol e o tetrapeptídeo catalisador nas quais uma das hidroxilas do substrato bisfenólico obrigatoriamente interagia com o sítio de

transferência de próton, o nitrogênio do anel metilimidazólico, de forma a avaliar se a outra hidroxila estava também interagindo em alguma outra região do catalisador, desempenhando seu papel bifuncional (Figura 3.20b), ou se simplesmente a outra hidroxila estava voltada para o solvente (Figura 3.20a), sem interagir com o tetrapeptídeo.

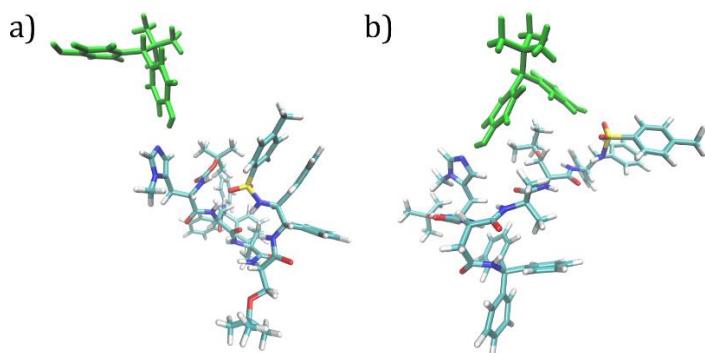


Figura 3.20. a) Bisfenol ligado ao tetrapeptídeo apenas pelo nitrogênio do anel metilimidazólico e b) bisfenol ligado ao catalisador simultaneamente pelo anel e por outro resíduo.

Na simulação 1, na qual o tetrapeptídeo manteve-se em sua conformação compacta, em aproximadamente 22% do tempo que uma das hidroxilas do bisfenol interagia com o nitrogênio metilimidazólico, a outra hidroxila estava interagindo com o oxigênio da carbonila do resíduo Ser, enquanto que no restante do tempo, esta hidroxila ficava voltada para o solvente. Na simulação 2, em que o catalisador também assumiu a conformação compacta, enquanto uma das hidroxilas interagia com o sítio de funcionalização, a outra hidroxila do bisfenol manteve-se sempre voltada para o solvente. Já na simulação 3, na qual o tetrapeptídeo manteve-se na conformação estendida, em aproximadamente 51% do tempo em que uma das hidroxilas do bisfenol interagia com o átomo de nitrogênio do anel metilimidazólico, a outra hidroxila interagia também principalmente com os oxigênios ligados ao átomo de enxofre do grupo tosil.

Esses resultados mostram que é mais provável ocorrerem interações de ambas as hidroxilas do substrato bisfenólico no tetrapeptídeo em sua conformação estendida do que com o catalisador em sua conformação compacta: de fato, como mostrado nas Tabelas 3.1 e 3.5, a quantidade de ligações de hidrogênio intramoleculares é maior na conformação compacta do tetrapeptídeo do que na estendida, de tal forma que nessa conformação mais átomos podem atuar como aceptores das ligações de hidrogênio,

propiciando que o bisfenol interaja simultaneamente com ambas hidroxilas mais facilmente do que na conformação compacta.

De acordo com o estudo realizado por Lewis¹², a otimização da porção carboxi terminal do tetrapeptídeo catalisador altera de forma significativa o rendimento e o excesso enantiomérico da reação. Especificamente, a alteração da configuração absoluta dos carbonos ligados aos grupos fenil do resíduo Dpd(Tos) aumenta o excesso enantiomérico de 64% para 84%.

As interações entre o tetrapeptídeo e o bisfenol mostraram que, para a conformação estendida, observaram-se interações entre os hidrogênios das hidroxilas do bisfenol e os oxigênios do grupo tosil do resíduo Dpd(Tos) por um pouco mais de 30% do tempo total de simulação (Tabela 3.7), enquanto que para a conformação compacta, essas interações ocorreram em menos de 10% do tempo, sendo que outras interações foram predominantes no caso do tetrapeptídeo compacto. Isso está de acordo com o fato observado experimentalmente de que o resíduo Dpd(Tos) desempenha uma função importante na catálise assimétrica e corrobora a sugestão de que o tetrapeptídeo catalisador em sua conformação estendida contribui de forma mais significativa para a alta enantioseletividade do que o tetrapeptídeo compacto.

3.8. Caracterização conformacional do tetrapeptídeo

As conformações do peptídeo observadas nas simulações foram caracterizadas através do acompanhamento de 21 diedros, dos quais 13 estão na cadeia principal e 8 estão nas cadeias laterais (Figura 3.21).

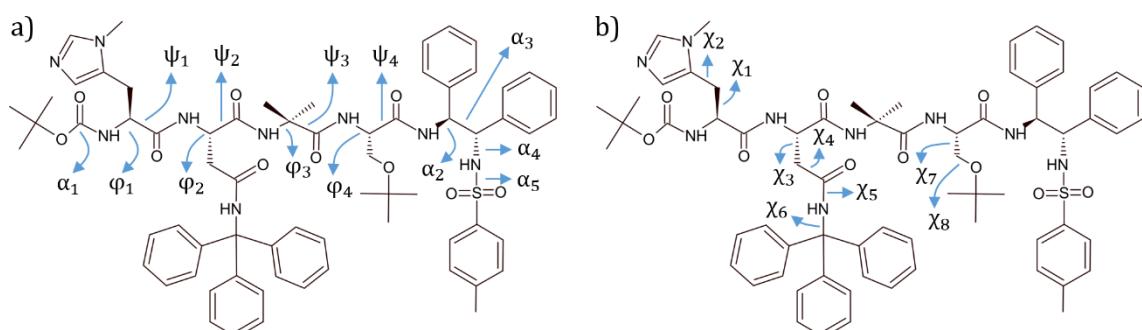


Figura 3.21. Indicação simplificada dos a) diedros da cadeia principal e b) diedros das cadeias laterais do tetrapeptídeo catalisador.

