

Ilha Solteira – SP  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP  
-Campus de Ilha Solteira-

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS  
-DEPARTAMENTO DE FÍSICA E QUÍMICA-

**Estudo de N-metilformamida em Meio não Aquoso. O  
caso NMF-Acetona**

Glauco Garrido Almeida

Ilha Solteira – SP  
Maio de 2011

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS  
-DEPARTAMENTO DE FÍSICA E QUÍMICA-

## **Estudo de N-metilformamida em Meio não Aquoso. O caso NMF-Acetona**

**Candidato:** Glauco Garrido Almeida  
**Orientador:** Prof. Dr. João Manuel Marques Cordeiro

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Estadual Paulista – “Julio de Mesquita Filho” – UNESP – Campus Ilha Solteira- como parte das exigências para a obtenção do Título de Mestre em Ciência dos Materiais.

Área de concentração: Física da Matéria Condensada.

Ilha Solteira – SP  
Maio de 2011

## FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da UNESP - Ilha Solteira.

A447e Almeida, Glauco Garrido.  
Estudo de N-metilformamida em meio não aquoso. O caso NMF-acetona / Glauco Garrido Almeida. -- Ilha Solteira : [s.n.], 2011  
83 f. : il.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área do Conhecimento: Física da Matéria Condensada, 2011  
Orientador: João Manuel Marques Cordeiro  
Inclui bibliografia  
1. Simulação MC. 2. N-metilformamida. 3. Acetona. 4. Ponte de hidrogênio.

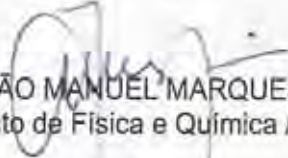
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

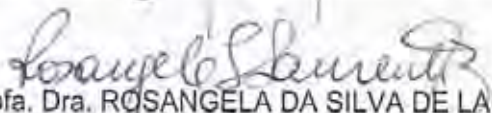
**TÍTULO:** Estudo do N-metilformamida em Meio Não Aquoso - O caso NMF - ACT

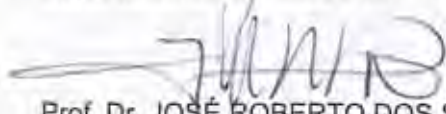
**AUTOR:** GLAUCO GARRIDO ALMEIDA

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. JOÃO MANUEL MARQUES CORDEIRO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência dos Materiais ,  
Área: FÍSICA DA MATERIA CONDENSADA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. JOÃO MANUEL MARQUES CORDEIRO  
Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

  
Profa. Dra. ROSANGELA DA SILVA DE LAURENTIZ  
Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

  
Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO DOS SANTOS POLITI  
Instituto de Química / Universidade de Brasília

Data da realização: 20 de maio de 2011.

Dedico esta dissertação

Aos meus Pais, Reginaldo e Gláucia,

Pelo incentivo financeiro, paciência, dedicação

e carinho, sobre tudo pelo que representam pra mim.

Especialmente a duas pessoas, minha avó materna, Maria Palmieri (*in momoriam*), uma pessoa que me ensinou o verdadeiro valor da vida, sendo uma influencia direta dos caminhos que me trouxeram até este momento. E, meu aluno Thiago Magalhães (*in memoriam*), uma pessoa que conheci, admirei, e, tive de aprender a conviver apenas com sua lembrança no decorrer desses dois anos de trabalho.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado o dom da vida e ter me ajudado em todos os momentos de dificuldade, sendo o principal pilar desta conquista.

Ao Professor Dr. João M. M. Cordeiro, sem o qual esse trabalho não poderia ser realizado, um orientador ímpar, que ganhou meu respeito e admiração também como ser - humano pessoa a quem sempre serei grato pelo que fez por mim.

Aos meus companheiros de mestrado, Alexandre, Bob, Elton, Gisele, João, Layciane, Lilian, Pipi, Piríca, Santim, Silvio, Timão, Vivian que me ajudaram com as dificuldades que encontrei nas disciplinas.

A todos professores e funcionários do departamento de Física e Química da UNESP de Ilha solteira que fizeram com que fossem dois anos de convívio muito agradáveis .

Ao meu sogro, José Luiz Gasche, que dedicou boa parte do seu tempo para me auxiliar nas dificuldades que encontrei nas disciplinas.

À minha noiva Caroline A. L. Gasche, pela compreensão e por sempre ter estado ao meu lado me motivando nos momentos de dificuldades (que foram muitos).

À família, Reginaldo de Almeida (pai), Gláucia de F. G. Almeida (mãe), Regiane G. Almeida (irmã) que me deram todo suporte e carinho que precisei, não somente hoje, por toda minha vida.

Ao meu “irmãozinho” Franco D. de Melo, por uma vida de amizade, e, acima de tudo por ter acreditado em mim.

A todos os amigos de verdade, que torceram por mim e acreditaram em mim.

A meus alunos e amigos do Jiu-Jitsu, que foram compreensivos com as ausências que tive de ter para terminar este trabalho.

A todas as pessoas que participaram direta, ou indiretamente, dessa conquista.

*“A mente que se abre a uma nova idéia, jamais retorna a seu tamanho original”.*

*Albert Einstein*

*“Pois, se quisermos ter sucesso em nossas coisas devemos ser como a Fênix, que está sempre se renovando, porém, é a mesma em sua essência”.*

*Glauco G. Almeida*

## RESUMO

Apresenta-se neste trabalho o estudo das propriedades estruturais e termodinâmicas dos líquidos acetona (ACT), N-metilformamida (NMF) e de suas misturas, utilizando-se simulação computacional com método Monte Carlo. O estudo foi realizado com o intuito de se entender melhor os mecanismos moleculares envolvidos na estabilização enzimática em meios não aquosos, uma vez que há um aumento significativo no uso de biocatálise nas indústrias química e farmacêutica nos últimos anos. Os resultados estruturais obtidos para os líquidos puros foram comparados com os obtidos por difratometria de nêutrons com substituição isotópica e posterior refinamento por meio do método EPSR (refinamento estrutural por potencial empírico). As simulações foram feitas no ensemble isotérmico-isobárico com temperatura de 298 K e pressão de 1 atm. A energia de interação intermolecular foi calculada utilizando-se o potencial de pares clássico 6-12 Lennard-Jones somado ao potencial de Coulomb. Os valores teóricos obtidos para o calor de vaporização e densidade estão em bom acordo com os experimentais para os líquidos puros. Verificou-se uma boa concordância entre a estrutura teórica e experimental dos líquidos (especialmente para a NMF). Na análise dos líquidos puros foi constatada diferença estrutural e termodinâmica entre eles, sobretudo em decorrência da presença de ligações de hidrogênio na NMF e ausência destas na ACT. Para a mistura, observou-se uma maior energia de interação entre moléculas de NMF do que de ACT, devido à presença de ligações de hidrogênio na primeira. Verificou-se também a formação de ligações de hidrogênio entre moléculas dos dois líquidos, com um aumento da força de interação por ligações de hidrogênio encontradas entre moléculas de NMF à medida que se adiciona acetona, devido a uma espécie de efeito solvofóbico. A influência da concentração na correlação dipolar entre as moléculas dos líquidos foi explorada, com discussão sobre a estrutura nas camadas de solvatação na mistura. A entalpia de excesso da mistura foi calculada e os resultados interpretados em função da diferença na qualidade das ligações de hidrogênio formadas no líquido. Nota-se que a formação da mistura é exotérmica, o que concorda com resultados de contração volumétrica encontrados na literatura.

**Palavras-chave:** Simulação MC. N-metilformamida. Acetona. Ponte de hidrogênio.



## ABSTRACT

This work presents the study of structural and thermodynamic properties of acetone (ACT) - N-methylformamide (NMF) mixtures using Monte Carlo simulation. The study has been performed in order to better understand the molecular mechanisms involved in the enzyme's stabilization in no aqueous media, since there is a significant increase in the use of biocatalysis in pharmaceutical and chemical industries in recent years. The structural results obtained for the pure liquids were compared with those obtained by neutron diffraction with isotopic substitution and subsequent refinement by the EPSR (empirical potential refinement) method. The simulations were performed in the isothermal-isobaric ensemble with a temperature of 298 K and 1 atm. The intermolecular energy was calculated using the classical 6-12 Lennard-Jones plus Coulomb pair potential. The theoretical values obtained for the heat of vaporization and density are in good agreement with the experimental data for pure liquids. There was a good agreement between experimental and theoretical structure of liquids (especially for NMF). In the pure liquids' analysis was found structural and thermodynamic differences among them, mainly due to the presence of hydrogen bonds in the NMF and the lack of it in the ACT. In the mixture, the interaction energy between the NMF molecules is larger than between the ACT molecules, also a consequence of the presence of hydrogen bonds in the first ones. It was also found the formation of hydrogen bonds between the two liquids, with an increase in the strength of hydrogen bond interaction between the NMF molecules as ACT was added due to some sort of solvophobic effect. The concentration's influence on the dipolar correlation between the molecules of the liquid has been explored with discussion of the structure in the solvation shells in the mixture. The excess enthalpy of the mixture was calculated and the results were interpreted according to the difference of the hydrogen bonds' quality in the liquid. The results shows that the mixture's formation is exothermic, which agrees with literature's results that indicates a decrease in the volume of the mixture.

**Keywords:** MC simulation. N-methylformamide. Acetone. Hydrogen bond.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Ligação peptídica entre $\alpha$ -aminoácidos, responsável pela formação da cadeia polipeptídica.....	14
Figura 02 – Ligações de hidrogênio dando configuração em alfa-hélice à cadeia polipeptídica.....	14
Figura 03 – Interações polares, apolares, ligações de hidrogênio fracas e por pontes de dissulfeto, dando origem ao enovelado polipeptídico que caracteriza a estrutura terciária de uma proteína.....	15
Figura 04 – Visão aumentada da estrutura terciária de uma proteína em cartoon.....	15
Figura 05 – Conglomerado de quatro estruturas terciárias, formando a estrutura quaternária de uma proteína.....	16
Figura 06 – Número de processos de biocatálise em escala industrial.....	17
Figura 07 – Setores industriais que mais utilizam a biocatálise.....	17
Figura 08 – NMF, confômero <i>trans</i> .....	21
Figura 09 – Potencial harmônico linear.....	26
Figura 10 – Potencial harmônico angular.....	26
Figura 11 – Simulação das condições de contorno utilizadas no método Monte Carlo.....	29
Figura 12 – Caixa de simulação com as moléculas no início da simulação.....	30
Figura 13 – Caixa de simulação termodinamicamente equilibrada.....	31
Figura 14 – Variação da energia potencial do sistema ao longo da simulação pelo método Monte Carlo.....	31
Figura 15 – Representação do raio de corte e convenção de imagem mínima.....	32
Figura 16 – Funções radiais de pares derivadas de cálculos por EPSR (linhas) e por simulações de Monte Carlo (círculos) para NMF. O símbolo (H)N representa o hidrogênio ligado ao nitrogênio e o C(Me) é o carbono do grupo metil.....	47
Figura 17 – Distribuição de energia de pares da simulação das moléculas de NMF líquida.....	48
Figura 18 – Geometria do dímero estatisticamente mais representativo no líquido. Alguns dos parâmetros geométricos são: ângulo (N-H-O) = $169^\circ$ , $r(\text{H-O}) = 1,81 \text{ \AA}$ , $r(\text{N-O}) = 2,76 \text{ \AA}$ , $r(\text{C-C}) = 4,47 \text{ \AA}$ , $r(\text{O-C(Me)}) = 3,7 \text{ \AA}$ , $r(\text{O-H(C)}) = 3,44 \text{ \AA}$ .....	49

Figura 19 – Correlação dipolo-dipolo média em função da distância C-C, onde teta é o ângulo entre os momentos dipolo de duas moléculas de NMF que estão sendo consideradas.....	50
Figura 20 – Funções radiais de pares derivadas de cálculos por EPSR (símbolos vazios) e por simulações de Monte Carlo(símbolos cheios) para ACT. Onde, C(Me) é o carbono do grupo metil.....	51
Figura 21 – Distribuição de energia de pares da simulação das moléculas de acetona líquida.....	52
Figura 22 – Correlação média de dipolo-dipolo em função da distância C-C. Onde teta é o ângulo entre os momentos dipolos das duas moléculas de acetona consideradas.....	53
Figura 23 – Geometria dos dímeros de acetona em função da distância C-C. Dímeros a, b, c e d correspondem as distâncias C-C listadas nas quatro colunas da direita, na quadro 6, respectivamente.....	54
Figura 24 – Número de coordenação para os líquidos ACT e NMF. Correlação O-H(N).....	55
Figura 25 – Distribuição radial de pares para a mistura NMF-ACT. Concentração de Mistura-50%.....	56
Figura 26 – Número de vizinhos em função da distância para a correlação O-H(N) entre os líquidos ACT e NMF em 7 diferentes concentrações, que indica o número de ligações de hidrogênio formadas entre ambos.....	57
Figura 27 – Correlação radial de pares, O-H(N), entre moléculas NMF-NMF, e, NMF-ACT.....	58
Figura 28 – Distribuição de energia de pares, NMF-NMF e NMF-ACT. Concentração de mistura-50%.....	59
Figura 29 – Função radial de pares, correlação O-H(N) entre moléculas NMF.....	60
Figura 30 – Correlação de dipolo-dipolo entre moléculas de NMF-ACT.....	61
Figura 31 – Correlação de dipolo-dipolo entre moléculas de NMF-NMF.....	62
Figura 32 – Dímero NMF-NMF estatisticamente mais representativo. Concentração de Mistura-50%.....	63
Figura 33 – Função radial de pares- NMF-NMF. Concentração de mistura-50%.....	64
Figura 34 – Energia de interação molecular em função da concentração de ACT em mistura.....	65
Figura 35 – Energia de interação NMF-NMF em função da concentração do solvente em mistura.....	67
Figura 36 – Energia de interação solvente-NMF em função da concentração do solvente....	68

Figura 37 – Entalpia de excesso das misturas NMF-ACT e Água-NMF.....	68
Figura 38 – Configuração final da caixa de simulação, concentração 87,5% de acetona em mistura.....	70

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Propriedades físico-químicas de NMF e ACT.....	23
Quadro 2 – Parâmetros moleculares para ACT.....	42
Quadro 3 – Coordenadas moleculares para ACT.....	43
Quadro 4 – Parâmetros moleculares para NMF.....	43
Quadro 5 – Coordenadas moleculares para NMF.....	43
Quadro 6 – Os ângulos entre os momentos dipolo para os dímeros ACT-ACT obtidos pela simulação nas distâncias C-C mostradas no quadro.....	54

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1	Apresentação	13
1.2	N-Metilformamida (NMF)	20
1.3	Acetona (ACT)	22
<b>2</b>	<b>SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL</b>	<b>24</b>
2.1	Mecânica molecular e campos de força	24
2.1.1	<i>Potenciais ligantes</i>	26
2.1.2	<i>Potenciais não-ligantes</i>	27
2.2	Método Monte Carlo – Algoritmo de Metropolis	28
2.3	Dinâmica molecular	33
2.4	Função de distribuição radial de pares	34
2.5	Número de coordenação	35
2.6	Difratometria de nêutrons	35
2.6.1	<i>Produção dos nêutrons</i>	37
2.6.2	<i>Moderador</i>	37
2.6.3	<i>Colimação</i>	38
2.6.4	<i>Amostras</i>	39
2.6.5	<i>Deteção dos nêutrons</i>	39
2.6.6	<i>Armazenamento dos dados</i>	40
2.7	EPSR – Refinamento estrutural por potencial empírico	40
2.8	Metodologia	41
2.8.1	<i>Teórico</i>	41
2.8.2	<i>Experimental</i>	43
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>46</b>
3.1	Análise estrutural	46
3.1.1	<i>N-metilformamida</i>	46
3.1.2	<i>Acetona</i>	50
3.1.3	<i>Mistura ACT-NMF</i>	55
3.2	Análise Termodinâmica	64
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>71</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>74</b>

## Capítulo 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 Apresentação e Objetivos

Enzimas são catalisadores de alta especificidade e eficiência, essenciais à maioria dos processos biológicos<sup>1</sup>. Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA, enzimas são proteínas<sup>2</sup> que têm a função de se ligar ao substrato para catalisar reações químicas. Uma característica marcante de sua atividade é a alta especificidade molecular na ligação enzima-substrato. Essa especificidade pode chegar ao ponto em que uma determinada enzima apresente enantioespecificidade, ou seja, reconheça apenas um dos <sup>I</sup>enantiômeros de uma substância (substrato) quiral<sup>3</sup>. Tal fenômeno se deve à sua complexa estrutura molecular, que pode ter de 3 a 4 níveis estruturais, que irão definir sua função bioquímica, dispostos (resumidamente) da seguinte maneira<sup>2</sup>:

Estrutura Primária: Formada por uma cadeia linear de <sup>II</sup> $\alpha$ -aminoácidos por meio de ligações peptídicas, em que o N do grupo amino se liga ao C do grupo ácido carboxílico, dando origem a um peptídeo, com a saída de uma molécula de água (Fig.1).

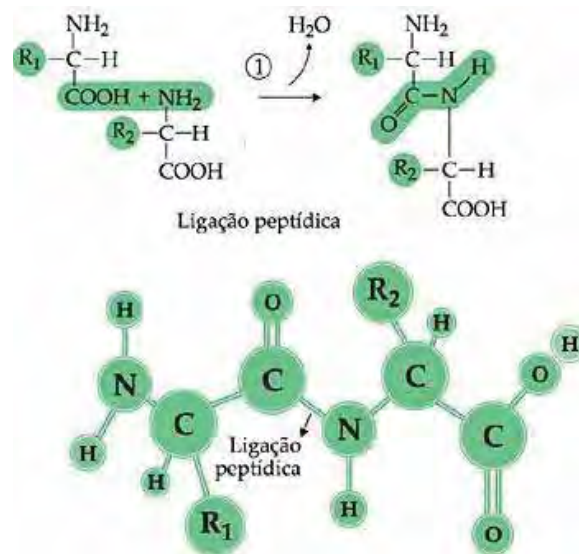
Estrutura Secundária: Formada por ligações de hidrogênio fortes, nas quais toma parte o H do grupo amino de um  $\alpha$ -aminoácido “A” e o O do grupo carboxílico de um  $\alpha$ -aminoácido “B”. Essa estrutura pode apresentar diversas conformações, porém, a estrutura secundária mais comum se dá em forma de  $\alpha$ -hélice (Fig.2).

---

<sup>I</sup> **Enantiômeros**: São estereoisômeros, ou seja, possuem mesma fórmula molecular e estrutural plana, diferindo apenas quanto a fórmula estrutural espacial. Especificamente os enantiômeros são moléculas que possuem isomeria óptica, possuindo ao menos um carbono quiral (com quatro ligantes diferentes) em sua estrutura, sendo que, são imagens uma da outra no espelho, não sendo sobreponíveis, nem por *translação*, nem por *rotação*. Os enantiômeros possuem características físico-químicas muito próximas devido a sua similaridade estrutural, porém podem apresentar funções biológicas completamente diferentes devido a alta especificidade molecular das enzimas envolvidas nos processos biológicos.

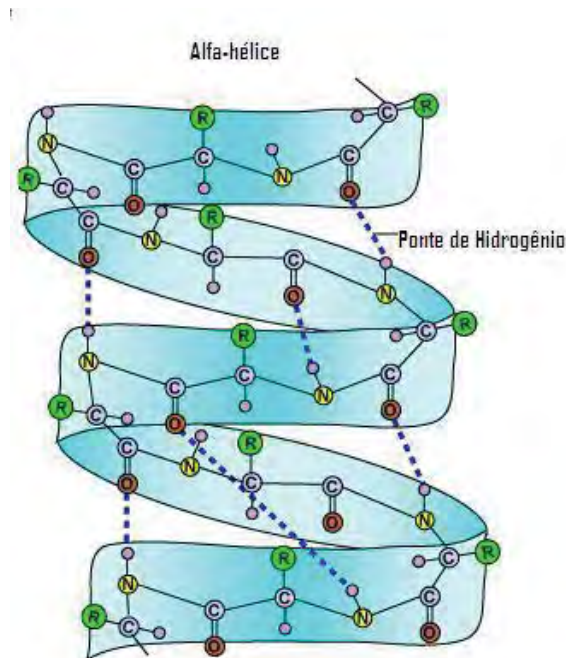
<sup>II</sup>  **$\alpha$ -aminoácidos**: São moléculas que possuem ao mesmo tempo em sua estrutura as funções orgânicas amina e ácido carboxílico, sendo que, as vinte variedades existentes de  $\alpha$ -aminoácidos diferem entre si quanto a composição das cadeias laterais. A ordem na qual os  $\alpha$ -aminoácidos estão dispostos ao longo da cadeia polipeptídica vai determinar as características bioquímicas desta.

Figura 1 – Ligação peptídica entre  $\alpha$ -aminoácidos, responsável pela formação da cadeia polipeptídica.



Fonte: Sóbiologia<sup>96</sup>

Figura 2 – Ligações de hidrogênio dando configuração em alfa-hélice à cadeia polipeptídica.

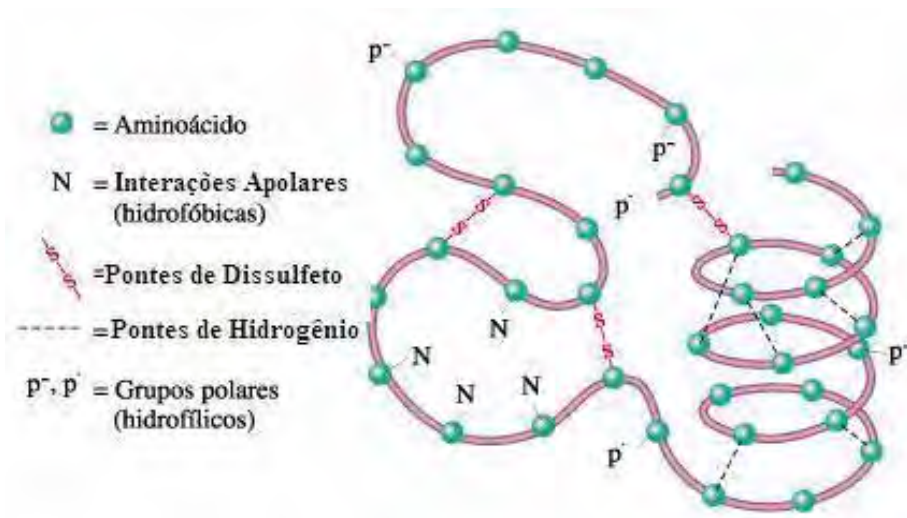


Fonte: Sóbiologia<sup>96</sup>



Estrutura Terciária: Formada, em geral, por interações internas iônicas, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, pontes de dissulfeto e interações hidrofílicas externas. A diversidade de interações citadas vai conferir à enzima uma configuração enovelada (Fig.3 e 4).

Figura 3 – Interações polares, apolares, ligações de hidrogênio fracas e por pontes de dissulfeto, dando origem ao enovelado polipeptídico que caracteriza a estrutura terciária de uma proteína.



Fonte: Souza e Neves<sup>97</sup>

Figura 4 – Visão aumentada da estrutura terciária de uma proteína em cartoon.



Fonte: Carla<sup>98</sup>

Nesse ponto a proteína, já pode possuir atividade catalítica, diretamente relacionada com a conformação espacial que lhe foi atribuída devido às interações citadas acima.

Estrutura Quaternária: Algumas proteínas possuem ligadas em sua estrutura mais de uma cadeia polipeptídica enovelada (subunidade terciária) para só então apresentar função enzimática. O conglomerado de estruturas terciárias dá origem a denominada estrutura quaternária (Fig.5).

Figura 5 – Conglomerado de quatro estruturas terciárias, formando a estrutura quaternária de uma proteína.

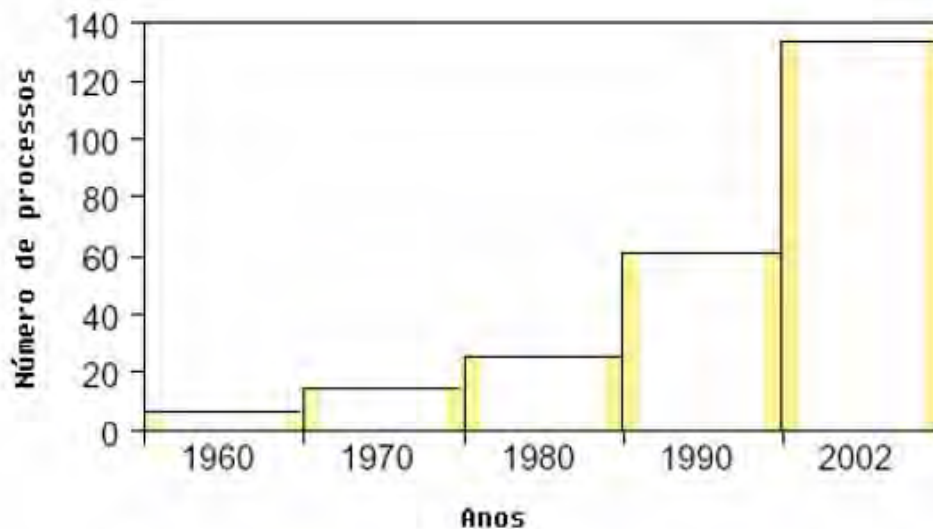


Fonte: Carla<sup>98</sup>

As enzimas diferem entre si quanto ao número, o tipo, e a ordem dos resíduos de  $\alpha$ -aminoácidos formadores, ou seja, a forma com que a cadeia primária está disposta irá implicar em uma configuração funcional catalítica muito específica para cada enzima, o que lhe atribuirá uma maior ou menor afinidade com determinado substrato.

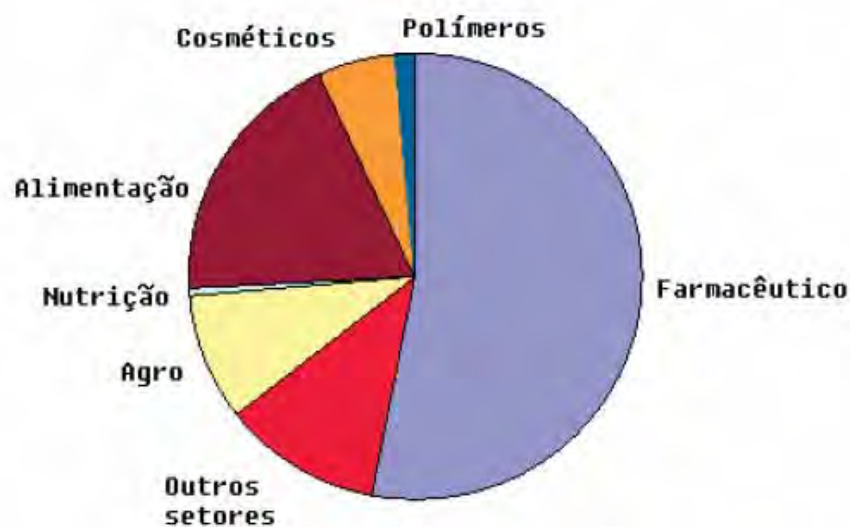
A aplicação de catalisadores enzimáticos (biocatálise) nas indústrias vêm crescendo substancialmente, sendo que dentre todos os seguimentos, a indústria farmacêutica é a que mais se utiliza desse tipo de tecnologia de acordo com o que se pode constatar nas figuras 6 e 7.

Figura 6 – Número de processos de biocatálise em escala industrial.



Fonte: Straathof, Panke, Schmid<sup>101</sup>

Figura 7 – Setores industriais que mais utilizam a biocatálise.



Fonte: Straathof, Panke, Schmid<sup>101</sup>

As significativas vantagens reacionais enzimáticas, como alta especificidade molecular e quiral, incomparável atividade sobre condições reacionais, alto *turnover*, e biodegradabilidade são os principais motivos para o interesse industrial na sua utilização, no entanto, há ainda um grande problema relacionado a sua intrínseca instabilidade, decorrente de sua complexa estrutura, dificuldade e alto custo na produção, processamento e armazenamento<sup>4</sup>. As enzimas sofrem uma grande variedade de processos de denaturação, que

podem ser revertidos se removida à situação denaturante, ou podem acarretar perda irreversível da atividade<sup>5</sup>. Compreender os mecanismos da inativação e a reversibilidade ou não das reações envolvidas ajuda na caracterização da estabilidade enzimática e permite melhor controle sobre a atividade catalítica.<sup>6-13</sup> O domínio destas questões pode vir a viabilizar a aplicação industrial em mais alta escala.

Para que tenha aplicação industrial é fundamental que a enzima seja estável nas condições reacionais específicas de interesse, que podem ser extremas. Vários agentes que promovem mudanças na configuração espacial e na atividade enzimática são conhecidos, como por exemplo, temperatura, pH, agentes químicos ou força iônica. A inativação enzimática segue um caminho reacional que inclui dissociação de subunidades em enzimas multiméricas, denaturação de estruturas secundárias ou terciárias, agregação, coagulação e decomposição química<sup>14</sup>. Geralmente, enzimas multiméricas são naturalmente mais estáveis, comparadas com monoméricas ou estruturas quaternárias mais simples, devido sua maior rigidez.

Uma das condições em que haveria instabilidade estrutural favorecendo a denaturação protéica seria a exposição a meios não aquosos, como solventes orgânicos. Apesar de existirem muitas enzimas (ou complexos multienzimáticos) como *lipases*, *esterases*, *desidrogenases*, e aquelas responsáveis pelo metabolismo xenobiótico (desintoxicação), que são cataliticamente ativas em ambientes hidrofóbicos naturais<sup>3</sup>, com eficiência similar, ou até superior, àquela em soluções aquosas<sup>3</sup>, via de regra, a estabilidade e/ou atividade de enzimas nestes sistemas é menor do que em meio aquoso.<sup>15</sup> Considerações que explicam a inativação enzimática em solventes orgânicos baseiam-se na idéia de que a molécula protéica é rodeada por uma camada de hidratação ligada à superfície da enzima por ligações de hidrogênio. Esta camada de hidratação, ou uma parte dela, faz parte da estrutura da proteína e é essencial para a função enzimática<sup>16, 17</sup>. Conseqüentemente, o deslocamento da camada aquosa por solvente orgânico resulta numa dramática mudança na estrutura da proteína, levando à denaturação. Então, solventes <sup>III</sup>hidrofóbicos e solventes com alta capacidade de solvatação, como 1,4-dioxano, tetrahydrofurano e etanol, são fortes denaturantes, causando inativação enzimática a concentrações tão baixas quanto 10% a 30% em volume. Por outro lado, solventes <sup>IV</sup>hidrofílicos como glicerol, etileno-glicol e formamida,

---

<sup>III</sup> **Solventes Hidrofóbicos:** O termo hidrofóbico refere-se a solventes que possuem polaridade diferente da água, ou seja, solventes apolares, que não se misturam a água ou qualquer outro composto com polaridade igual a esta.

<sup>IV</sup> **Solventes Hidrofílicos:** O termo hidrofílico refere-se a solventes que possuem a mesma polaridade da água, ou seja, solventes polares, que se misturam a água ou qualquer outro composto com polaridade igual a esta.

podem ser usados a concentrações de 50% a 60% sem provocar mudanças significativas na atividade<sup>4</sup>. Apesar de se saber que há atividade enzimática em meios não aquosos, e ser possível entender muitos dos mecanismos que estão associados a essa atividade devido aos avanços nessa área de estudo<sup>7-9, 11, 12, 16</sup>, por se tratar de uma área relativamente nova, ainda há muitos pontos a serem elucidados. Portanto, muito do foco em tecnologia de enzimas envolve o estudo do aumento da estabilidade e atividade enzimática em meio não aquoso<sup>16</sup>. Esse interesse advém das significativas vantagens obtidas na aplicação industrial de tais catalisadores utilizando como meio reacional solvente com essa natureza, o que favoreceria a maior solubilidade de substratos não polares, o deslocamento do equilíbrio termodinâmico a favor da síntese, a supressão de reações paralelas aquo-dependentes, a diminuição da contaminação microbiológica e o aumento da seletividade, da especificidade e da velocidade (catalisadores enzimáticos são capazes de aumentar a velocidade de uma reação em fatores de até  $10^{20}$  enquanto catalisadores não enzimáticos aumentam a velocidade de uma reação em fatores que vão de  $10^2$  a  $10^4$ )<sup>18</sup> de catálise sobre condições industriais.<sup>17</sup>

É importante, então, explorar a estrutura de misturas enzima-solventes orgânicos, tentando desvendar quais fatores, e de que maneira, influenciam a catálise em meio não-aquoso, além de aprofundar o conhecimento sobre o papel da água na catálise.

Métodos de simulação molecular são ferramentas muito úteis para investigar interações intermoleculares em sistemas líquidos, como se pode notar de aplicações de algumas destas metodologias publicadas recentemente<sup>19-21</sup>. No caso de moléculas biológicas, como enzimas, por exemplo, é difícil simular um sistema real devido ao tamanho e a grande complexidade de tais sistemas. Em função disso, é usual estudar-se sistemas modelo menores e o conhecimento obtido é “transferido” para o sistema maior, de interesse. A linha mestre deste projeto é investigar o comportamento da ligação peptídica em diversos solventes. A abordagem proposta seguirá exatamente essa linha de raciocínio, quer seja, estudar-se-á o comportamento da ligação peptídica presente entre as moléculas de NMF quando imersas no solvente acetona com o objetivo de aumentar o entendimento sobre a estabilização enzimática em meios não aquosos, uma vez que esse tipo de ligação encontrada entre as moléculas de NMF é a mesma presente na estrutura primária protéica, que dá base para a formação das estruturas secundárias, terciárias e quaternárias, essenciais ao funcionamento enzimático. Portanto, o entendimento sobre as mudanças que pode sofrer a estrutura primária de uma enzima devido à exposição a solventes orgânicos é de grande valia para elucidar questões relativas à desestabilização enzimática. Uma vez que esse comportamento seja melhor compreendido no sistema proposto, ACT-NMF, o objetivo futuro é *transferir* esse

conhecimento para sistemas maiores (enzima-solventes orgânicos) tendo como grande motivação a importância da biocatálise nos processos industriais farmacêuticos, especialmente devido a sua especificidade molecular.

Em nosso laboratório, demos recentemente início ao estudo de sistemas NMF-solvente orgânico investigando o comportamento da mistura NMF-DMSO. Para tanto, utilizamos simulação computacional de Monte Carlo<sup>22</sup> e espalhamento de nêutrons com método EPSR<sup>23, 24</sup>. No presente projeto propõe-se estudar a mistura N-metilformamida – acetona, empregando-se essa mesma abordagem.

## 1.2 N-Metilformamida (NMF)

A N-Metilformamida é um solvente prótico polar, tendo sido amplamente estudado tanto teoricamente<sup>22, 25-32</sup> como experimentalmente<sup>23, 33-39</sup>. Existem diversos fatores que fazem com que haja interesse no estudo desse líquido, dentre eles o fato de ser uma das moléculas com estrutura mais simples que apresenta uma ligação peptídica (Fig.1). Esse tipo de ligação química é idêntica a encontrada na estrutura primária das enzimas (como discutido anteriormente). Além disso, as moléculas de NMF atuam como doadoras e receptoras de prótons por meio respectivamente dos grupos C=O e N-H, conseqüentemente formam interações por ligações de hidrogênio, C=O $\cdots$ H-N. A interação por ligação de hidrogênio mantém as moléculas unidas em longas cadeias ao longo do líquido puro, esse efeito é refletido nas propriedades termodinâmicas encontradas, como seu momento dipolo  $\mu=3,83$  D, sua temperatura de ebulição  $T_{eb}= 472,65$  K, e, seu calor de vaporização igual a 13,77 kcal/mol (vide quadro 1).

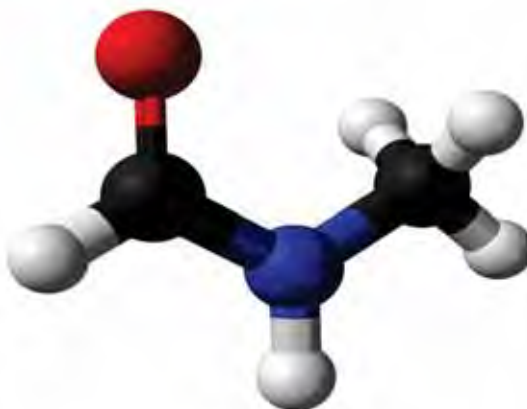
As interações por ligações de hidrogênio encontradas no líquido NMF são as mesmas que desempenham papel importante na estabilização das estruturas intramoleculares de peptídeos e proteínas (enzimas). Além desse tipo de interação, as moléculas de NMF podem ainda formar as chamadas ligações de hidrogênio fracas, C=O $\cdots$ H-C, as quais se mostram importantes na estabilização de diversas estruturas, como já foi extensivamente reportado<sup>40</sup>.

Por apresentar as características estruturais citadas acima, a NMF representa um bom modelo de estudo para ligações peptídicas de proteínas e peptídeos, motivo pelo qual foi escolhida para o desenvolvimento do trabalho.

É importante salientar que a NMF possui duas conformações, *cis* e *trans*. A ausência de rotação em torno da ligação C – N se deve à ressonância eletrônica que a ligação peptídica apresenta. Neste trabalho, consideramos apenas a configuração *trans* (Fig.8), por representar

94% das moléculas presentes no estado líquido da NMF<sup>19, 41</sup>. À primeira vista essa afirmação pode parecer controversa levando-se em consideração um possível impedimento estérico ao se posicionar o oxigênio e o grupo metil do mesmo lado da molécula, no entanto, estudos indicam que essa é a realidade.

Figura 8 – NMF, confômero *trans*.



Fonte: Wikipedia<sup>99</sup>

De nosso conhecimento, o primeiro estudo nesse sentido foi realizado por Jones, que concluiu por meio de espectroscopia de infravermelho que o confômero mais representativo para a molécula de NMF seria o *cis*<sup>42</sup>, porém, anos mais tarde Miyazawa investigou em detalhes as vibrações normais de amidas mono-substituídas e concluiu que a configuração *trans* seria a mais comum<sup>43</sup>. Como os dois resultados são divergentes, Hallam e Jones estudaram novamente a fase gasosa do espectro infravermelho em temperatura ambiente usando um método mais confiável e concluíram que o confômero mais comum na fase gasosa era realmente o *trans*, porém verificou-se também a presença de confômeros *cis* em menor quantidade<sup>44</sup>. Em 1974 Kitano e Kuchitsu notaram por meio de difração de elétrons, a presença de uma pequena fração de confômeros *cis*, que representavam 17% das moléculas de NMF em temperatura ambiente<sup>45</sup>. Uma década mais tarde Ataka et al. utilizaram a espectroscopia de infravermelho em matriz a baixa temperatura e estimaram a diferença de entalpia dos dois confômeros rotacionais em 1,3 Kcal/mol<sup>46</sup>. Fantoni et al, estudaram a estrutura de amidas por meio da espectroscopia de microondas e cálculos *ab initio*, e concluíram que o confômero *trans* da NMF é 4,5-5 kJ/mol mais estável que o confômero *cis*<sup>41, 47</sup>. Baseados nesses estudos os autores concluíram que a população do confômero *cis* no líquido é de cerca de 6% da população total de moléculas, Headley and Nam estudaram os efeitos da substituição nas energias relativas e momentos dipolo do confômero em nível

MP2<sup>29</sup>, e, Shin et al. realizaram cálculos *ab initio* no infravermelho e espectro NMR do NMF usando funcional de densidade B3LYP com bases 6-31++G\*\*<sup>35</sup> implementadas no programa Gaussian. Os autores relataram que o confômero *trans* da NMF é 0,872 Kcal/mol mais estável que o confômero *cis*. Ao mesmo tempo, Cordeiro et al. realizaram cálculos *ab initio* utilizando o programa Gaussian com diferentes níveis de cálculo e diferentes bases para investigar as interações intermoleculares desses dois confômeros<sup>32</sup>. Cálculos utilizando DFT com o funcional B3LYP e MP2 foram realizados com a base 6-311++G\*\* e os resultados indicaram que o confômeros *trans* são 7,78 kJ/mol mais estáveis que os confômeros *cis*, um valor aproximadamente 50% maior que o valor obtido por Fantoni e Caminati<sup>47</sup>, o que reforça a baixa porcentagem de confômeros *cis* no líquido NMF. Martinez et al. realizaram cálculos *ab initio* para investigar a proporção de confômeros *cis/trans* presentes no NMF em diferentes solventes<sup>31</sup>. Os autores concluíram que a proporção de *cis/trans* no NMF é insensível aos diferentes tipos de solventes, o que permite que se façam simulações como as que são feitas no presente trabalho, sem que nos preocupemos com a possível mudança na relação entre os isômeros *cis* e *trans* em função do solvente. Eles afirmaram que a predominância dos isômeros *trans* em NMF pode ser racionalizada em termos de interações entre o grupo formil e grupo metil ligado ao N. Cálculos prévios realizados para as formas *cis* e *trans* utilizando a base RHF/cc-pVDZ na qual estabilidade dos confômeros foi explorada em função da rotação do grupo metil, também apontam nessa direção<sup>32</sup>.

### 1.3 Acetona (ACT)

Assim como a NMF, o líquido acetona puro e algumas de suas misturas com outros líquidos foram extensivamente estudados, tanto por meio de difratometria quanto por meio de simulação computacional<sup>19, 48-59</sup>.

A acetona pertence à classe dos solventes apróticos polares, e, possui geometria triangular plana, com o carbono central no centro geométrico do triângulo. Ao contrário do que ocorre na NMF, a acetona é um líquido pouco estruturado, fato este que se reflete nos valores muito menores das propriedades termodinâmicas do que os encontrados na NMF, como seu momento dipolo  $\mu=2,88$  D, sua temperatura de ebulição  $T_{eb}= 329,65$  K, e, seu calor de vaporização igual a 7,4 Kcal/mol (vide quadro 1).

A correlação por dipolo parece ser o aspecto mais importante na estabilização da estrutura do líquido (o que justifica a pouca organização do mesmo) sendo que a curtas distâncias há uma predominância de alinhamentos antiparalelos dos momentos dipolo, e, à



medida que há um aumento na distância entre as moléculas os momentos dipolo vão se tornando mais paralelos e as moléculas adotam mais a configuração cabeça-cauda<sup>19,59</sup>.

O grupo C=O atua como acceptor de prótons, podendo formar ligações de hidrogênio com moléculas que sejam doadoras de prótons, e os dois grupos CH<sub>3</sub> podem apresentar efeitos hidrofóbicos quando colocados em meios aquosos<sup>48</sup>.

Devido às características citadas acima, e, ao fato da acetona ser de grande interesse industrial como meio reacional esta se mostra como um interessante solvente orgânico para o estudo da atividade enzimática em meios não aquosos, motivo pelo qual foi escolhida para o trabalho.

A seguir é apresentada o Quadro 1, onde estão dispostos os valores de algumas das propriedades termodinâmicas mais comuns, já citadas acima, para que se torne mais fácil a comparação e a compreensão sobre as diferenças apresentadas pelos líquidos em decorrência de suas diferenças na estruturação molecular.

**Quadro1** – Propriedades físico-químicas de NMF e ACT.

Líquido	E	μ (D)	PE(°C)	ΔH <sub>vap</sub> (kcal/mol)	ΔS <sub>vap</sub> (cal/mol.K)	ρ(g/cm <sup>3</sup> )	MM(g/mol)
NMF	182	3,86	199,5	13,77	29,13	1,00	59
ACT	20,7	2,88	56,5	7,40	22,45	0,78	48

ε = constante dielétrica, μ = momento dipolo, PE = ponto de ebulição, ΔH<sub>vap</sub> = calor de vaporização, ΔS<sub>vap</sub> = entropia de vaporização, ρ = densidade, MM = massa molar. Os valores podem ser encontrados em: Lide, D. R., Handbook of Chemistry and Physics, Wiley, New York, 2002.

Fonte: Produção do próprio autor.

## Capítulo 2 – SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL

Para estudar esse sistema fizemos então uso da química computacional, a qual está assentada como área de pesquisa capaz de oferecer excelentes subsídios para a compreensão da complexidade de sistemas químicos<sup>60</sup>. Podemos citar como metodologias mais usadas nesse âmbito, os métodos *ab initio* e *semiempíricos* na química quântica<sup>60-62</sup>, assim como *Monte Carlo* e *Dinâmica Molecular* na mecânica estatística<sup>63</sup>. Os métodos *ab initio* consistem em calcular todas as propriedades do sistema do início, ou seja, com exceção das constantes físicas<sup>v</sup> fundamentais (*e*, *c*, *h* e *m*) não são utilizados dados empíricos do sistema para se determinar as propriedades físicas desejadas, elas são calculadas totalmente por meio da resolução da equação de Schrödinger, na qual se emprega aproximações numéricas adequadas. Os métodos semiempíricos também lançam mão de cálculos quânticos para determinar as propriedades do sistema, porém são utilizados dados empíricos nos cálculos, o que implica em um menor custo computacional em relação aos cálculos *ab initio*. Tais métodos são, sem dúvida, muito valiosos para determinar propriedades eletrônicas, oferecendo subsídios importantes para o estudo de sistemas em fase condensada. Porém, se torna inviável o cálculo envolvendo muitas moléculas, ou moléculas muito grandes, devido ao alto custo computacional (tanto em tempo de cálculo, quanto em relação à memória necessária para armazenamento), sendo assim, há grande dificuldade de se aplicar tais métodos em sistemas com mais de algumas dezenas de moléculas ou centenas de átomos.

Para estudar sistemas com muitas moléculas, visando obter a correlação entre sistemas microscópicos (simulação molecular) e sistemas macroscópicos (experimental) os métodos de simulação mais utilizados são os de mecânica estatística, quais sejam *Monte Carlo* (estocástico) e *Dinâmica Molecular* (determinística).

### 2.1 Mecânica molecular e campos de força

Os métodos de mecânica molecular são de natureza empírica, portanto, seus parâmetros são ajustados para reproduzir dados determinados experimentalmente, como por exemplo, o calor de vaporização. Para isso utiliza-se um ensemble estatístico (NPT, neste trabalho) em que as condições nas quais ocorrem as simulações são mantidas constantes,

---

<sup>v</sup> **e, c, h, m:**, carga elementar, velocidade da luz no vácuo, constante de Planck, massa.

permitindo acessar um conjunto de microestados capaz de representar o macroestado desejado. O tratamento clássico, ao invés de quântico, em sistemas microscópicos é possível graças à aproximação de Born- Oppenheimer, que é baseada na diferença de tamanho entre prótons ( $m_p$ ) e elétrons ( $m_e$ ). Como  $m_p=1836 m_e$ , ou seja os elétrons podem se ajustar aos prótons mais rapidamente, sem influenciá-los diretamente, isso torna possível a determinação das energias potenciais por meio das posições moleculares ( já que não há, no caso clássico, a resolução eletrônica do sistema). Essa aproximação permite que seja associado ao sistema um campo de força empírico, que é, na realidade, uma função de energia potencial, que permite que a energia potencial total do sistema,  $V(r)$ , seja determinada de acordo com sua estrutura tridimensional.  $V(r)$  é descrito como a somatória de vários termos de energia, incluindo os termos para átomos ligados (comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros) e os termos para átomos não-ligados (interações de van der Waals e de Coulomb)<sup>64</sup>.