A Figura 3.22 mostra as distribuições dos diedros da cadeia principal do catalisador à temperatura de 243 K (temperatura experimental). Nota-se a presença de diferentes distribuições de diedros ao longo da cadeia principal. Os diedros φ_1 , ψ_1 , φ_2 , α_1 e α_3 apresentaram distribuições praticamente unimodais, com um pico de distribuição claramente predominante, enquanto que os outros diedros apresentaram distribuições bimodais ou trimodais.

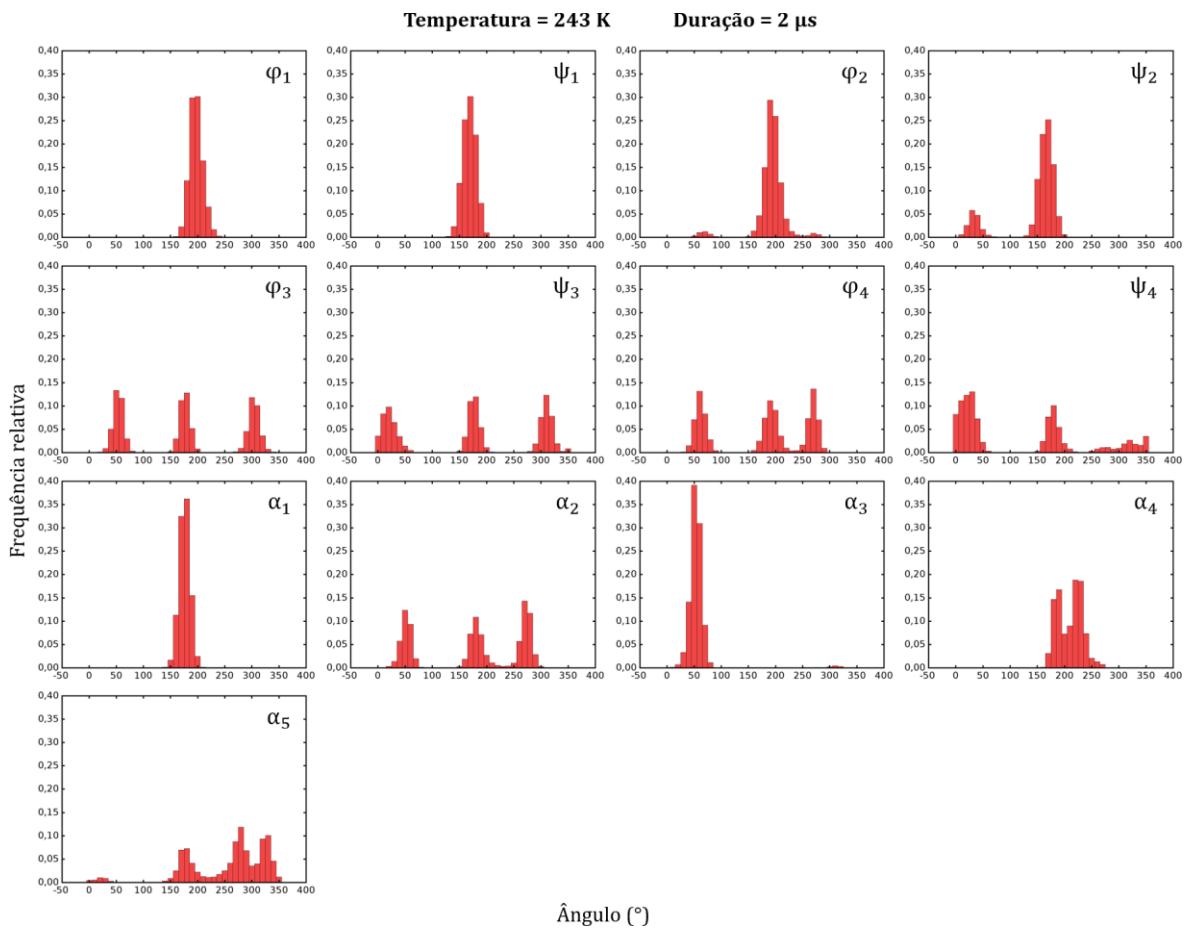


Figura 3.22. Distribuições dos diedros da cadeia principal do tetrapeptídeo catalisador em clorofórmio na triplicata de simulações realizadas à temperatura de 243 K.

Na Figura 3.23, são mostradas as distribuições de diedros da cadeia principal do catalisador a 273 K. Percebe-se que o aumento da temperatura alterou a distribuição de alguns diedros, em relação às distribuições observadas a 243 K. As distribuições dos diedros φ_2 e α_3 , que eram praticamente unimodais, tornaram-se bimodais devido ao surgimento de pequenos picos ao redor de 275° e 310°, respectivamente.

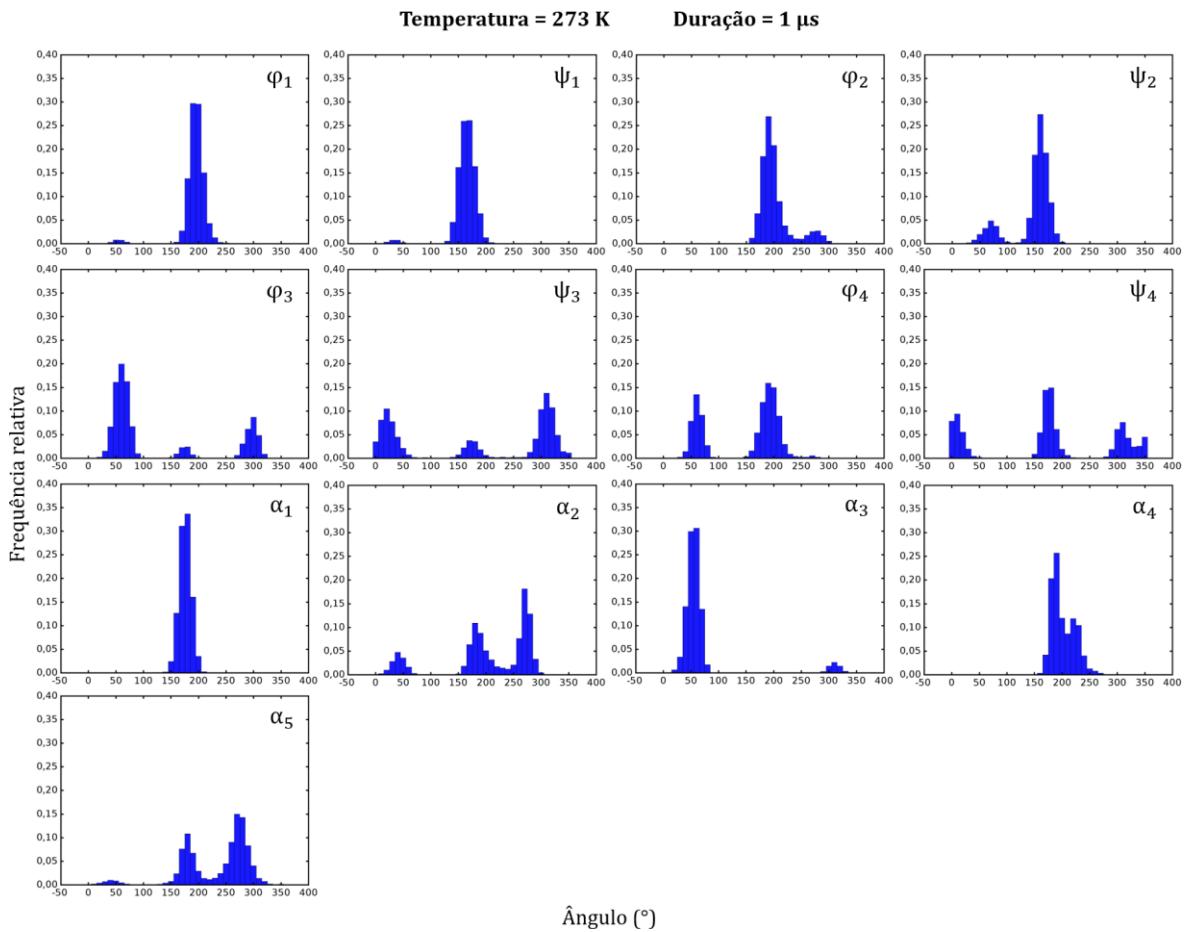


Figura 3.23. Distribuições dos diedros da cadeia principal do tetrapeptídeo catalisador em clorofórmio na triplicata de simulações realizadas à temperatura de 273 K.

O diedro φ_3 , que possuía uma distribuição trimodal com picos de mesmo tamanho, apresentou diminuição dos picos em torno de 175° e 300° e aumento da frequência relativa no pico ao redor de 60° . Também foi observada alteração na frequência relativa dos diedros ψ_4 e α_2 . No caso do diedro φ_4 , a distribuição que era trimodal a 243 K, tornou-se praticamente bimodal a 273 K devido ao desaparecimento quase completo do pico em 275° .

A Figura 3.24 mostra as distribuições dos diedros da cadeia principal do tetrapeptídeo em clorofórmio a 300 K. Em relação às distribuições dos diedros a 273 K, observam-se mudanças na frequência relativa dos diedros φ_3 , ψ_3 , ψ_4 , α_2 , α_4 e α_5 . A distribuição que mais foi modificada pelo aumento de 273 K para 300 K foi a do diedro φ_4 , a qual passou de uma distribuição bimodal para trimodal.