A portabilidade de campos de força é um fator determinante para a boa representação clássica de sistemas microscópicos, devendo ser parametrizados de acordo com o sistema que se deseja estudar. Em geral, um campo de força pode ser representado pela seguinte equação:

$$V_{\text{total}} = V_{\text{ligante}} + V_{\text{não-ligante}} \quad (1)$$

que pode ser escrito da seguinte maneira:

$$V_{\text{total}} = V_d + V_\theta + V_\varphi + V_{LJ} + V_c \quad (2)$$

onde:

$$\left. \begin{array}{l} V_d = \text{Potencial Harmônico Linear} \\ V_\theta = \text{Potencial Angular} \\ V_\varphi = \text{Potencial Torcional} \end{array} \right\} V_{\text{ligante}}$$

$$\left. \begin{array}{l} V_{LJ} = \text{Potencial de Lennard-Jones} \\ V_C = \text{Potencial de Coulomb} \end{array} \right\} V_{\text{não-ligante}}$$

### 2.1.1 Potenciais ligantes

- **Potencial Harmônico Linear ( $V_d$ )**

Representa a energia associada a variação na distância de ligação entre dois átomos ligados covalentemente, segundo a equação 3:

$$V_d = \frac{1}{2} k_d (d - d_0)^2 \quad (3)$$

Figura 9 – Potencial harmônico linear.



Fonte: Verli<sup>102</sup>

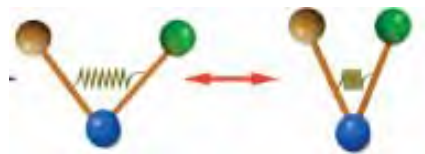
Onde,  $d$  é o comprimento de ligação entre dois átomos  $i$  e  $j$ ,  $d_0$  é o comprimento de equilíbrio, e  $k_d$  é a constante elástica da força.

- **Potencial Harmônico Angular ( $V_\theta$ )**

Representa a energia associada a variação dos ângulos de ligação entre três átomos ligados consecutiva e covalentemente, segundo a equação 4:

$$V_\theta = \frac{1}{2} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (4)$$

Figura 10 – Potencial harmônico angular.



Fonte: Verli<sup>102</sup>

Onde,  $\theta$  é o ângulo definido pelos átomos  $i$ ,  $j$ ,  $k$ ,  $\theta_0$  é o ângulo de equilíbrio, e  $k_\theta$  é a constante elástica da força.

- **Potencial Torsional**

Representa a energia associada a torção em uma das ligações covalentes onde quatro átomos encontram-se consecutivamente ligados,  $i,j,k,l$ , sendo gerado um potencial torsional em torno do eixo  $j,k$ , onde ocorre a torção. Esse potencial é dado pela equação 5:

$$V_{\varphi} = K_{\varphi} [ 1 + \cos(p\varphi + \delta) ] \quad (5)$$

Onde,  $K_{\varphi}$  é a constante de força,  $p$  é a periodicidade do potencial e  $\delta$  é a fase.

### 2.1.2 Potenciais não-ligantes

- **Potencial de Lennard-Jones**

Representa as energias decorrentes das interações por *van der Waals*, segundo a equação 6:

$$V_{ij} = 4\varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (6)$$

Onde,  $\varepsilon$  representa o mínimo de energia do poço de potencial (ponto em que ocorre a máxima interação entre os átomos),  $\sigma$  se refere à média aritmética dos raios dos átomos envolvidos no cálculo, e,  $r_{ij}$  simboliza a distância entre o átomo  $i$  da molécula  $a$ , e, o átomo  $j$  da molécula  $b$ , de forma que o argumento que está elevado a 12 refere-se ao potencial repulsivo que ocorre quando há sobreposição de densidade eletrônica com a aproximação dos átomos  $i$  e  $j$ . Já o argumento elevado a 6, descreve o potencial atrativo decorrente da formação de dipolos induzidos, instantâneos, originados por flutuações na densidade de carga eletrônica dos átomos.

- **Potencial de Coulomb**

Representa a energia associada às interações eletrostáticas entre os átomos, segundo a equação 7:

$$V_{elet} = \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_o r_{ij}} \quad (7)$$

Onde,  $r_{ij}$  simboliza a distância entre o átomo  $i$  da molécula  $a$ , e, o átomo  $j$  da molécula  $b$ ,  $q_i, q_j$  representam as cargas dos átomos  $i$  e  $j$  das moléculas  $a$  e  $b$ , respectivamente, e  $\varepsilon_0$  representa a constante dielétrica do meio.

A partir do modelo molecular é possível por meio da mecânica estatística, utilizando-se equações físico-matemáticas e um método adequado, obter propriedades macroscópicas do sistema. As equações que são utilizadas em geral dependem do *ensemble* utilizado no sistema em questão. Passa-se a seguir a uma descrição resumida dos métodos mais utilizados para estudo de líquidos, que utilizam conceitos de termodinâmica estatística.

## 2.2 Método Monte Carlo – Algoritmo de Metropolis

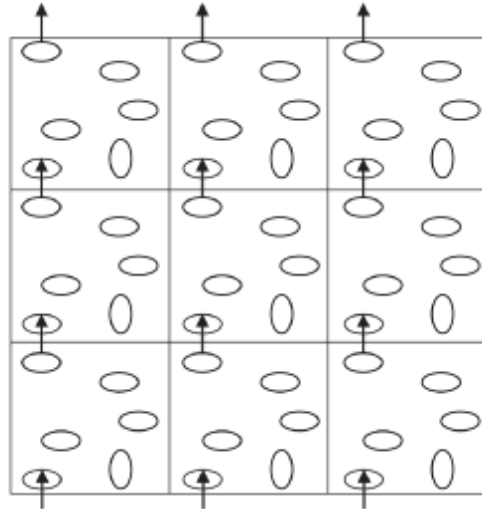
O método Monte Carlo, desenvolvido por Von Neumann, Ulam e Metropolis no fim da segunda guerra mundial, utilizado na ocasião para o estudo da difusão de nêutrons em materiais passíveis de fissão nuclear, é um método estatístico que permite o cálculo de integrais. Seu nome foi escolhido em razão da extensiva utilização de números aleatórios nos cálculos<sup>65</sup>, sendo que a denominação “Monte Carlo” remete a capital do principado de Mônaco, onde jogos que envolvem probabilidade são muito comuns.

O método Monte Carlo é amplamente utilizado para se fazer simulações computacionais envolvendo líquidos, sendo que por meio do algoritmo proposto por Metropolis e colaboradores<sup>66</sup> o sistema é descrito por funções de distribuição de probabilidades. Usualmente, inclusive no presente trabalho, é utilizada a função de distribuição de Boltzmann, que governa as populações dos níveis energéticos de um determinado sistema. Sendo assim, o método Monte Carlo simula o sistema por meio de amostragem aleatória da função de distribuição escolhida e calcula os valores médios das propriedades físicas desejadas. Nesse trabalho, foi utilizado o *ensemble* NPT, ou seja, número de átomos, pressão e temperatura constantes, para se fazer esses cálculos.

A simulação ocorre “dentro de uma caixa” que contém o número de moléculas que se deseja simular. A utilização do algoritmo de Metropolis viabiliza a utilização do método Monte Carlo por meio do conceito de probabilidade de *transição*, permitindo que seja simulado um sistema real com um número de moléculas extremamente reduzido, na ordem de centenas (utilizando-se a aproximação de imagem mínima). Isso é possível por meio das condições de contorno propostas pelo algoritmo, que implicam em replicar a caixa de simulação infinitamente no espaço, de forma que quando uma molécula se move na caixa central, suas imagens periódicas também se movem nas caixas replicadas, ou seja, caso uma molécula saia da caixa por um lado, outra entrará pelo lado oposto, eliminando os efeitos de superfície e mantendo o número de moléculas dentro da caixa constante, porém sem restrições de movimento devido aos limites da caixa (Fig.11).

No princípio da simulação, as moléculas são distribuídas num retículo cúbico de face centrada (Fig.12), então, uma molécula selecionada ao acaso tem sua posição modificada dentro da caixa por meio de movimentos rotacionais e *translacionais*.

Figura 11 – Simulação das condições de contorno utilizadas no método Monte Carlo.



Fonte: Costa e Ribeiro<sup>103</sup>

A partir desse ponto é calculada a variação de energia potencial da caixa,  $\Delta U_N$ , por meio da equação:

$$\Delta U_N = U_{N+1}(X^N) - U_N(X^N) \quad (15)$$

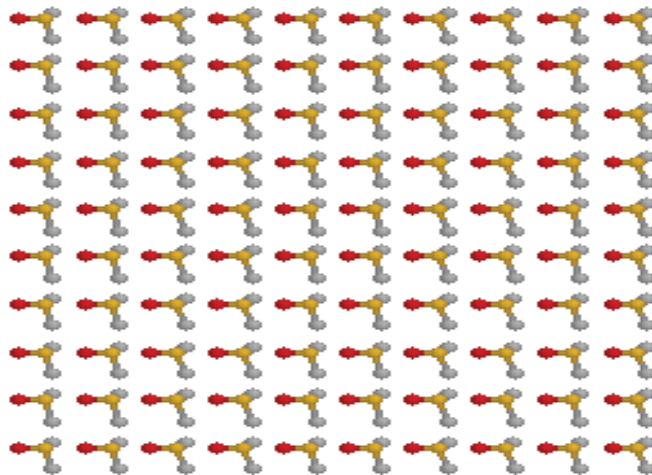
Onde  $X^N$  é a configuração molecular do sistema e  $N$  seu número de partículas.  $U_N(X^N)$  é definido como o trabalho requerido para trazer  $N$  moléculas infinitamente separadas para a configuração  $X^N$ . Uma vez que  $U_N(X^N)$  é uma função que depende da configuração de uma forma muito complexa, costuma-se utilizar algumas aproximações para torná-la mais “simples e prática”. Uma aproximação que é muito utilizada é a que tem sido chamada de aditividade de pares. Nesta aproximação,  $U_N(X^N)$  é escrita como a soma de  $U(X_i, X_j)$ . A função  $U(X_i, X_j)$  é chamada de potencial de pares, e representa o trabalho para trazer cada par de moléculas infinitamente separadas para a configuração  $(X_i, X_j)$ . Então, o potencial total  $U_N(X^N)$  é aproximado pela equação:

$$U_N(X^N) = \sum_{1 \leq i < j \leq N} U(X_i, X_j) \quad (16)$$

Caso a energia total da caixa diminua após o movimento molecular realizado, ou seja,  $\Delta U_N < 0$ , a nova configuração é mantida por representar melhor o sistema real do que a

configuração que a precedia, pois, de acordo com a distribuição de Boltzmann o estado de menor energia é favorecido. Porém, caso a nova configuração gerada tenha energia maior do que a anterior, ela não é automaticamente descartada, como se poderia imaginar. Ao invés disso, é gerado um número aleatório  $\varepsilon$  entre 0 e 1, o qual é, então, comparado com a função  $\exp[-\beta \Delta U_N (X^N)]$ . Caso  $\varepsilon < \exp[-\beta \Delta U_N (X^N)]$  a nova configuração é aceita, caso contrário a configuração anterior é retomada. Esse processo permite que configurações desfavoráveis do ponto de vista da energia potencial, mas que poderiam ser acessadas graças à energia cinética da molécula sejam consideradas. Após a definição de aceite ou não do movimento molecular aleatório dentro da caixa de simulação, outra molécula é escolhida ao acaso e o processo todo se repete até que a caixa esteja termodinamicamente equilibrada (Fig.13), de forma que os movimentos moleculares não causem mais uma variação significativa da energia potencial total do sistema. A variação de energia potencial que ocorre na caixa de simulação ao longo do método Monte Carlo é mostrada na Fig.14.

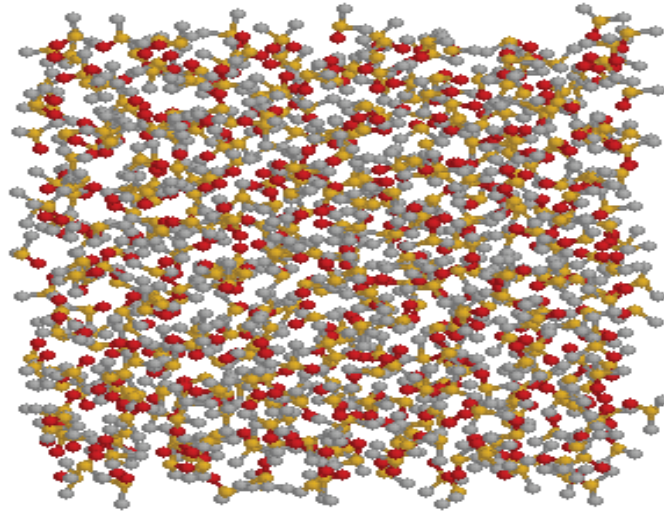
Figura 12 – Caixa de simulação com as moléculas no início da simulação



Fonte: Bosso<sup>100</sup>

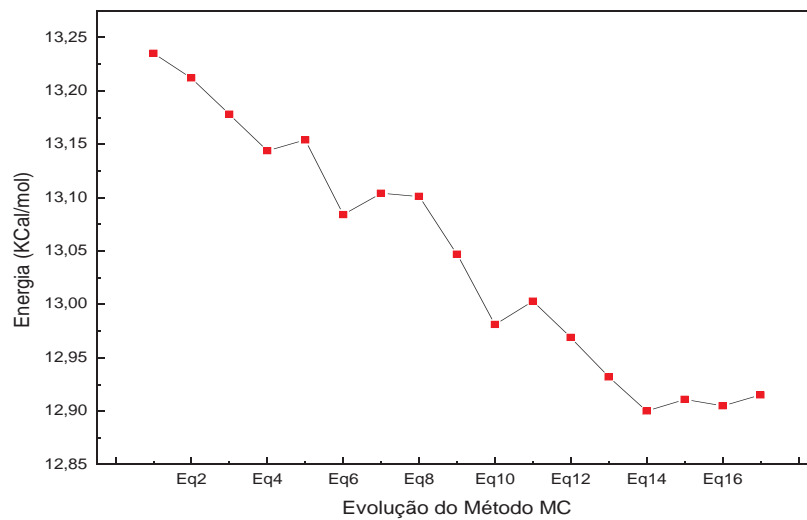


Figura 13 – Caixa de simulação termodinamicamente equilibrada.



Fonte: Bosso<sup>100</sup>

Figura 14 – Variação da energia potencial do sistema ao longo da simulação pelo método Monte Carlo.



Fonte: Bosso<sup>100</sup>

A função de energia potencial aplicada à simulação molecular neste trabalho é dada pelo potencial de pares, que considera apenas as interações intermoleculares por meio da soma dos potenciais clássicos de *Lennard-Jones* e *Coulomb*, segundo a equação 17:

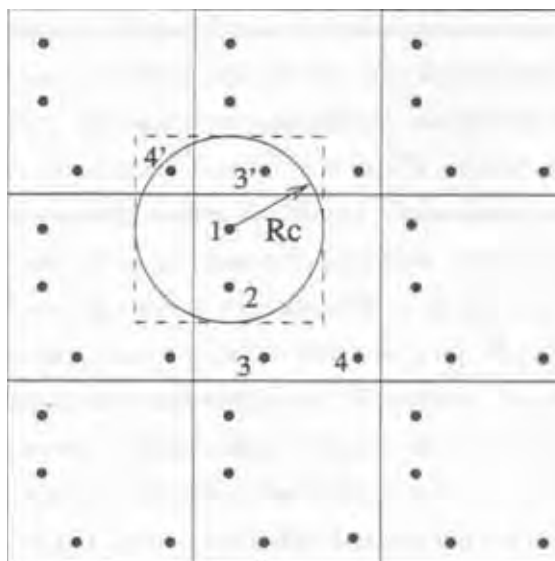
$$U_{ij} | X^N = 4\epsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (17)$$

Como não há uma mobilidade significativa das moléculas estudadas neste trabalho, elas podem ser consideradas rígidas sem que haja prejuízo aos resultados. Dessa forma, os termos do campo de força referentes a distorções nos comprimentos e ângulos de ligação não são considerados. Então, a simulação é feita calculando-se apenas os potenciais não-ligantes.

Porém, como as caixas são replicadas infinitamente, há a necessidade de se limitar o cálculo dessa energia, caso contrário haveriam infinitos termos a serem considerados o que tornaria os cálculos impraticáveis refletiriam uma periodicidade estrutural artificialmente criada. Para isso, são feitas duas aproximações:

- Raio de corte – Como a maior contribuição para o potencial intermolecular é devida aos vizinhos mais próximos da molécula de interesse, é introduzido um raio de corte ao redor desta (círculo na Fig.15), para que apenas as interações mais significativas sejam consideradas.
- É importante salientar que, para não haver a possibilidade da molécula interagir com sua própria imagem, ou, com uma mesma molécula duas vezes, o raio de corte deve ter uma magnitude máxima de  $L/2$ , onde  $L$  é o tamanho da aresta da caixa de simulação.
- Convenção de Imagem mínima – Escolhe-se aleatoriamente uma molécula que estará no centro de uma região do mesmo formato da caixa de simulação (área pontilhada na Fig.15), essa área de maior densidade molecular irá tangenciar os limites do raio de corte, indicando a região mais representativa para a realização dos cálculos.

Figura 15 – Representação do raio de corte e convenção de imagem mínima.



Fonte: Allen e Tildesley<sup>63</sup>

Por fim, por meio desse processo <sup>VI</sup>markoviano<sup>67</sup>, a caixa é equilibrada segundo a distribuição de probabilidade de Boltzmann utilizando-se o algoritmo de Metrópolis, e valores médios das propriedades físico-químicas do sistema provenientes da simulação computacional são calculados e comparados com os valores experimentais. Caso haja boa conformidade entre eles, passa-se a nova etapa, na qual são obtidas as propriedades estruturais da mistura.

### 2.3 Dinâmica molecular

Ao contrário do método Monte Carlo, onde as configurações são geradas aleatoriamente, e, portanto, as trajetórias moleculares não tem sentido físico, no método de Dinâmica Molecular cada molécula dentro da caixa de simulação apresenta uma trajetória definida por meio da evolução temporal do sistema, baseada nas integrais das equações clássicas de movimento de Newton.

Para isso é necessário que seja determinado o potencial total de interação das moléculas. Caso a molécula não seja considerada rígida, torna-se necessário a inclusão de potenciais referentes às vibrações moleculares, torções em ângulos de ligação e diédricos. Na maioria dos campos de força estas contribuições para o potencial total do sistema são representadas por funções harmônicas, tais como, estiramento de ligações e em ângulos de ligações, e, por série de Fourier, como as energias de torção de ângulos diédricos. Esse potencial, portanto, é dividido em partes, cada qual construída e parametrizada para representar aspectos da realidade física do problema. Esse potencial é determinado por meio da utilização do campo de força escolhido para o sistema, de acordo com o que foi explicado no item 2.1.

Uma vez definido o potencial total de interação por meio da utilização do campo de força escolhido para o sistema, é possível calcular as forças que agem sobre cada átomo a partir da derivada primeira dessa energia potencial em relação às posições desses átomos, segundo a equação:

(18)

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

---

<sup>VI</sup> **Processos Markovianos:** São processos onde estados futuros do sistema independem dos estados anteriores, desde que se conheça o estado presente deste.

Onde,  $F_i(t)$  é a força sobre o átomo  $i$  no instante  $t$ ,  $\partial V(r_1, r_2, \dots, r_n)$  é o potencial total de interação, e,  $r_i$  é a posição atômica do átomo  $i$ .

Dessa forma, a partir da força que age sobre um determinado átomo em um instante  $t$ , é possível saber qual é a aceleração que age sobre esse átomo nesse mesmo instante, de acordo com a equação de Newton:

$$F_i(t) = m_i a_i \quad (19)$$

Que também pode ser escrita na forma:

$$\frac{F_i(t)}{m_i} = \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} \quad (20)$$

Uma vez determinada a aceleração sobre cada partícula, e considerando que essa seja constante no intervalo de tempo entre  $t$  e  $t + dt$ , pode-se determinar sua velocidade a partir da integração das equações de movimento. Dessa forma, a partir da integração da velocidade, é possível calcular a mudança de posição de cada átomo. Sabendo-se as novas velocidades e posições para cada partícula, são obtidas as energias potenciais e cinéticas do sistema. Por fim, esse processo se repete ao longo de toda a simulação e o conjunto de diferentes velocidades e posições para cada átomo são armazenadas, gerando as trajetórias moleculares.

Nesse ponto, vale a pena ressaltar que, como não existe solução analítica para a resolução das equações de movimento, diferentes métodos numéricos são utilizados para se fazer essa integração.

É importante salientar que as mesmas condições periódicas de contorno explicadas para o método Monte Carlo são utilizadas na dinâmica molecular, uma vez que a caixa é igualmente replicada infinitamente a fim de eliminar os efeitos de superfície e aumentar o tamanho do sistema, o que implica também na necessidade de serem utilizados a convenção de imagem mínima e o raio de corte para o sistema.

## 2.4 Função de distribuição radial de pares

A função radial de pares,  $g(r)$ , é uma função de frequência, que indica a quantidade de átomos que se relaciona com o átomo de referência em função da distância radial do mesmo.

A equação que rege essa distribuição é dada abaixo:

$$g_{ij}(r) = \frac{N_{ij}(r, r + \Delta r)}{4\pi r^2 \Delta r \rho_j} \quad (21)$$

Onde  $r$  é a distância entre as partículas  $i$  e  $j$ ,  $N_{ij}(r, r + \Delta r)$  é o número médio de partículas  $j$  dentro da casca esférica de largura  $\Delta r$ , cujo centro está sobre a partícula de referência  $i$ , e  $\rho_j$  é a densidade numérica média de  $j$  na caixa de simulação.

A obtenção da função de distribuição radial de pares por meio da simulação é de extrema importância para a determinação estrutural do líquido, pois técnicas experimentais como a difratometria de nêutrons e de raios X esbarram na dificuldade de haverem distâncias de correlações que se sobrepõe, ou seja, mais de uma correlação contribui para a mesma banda, o que torna muito mais difícil a determinação do  $g(r)$  experimental.

## 2.5 Número de coordenação

Os picos das funções de distribuição radial representam as distâncias médias mais prováveis entre vizinhos. No caso de líquidos, são associados às camadas de solvatação. A integração da Eq.21 entre os mínimos correspondentes fornece estimativa do número de vizinhos, ou número de coordenação, segundo a equação abaixo:

$$N_{r_0} = \int_0^{r_0} 4\pi \rho_j r^2 g(r) dr \quad (22)$$

Onde,  $\rho_j$  é a densidade do líquido,  $r$  é a distância interatômica e  $r_0$  é a posição do primeiro mínimo.

## 2.6 Difratometria de Nêutrons

A evidência de existência de nêutrons foi anunciada por Chadwick em 1932, quando ele detectou que partículas ejetadas de diferentes núcleos após o bombardeamento com partículas  $\alpha$ , considerando-se a conservação da energia e do momentum, poderiam ser explicadas pela existência do nêutron, uma partícula sem carga com massa similar a do

próton, sendo que essa partícula obedeceria a <sup>VII</sup>dualidade onda-partícula proposta por de Broglie. A descoberta do nêutron e de sua produção implicou em diversos avanços tecnológicos, dentre eles a espectroscopia de nêutrons, desenvolvida pelo físico canadense Neville Brockhouse, o qual ganhou o prêmio Nobel da física em 1994 devido à descoberta.

A espectroscopia de nêutrons é obtida a partir da quantidade de energia perdida pelos nêutrons à medida que estes passam por meio da mostra, fornecendo informação da dinâmica dos átomos. Já a difratometria (técnica utilizada no presente trabalho), nos dá informações estruturais dos arranjos atômicos da amostra, por meio da medição das direções em que os nêutrons são espalhados quando atravessam a amostra.