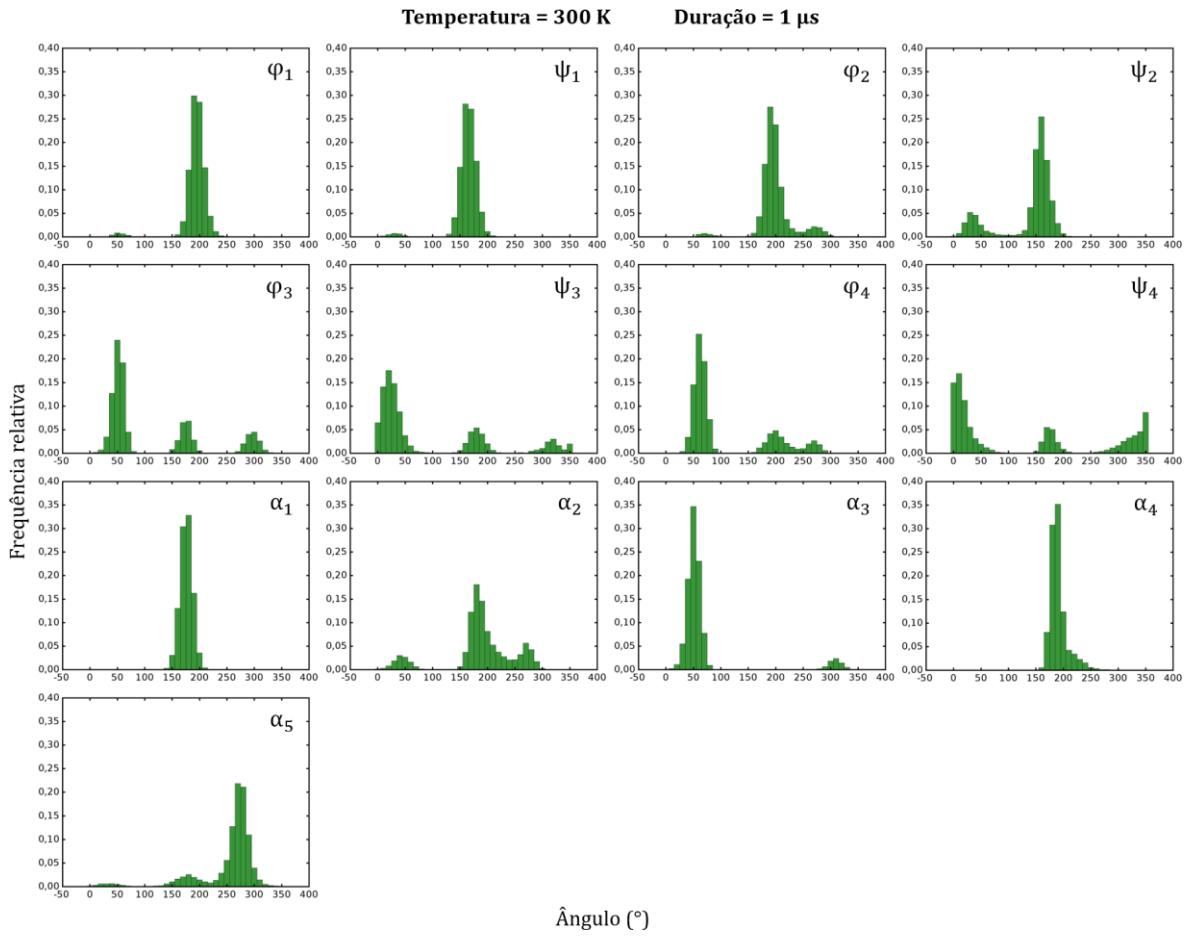


Figura 3.24. Distribuições dos diedros da cadeia principal do tetrapeptídeo catalisador em clorofórmio na triplicata de simulações realizadas à temperatura de 300 K.

Na Figura 3.25, são mostradas as distribuições dos diedros das cadeias laterais do tetrapeptídeo em clorofórmio a 243 K, 273 K e 300 K. As distribuições de diedros das cadeias laterais que mais se alteram com a mudança de temperatura são aquelas referentes aos diedros χ_1 , χ_3 e χ_7 . A distribuição do diedro χ_1 se alterou de tal forma que o pico ao redor de 300° diminuiu com o aumento da temperatura, enquanto que para os outros dois picos em 50° e 175° foram observadas mudanças nas frequências relativas. O diedro χ_3 apresentou uma distribuição bimodal com picos em 50° e 200° a temperatura de 243 K. Já a 273 K, a distribuição desse diedro é praticamente unimodal, com o pico em 200°. E a 300 K, a distribuição tornou-se trimodal, com a presença de um pequeno pico ao redor de 300°. Em relação ao diedro χ_7 , observam-se distribuições trimodais para as temperaturas de 243 K e 273 K, enquanto que a 300 K, a distribuição é praticamente bimodal, como um aumento da frequência relativa do pico ao redor de 300° em relação às

frequências dos picos nas temperaturas menores. As outras distribuições não sofrem alterações significativas com a variação de temperatura.