Esses avanços permitiram a determinação estrutural e dinâmica de diversos materiais, inclusive, como no presente trabalho, de líquidos.

A grande vantagem da difração de nêutrons em relação a difração por raio-x, consiste no fato de que como os nêutrons interagem com os núcleos atômicos das moléculas da amostra, e não com sua eletrosfera (como ocorre na difração por raio-x), é possível determinar com excelente precisão a posição de átomos leves, como hidrogênio e deutério, além de permitir a distinção isotópica dos mesmos possibilitando a substituição isotópica na aplicação da técnica de EPSR (técnica de refinamento estrutural por potencial empírico) que será discutida na secção 2.7.

Os dados de difratometria de nêutrons apresentados neste trabalho foram coletados usando o difratômetro de nêutrons de baixo ângulo (SANDALS) do ISIS – Rutherford-Appleton Laboratory (Oxford-UK) o qual é voltado para o estudo de líquidos e sólidos amorfos.

Dessa forma, todo o protocolo que é descrito a seguir se refere à maneira com que a técnica é aplicada no ISIS. Informações mais técnicas do aparelho e toda a referência da parte que se segue sobre o assunto podem ser encontradas no manual do usuário<sup>68</sup>.

Para que seja possível a aplicação da difratometria de nêutrons é necessário que sejam seguidos sete princípios: produção dos nêutrons, diminuição da velocidade e termalização dos nêutrons por meio de um moderador, colimação dos nêutrons em feixe, preparação da amostra que causará a difração, presença de detectores para medir o padrão de “difração” gerado pelo espalhamento de nêutrons, armazenamento dos dados captados pelos detectores, e, um pacote de análise dos dados gerados.

---

<sup>VII</sup> **Dualidade Onda-Partícula:** Proposta pelo físico francês Louis –Victor de Broglie, se refere aos elétrons, afirmando que estes se comportam hora como onda, hora como partícula, dependendo da situação específica em que este se encontra.

### **2.6.1 Produção dos nêutrons**

A produção dos nêutrons se dá por meio da técnica de espalhamento, que consiste em se gerar um feixe de prótons de altíssima energia (500-800 MeV), para que quando esse feixe se choque com o núcleo do metal-alvo, sejam gerados estados nucleares excitados, que vão decair imediatamente, ou após alguns décimos de segundo, liberando partículas nucleares, como por exemplo, nêutrons. No caso do presente trabalho, em que foi utilizado o tungstênio como metal-alvo foram gerados cerca de 15 nêutrons por próton.

Para produção de nêutrons são necessárias, basicamente, três etapas, a primeira ocorre no injetor, onde são produzidos íons negativos de hidrogênio (um próton mais dois elétrons) utilizando-se descarga elétrica, os quais são acelerados e separados em feixes por intermédio da utilização de acelerador de radio frequência. Esses feixes são então acelerados por meio do linac (acelerador linear) que consiste de quatro tanques de dez metros contendo eletrodos de tubos tração feitos de cobre, ao final desse acelerador os feixes viajam a 37% da velocidade da luz.

A segunda etapa utiliza o síncroton, que consiste em um anel de poderosos ímãs com raio de 26m, os feixes acelerados pelo acelerador linear entram no síncroton e uma fina película de alumínio remove as cargas negativas dos feixes de  $H^-$ , resultando em feixes de prótons, esses são repetidamente acelerados por campos elétricos de radiofrequência dentro de dez cavidades de aceleração. Após aproximadamente dez mil voltas ao redor do síncroton os feixes de prótons ficam separados em feixes mais largos, viajando a uma velocidade equivalente a 84% da velocidade da luz, nesse momento cada feixe é retirado do síncroton por um poderosíssimo ímã que chega a cinco mil ampères em cem nano segundos, o processo todo se repete 50 vezes por segundo. Sendo assim, cada feixe retirado do síncroton viaja em direção ao metal-alvo, tungstênio.

A terceira etapa para produção de nêutrons pela técnica de espalhamento consiste no bombardeamento de uma série de placas grossas de tungstênio presas dentro de um recipiente com pressão pelos feixes de prótons com energia de 160kW.

### **2.6.2 Moderador**

Os nêutrons gerados pelo processo de espalhamento têm velocidades em média  $10^9$  vezes maiores do que as adequadas para que seja possível visualização dos efeitos da difratometria. Por esse motivo, são utilizados os denominados moderadores, que tem a função

de dispersar os nêutrons gerados, fazendo com que os nêutrons se choquem com as moléculas do próprio moderador diminuindo sua velocidade, ou seja, quanto mais denso for o moderador, mais efetivo ele será no papel de diminuir a velocidade dos nêutrons. É importante salientar que, apesar de se desejar uma diminuição significativa das velocidades dos nêutrons, há de se encontrar um moderador que consiga desempenhar seu papel sem comprometer os picos resultantes da difratometria.

Normalmente são utilizados quatro diferentes tipo de moderadores:

- Dois são compostos de água a 298K
- O terceiro é composto de metano a 100K
- O quarto é composto de hidrogênio a 20K

A quantidade de cada moderador é relativamente pequena, cerca de 0,5 L , sendo que estes são cercados por um refletor de berílio refrigerado a água, que é responsável por mandar os nêutrons de volta aos moderadores dobrando a capacidade de fluxo do material.

Essa etapa é toda monitorada por meio de câmeras e de vidros que servem como escudo contra a radiação, pois todos os componentes envolvidos se tornam altamente radioativos. Também por esse motivo, qualquer tipo de manutenção, substituição do metal-alvo ou do moderador é feita remotamente.

### **2.6.3 Colimação**

No caso da produção de nêutrons por meio do processo de espalhamento há um problema que precisa ser resolvido, como a energia com que o próton se choca com o tungstênio é muito alta, quando são liberados os nêutrons estes não possuem uma direção única, situação extremamente necessária para a aplicação da técnica de difratometria, então, quando saem dos moderadores esses nêutrons ainda se encontram “desorientados”, por esse motivo é necessário que seja feita a colimação, que consiste em alinhá-los na direção da amostra a ser estudada.

Para isso são utilizadas ceras ou resinas compostas principalmente de boro com altas taxas de ferro e hidrogênio.



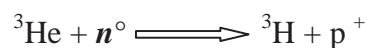
#### 2.6.4 Amostras

A amostra que se deseja estudar é normalmente colocada em uma cela, sendo que a montagem e o acondicionamento da amostra são cruciais para que as medidas de fator de estrutura sejam *precisas*, uma vez que o difratômetro é muito sensível a pequenas mudanças de posicionamento, na ordem de 1 mm. Essa sensibilidade advém das pequenas variações no final da trajetória de vôo e do ângulo de espalhamento, que podem ocorrer caso uma nova amostra seja colocada em posição diferente da primeira. Uma solução a esse problema, no caso de amostras que não estão sobre pressão, é a utilização de uma cela plana mais larga do que o feixe de nêutrons para conter a amostra. Nos casos em que a amostra deve estar sobre pressão é possível a utilização de uma cela cilíndrica.

Idealmente a cela deve ser feita puramente de materiais de espalhamento incoerente, tais como, vanádio ou materiais que apresentem uma pequena seção *transversal* elástica, como as ligas de titânio-zircônio. Caso não se faça uso desses materiais as refrações de Bragg vindas da cela podem ser difíceis de serem subtraídas completamente.

#### 2.6.5 Detecção dos Nêutrons

Os detectores de nêutrons são projetados para medir o fluxo de nêutrons produzidos em um experimento de difração. As respostas dos detectores são governadas pelo espectro de energia dos nêutrons incidentes. No caso do estudo de líquidos os detectores são mais sensíveis a nêutrons com menor velocidade, como o  $^3\text{He}$  utilizado no SANDALS, que consistem em tubos cilíndricos cheios de hélio pressurizado a aproximadamente 2.5 bar, onde os nêutrons são detectados por meio de uma reação p – n que ocorre da seguinte maneira:



Como o próton possui uma carga positiva, ele pode agir como um carregador de carga a fim de gravar eletronicamente o espalhamento que o nêutron sofreu ao passar pela amostra.

### 2.6.6 Armazenamento dos Dados

Para o armazenamento dos dados obtidos do experimento de difratometria de nêutrons, é utilizado um programa de aquisição de dados, que registra a atividade do nêutron rotulando o detector no qual foi registrada a atividade e o tempo de chegada do nêutron nesse detector. O relógio que registra o tempo de chegada é iniciado por meio de um pulso eletrônico que é gerado quando há o choque entre o feixe de nêutrons e a amostra, no laboratório em que foram realizados os experimentos esse evento acontece cinquenta vezes a cada segundo.

Uma vez gerado o rótulo, este é gravado na memória do computador e um histograma dos eventos pode ser feito. A partir desse momento, utiliza-se um programa para manipular e analisar os dados obtidos na difratometria de nêutrons.

### 2.7 EPSR – Refinamento estrutural por potencial empírico

O método de EPSR<sup>69-70</sup> (refinamento estrutural por potencial empírico) é utilizado para se gerar um modelo tridimensional a partir dos dados obtidos por meio da difratometria de nêutrons.

A partir da difratometria de nêutrons é obtida a função de fator total de estrutura,  $F(Q)$ , que é dada pela equação 23:

$$F(Q) = \sum_{\alpha \leq \beta} (2 - \delta_{\alpha\beta}) c_{\alpha} c_{\beta} b_{\alpha} b_{\beta} (S_{\alpha\beta}(Q) - 1) \quad (23)$$

A qual é definida em termos da magnitude do vetor de espalhamento,  $Q$ :

$$Q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta \quad (24)$$

Onde,  $\lambda$  é o comprimento de onda dos nêutrons incidentes e  $2\theta$  é o ângulo de espalhamento.

Essa função contém dados a respeito da correlação de pares dos átomos  $\alpha$  e  $\beta$ , refletindo a soma dos fatores parciais de potencial,  $S_{\alpha\beta}(Q)$ . Esses termos são ponderados de acordo suas respectivas concentrações,  $c_{\alpha}$  e  $c_{\beta}$ , e ângulos de espalhamento,  $b_{\alpha}$  e  $b_{\beta}$ , de cada tipo atômico<sup>23</sup>. Os fatores de estrutura, parcial e total, podem ser convertidos na função de distribuição de pares no espaço atômico real,  $g_{\alpha\beta}(r)$  por meio da transformação de Fourier ponderada pela densidade atômica,  $\rho$ :

$$(S_{\alpha\beta}(Q) - 1) = 4\pi\rho \int_0^{\infty} r^2 (g_{\alpha\beta}(r) - 1) \frac{\sin Qr}{Qr} dr \quad (25)$$

Onde,  $g_{\alpha\beta}(r)$  representa a correlação entre os pares de átomos no espaço real como função de sua separação,  $r$ , sendo uma das principais funções de interesse no estudo estrutural de líquidos e materiais desorganizados.

Assim, no princípio é feita uma simulação padrão por meio do método Monte Carlo<sup>71</sup> utilizando-se potenciais de referencia pré-existentes. A função de correlação de pares obtida por meio da simulação molecular é convertida em  $F(Q)$  e  $f(r)$  (que é obtida por meio da transformação direta de Fourier a partir do inverso de  $F(Q)$ ), e verifica-se a similaridade entre as funções  $F(Q)$  e  $f(r)$  obtidas por meio da simulação e por meio da difratometria de nêutrons.

Então, os potenciais moleculares utilizados previamente na simulação molecular são perturbados interativamente, e são gerados novos potenciais que tem como objetivo reproduzir da maneira mais fiel possível os dados obtidos pela função de fator estrutural total,  $F(Q)$ , advinda da difratometria de nêutrons. Essas perturbações são originárias da diferença existente entre os dados medidos por meio da difratometria de nêutrons e dos dados obtidos por meio da simulação por Monte Carlo com o uso dos parâmetros de potenciais de campo de força pré-estabelecidos. É importante ressaltar que os parâmetros inicialmente utilizados são os mesmos presentes no refinamento da estrutura, a diferença entre eles é devida apenas às perturbações sofridas com o intuito de se conseguir dados mais próximos daqueles obtidos experimentalmente, sendo que, quando há uma boa conformidade entre os valores de  $F(Q)$  e  $f(r)$  teóricos e experimentais, é então gerado por meio da simulação computacional o  $g(r)$  referente aos dados experimentais obtidos a partir da difratometria de nêutrons.

## 2.8 Metodologia

### 2.8.1 Teórico

Para se estudar a mistura NMF-ACT teoricamente, foi realizada simulações de mecânica molecular, utilizando-se o método de Monte Carlo, tanto para os líquidos puros (ACT e NMF), quanto para as diferentes concentrações de misturas (12.5%, 25%, 37.5%, 50%, 62.5%, 75%, 87.5 % de acetona em mistura com NMF). As simulações foram feitas em uma caixa cúbica contendo 400 moléculas, em que, sempre que dois sítios atômicos de

moléculas distintas se situassem a uma distância menor do que 11 ângstroms (um em relação ao outro) eram calculados o potencial de interação de pares (potencial de Lennard-Jones somado o potencial de Coulomb) entre essas moléculas, utilizando-se a equação 16. Métodos para incluir interações de Coulomb de longo alcance não foram utilizados baseando-se no fato de que correlações de pares, propriedades termodinâmicas de líquidos polares são insensíveis a forças de longo alcance dentro de um sistema<sup>72-73</sup>.

As simulações foram realizadas de acordo com o que foi descrito no item 2.4, sendo que, uma mudança no volume era tentada a cada 500 movimentos moleculares, e, os movimentos de *translação* e *rotação* das moléculas foram ajustados para que se conseguisse um aceite de novas configurações moleculares entre 0.40 e 0.45.

A fase de termalização da caixa foi feita por meio de  $2,4 \times 10^7$  configurações, que são descartadas, sendo que as médias foram calculadas durante mais  $2,4 \times 10^7$  configurações. As incertezas estatísticas foram calculadas em diferentes blocos de cálculos de médias de  $2 \times 10^5$  configurações.

Os parâmetros de campo de força utilizados para se fazer as simulações foram OPLS-aa otimizados, sendo que, para a NMF esses parâmetros foram otimizados em nosso laboratório, enquanto que para a acetona utilizamos os mesmos parâmetros otimizados por Ferrario et. al.<sup>52</sup>. Os valores referentes a esses parâmetros, e, as coordenadas moleculares utilizadas para que a molécula fosse representada de maneira correta são apresentados nos quadros 2, 3, 4 e 5.

**Quadro 2** – Parâmetros moleculares para ACT.

Sítio	$\Sigma$	$E$	q
C1	3.750	0.105	0.425
O2	2.960	0.210	-0.425
C(3,7)	3.500	0.066	-0.180
H(4,5,6,8,9,10)	2.500	0.02485	0.06

Fonte: Produção do próprio autor.

**Quadro 3** – Coordenadas moleculares para ACT.

Sítio	X	Y	Z
C1	-0.0278	0.2582	0.0937
O2	-0.1725	1.3901	0.5005
C3	-1.2148	-0.5675	-0.3687
H4	-1.9437	-0.6813	0.4654
H5	-1.7201	-0.0582	-1.2204
H6	-0.9024	-1.5827	-0.7026
C7	1.3384	-0.3991	0.0213
H8	2.1352	0.2907	0.3816
H9	1.5704	-0.6805	-1.0308
H10	1.3553	-1.3134	0.6567

Fonte: Produção do próprio autor.

**Quadro 4** – Parâmetros moleculares para NMF.

Sítio	$\Sigma$	$E$	Q
C1	3.75000	0.10500	0.340
N4	3.25000	0.14000	-0.700
O2	2.96000	0.21000	-0.460
H3	2.75000	0.03800	0.120
C6	3.20000	0.05000	0.105
H5	0.00000	0.00000	0.415
H(7,8,9)	2.35000	0.01700	0.060

Fonte: Produção do próprio autor.

**Quadro 5** – Coordenadas moleculares para NMF.

Sítio	X	Y	Z
C1	0	0	0
O2	-0.668	1.032	0
H3	-0.493	-0.984	0
N4	1.335	0	0
H5	1.812	-0.833	0
C6	2.1	1.23	0
H7	3.1862	1.0015	0
H8	1.8576	1.8278	-0.9032
H9	1.8576	1.8278	0.9032

Fonte: Produção do próprio autor.

### 2.8.2 Experimental

Os resultados teóricos provenientes da simulação por Monte Carlo para os solventes puros foram comparados com dados experimentais obtidos por meio da difratometria de nêutrons. Para ambos os casos, a difratometria foi realizada no SANDALS (difratômetro de nêutrons de baixo ângulo para materiais amorfos e líquidos) no ISIS em Rutherford no

laboratório de Appleton, Reino Unido. Esse aparelho concentra seus detectores de nêutrons em ângulos de difração ( $2\theta$ ) abaixo de  $40^\circ$ , o que ajuda a reduzir o recuo nuclear quando os nêutrons são espalhados por materiais contendo hidrogênio. Para facilitar a extração direta das correlações estruturais intermoleculares foram coletados dados de três diferentes amostras, a primeira continha cem por cento dos seus átomos de hidrogênios mantidos na estrutura nativa da molécula; a segunda apresentava todos os átomos de hidrogênio substituídos por átomos de deutério, e, a terceira amostra apresentava uma mistura de 50% de moléculas do solvente contendo deutérios e 50% das moléculas com os hidrogênios nativos de suas estruturas (processo que será explicado melhor a frente).

Os procedimentos utilizados para obtenção e espalhamento dos nêutrons são os mesmos explanados no item 2.6, sendo que, os dados do espalhamento foram analisados utilizando-se comprimentos de onda entre  $0,075 \text{ \AA}$  e  $3,5 \text{ \AA}$  sobre a correspondente variação de  $Q$  para cada conjunto de dados de  $0,1 \text{ \AA}^{-1}$  e  $30 \text{ \AA}^{-1}$ .

Após a obtenção dos dados provenientes da difratometria de nêutrons, foi então realizado o refinamento estrutural por potencial empírico (EPSR), onde os potenciais moleculares utilizados para se realizar a simulação molecular (quadros 3 e 5) foram perturbados de forma que houvesse a maior similaridade possível com os dados provenientes da difratometria de nêutrons (conforme explanado no item 2.7). Com esses novos potenciais foram geradas novas simulações moleculares que nos forneceu uma nova correlação de pares para os líquidos puros (NMF e ACT).

Nesse processo, para que houvesse mais parâmetros de comparação (aumentando assim a confiabilidade dos dados) foram estudados em cada líquido três diferentes composições, baseadas na substituição isotópica dos átomos de hidrogênio por átomos de deutérios. Uma composição original, contendo todos os átomos de hidrogênio nativos de sua estrutura, uma composição onde houve substituição da metade dos átomos de hidrogênio por átomos de deutério, e, uma composição onde todos os átomos de hidrogênio foram substituídos por átomos de deutério. Como há uma grande diferença no comprimento do espalhamento de nêutrons entre os átomos de hidrogênio ( $-3,74 \text{ fm}$ ) e deutério ( $6,77 \text{ fm}$ )<sup>23</sup> diferentes  $F(Q)$  e  $f(r)$  são gerados para cada composição, e, uma vez que os potenciais moleculares são ajustados por refinamento para uma composição, caso eles reproduzam também as outras duas composições de forma correta, há uma grande possibilidade dos parâmetros refinados serem os mesmos encontrados experimentalmente nos líquidos puros, o que dá suporte para que se faça a simulação molecular possibilitando que seja acessado teoricamente dados que não podem ser determinados experimentalmente. No entanto, vale

ressaltar que o método EPSR não reproduz, necessariamente, a única interpretação dos dados experimentais, sendo desta forma apenas um modelo que concorda com os dados obtidos experimentalmente<sup>69-70, 74-75</sup>.

## Capítulo 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Análise estrutural

A seguir serão apresentados e discutidos primeiramente os resultados relativos a parte estrutural dos líquidos puros NMF, ACT, e mistura desses nas diferentes concentrações estudadas.

#### 3.1.1 *N-metilformamida*

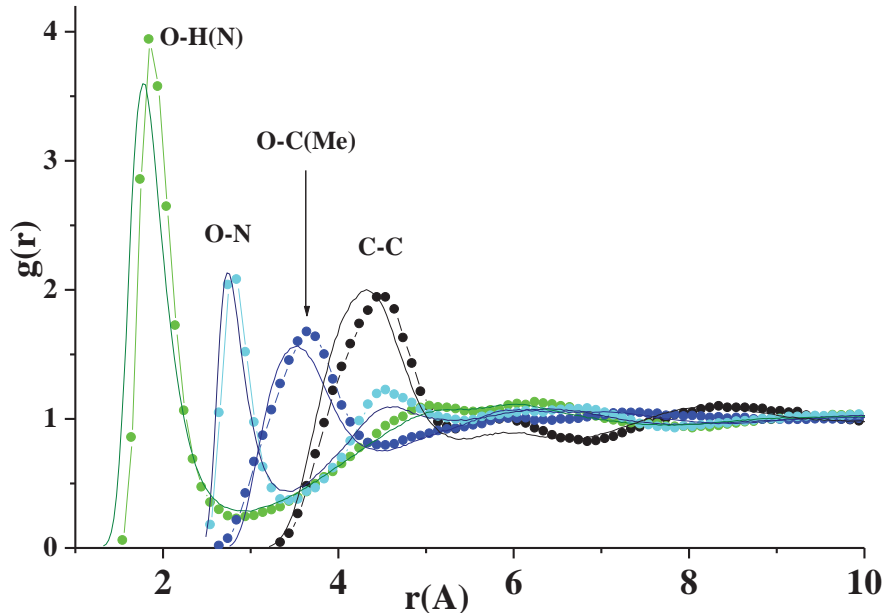
Na Fig.16 está representada a qual foi obtida a partir de dois diferentes métodos. Teoricamente, por meio da simulação computacional baseada no método Monte Carlo, e, experimentalmente por meio da difratometria de nêutrons com substituição isotópica<sup>74, 76-79</sup> e posterior refinamento utilizando-se refinamento estrutural por potencial empírico (EPSR)<sup>80-84</sup>.

A amplitude dos picos apresentados nos gráficos indica a probabilidade de se encontrar a ligação estudada (indicada pela legenda) na distância correspondente do eixo x (distância radial em ângstroms dos átomos envolvidos na ligação), ou seja, à distância na qual há maior amplitude do pico indica o local de maior probabilidade de se encontrar a correlação indicada.

A largura dos picos representa a mobilidade dos átomos envolvidos na ligação estudada e, portanto, a intensidade das interações intermoleculares, ou seja, quanto menor a largura de um determinado pico, menor será a mobilidade e mais intensa será a interação intermolecular dos átomos envolvidos na correlação.



Figura 16 – Funções radiais de pares derivadas de cálculos por EPSR (linhas) e por simulações de Monte Carlo (círculos) para NMF. O símbolo (H)N representa o hidrogênio ligado ao nitrogênio e o C(Me) é o carbono do grupo metil.



Fonte: Produção do próprio autor.

Como se pode notar, o comparativo entre os dois gráficos mostra que o modelo de NMF utilizado para fazer as simulações por Monte Carlo neste trabalho se mostrou capaz de reproduzir de forma muito satisfatória a estrutura do líquido, apesar dos resultados experimentais mostrarem que os átomos estão um pouco mais próximos uns dos outros no líquido do que no modelo teórico. Porém essas diferenças são irrelevantes para todos os propósitos práticos da presente análise. É importante notar que além de reproduzir muito bem a média de distribuição das moléculas no líquido, o modelo teórico utilizado também reproduz muito bem a interação entre essas moléculas, fato que pode ser inferido, por exemplo, com a boa conformidade entre os valores de densidade e de entalpia de vaporização, que são respectivamente iguais a,  $1,00\text{g/cm}^3$ , e,  $13,77\text{ Kcal/mol}$  (experimentais), e  $1,000 \pm 0,007\text{ g/cm}^3$  e  $13,72 \pm 0,01\text{ Kcal/mol}$  (teóricos).