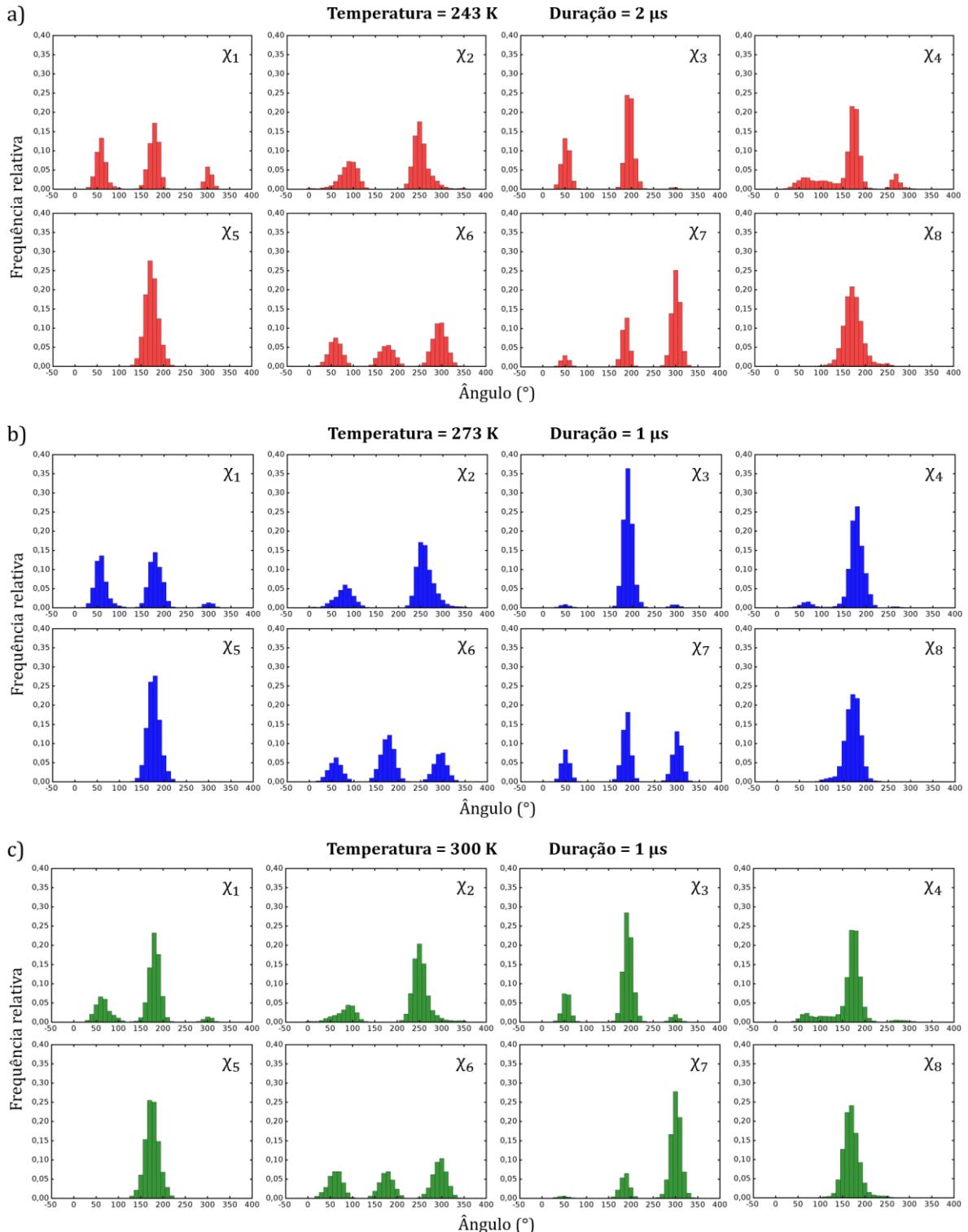


Figura 3.25. Distribuições dos diedros das cadeias laterais do tetrapeptídeo catalisador em clorofórmio na triplicata de simulações realizadas às temperaturas de a) 243 K, b) 273 K e c) 300 K.

Assim, observou-se que o diedro α_1 da porção terminal Boc e os diedros φ_1 e ψ_1 do resíduo Pmh apresentaram distribuições unimodais que não foram alteradas com a variação de temperatura. O diedro ψ_2 do resíduo Asn(Trt) apresentou uma distribuição bimodal que também não sofreu alteração com a mudança de temperatura. Por outro lado, os diedros φ_2 do resíduo Asn(Trt), φ_3 e ψ_3 do resíduo Aib, φ_4 e ψ_4 do resíduo Ser(t-Bu), α_2 , α_3 , α_4 e α_5 da porção terminal Dpd(Tos) sofreram alterações nas distribuições. Em relação às cadeias laterais, os diedros que sofreram mudanças nas distribuições são o diedro χ_1 do resíduo Pmh, χ_3 do resíduo Asn(Trt) e χ_7 da porção Ser(t-Bu), enquanto que os outros diedros mantiveram distribuições parecidas nas diferentes temperaturas.

Capítulo 4 – Considerações finais e conclusões

Este trabalho consistiu na análise conformacional de um tetrapeptídeo catalisador de uma reação de acetilação enantiosseletiva do bisfenol. Esse tetrapeptídeo tinha sido otimizado a fim de se obter o máximo de rendimento e excesso enantiomérico¹². Foram simulados dois sistemas buscando a reprodução de condições experimentais: o tetrapeptídeo catalisador solvatado por clorofórmio e o tetrapeptídeo e uma molécula de bisfenol, também solvatados por clorofórmio.

As simulações de dinâmica molecular dos dois sistemas mostraram a existência de duas conformações distintas para o tetrapeptídeo catalisador: uma conformação estendida e outra compacta. Não foram observadas transições entre essas conformações nas simulações à temperatura de 243 K (temperatura experimental e otimizada para maior excesso enantiomérico), enquanto que nas temperaturas de 273 K e 300 K ocorreram transições esporádicas entre as conformações. Assim, essas simulações motivaram o estudo mais aprofundado do equilíbrio conformacional do tetrapeptídeo, que feito através das simulações utilizando técnicas de amostragem ampliada.