De acordo com o gráfico da função radial de pares obtido para a NMF pode-se inferir que se trata de um líquido bem estruturado, pois possui uma prevalência de picos agudos e bem definidos que se formam a relativamente baixos valores de  $r$  (eixo x).

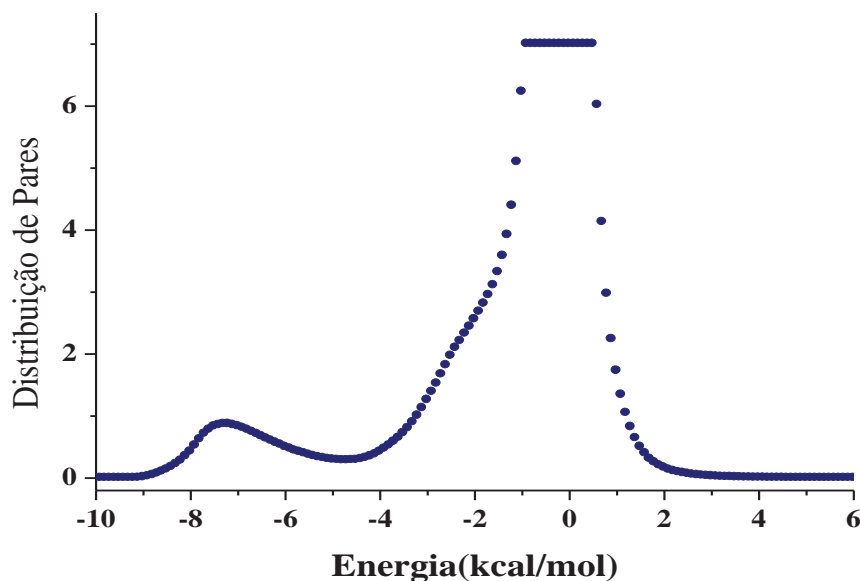
A correlação O-H(N) que tem seu pico por volta de 1,8 ângstroms indica interação por ligação de hidrogênio, que ocorre entre o oxigênio de uma molécula de NMF, com o hidrogênio ligado ao nitrogênio de uma molécula vizinha<sup>85</sup>. Outra correlação que sugere a

formação de ligação de hidrogênio entre as moléculas de NMF é a O-N que tem seu pico em aproximadamente 2,8 ângstroms o que indica que os átomos O-H(N)-N são praticamente colineares (uma vez que a distância entre H(N)-N é aproximadamente 0,96 ângstroms). Dessa maneira, os valores obtidos para a distância O-H(N) e para o ângulo O-H(N)-N concordam com aqueles que são usualmente aceitos para caracterizar ligações de hidrogênio: O-H(N) tendo uma distância entre 1.2 e 2.2 ângstroms, e, O-H(N)-N com ângulo entre 130° e 180°<sup>85</sup>. Esses resultados concordam com o que é encontrado na literatura, tanto experimentalmente, quanto teoricamente, que têm relacionado os altos valores das propriedades termodinâmicas da NMF, como a constante dielétrica, momento de dipolo, ponto de ebulição e calor de vaporização, a ligações de hidrogênio presentes na estrutura do líquido<sup>23</sup>, como discutido anteriormente. Ainda nessa linha de raciocínio pode-se observar que correlações extremamente repulsivas, por terem átomos com cargas de mesmo sinal, como (C-C) e (O-N) também apresentam picos bem definidos, o que indica que as ligações de hidrogênio intermoleculares formadas no líquido são suficientemente fortes para mantê-las unidas, formando uma estrutura multimolecular rígida.

Sendo assim, levando em consideração que do ponto de vista do gráfico de  $g(r)$ , o modelo teórico foi capaz de reproduzir a estrutura do líquido, pode-se utilizar esse modelo para explorar mais a fundo as interações intermoleculares.

Como ponto de partida foi plotado o gráfico de distribuição de energia de pares ao longo da simulação para as correlações intermoleculares, como é mostrado abaixo.

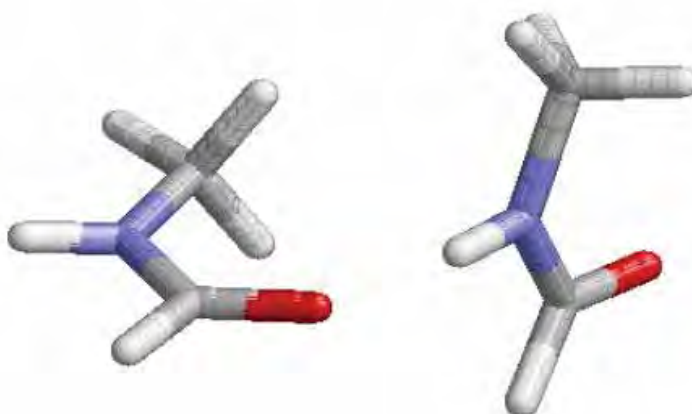
Figura 17 – Distribuição de energia de pares da simulação das moléculas de NMF líquida.



Fonte: Produção do próprio autor.

Em um primeiro momento nota-se que a energia entre os pares é significativamente mais negativa do que em outros solventes orgânicos polares, como o etanol, por exemplo<sup>86</sup>, e a forma bimodal da curva apresentada no gráfico é característica de líquidos que apresentam interação por ligações de hidrogênio, como já foi discutido na literatura<sup>85,87</sup> (a comparação com o mesmo gráfico para a acetona que é feita mais a frente neste trabalho ilustra bem essa questão). Essa constatação indica, assim como o  $g(r)$  sugeria, um líquido bem estruturado. Dessa maneira, como na simulação por Monte Carlo as interações moleculares são representadas pelo potencial de pares, foi feita uma busca na caixa de simulação para que fosse encontrado o dímero estatisticamente mais representativo no líquido. O dímero encontrado está representado abaixo:

Figura 18 – Geometria do dímero estatisticamente mais representativo no líquido. Alguns dos parâmetros geométricos são: ângulo (N-H-O) = 169°,  $r(\text{H-O}) = 1,81 \text{ \AA}$ ,  $r(\text{N-O}) = 2,76 \text{ \AA}$ ,  $r(\text{C-C}) = 4,47 \text{ \AA}$ ,  $r(\text{O-C(Me)}) = 3,7 \text{ \AA}$ ,  $r(\text{O-H(C)}) = 3,44 \text{ \AA}$ .

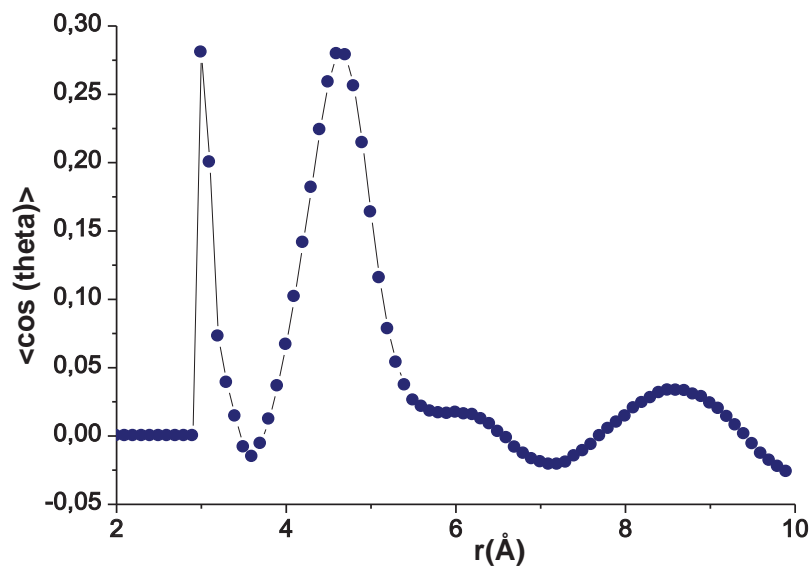


Fonte: Produção do próprio autor.

Nota-se uma concordância marcante entre as distâncias dos átomos no dímero representado na Fig.18 e as distâncias referentes ao gráfico de  $g(r)$  representado na Fig.16 reafirmando os valores de ângulo N-H-O, e, distância de ligação O-H(N) que são aceitos na literatura para a caracterização das ligações de hidrogênio, como discutido acima, o que vem reforçar a idéia de um líquido com moléculas interagindo entre si por ligações de hidrogênio, resultado que já tinha sido alcançado anteriormente por meio de outras abordagens<sup>23</sup>. Vale ainda ressaltar que a distância O-H(C=) é 3,44 Å, o que permite relacioná-la a uma ligação de hidrogênio fraca, de acordo com o critério amplamente utilizado na literatura<sup>40</sup>, e, dizer que essa interação está desempenhando um papel importante na estrutura desse dímero em particular, e conseqüentemente, no líquido como um todo. Outros aspectos sobre esse dímero analisados por meio de cálculos *ab initio* presentes na literatura<sup>32</sup>.

Para que fosse possível obter mais detalhes sobre as interações intermoleculares, o gráfico de correlação de dipolo-dipolo entre as moléculas foi plotado com  $\langle \cos\theta \rangle$  em função da distância entre C-C, representado na Fig.19, onde  $\theta$  é o ângulo entre o momento de dipolo de duas moléculas que estão sendo consideradas. Como se pode notar, a correlação de dipolo segue um padrão que concorda de forma marcante com as correlações C-C plotadas no  $g(r)$ , Fig.16: há uma correlação de dipolo muito forte para as distâncias C-C entre 3 Å e 5 Å, com as moléculas orientadas de certa forma que os ângulos de dipolos se orientam entre si por volta de  $73^\circ$ . É importante ressaltar a concordância entre este ângulo e aquele formado entre as moléculas do dímero estatisticamente mais estável (Fig.18). Esse comportamento sugere a formação de uma camada de solvatação com elevada estruturação e deve estar relacionado com o ombro notado no gráfico da distribuição de energia de pares em aproximadamente -2 kcal/mol. A distâncias maiores as moléculas adotam uma configuração mais perpendicular.

Figura 19 - Correlação dipolo-dipolo média em função da distância C-C, onde teta é o ângulo entre os momentos dipolo de duas moléculas de NMF que estão sendo consideradas.



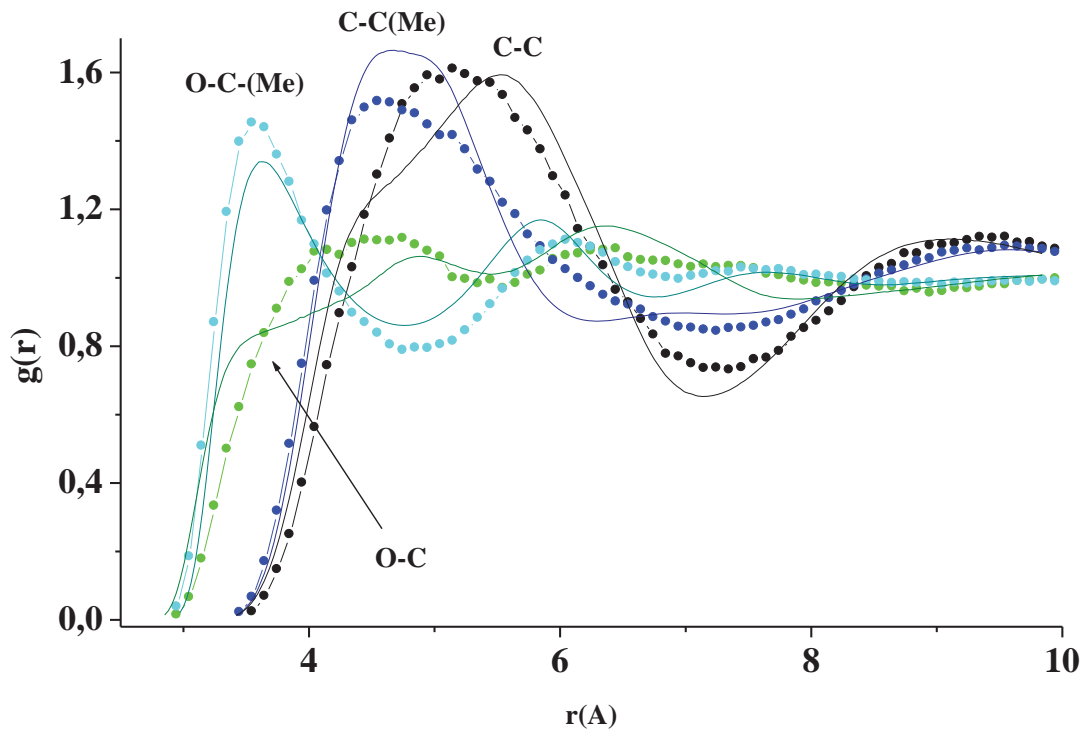
Fonte: Produção do próprio autor.

### 3.1.2 Acetona

A abordagem feita para acetona seguirá a mesma linha de raciocínio considerada para a NMF. Dessa maneira, a figura apresentada abaixo mostra o gráfico de função radial de pares do modelo teórico do líquido, obtido a partir da simulação computacional utilizando-se o método Monte Carlo, e, sobreposto a este, outro gráfico de função radial de pares, porém,

obtido a partir da difratometria de nêutrons com substituição isotópica<sup>59</sup> e refinamento de estrutura por meio do método EPSR.

Figura 20 – Funções radiais de pares derivadas de cálculos por EPSR (linhas) e por simulações de Monte Carlo (círculos) para ACT. Onde, C(Me) é o carbono do grupo metil.



Fonte: Produção do próprio autor.

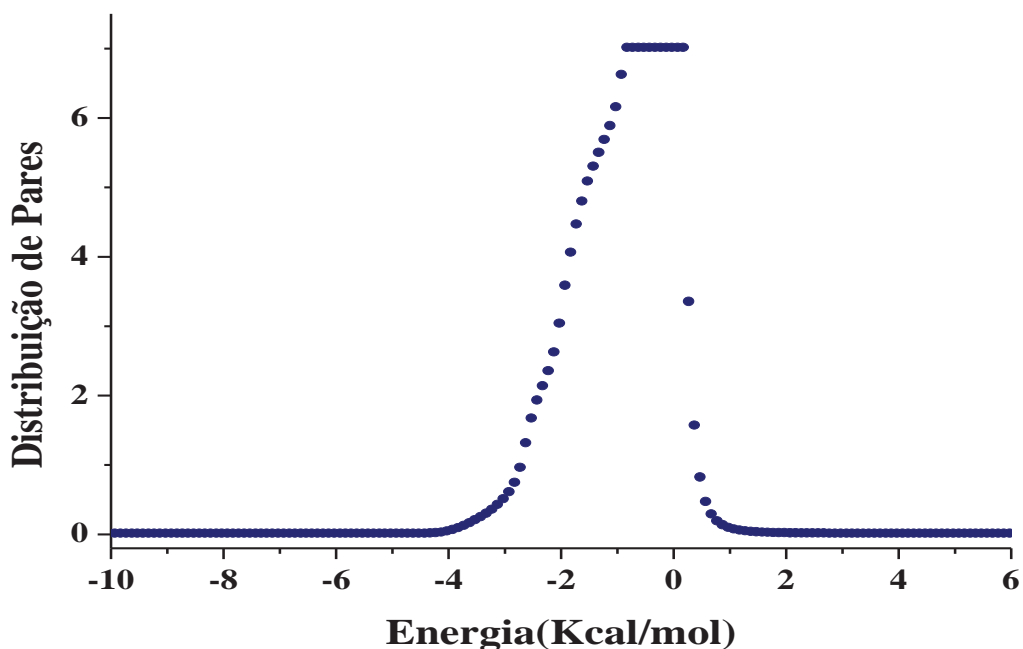
Neste caso, nota-se que a concordância entre o modelo teórico e o experimental não é tão boa quanto a encontrada para a NMF (o que pode ser consequência de seu menor grau de estruturação), mas em geral também se mostra satisfatória. O modelo teórico da acetona falha em representar a estrutura mais fina do líquido, responsável pelos “ombros” encontrados nas curvas experimentais, porém as diferenças são suficientemente pequenas para que se possa esperar que os resultados obtidos a partir da simulação computacional reproduzam bem o comportamento do líquido. A favor deste argumento tem-se a excelente concordância entre os valores, respectivamente, experimentais e teóricos da densidade  $0,78 \text{ g/cm}^3$  e  $0,776 \pm 0,006 \text{ g/cm}^3$ , e, do calor de vaporização  $7,78 \text{ Kcal/mol}$  e  $7,74 \pm 0,01 \text{ kcal/mol}$ .

De forma geral, nota-se que a acetona apresenta picos de menor amplitude, maior largura, e, formados a distâncias maiores de  $r$  dos que encontrados na NMF. Isso indica que a acetona é um líquido muito menos estruturado. O primeiro pico aparece apenas a 3.5

ângstroms, que ocorre entre os sítios atômicos O-C(Me). Essas observações sobre as curvas de  $g(r)$  confirmam o que é encontrado na literatura, que indica uma baixa entropia de vaporização para a maioria dos líquidos orgânicos<sup>88-90</sup>, ao contrário do que ocorre com líquidos orgânicos que têm a possibilidade de formar ligações de hidrogênio, como é o caso da NMF<sup>87,91-92</sup>.

Assim, considerando que o modelo teórico é capaz de reproduzir a estrutura do líquido com uma confiabilidade satisfatória, os resultados obtidos da simulação computacional são úteis para se entender mais a fundo aspectos das interações intermoleculares encontradas na acetona. Como feito acima, para a NMF, começamos a análise a partir da distribuição de energia de pares ao longo da simulação para as correlações intermoleculares, mostrado abaixo:

Figura 21 – Distribuição de energia de pares da simulação das moléculas de acetona líquida.

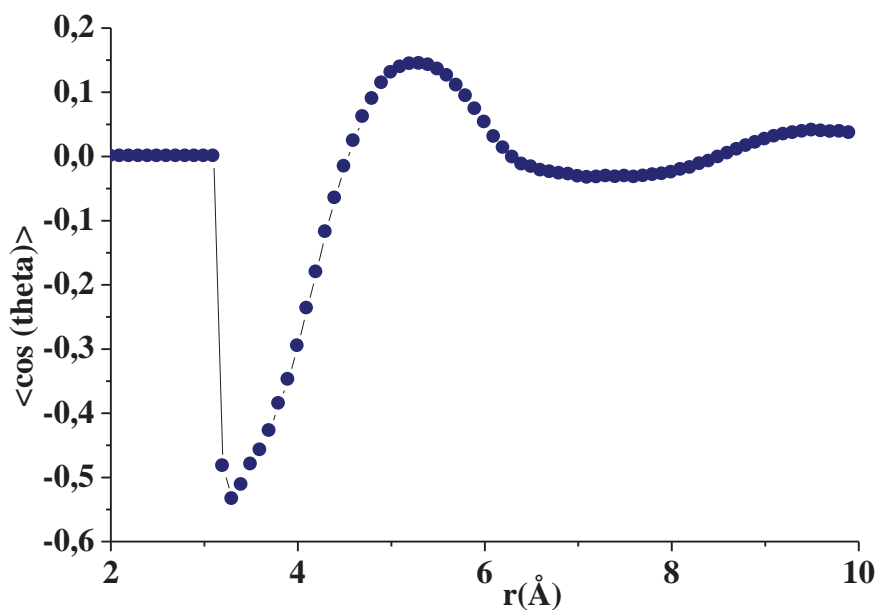


Fonte: Produção do próprio autor.

A distribuição de energia é mais estreita e as espécies mais estáveis não são tão atrativas quanto às encontradas no líquido NMF. As ondulações no lado esquerdo da curva sugerem que as moléculas estão ligadas em diferentes direções ao longo do líquido, o que concorda plenamente com o que se verifica nas bandas do gráfico de  $g(r)$ , Fig.20, sugerindo fortemente uma estrutura pouco organizada do líquido.

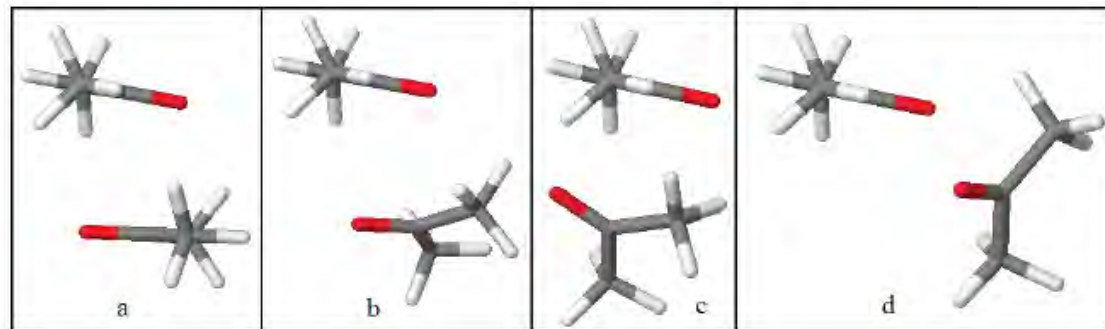
Aqui, vale chamar a atenção para o fato de que o gráfico não apresenta a forma bimodal encontrada no NMF, isso porque neste caso não há ligações de hidrogênio. Outro fator relevante em relação a Fig.21 é o fato da banda de distribuição de pares começarem a aparecer apenas em valores superiores a -4 kcal/mol, contrastando com o que se observou no líquido NMF. Devido a esse comportamento não cabe, neste caso, buscar pelo dímero mais estável dentro da caixa de simulação, uma vez que não existiria um dímero preponderante, mas sim, um conjunto de dímeros mais comuns. Esse comportamento é claramente refletido na forma da curva da Fig.22 de correlação dipolo-dipolo entre as moléculas em função da distância C-C. Nesse gráfico é possível observar bandas muito mais largas do que as apresentadas no líquido NMF, uma clara consequência do espalhamento nas correlações moleculares. Sendo assim, ao invés de procurar o dímero mais estável estatisticamente no líquido, fez-se uma busca em seis diferentes distâncias definidas entre C-C, pelos dímeros mais representativos nessas curtas distâncias. Foram coletados então seis diferentes dímeros, um para cada distância, mostrados na quadro 6 com os respectivos ângulos entre os momentos de dipolo para cada um. A Fig.23 mostra os quatro primeiros desses dímeros a mérito de ilustração.

Figura 22 – Correlação média de dipolo-dipolo em função da distância C-C. Onde teta é o ângulo entre os momentos dipolos das duas moléculas de acetona consideradas.



Fonte: Produção do próprio autor.

Figura 23 – Geometria dos dímeros de acetona em função da distância C-C. Dímeros a, b, c e d correspondem às distâncias C-C listadas nas quatro colunas da direita, na quadro 6, respectivamente.



Fonte: Produção do próprio autor.

**Quadro 6** – Os ângulos entre os momentos dipolo para os dímeros ACT-ACT obtidos pela simulação nas distâncias C-C mostradas no quadro.

Distância(Å)	4-5	4.5-5.5	5-6	5.5-6.5	6-7	6.5-7.5
Ângulo(graus)	172.0	160.0	156.5	130	106	45

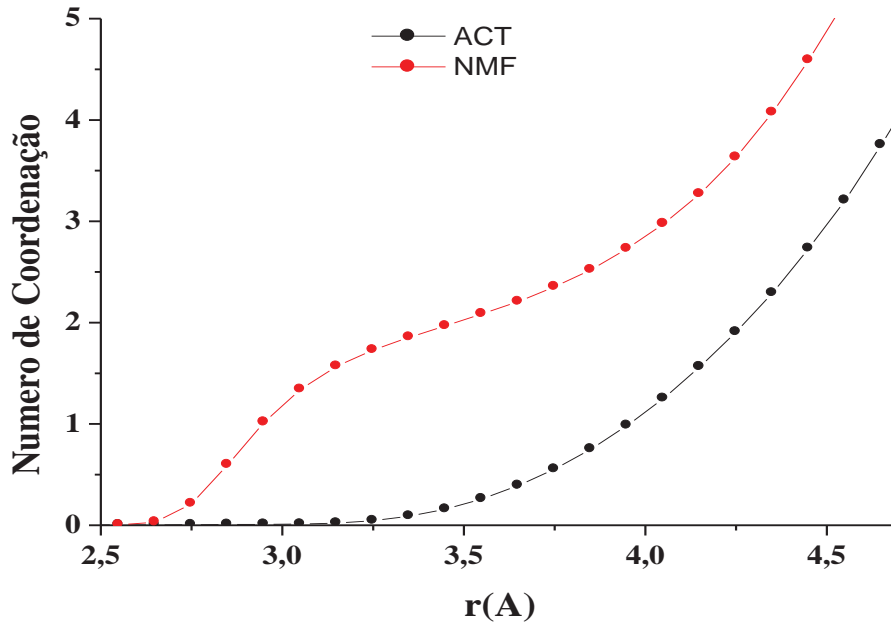
Fonte: Produção do próprio autor.