Os perfis de energia livre do tetrapeptídeo em clorofórmio, obtidos pelo método de amostragem ampliada ABF, mostraram que as conformações estendida e compacta correspondiam aos mínimos de energia livre (Figura 4.1). Considerando o equilíbrio entre as conformações, Compacta \rightleftharpoons Estendida, determinaram-se as constantes de equilíbrio para cada temperatura: 243 K, 273 K e 300 K. Notou-se que a constante de equilíbrio para a temperatura experimental de 243 K era $K = 2,8$, enquanto que para 273 K e 300 K, obtiveram-se $K = 0,017$ e $K = 0,025$, respectivamente. Isso indica que, a 243 K, a quantidade de moléculas na conformação estendida é maior do que a quantidade de moléculas na conformação compacta, enquanto que a 273 K e 300 K ocorre o inverso. Juntamente com o fato experimental de que a diminuição da temperatura resulta em um aumento do rendimento e do excesso enantiomérico, sugeriu-se que a conformação estendida do tetrapeptídeo deva ser a conformação determinante para a enantiosseletividade da reação. Esse resultado poderia ser utilizado para otimizar as condições reacionais experimentais. Computacionalmente, poderiam ser realizadas modificações nas cadeias laterais dos resíduos principais do tetrapeptídeo a fim de mantê-lo em sua conformação estendida. Essas modificações não deveriam afetar os

resíduos de Pmh, no qual está localizado o anel metilimidazólico, e nem a porção carboxiterminal, Dpd(Tos), que parece desempenhar um papel importante no ancoramento do bisfenol ao catalisador, mas poderiam ser feitas em outros resíduos. Através de simulações de dinâmica molecular, a estabilidade da conformação estendida desse novo tetrapeptídeo poderia ser verificada. Então, poderiam ser realizadas experimentalmente as reações de acetilação do bisfenol em temperaturas maiores que os 243 K a fim de verificar a reatividade e seletividade do tetrapeptídeo proposto.

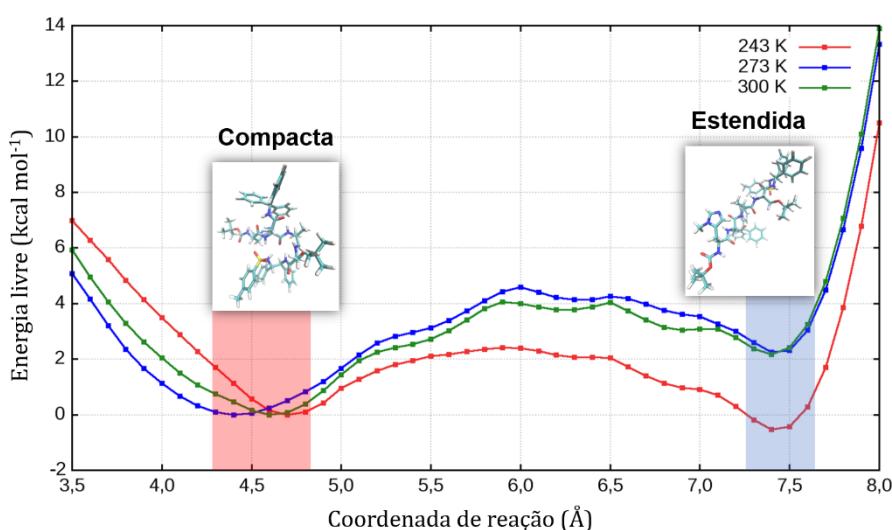


Figura 4.1. Energia livre das conformações estendida e compacta do tetrapeptídeo correspondentes aos mínimos de energia.

Nas simulações do tetrapeptídeo com o bisfenol, observaram-se interações esporádicas entre o bisfenol e o tetrapeptídeo, tanto para a conformação compacta quanto para a estendida. Essas interações ocorreram tanto com apenas uma das hidroxilas do bisfenol quanto com as duas hidroxilas simultaneamente. De acordo com a proposta de mecanismo de Lewis e colaboradores¹², uma das hidroxilas do substrato bisfenólico deveria interagir com o nitrogênio do anel metilimidazólico enquanto a outra hidroxila interagiria com alguma outra parte do tetrapeptídeo. Dessa forma, avaliaram-se as interações entre o tetrapeptídeo e o bisfenol nas quais uma das hidroxilas obrigatoriamente estava interagindo com o nitrogênio do anel, a fim de verificar se a outra hidroxila estava interagindo com algum outro resíduo do catalisador. Foi observado que, para o tetrapeptídeo em sua conformação estendida, ocorrem mais interações simultâneas das hidroxilas do que para o tetrapeptídeo compacto, o que corrobora a

sugestão de que a conformação estendida é responsável pela alta atividade enantiosseletiva.

Ainda, segundo o trabalho de Lewis e colaboradores¹², o substituinte do carbono pró-quiral do bisfenol é fundamental para a alta enantiosseletividade da reação. No caso da reação com maior rendimento e excesso enantiomérico, o substituinte era um grupo terc-butil. Lewis e colaboradores compararam o efeito de diferentes substituintes e notaram que outros grupos não levavam a um rendimento e excesso enantiomérico tão altos quanto com o substituinte terc-butil. Nas simulações de dinâmica molecular convencional, não foi possível observar interações específicas entre o tetrapeptídeo e o substituinte terc-butil do carbono pró-quiral do bisfenol que justificassem a enantiosseletividade da reação. Trabalhos recentes mostraram que a enantiosseletividade apresenta alta correlação com parâmetros estéricos dos diferentes substituintes do carbono pró-quiral do bisfenol⁴⁰ e com estiramentos dos anéis do bisfenol, sendo que foi suposto que esses estiramentos variavam de acordo com o substituinte do carbono pró-quiral⁴¹. Esses resultados corroboram a hipótese de que a enantiosseletividade depende da interação direta entre o tetrapeptídeo e o grupo substituinte do carbono pró-quiral, entretanto a maneira como essa interação ocorre não é clara e seu estudo parece não ser trivial.