Fica claro pelas análises dos dados apresentados, que as moléculas têm uma correlação de dipolo antiparalela em distâncias curtas, enquanto que á medida que a distância vai aumentando as correlações entre os momentos de dipolo vão ficando mais paralelas, caracterizando um alinhamento cabeça-cauda. Esse tipo de comportamento é característico de líquidos com interações guiadas por meio de correlações por dipolos. É exatamente esse comportamento que foi evidenciado pela difratometria de nêutrons<sup>59</sup>. Essa concordância entre os resultados mostra, mais uma vez, a capacidade do modelo molecular teórico em representar a estrutura do líquido de maneira satisfatória.

Para finalizar apresenta-se na Fig.24 o gráfico de número de vizinhos em função da distância para acetona e NMF. É notável, da simples observação dos gráficos, a diferença de estruturação dos líquidos. Na NMF nota-se um platô para  $r$  entre 3,25 e 4 Å, clara conseqüência de uma bem estruturada camada de solvatação, enquanto que a acetona apresenta o clássico aumento “exponencial” do número de vizinhos em função da distância, característico de líquidos com pouca estruturação. Corroborando essa observação, a integral da correlação O-C até o primeiro ponto de mínimo em  $g(r)$ , é igual a 12, que é o número que se obtém para uma distribuição de esferas não interagentes, o que, mais uma vez, confirma a pouca estruturação da acetona na fase líquida.



Figura 24 – Número de coordenação para os líquidos ACT e NMF. Correlação O-H(N).



Fonte: Produção do próprio autor.

### 3.1.3 Mistura ACT – NMF

Considerando a análise feita até aqui para os líquidos puros, depreende-se que as ligações de hidrogênio (fracas e fortes) presentes na NMF fazem com que este seja muito mais organizado do que a ACT, justificando os valores termodinâmicos apresentados para ambos os líquidos no quadro 1. Dessa maneira, uma vez que a análise dos resultados teóricos permite uma boa confiabilidade no modelo, passa-se à simulação de misturas dos dois líquidos em 7 diferentes concentrações, indo de 12,5% até 87,5% de acetona na mistura, variando em 12,5% entre cada concentração.

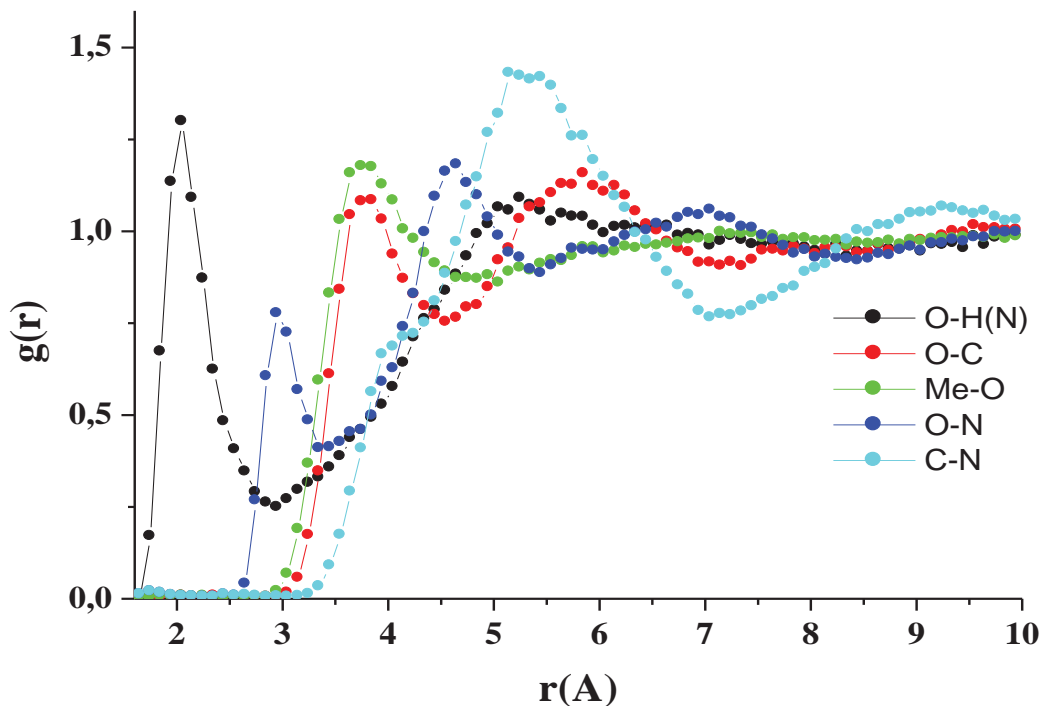
Os resultados obtidos são apresentados a seguir:

Primeiramente, como feito para os líquidos puros, foi plotado o gráfico de distribuição radial de pares da mistura NMF-ACT, com concentração de 50% (Fig.25). A escolha desta concentração se dá pelo fato do número de moléculas presentes na mistura ser igual, implicando em uma composição que representa satisfatoriamente o comportamento médio da mistura em todo intervalo de concentração. A amplitude e largura das bandas mostradas no gráfico sugerem que a mistura apresenta uma estrutura com organização maior do que a encontrada no líquido puro acetona, porém, menor do que a encontrada no líquido puro NMF. A correlação que desempenha o papel principal na estruturação da mistura ocorre

entre o oxigênio da acetona e o hidrogênio ligado ao nitrogênio da N-metilformamida, tendo seu pico por volta de 2 ângstroms, o que sugere que haja uma interação por ligação de hidrogênio entre os dois líquidos. Ainda a favor desse argumento pode-se observar a correlação O-N que tem seu pico por volta de 3 ângstroms, que indica que os átomos O-H(N)-N são praticamente colineares, uma vez que a distância de ligação O-N é de 0,96 ângstroms, dessa maneira, como no caso do líquido puro NMF, tanto o valor relativo à distância de ligação O-H(N), quanto ao ângulo entre os átomos O-H(N)-N estão dentro dos valores aceitos para caracterizar a ligação de hidrogênio<sup>85</sup> como discutido anteriormente. Esse tipo de interação entre os dois líquidos vai ao encontro do que se esperava, considerando o que está estabelecido na literatura, uma vez que o grupo C=O presente na acetona funciona como acceptor de prótons, e poderia formar ligações de hidrogênio com líquidos que tenham grupos doadores de prótons, como é o caso da NMF.

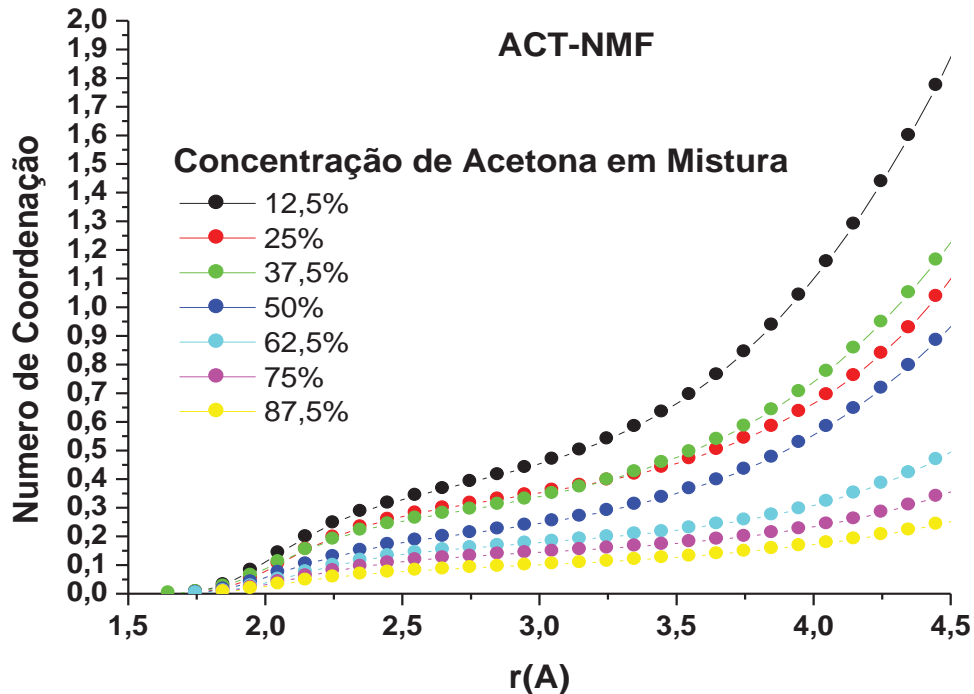
Para entender melhor essa interação, apresenta-se na Fig.26 o gráfico de número de vizinhos em função da distância para a correlação O-H(N) entre os líquidos acetona e NMF.

Figura 25 – Distribuição radial de pares para a mistura NMF-ACT. Concentração de Mistura-50%.



Fonte: Produção do próprio autor.

Figura 26 – Número de vizinhos em função da distância para a correlação O-H(N) entre os líquidos ACT e NMF em 7 diferentes concentrações, que indica o número de ligações de hidrogênio formadas entre ambos.



Fonte: Produção do próprio autor.

Como se observa a correlação apresenta o platô característico de um líquido estruturado, sendo que, o número de vizinhos correspondente ao platô representa o número de ligações de hidrogênio entre ACT e NMF. Todavia, observa-se que na concentração 50%, o número de ligações de hidrogênio formado é de apenas aproximadamente 0,25 ponte por molécula. Daí pode-se concluir que há uma pequena tendência à formação de ligações de hidrogênio entre ACT e NMF, uma vez que, ao que tudo indica, as moléculas de NMF estão, preferencialmente, ligadas entre si. Este aspecto voltará a ser discutido mais à frente.

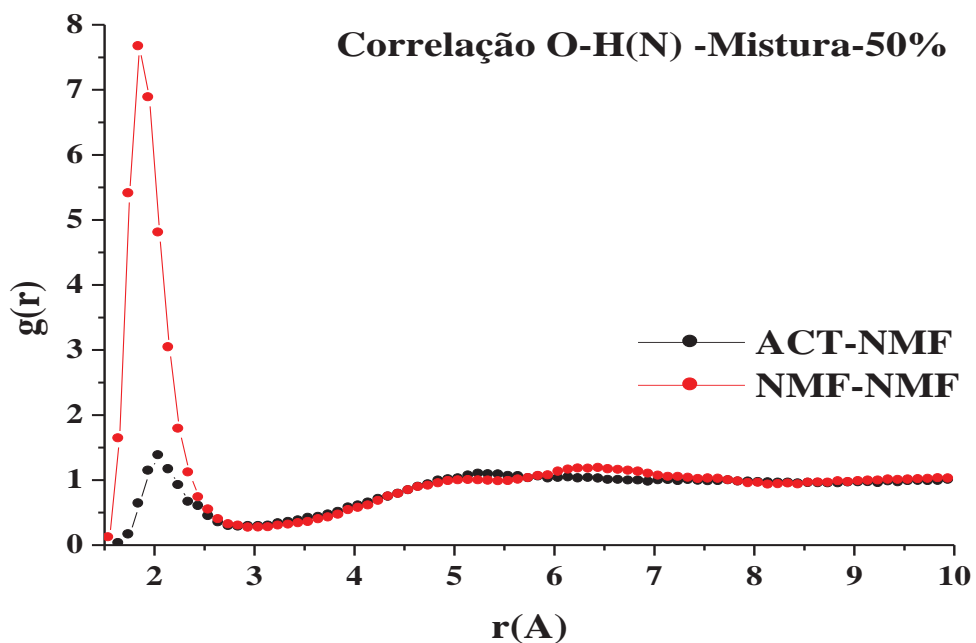
Ainda com respeito aos gráficos da Fig.25, os picos correspondentes às demais correlações apresentam bandas mais largas e são menos intensas, o que indica uma perda na organização molecular na mistura.

De acordo com as análises feitas acima, a correlação que se mostrou mais importante na estruturação, tanto do líquido NMF puro, quanto da mistura NMF-ACT, foi a O-H(N). Dessa maneira, uma questão que se levanta, e que já foi rapidamente comentada acima, é: qual seria a tendência maior para formação de interações por ligações de hidrogênio, ou seja, uma vez feita a mistura, as moléculas de NMF que antes estavam ligadas entre si por meio de ligações de hidrogênio tenderiam a continuar unidas por essa interação, ou elas teriam uma

tendência maior de se correlacionarem por meio de ligações de hidrogênio com as moléculas de acetona, que estão presentes na mistura. A resposta a esta pergunta é fundamental para entendermos o possível papel que acetona viria a desempenhar como solvente para uma determinada proteína.

A fim de obter subsídios para tentar esclarecer essa questão foi plotado o gráfico de distribuição radial de pares para a concentração de 50% de acetona em mistura, sobrepondo as curvas O-H(N) relativas às interações NMF-NMF, e, NMF-ACT. O gráfico está mostrado na Fig.27.

Figura 27 – Correlação radial de pares, O-H(N), entre moléculas NMF-NMF, e, NMF-ACT.

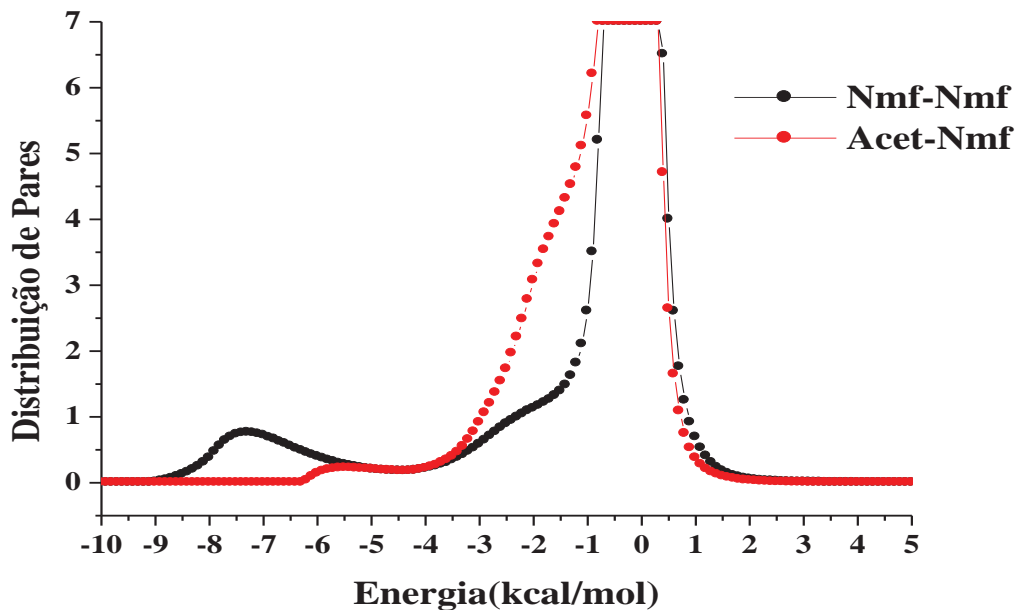


Fonte: Produção do próprio autor.

Segundo o que se pode inferir desse gráfico, a correlação O-H(N) é muito mais frequente entre as moléculas de NMF, do que entre as moléculas de acetona e as moléculas de NMF, pois mesmo estando em mesma proporção dentro da mistura, a probabilidade de se encontrar uma molécula de NMF interagindo com outra molécula de NMF por meio de ponte hidrogênio é maior do que encontrar uma molécula de acetona interagindo com uma molécula de NMF. Tal fato é sugerido devido a maior amplitude do pico correspondente a interação O-H(N) das moléculas NMF-NMF. Uma vez que foi observada uma maior frequência de ligações de hidrogênio para os dímeros NMF-NMF, do que para os dímeros NMF-ACT, foi plotado o gráfico apresentado na Fig.28, que mostra a distribuição de energia de pares em

função da distância entre as moléculas, para que, por meio da sobreposição da energia de interação envolvida nos dímeros NMF-NMF e NMF-ACT ficasse mais claro o porquê dessa tendência.

Figura 28 – Distribuição de energia de pares, NMF-NMF e NMF-ACT. Concentração de mistura-50%.

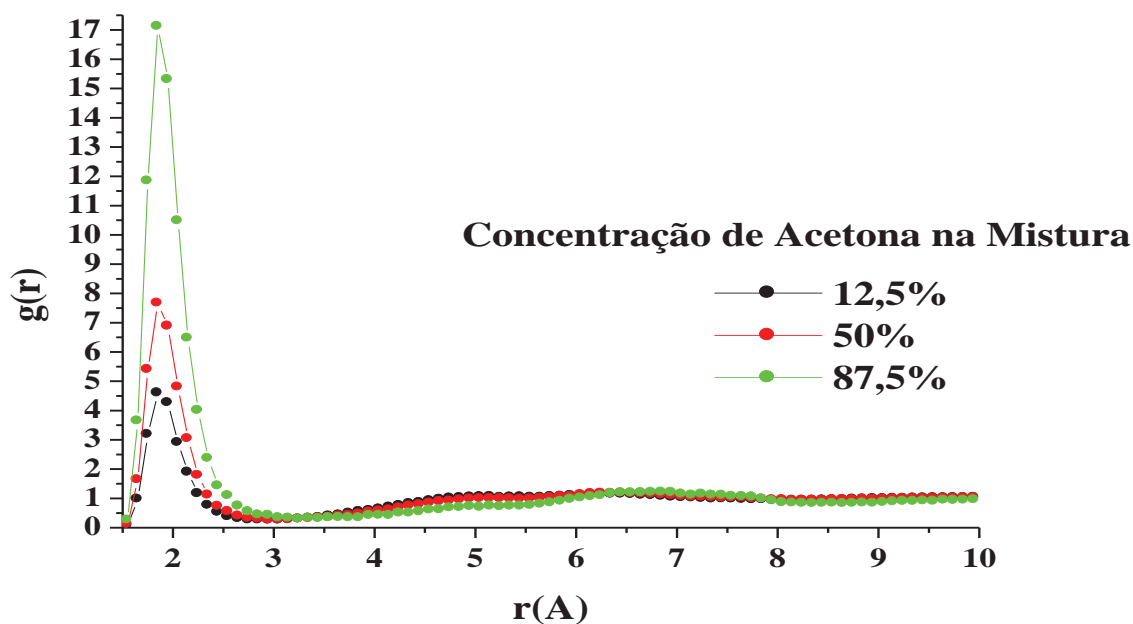


Fonte: Produção do próprio autor.

A forma bimodal da curva apresentada no gráfico acima é característica de líquidos que apresentam ligações de hidrogênio<sup>88, 92</sup> e o resultado mostrado concorda com o que foi inferido da Fig.27, indicando que as ligações de hidrogênio encontradas entre as moléculas de NMF são mais atrativas do que as encontradas entre moléculas de NMF-ACT: -7,5 kcal/mol nos dímeros NMF-NMF, contra -5,8 kcal/mol nos dímeros NMF-ACT, resultando em uma maior frequência dos primeiros na mistura. Observa-se na Fig.28 que há um ombro do lado esquerdo da principal banda de energia, que, menor no líquido NMF, se acentua na mistura. Esse comportamento é explicado pela diferença nas forças de interação que estruturam os líquidos, como na mistura NMF-ACT as interações são predominantemente dipolo-dipolo há, conseqüentemente, maior variabilidade nas forças de interação. O que se percebe é que enquanto que o número de pares NMF-NMF é maior a energias muito negativas, devido a maior energia de interação relacionada às ligações de hidrogênio, à medida que a energia se aproxima do valor mais provável, é maior o número de pares NMF-ACT.

Seguindo a mesma linha de raciocínio, para que fosse possível entender qual o efeito de solvente resultante da adição de acetona no líquido NMF, foi feito um gráfico de  $g(r)$  que relaciona a ligação O-H(N) entre as moléculas de NMF, em três diferentes concentrações (Fig.29).

Figura 29 – Função radial de pares, correlação O-H(N) entre moléculas NMF

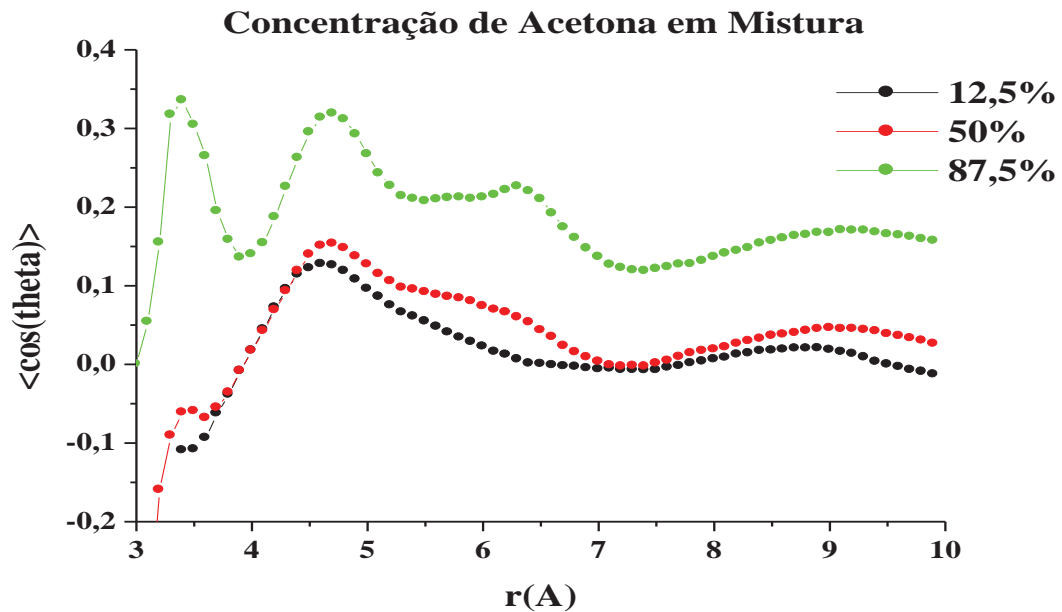


Fonte: Produção do próprio autor.

É possível observar, na figura acima que com o aumento da concentração de acetona na mistura há também um aumento da intensidade dos picos de ligações de hidrogênio entre as moléculas de NMF, o que indica um efeito tipo solvofóbico (por analogia com hidrofobicidade) das moléculas de acetona em relação às moléculas de NMF, pois mesmo havendo menos moléculas de NMF na mistura à medida que se adiciona acetona, a probabilidade relativa de se encontrar moléculas de NMF interagindo por meio de ligações de hidrogênio aumenta significativamente. Cabe ressaltar, no entanto, que esta explicação deve ser encarada com bastante cuidado uma vez que as amplitudes em  $g(r)$  dependem também do tamanho das moléculas e, portanto, a comparação não é tão direta assim.

Ainda tendo como foco os efeitos de solvente da acetona sobre a NMF em solução, mostra-se a seguir a Fig.30 na qual está plotado o gráfico de correlação entre os momentos de dipolo NMF-ACT.

Figura 30 – Correlação de dipolo-dipolo entre moléculas de NMF-ACT.