Este trabalho permitiu estudar aspectos fundamentais envolvidos na reação de acetilação enantiosseletiva do bisfenol catalisada por um tetrapeptídeo. As simulações de dinâmica molecular convencional de longa duração mostraram a existência de duas conformações do tetrapeptídeo catalisador: uma estendida e uma compacta. As simulações de dinâmica molecular com amostragem ampliada permitiram a obtenção dos perfis de energia livre em diferentes temperaturas e mostrar que na temperatura experimental a população de moléculas do tetrapeptídeo na conformação estendida é quase três vezes maior que a população do tetrapeptídeo na conformação compacta. A partir desse resultado, sugerimos que a conformação estendida contribui significativamente para a alta enantiosseletividade da reação. Além disso, as simulações sugerem que o bisfenol interage através de suas hidroxilas simultaneamente com mais frequência com o tetrapeptídeo estendido do que com sua conformação compacta, reforçando a sugestão de que a conformação estendida é a responsável pela atividade catalítica.

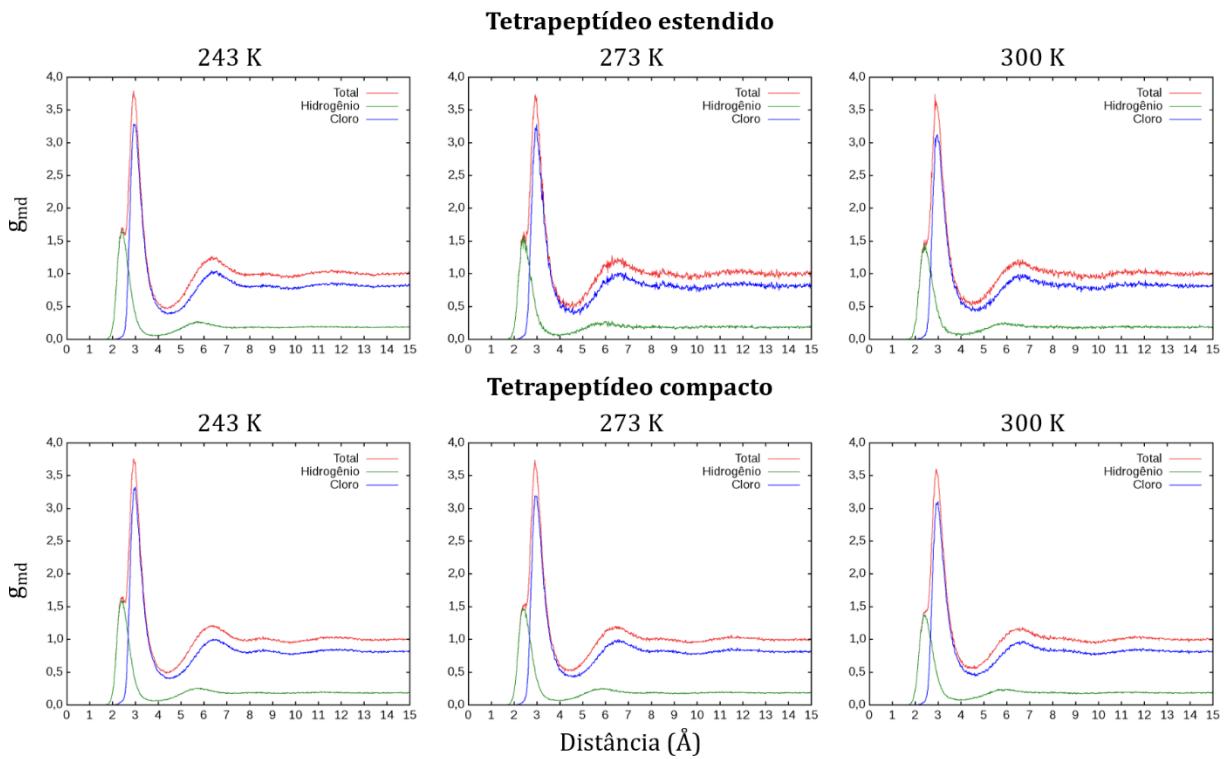
Bibliografia

1. Carey, F. A. *Organic Chemistry*. (McGraw-Hill, 2003).
2. Wade, L. G. Precision in Stereochemical Terminology. *J. Chem. Educ.* **83**, 1793 (2006).
3. Kaidor, File:Polarimeter (Optical rotation).svg - WikiCommons (CC BY-SA 3.0) [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polarimeter_\(Optical_rotation\).svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polarimeter_(Optical_rotation).svg) (acessado em maio/2018).
4. Moss, G. P. Basic Terminology of Stereochemistry. *Pure Appl. Chem.* **68**, 2193–2222 (1996).
5. Görög, S. & Gazdag, M. Enantiomeric derivatization for biomedical chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **659**, 51–84 (1994).
6. Rentsch, K. M. The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory. *J. Biochem. Biophys. Methods* **54**, 1–9 (2002).
7. Nguyen, L. A., He, H. & Pham-Huy, C. Chiral drugs: an overview. *Int. J. Biomed. Sci.* **2**, 85–100 (2006).
8. Kim, J. H. & Scialli, A. R. Thalidomide: The Tragedy of Birth Defects and the Effective Treatment of Disease. *Toxicol. Sci.* **122**, 1–6 (2011).
9. Wani, T. H. *et al.* The Dihydroxy Metabolite of the Teratogen Thalidomide Causes Oxidative DNA Damage. *Chem. Res. Toxicol.* **30**, 1622–1628 (2017).
10. Höglund, P., Eriksson, T. & Björkman, S. A Double-Blind Study of the Sedative Effects of the Thalidomide Enantiomers in Humans. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **26**, 363–383 (1998).
11. Schoetz, G., Trapp, O. & Schurig, V. Determination of the enantiomerization barrier of thalidomide by dynamic capillary electrokinetic chromatography. *Electrophoresis* **22**, 3185–3190 (2001).
12. Lewis, C. A. *et al.* A Case of Remote Asymmetric Induction in the Peptide-Catalyzed Desymmetrization of a Bis(phenol). *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 16358–16365 (2008).
13. Gross, L., Mohn, F., Moll, N., Liljeroth, P. & Meyer, G. The Chemical Structure of a Molecule Resolved by Atomic Force Microscopy. *Science (80-.).* **325**, 1110–1114 (2009).
14. Jensen, F. *Introduction to Computational Chemistry*. (John Wiley & Sons, Ltd, 2007).
15. MacKerell, A. D. *et al.* All-atom empirical potential for molecular modeling and

- dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B* **102**, 3586–616 (1998).
- 16. Weiner, S. J. *et al.* A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 765–784 (1984).
 - 17. Cornell, W. D. *et al.* A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5179–5197 (1995).
 - 18. Hermans, J., Berendsen, H. J. C., Van Gunsteren, W. F. & Postma, J. P. M. A consistent empirical potential for water–protein interactions. *Biopolymers* **23**, 1513–1518 (1984).
 - 19. Jorgensen, W. L., Maxwell, D. S. & Tirado-Rives, J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 11225–11236 (1996).
 - 20. Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. a & Case, D. a. Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* **25**, 1157–1174 (2004).
 - 21. González, M. A. Force fields and molecular dynamics simulations. *École thématique la Société Française la Neutron.* **12**, 169–200 (2011).
 - 22. Berman, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242 (2000).
 - 23. Leach, A. R. *Molecular Modelling - Principles and Applications*. (Pearson Education, 2001).
 - 24. Comer, J. *et al.* The adaptive biasing force method: Everything you always wanted to know but were afraid to ask. *J. Phys. Chem. B* **119**, 1129–1151 (2015).
 - 25. Chipot, C. & Pohorille, A. *Free Energy Calculations - Theory and Applications in Chemistry and Biology*. (Springer, 2007).
 - 26. Batista, M. R. B. Diversidade Conformacional da Hélice 12 do Receptor PPAR γ e suas Implicações Funcionais. Tese Doutorado (Unicamp, 2016).
 - 27. Oliveira, I. P. de. Dinâmica Molecular da Enzima BCL (*Burkholderia cepacia* lipase): Aspectos da Solvatação e Abertura do Sítio Catalítico na Presença de Osmólitos e em Interfaces. (Unicamp, 2017).
 - 28. Martínez, L. & Shimizu, S. Molecular Interpretation of Preferential Interactions in Protein Solvation: A Solvent-Shell Perspective by Means of Minimum-Distance Distribution Functions. *J. Chem. Theory Comput.* **13**, 6358–6372 (2017).
 - 29. Martínez, L. MDAnalysis. Version 17-108. (2016).
 - 30. Vanquelef, E. *et al.* R.E.D. Server: a web service for deriving RESP and ESP charges and building force field libraries for new molecules and molecular fragments.

- Nucleic Acids Res.* **39**, W511–W517 (2011).
- 31. Wang, F., Becker, J. P., Cieplak, P. & Dupradeau, F.-Y. R.E.D. Python: Object oriented programming for Amber force fields. (2013).
 - 32. Dupradeau, F.-Y. *et al.* The R.E.D. tools: advances in RESP and ESP charge derivation and force field library building. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 7821 (2010).
 - 33. Bayly, C. C. I., Cieplak, P., Cornell, W. D. & Kollman, P. a. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J. Phys. ...* **97**, 10269–10280 (1993).
 - 34. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ort, D. J. F. Gaussian. (2016).
 - 35. D.A. Case, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden, R.E. Duke, T.J. Giese, H. Gohlke, A.W. Goetz, D. Greene, N. Homeyer, S. Izadi, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, D. Mermelstein, K.M. Merz, G. Monard, H., P. A. K. AMBER. (2017).
 - 36. Cieplak, P., Caldwell, J. & Kollman, P. Molecular mechanical models for organic and biological systems going beyond the atom centered two body additive approximation: aqueous solution free energies of methanol and N-methyl acetamide, nucleic acid base, and amide hydrogen bonding and chloroform/. *J. Comput. Chem.* **22**, 1048–1057 (2001).
 - 37. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38 (1996).
 - 38. Martínez, L., Andrade, R., Birgin, E. G. & Martínez, J. M. PACKMOL: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.* **30**, 2157–2164 (2009).
 - 39. Phillips, J. C. *et al.* Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **26**, 1781–1802 (2005).
 - 40. Harper, K. C., Bess, E. N. & Sigman, M. S. Multidimensional steric parameters in the analysis of asymmetric catalytic reactions. *Nat. Chem.* **4**, 366–374 (2012).
 - 41. Milo, A., Bess, E. N. & Sigman, M. S. Interrogating selectivity in catalysis using molecular vibrations. *Nature* **507**, 210–214 (2014).

Anexos



Anexo 1. Contribuições dos átomos de hidrogênio e de cloro da molécula de clorofórmio para as funções de distribuição de distância mínima (g_{md}) do tetrapeptídeo estendido e compacto nas temperaturas de 243 K, 273 K e 300 K.