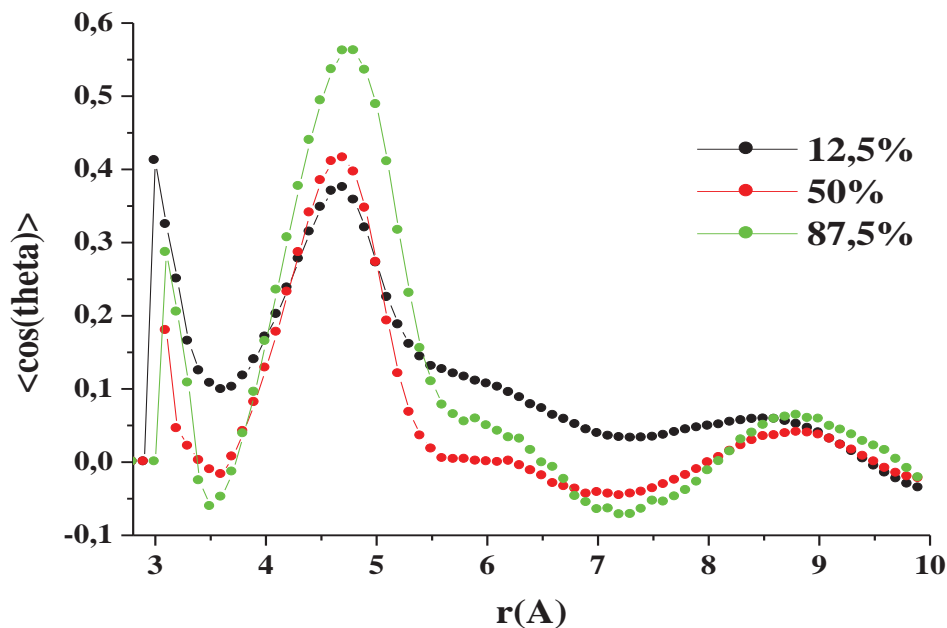


Fonte: Produção do próprio autor.

A Fig.30 mostra que há dependência entre os ângulos dos dímeros formados e a concentração da mistura, o que reforça o caráter solvofóbico da acetona em relação à NMF, que foi constatado na Fig.29, pois fica claro que com a adição de acetona, em NMF, os dímeros começam a se formar a distâncias menores (por volta de 3,4 ângstroms) além de irem formando uma segunda camada de solvatação, que se estabelece na mistura com concentração de acetona igual a 87,5 % na distância de 4,7 ângstroms, o que indica uma maior estruturação do líquido. É importante salientar que a orientação dipolo-dipolo entre os dímeros das duas camadas de solvatação permanecem iguais, cerca de 81°.

Na Fig.31 apresenta-se o gráfico para a correlação de dipolos entre as moléculas de NMF em 3 concentrações distintas.

Figura 31 – Correlação de dipolo-dipolo entre moléculas de NMF-NMF



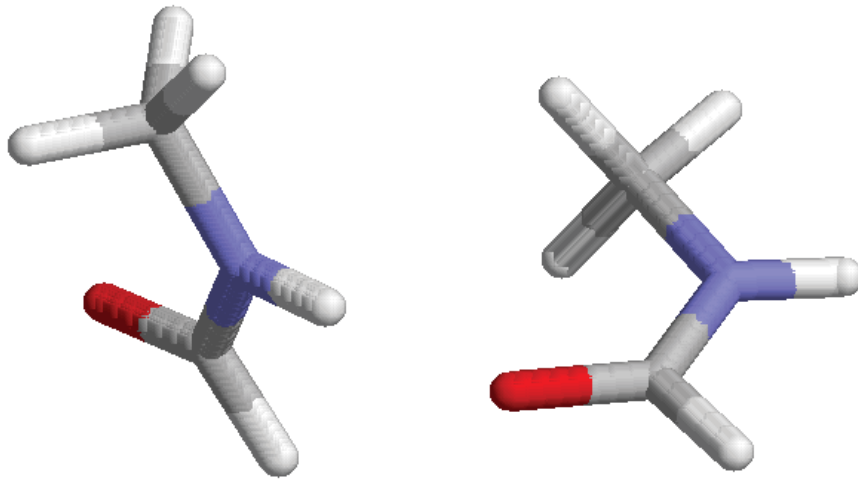
Fonte: Produção do próprio autor.

Fixando a atenção apenas nas bandas verificadas em 4,5ângstroms, nota-se que à medida que se adiciona acetona na mistura o ângulo entre os momentos de dipolo dos dímeros NMF-NMF variando de 73°(ângulo entre os dímeros do líquido NMF puro, Fig.14) até 53° (87,5% de acetona em mistura, mostrado na figura acima) indicando que a orientação molecular muda de mais perpendicular para mais paralela, assumindo uma configuração mais cabeça-cauda. Essa mudança no ângulo de interação não é, no entanto, uniforme. A variação no ângulo de correlação é maior quanto maior for a concentração de acetona. Esse fenômeno é observado também entre os dímeros de NMF-ACT (Fig.30). Infere-se, neste ponto, que o caráter denaturante protéico dos solventes “hidrofóbicos” citado na introdução<sup>4</sup> pode se dar, em parte, em função dessa mudança de ângulo entre as moléculas do solvente e da proteína imersa neste. O que implicaria em uma mudança nos ângulos das moléculas formadoras da cadeia primária protéica, desorganizando sua estrutura, podendo chegar a denaturá-la, de acordo com a concentração desse solvente no meio.

Por fim, para nos certificarmos que as correlações entre os átomos de O-H(N) são de fato ligações de hidrogênio, encontramos o dímero estatisticamente mais representativo da interação NMF-NMF dentro da mistura 50% por meio de uma busca pela caixa de simulação que está mostrado na Fig.32.



Figura 32 – Dímero NMF-NMF estatisticamente mais representativo. Concentração de Mistura-50%.

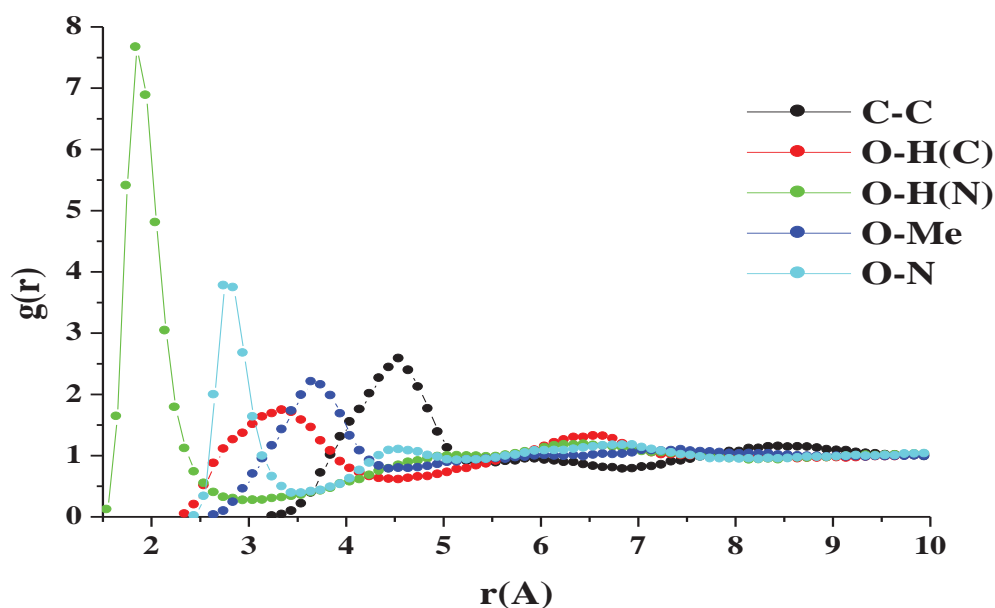


Fonte: Produção do próprio autor.

A distância da correlação  $O\cdots H(N)$  apresentada pelo dímero é de 1,83 ângstroms e a distância entre a correlação  $O\cdots N$  é de 2,79 ângstroms, a diferença entre ambas é 0,93 ângstroms, o que significa dizer que o ângulo  $N - H\cdots O$  é muito próximo a  $180^\circ$ , pois a distância de ligação entre o  $N-H$  é de 0,96 ângstroms. Esse ângulo medido no dímero mostrado é  $167^\circ$ . Dessa maneira, os valores obtidos para a distância  $O\cdots H$  e para o ângulo  $N - H\cdots O$  concordam com aqueles que são usualmente aceitos para caracterizar ligações de hidrogênio:  $O\cdots H(N)$  tendo uma distância entre 1,2 e 2,2 ângstroms e  $N - H\cdots O$  com ângulo entre  $130^\circ$  e  $180^\circ$ <sup>59</sup>.

Para nos certificarmos que o dímero gerado como sendo estatisticamente o mais representativo da correlação NMF-NMF na mistura de concentração 50% representa as configurações estruturais obtidas por meio das funções radiais de pares calculadas, segue abaixo o gráfico de  $g(r)$  referente às correlações interatômicas dessa interação na concentração em questão.

Figura 33 – Função radial de pares- NMF-NMF. Concentração de mistura-50%.



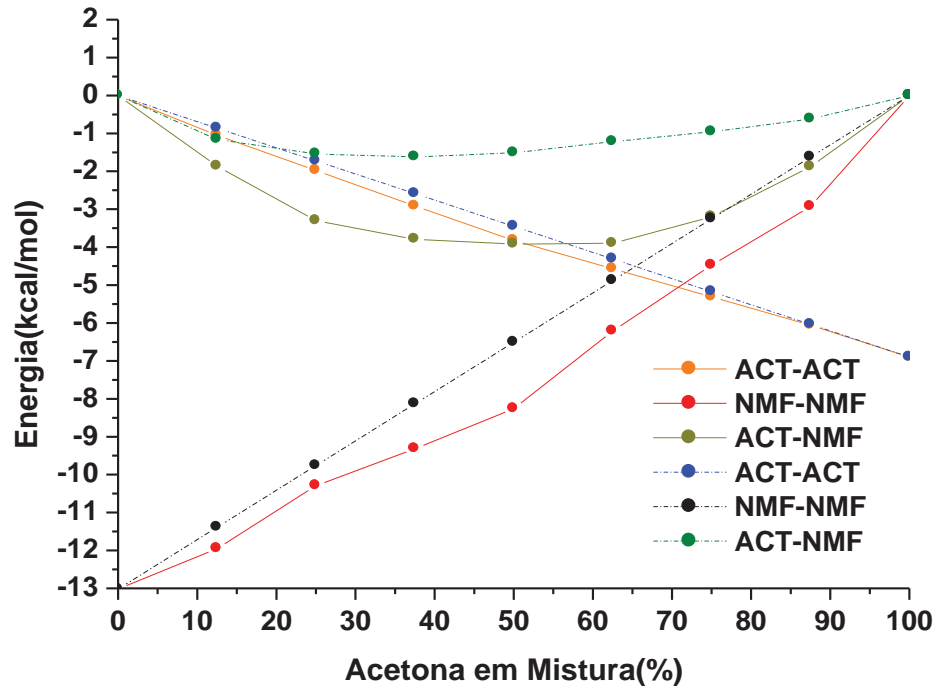
Fonte: Produção do próprio autor.

A comparação entre as distâncias dos átomos do dímero gerado (Fig.32) e do  $g(r)$  correspondente (Fig.33) são marcantes, além dos valores comparados na discussão da Fig.32, medimos também as correlações O-H...C (3,33 ângstroms) e O-C(Me) (3,8 ângstroms), o alto índice de correspondência entre ambos dá credibilidade às inferências feitas nos parágrafos anteriores baseados nos gráficos de distribuição radial de pares.

### 3.2 Análise Termodinâmica

A partir deste ponto, passar-se-á ao estudo teórico da termodinâmica do sistema. Como primeiro passo para que pudéssemos entender seu comportamento, foi gerado o gráfico de energia de interação molecular em função da concentração de ACT para as diferentes concentrações de misturas estudadas no trabalho, o resultado obtido pode ser observado na Fig.34:

Figura 34 – Energia de interação molecular em função da concentração de ACT em mistura.



Fonte: Produção do próprio autor.

Para que ocorra uma mistura, é necessário que haja a separação das moléculas dos líquidos puros, o que implica na realização de um trabalho e, posteriormente, a junção das moléculas dos diferentes líquidos entre si. A energética dessas três interações pode ser representada graficamente como se pode ver na Fig.34. Esse tipo de gráfico é obtido graças à equi-partição da energia e só pode ser acessado teoricamente, uma vez que experimentalmente só é possível determinar a energia total da mistura e não a energia envolvida na interação entre as diferentes moléculas presentes na mistura.

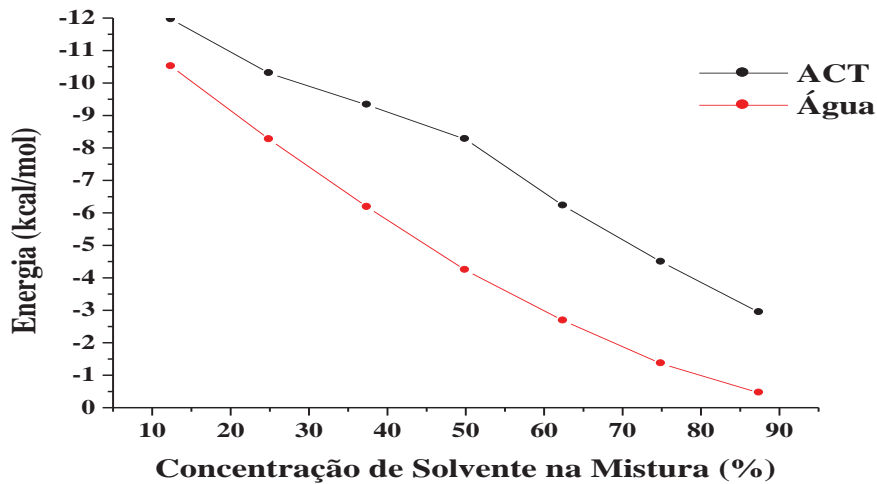
No gráfico, as linhas tracejadas representam o comportamento ideal. Já as linhas preenchidas, representam a energia de interação calculada, que ocorreu nas misturas realizadas.

A seguir serão analisadas as três diferentes energias de interação existentes no sistema, ACT-ACT, NMF-NMF, e, NMF-ACT. Como se pode notar, as moléculas de acetona apresentam energias de interação inferiores às da NMF. Esse comportamento já era esperado tendo em vista as propriedades dos dois líquidos apresentadas no quadro 1. Os valores listados no quadro deixam claro que as interações entre as moléculas da acetona são mais fracas do que as entre as moléculas da NMF, conforme já se discutiu na análise estrutural dos

líquidos puros. Ponto que merece destaque são os desvios encontrados em relação à idealidade nos líquidos, a ACT se comporta quase que idealmente ao longo da mistura, apresentando apenas um discreto aumento em sua energia de interação (valor mais negativo), o que indica que a presença das moléculas de NMF não influencia a “força” de interação entre as moléculas de ACT. Para a NMF, no entanto, observa-se um desvio muito mais acentuado. Esse aumento na energia de interação poderia ser atribuído a um certo efeito solvofóbico gerado pela adição de ACT na mistura, pois, com essa adição as moléculas de NMF tendem a se correlacionarem ainda mais fortemente entre si (conforme se pode observar na Fig.29), implicando neste desvio acentuado da energia de interação das moléculas de NMF constatado no gráfico acima. Por fim, a mistura apresenta também, um deslocamento para baixo no gráfico em relação ao que se poderia esperar de uma mistura ideal. Esse resultado é atribuído às ligações de hidrogênio que se estabelecem entre as moléculas de NMF e ACT. Como se percebe, os resultados de energia de interação entre os três tipos diferentes de interações intermoleculares presentes na mistura, corroboram o que se discutiu antes para a estrutura do líquido.

Para que ficasse mais claro o efeito de solvente exercido pela ACT na NMF, comparamos os presentes dados com trabalhos publicados para a mistura Água-NMF<sup>48</sup>. O gráfico de energia de interação em função da concentração do solvente fornece subsídios interessantes para essa discussão. Em função disso, plotamos um gráfico onde estão comparadas as energias de interação entre moléculas de NMF nos dois tipos de solventes (água e ACT):

Figura 35 – Energia de interação NMF-NMF em função da concentração do solvente em mistura.



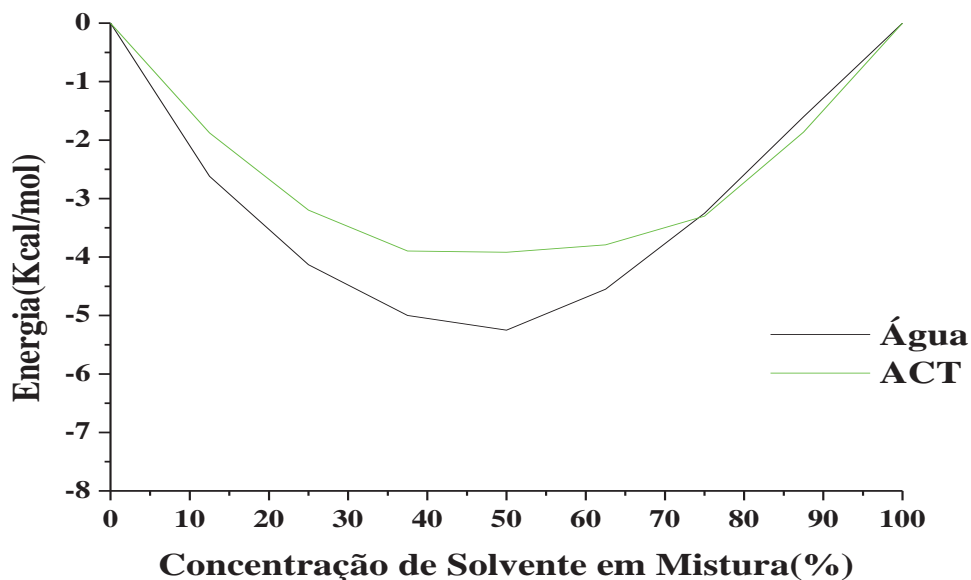
Fonte: Produção do próprio autor.

Como se pode notar, a interação entre moléculas de NMF tem energia consideravelmente mais negativa no solvente ACT, do que em água (Fig.35). Esse resultado se explica levando-se em consideração que a interação entre moléculas de NMF e água é mais intensa do que entre moléculas de NMF e ACT (Fig.36). Portanto a presença da água na mistura “enfraquece” a interação entre as moléculas de NMF. A razão fundamental desse comportamento seria a formação de mais fortes ligações de hidrogênio entre NMF e água do que entre NMF e ACT. Essa constatação concorda com o que haveria de se esperar, uma vez que o valor de carga do oxigênio utilizado para se fazer a simulação molecular é mais negativo na água do que na ACT (-0,834 água contra -0,425 na ACT). Essa enorme diferença nas cargas dos oxigênios implica em interações mais atrativas e freqüentes entre moléculas de água e a NMF do que entre ACT e a NMF, como consequência desse fato, os dímeros de NMF estariam mais enfraquecidos na água, tendo em vista que os sítios moleculares relativos às ligações de hidrogênio formadas entre eles teriam uma competição maior com as moléculas de água, do que com as moléculas de ACT, implicando em um maior número de ligações de hidrogênio entre moléculas de NMF na mistura com ACT do que na mistura com a água.

A energia de interação mais intensa apresentada pela mistura água-NMF reflete o fato de estes dois componentes formarem uma mistura mais bem estruturada, em decorrência do maior número de ligações de hidrogênio presentes entre a água e a NMF, em comparação com a mistura NMF-ACT. Essa diferença na energia de interação entre as duas misturas é

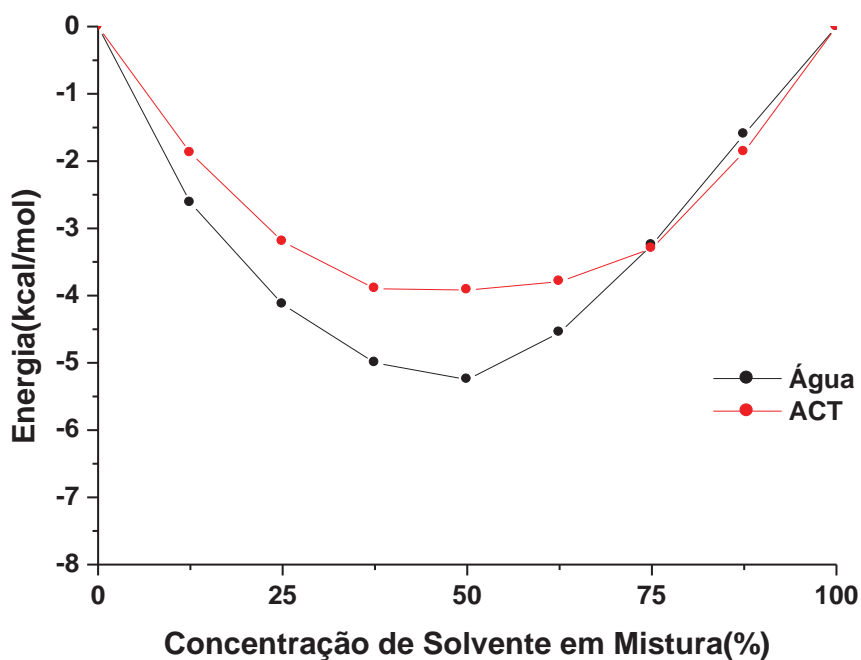
refletida no valor de entalpia de excesso de ambas, gráfico mostrado na Fig.37 comparado com os valores de entalpia de excesso experimentais para a mistura NMF-água<sup>93</sup>.

Figura 36 – Energia de interação solvente-NMF em função da concentração do solvente.



Fonte: Produção do próprio autor.

Figura 37 – Entalpia de excesso das misturas NMF-ACT e Água-NMF.



Fonte: Produção do próprio autor.

Em primeiro lugar, destaca-se que o processo de mistura NMF-ACT é exotérmico. Todavia, pelo fato de apresentar maior número de ligações de hidrogênio, a mistura água-NMF possui também um maior valor de entalpia de excesso.

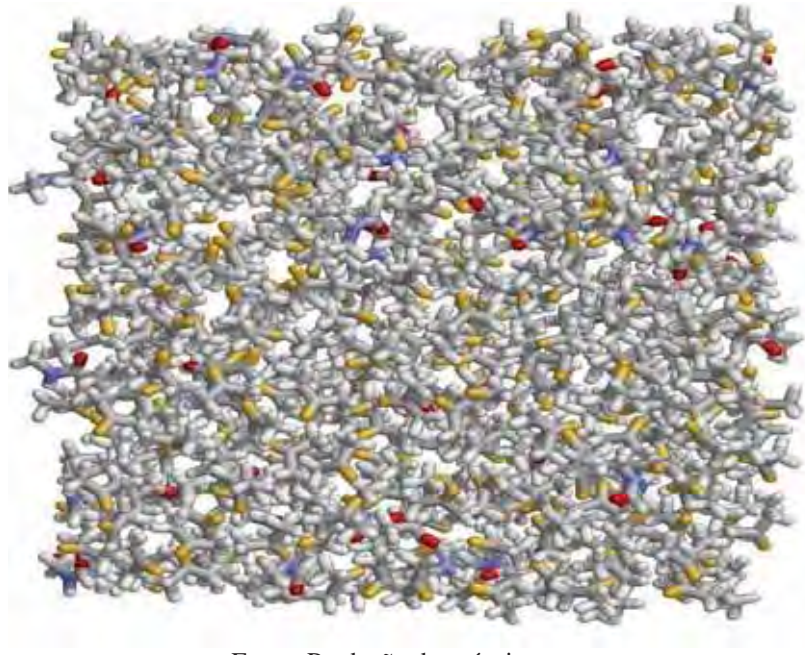
O comportamento exotérmico na mistura NMF-ACT, concorda com dados publicados anteriormente<sup>94</sup> que relatam um valor negativo para o volume de excesso da mistura NMF-ACT, ou seja, ocorre uma contração na mistura. Na literatura<sup>95</sup> esse fenômeno é relacionado a três fatores: 1) Interações específicas relativamente fortes entre os componentes da mistura, como ligações de hidrogênio; 2) Interações não específicas de *van der waals* entre as moléculas dos componentes; 3) Tamanho e estruturas moleculares dos componentes que permitam que estes se aproximem aumentando a interação molecular. Aqui, acredita-se que esse efeito se dê principalmente por dois motivos, o efeito solvofóbico causado pela adição de acetona (explicado acima no texto), e, maior proximidade das moléculas de NMF em função da substituição de moléculas de NMF por ACT. Sendo assim, devido ao fato da molécula de ACT ser menor do que a molécula de NMF haveria uma maior proximidade entre as moléculas de NMF, aumentando assim sua energia de interação.

Neste ponto, vale à pena ressaltar que não foram encontrados resultados experimentais de entalpia de excesso para a mistura NMF-ACT, mas os valores obtidos de entalpia de excesso da mistura NMF-ACT apresentam uma ordem de grandeza condizente com tudo que se discutiu anteriormente. Acredita-se que o valor obtido por meio das simulações por Monte Carlo feitas neste trabalho está muito próximo do real, uma vez que, os dados provenientes da simulação computacional têm mostrado grande consistência ao longo do trabalho para se determinar tanto propriedades estruturais, quanto termodinâmicas da mistura.

Os valores de entalpia para a NMF-ACT se mostram deslocados em relação aos esperados para uma mistura ideal, especialmente os referentes as concentrações acima de 50%, o que indica uma assimetria no comportamento termodinâmico da mistura. Há ainda, uma boa conformidade entre os valores de mínimo de entalpia de mistura para a mistura NMF-ACT e água-NMF (732,7 e 1000 J<sup>93</sup>) respectivamente, o que indica uma boa conformidade nos dados, uma vez que um dos componentes da mistura permaneceu inalterado (NMF).

Por fim, para ilustrar o grau de organização da mistura NMF-ACT é apresentada, na Fig. 38, a caixa de simulação em sua forma final para a concentração de 87,5% de acetona em mistura.

Figura 38 – Configuração final da caixa de simulação, concentração 87,5% de acetona em mistura.



Fonte: Produção do próprio autor.

Observa-se que a distribuição de NMF pela mistura não é homogênea, concentrando-se preferencialmente em algumas regiões. Realizando-se uma busca pelos dímeros formados entre as moléculas de NMF que estão presentes na mistura, encontram-se preferencialmente espécies com parâmetros moleculares que concordam com o que foi discutido ao longo do trabalho, com uma clara correlação NMF-NMF e ACT-NMF orientada por ligações de hidrogênio.



## Capítulo 4 – CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos por meio da simulação computacional com o método Monte Carlo e da difratometria de nêutrons com substituição isotópica, posteriormente refinados com o método EPSR, foi possível determinar propriedades termodinâmicas e estruturais para os líquidos puros acetona (ACT), N-metilformamida (NMF) e suas misturas nas concentrações de 12.5%, 25%, 35.5%, 50%, 62.5%, 75%, 87,5%.

Os valores das propriedades termodinâmicas e estruturais para os dois líquidos puros mostraram boa concordância com os experimentais disponíveis, sendo que no caso da NMF, a distribuição espacial das moléculas no líquido mostrou uma concordância mais marcante em relação à distribuição proveniente da difratometria de nêutrons, do que a acetona. De acordo com o que se pôde observar por meio dos gráficos de função radial de pares, distribuição de energia de pares, correlação de dipolos, dímeros estatisticamente mais representativos dos líquidos e número de coordenação, é possível concluir que a NMF possui uma estrutura mais organizada do que a ACT, o que explica os valores de propriedades termodinâmicas mais elevadas para o primeiro, como observado no quadro 1. Essa diferença na organização dos líquidos puros, NMF e ACT, ocorrem principalmente em razão das ligações de hidrogênio encontradas no líquido NMF, enquanto que na ACT as interações intermoleculares são predominantemente interações dipolares, implicando em uma maior estabilidade nas interações intermoleculares da N-metilformamida.

A presença de ligações de hidrogênio entre as moléculas de NMF é sugerida pelo gráfico de  $g(r)$  plotado para o líquido, onde se verifica a presença de um pico para a correlação O-H(N) a uma distância de aproximadamente 1,8 ângstroms, e de um pico para a correlação O-N a uma distância de aproximadamente 2,8 ângstroms, indicando que os átomos O-H(N)-N são praticamente colineares (uma vez que a distância de ligação H-N é 0,96 Å). Esses resultados concordam com aqueles que são usualmente aceitos para caracterizar ligações de hidrogênio<sup>59</sup>. A forma bimodal da curva presente na Fig.17, e, ausente na Fig.21, também sugere a presença e ausência de ligações de hidrogênio, respectivamente para a NMF e ACT.

Uma evidência clara dessa maior organização pode ser observada no gráfico apresentado na Fig.24, que mostra a formação de uma camada de solvatação bem definida para NMF, caracterizada pelo platô existente para  $r$  entre 3,25 Å e 4 Å, enquanto que para a ACT o gráfico mostra um crescimento exponencial que caracteriza líquidos que não possuem camada de solvatação bem definida.

Em relação às misturas, pôde-se observar que há a formação de ligações de hidrogênio entre os dois líquidos, por critérios de análise análogos aos utilizados para o líquido NMF puro, utilizando-se os gráficos de  $g(r)$  e distribuição de energia de pares da mistura. No entanto, percebe-se que a interação entre moléculas de NMF é preferencial comparativamente à interação NMF-ACT, fato evidenciado pelas Fig.27 e 24. A adição de acetona ao meio é acompanhada de um comportamento em que, mesmo em menor número dentro da mistura, é cada vez mais freqüente a interação por ligações de hidrogênio entre moléculas de NMF (Fig.29). Esse efeito solvofóbico é evidenciado também no gráfico apresentado na Fig.30, que indica dependência dos dímeros formados e a concentração da mistura, sendo que, quanto mais alta a concentração de ACT, maiores as diferenças encontradas. Esse comportamento e aquele observado para a Fig.31 sugeririam que a desnaturação protéica ocorre, em parte, devido a mudança nos ângulos de interação dos resíduos formadores da cadeia protéica primária, causada pela mudança nos ângulos de correlação de dipolos das moléculas do solvente, em que essa proteína encontra-se inserida.

Em relação ao comportamento termodinâmico dos líquidos puros, observamos que a NMF apresenta correlações intermoleculares mais intensas do que a ACT, indo ao encontro de tudo que foi discutido nos resultados e anteriores, neste próprio capítulo. Com relação à mistura, é possível concluir que se trata de uma mistura exotérmica, em função dos valores calculados para a entalpia de excesso. Esse comportamento se deve a interações intermoleculares mais intensas do que aquelas esperadas para uma mistura ideal, como é possível observar na Fig.34. Como as moléculas interagem de forma mais intensa, ficam mais próximas umas das outras, o que implica na ocupação de um menor volume por parte da mistura, com uma conseqüente contração de volume. O efeito solvofóbico constatado pela adição de acetona deve contribuir em grande parte para que essa seja uma mistura exotérmica, uma vez que, com a adição de acetona, as moléculas de NMF tendem a se correlacionar ainda mais fortemente entre si. Comparando-se com a mistura NMF-água, que possui comportamento mais próximo do ideal, nota-se uma energia de interação intermolecular muito maior para as moléculas de NMF presentes na mistura com ACT do que na mistura com a água (de acordo com o que se observa no gráfico apresentado na Fig.35), já que a tendência de se formar ligações de hidrogênio entre NMF e água é maior do que entre NMF e ACT. Esse fato implica em um maior número de ligações de hidrogênio presentes na mistura NMF-água em decorrência da maior probabilidade de interação entre as moléculas dos dois líquidos, implicando em uma mistura mais estruturada do que a NMF-ACT. Por fim, uma vez que o gráfico de entalpia de excesso experimental para a mistura NMF-ACT não foi

encontrado na literatura, concluímos a partir do gráfico conhecido para a mistura NMF-água, que os valores teóricos obtidos para a mistura NMF-ACT devem representar satisfatoriamente os valores experimentais. Vale a pena ressaltar que o desvio da idealidade se mostra maior para valores de acetona acima de 50%, assim como constatado na análise estrutural da mistura, indicando que, como no primeiro caso, há uma assimetria em relação à concentração também no comportamento termodinâmico da mistura.

Com base nos resultados obtidos e inferências feitas, pode-se dizer que a simulação computacional é uma ferramenta imprescindível para o melhor entendimento da estrutura e comportamento molecular de sistemas líquidos. Para o futuro, pretende-se avançar em grau de complexidade, utilizando-se, além de Monte Carlo, o método de dinâmica molecular para elucidar questões como, tempo de vida de ligações de hidrogênio formadas entre moléculas de NMF e moléculas de NMF-ACT, coeficiente de difusão da acetona em NMF, raio de giro molecular, para aprofundar o conhecimento a respeito dos efeitos de solvente encontrado na mistura. Outro aspecto que virá auxiliar na compreensão sobre o comportamento das ligações peptídicas em solventes orgânicos (como acetona) é o estudo da barreira de energia potencial da rotação em torno da ligação C-N da NMF em diversos solventes, utilizando-se teoria de perturbação termodinâmica.

## REFERÊNCIAS

- 1 CORDEIRO, J. M. M. Dynamics of meso and thermo citrate synthases with implicit solvation. **International Journal of Quantum Chemistry**, New York, v. 106, n. 3, p. 652-658, 2008.
- 2 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: principles of biochemistry**. 4. ed. New York: Sarvier, 2007. p. 1100-1120.
- 3 LIMA, A. W. O.; AGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 229, 1999.
- 4 IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization-aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 43, n. 10, p. 1019-1032, 2008.
- 5 FAGAIN, O. Understanding and increasing protein stability. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1, n. 1252, p. 1-14, 1995.
- 6 BROOS, J. et al. Flexibility of enzymes suspended in organic solvents probed by time-resolved fluorescence anisotropy: evidence that enzyme activity and enantioselectivity are directly related to enzyme flexibility. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 117, n. 51 p. 12657-12663, 1995.
- 7 VIDAL, M.; SANTOS, A. M.; BARLETTA, G. Nativelike enzyme properties are important for optimum activity in neat organic solvents. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 123, n. 22, p.5380-5381, 2001.
- 8 HALLING, P. J.; BLACKWOOD, A. D.; MOORE, B. D. Control of ionization state and activity of enzymes ins organic media. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 799, n. 13, p. 251-256, 1996.
- 9 COLOMBO, G.; TOBA, S.; MERZ, K. M. Rationalizaton of the enantioselectivity of subtilisin in DMF. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 121, n. 14, p. 3486-3493, 1999.
- 10 KLIBANOV, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature: international weekly journal of science**, London, v. 409, n. 1038, p. 241-246, 2001.
- 11 PETERS, G. H. et al. Dynamics of proteins in different solvent systems: analysis of essential motion in lipases. **Biophysical Journal**, New York, v. 71, n. 5, p. 2245-2255, 1996.
- 12 TOBA, S.; HARTSOUGH, D. S.; MERZ, K. M. Solvation and dynamics of chymotrypsin in hexane. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 118, n. 27, p. 6490-6498, 1996.

- 13 ZENG, Y.-J.; ORNSTEIN, R. L. A molecular dynamics and quantum mechanics analysis of the effect of DMSO on enzyme structure and dynamics: subtilisin. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 118, n. 17, p. 4175-4180, 1996.
- 14 LADERO, M. et al. Thermal and pH inactivation of na immobilized thermostable beta-galactosidase from thermus SP strain T2: Comparson to the free enzyme. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 14-24, 2006.
- 15 ZAKS, A.; KLIBANOV A. M. The effect of water on enzyme action in organic media. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 263, n. 17, p. 8017-8021, 1988.
- 16 HALLING, P. J. What can we learn by studying enzymes in non-aqueous media? **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B - biological sciences**, London, v. 359, n. 1098, p. 1287-1297, 2004.
- 17 OGINO, H.; ISHIKAWA H. Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 91, n. 2, p. 109-116, 2001.
- 18 CAMPBELL, M. K; FARRELL, S. O. **Bioquímica: combo**. São Paulo: Thomson, 2009.
- 19 CORDEIRO, J. M. M. Structure of acetone and dimethylsulfoxide from Monte Carlo simulations and MM2 calculations. **Physics and Chemistry of Liquids**, London, v. 45, n. 1, p. 31-39, 2007
- 20 OLIVEIRA, O. V.; FREITAS, L. C .G. Molecular dynamics simulation of liquid ethylene glycol and its aqueous solution. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 728, p. 179-187, 2005.
- 21 SKARMOUTSOS, I.; SAMIOS, J. Solvation structure and dynamics of cis- and trans-1,2 dichloroethene isomers in supercritical carbon dioxide. a molecular dynamics simulation study. **Journal of Physical Chemistry, B - condensed matter, materials, surfaces, interfaces and biophysical chemistry**, Washington, v. 115, n. 42, p. 12098-12107, 2011.
- 22 BOSSO, A. R. S. A.; CORDEIRO, J. M. M. A Monte Carlo revisiting of n-methylformamide and acetone. **Journal of Molecular Liquids**, Amsterdam, v. 154, n. 1, p. 36-40, 2010.
- 23 CORDEIRO, J. M. M.; SOPER, A. K. Neutron diffraction study of liquid N-methylformamide using EPSR simulation. **Journal of Physical Chemistry, B - condensed matter, materials, surfaces, interfaces and biophysical chemistry**, Washington, v. 113, n. 19, p. 6819-6825, 2009.
- 24 CORDEIRO, J. M. M.; SOPER, A. K. Investigation on the structure of liquid N-methylformamide-dimethylsulfoxide mixtures. **Journal of Chemical Physics**, New York, v. 381, n. 1, p. 21-28, 2011.

- 25 GAO, J.; PAVELITES, J. J.; HABIBOLLAZADEH, D. Crystal structure of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in hexane. **Journal of Physical Chemistry, A - Molecules, spectroscopy, kinetics, environment and general theory**, Washington, v. 96, n. 18, p. 10062-10067, 1999.
- 26 HIRST, J. D.; HIRST, D. M.; BROOKS, C. L. Multireference configuration interaction calculations of electronic states of n-methylformamide, acetamide, and n-methylacetamide. **Journal of Physical Chemistry, A - Molecules, spectroscopy, kinetics, environment and general theory**, Washington, v. 101, n. 26, p. 4821-4827, 1997.
- 27 DESFRANCOIS, C. et al. Experimental and ab initio theoretical studies of electron binding to formamide, N-methylformamide, and N-N-dimethylformamide. **Journal of Chemical Physics**, New York, v. 110, n. 9, p. 4309-4314, 1999.
- 28 TORII, H.; TASUMI, M. Low-wavenumber vibrational dynamics of liquid formamide and n-methylformamide: molecular dynamics and instantaneous normal mode analysis. **Journal of Chemical Physics**, New York, v. 104, n. 18, p. 4174-4181, 2000.
- 29 HEADLEY, A. D.; NAM, J. A theoretical analysis of substituted formamide conformers. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 589-590, p. 423-429, 2002.
- 30 NANDINI, G.; SATHYANARAYANA, D. N. Hydration of simple amides. ftir spectra of hdo and theoretical studies. **Journal of Molecular Structure, Amsterdam**, v. 579, n. 1, p. 2483-2493, 2002.
- 31 MARTINEZ, A. G. et al. Computational and experimental study on the relative stabilities of *cis* and *trans* isomers of N-alkylamides in gas phase and in solution. **Journal of Physical Chemistry, A - Molecules, spectroscopy, kinetics, environment and general theory**, Washington, v. 106, n. 19, p. 4942-4950, 2002.
- 32 CORDEIRO, J. M. M. et al. Theoretical studies on the stability of N-methylformamide in both liquid and gas phases. **Chemical Physics Letters**, Amsterdam, v. 423, n. 1-3, 67-70, 2006.
- 33 HAMMAMI, F.; NASR, S.; BELLISENT-FUNEL, M. C. Neutron scattering study of the H-bond network in amorphous N-methylformamide. **Journal of Chemical Physics**, New York, v. 122, n. 1, p. 64505-64513, 2005.
- 34 SCHOESTER, P. C. et al. Comparison of structure of liquid amides as determined by diffraction experiments and molecular dynamics simulation. **Zeitschrift für Naturforschung, Section A - a journal of physical sciences**, Tübingen, v. 50, n. 1, p. 38-50, 1995.
- 35 SHIN, S. et al. Conformational behavior of N-methylformamide in the gas, matrix, and solution states as revealed by IR and NMF spectroscopic measurements and by theoretical calculations. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 791, p. 30-40, 2006.

- 36 NEUEFEIND, J.; CHIEUX, P.; ZEIDLER, M. D. Geometry and intermolecular structure of N-methylformamide in the liquid phase as measured by neutron scattering. **Molecular Physics**, London, v. 76, p. 143-156, 1992.
- 37 NEUEFEIND, J.; ZEIDLER, M. D.; POULSEN, H. F. The atomic and electronic structure of liquid N-methylformamide as determined from diffraction experiments. **Molecular Physics**, London, v. 87, n. 1, p. 189-201, 1996.
- 38 HAMMAMI, F.; NASR, S.; OUMEZZIME, M.; CORTES, R. H-bonding in liquid N-methylformamide as studied by X-ray scattering. **Biomolecular Engineering**, New York, v. 19, p. 201-205, 2002.
- 39 SATHYANARAYANA, D. N.; GANESHSRINIVAS, E. Simulation of the infrared spectra of N-methylformamide and N-methylacetamide by the extended molecular mechanics method. **Indian Journal of Chemistry, Section A - inorganic, bio-inorganic, physical, theoretical and analytical chemistry**, New Delhi, v. 42, n. 7, p. 1564-1574, 2003.
- 40 DESIRAJU, G. R.; STEINER, T. **The weak hydrogen bond in structural chemistry and biology**. 9. ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.
- 41 FANTONI, A. C.; CAMINATI, W. Rotational spectrum and ab initio calculations of N-methylformamide. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, London, v. 92, p. 343-346, 1996.
- 42 JONES, R. L. Spectra of homologous series of monosubstituted amides. **Journal of Molecular Spectroscopy**, New York, v. 2, n. 581, p. 1097-10104, 1958.
- 43 MIYAZAWA, T. Infrared spectra of formamide and deuterated formamide. **Journal of Molecular Spectroscopy**, New York, v.76, n. 7, p. 821-824, 1960.
- 44 HALLAM, H. E.; JONES, C. M. Molecular configuration and interactions of the amide group. Part 4: band contour analysis of the infra-red spectrum of N-methylformamide in the vapour phase at 20°C. **Transactions of the Faraday Society**, London, v. 65, p. 2607-2610, 1969.
- 45 KITANO, M.; KUCHITSU, K. Molecular Structure of N-methylformamide as studied by gas electron diffraction. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, Tokyo, v. 47, p. 631-634, 1974.
- 46 ATAKA, S.; TAKEUCHI, H.; TASUMI, M. Infrared spectroscopy studies of the less stable *cis* form of N-methylformamide in low temperature nitrogen matrices and vibrational analyses of *trans* and *cis* forms of these molecules. **Journal of Molecular Spectroscopy**, New York, v. 113, n. 111, p. 147-160, 1984.
- 47 FANTONI, A. C. et al. The very low methyl group V3 barrier of *cis* methylformamide: A-E doubling from the free jet rotational spectrum. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 612, n. 3, p. 305-307, 2002.

- 48 FREITAS, L. C. G.; CORDEIRO, J. M. M.; GARBUJO, F. L. L. Theoretical studies of liquids by computer simulation: the water-acetone mixture. **Journal of Molecular Liquids**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 1-15, 1999.
- 49 BERTAGNOLLI, H.; HOFFMANN, M.; OSTHEIMER, M. Z. Local structural order and molecular associations in water-DMSO mixtures. Molecular dynamics study. **Phys. Chem.**, North Carolina, v. 114, n. 20, p. 7889-7896, 1992.
- 50 FERRARIO, M. et al. Molecular dynamics simulation of aqueous mixtures: methanol, acetone, and ammonia. **Journal of Physical Chemistry, B - Condensed matter, materials, surfaces, interfaces and biophysical chemistry**, Washington, v. 93, p. 5156-5167, 1990.
- 51 RICHARDI, J. et al. Liquid acetone and chloroform: a comparison between Monte Carlo simulation, molecular Ornstein-Zernik theory, and site-site Ornstein-Zernik theory. **Molecular Physics**, London, v. 93, p. 925-938, 1998.
- 52 WHEELER, D. R.; ROWLEY, R. L. Nonequilibrium molecular dynamics simulation of shear viscosity of polar liquids. **Molecular Physics**, London, v. 94, n. 3 p. 555-564, 1998.
- 53 RADNAI, T. et al. Local order in some aprotic dipolar liquids. **Molecular Simulation**, New York, v. 16, p. 345-358, 1996.
- 54 JEDLOVSZKY, P.; PALINKAS, G. Monte Carlo simulation of liquid acetone with a polarizable molecular model. **Molecular Physics**, London, v. 84, p. 217-233, 1995.
- 55 WEERASINGHE, S.; SMITH, P. E. Kirkwood-buff derived force field for mixtures of acetone and water. **Journal of Chemical Physics**, New York, v. 118, p. 10663-10670, 2003.
- 56 VENABLES, D. S.; SCHMUTTENMAER, C. A. Spectroscopy and dynamics of mixtures of water with acetone, acetonitrile, and methanol. **Journal of Chemical Physics**, New York, v. 113, p. 11222-11237, 2000.
- 57 VENABLES, D. S.; SCHMUTTENMAER, C. A. Structure and dynamics of nonaqueous mixtures of dipolar liquids. II. Molecular dynamics simulations. **Journal of Chemical Physics**, New York, v. 113, p. 3249-3261, 2000.
- 58 JORGENSEN, W. L.; BRIGGS, J. M.; CONTRERAS, M. L. Relative Partition Coefficients for Organic Solutes from Fluid Simulations. **Journal of Physical Chemistry**, Ithaca, v. 94, p. 1683-1686, 1990.
- 59 MCLAIN, S. E.; SOPER, A. K.; LUZAR, A. Orientational correlations in liquid acetone and dimethyl sulfoxide: a comparative study. **Journal of Physical Chemistry**, Ithaca, v. 124, n. 7, p. 74502-74514, 2006.
- 60 LEVINE, I. N. **Quantum chemistry**. 4. ed. New York: Prentice Hall, 1991.
- 61 FORESMAN, J. B.; FRISCH, A. E. **Exploring chemistry with electronic structure methods**. Pittsburgh: Gaussian, 1996. p. 213-227.



- 62 FORESMAN, J. B.; FRISCH, A. E. **Gaussian 94**: user's reference. Pittsburgh: Gaussian, 1996.
- 63 ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. **Computer simulation of liquids**. Oxford: Clarendon, 1987.
- 64 BARREIRO, E. J.; RODRIGUES, C. R. sobre a química dos remédios, dos fármacos e dos medicamentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 3, p. 4-9, 2006.
- 65 METROPOLIS, N.; ULAM, S. J. The Monte Carlo method. **Journal of the American Statistical Association**, New York, v. 44, n. 247, p. 335-341, 1949.
- 66 METROPOLIS, N. et al. Equation of state calculations by fast computing machines. **J Journal of Chemical Physics**, New York, v. 21, n. 6, p. 1087-1092, 1953.
- 67 GOVARDHAN, C. P.; MARGOLIN, A. L. Extremozymes for industry - from nature and by design. **Chemistry and Industry**, London, p. 689-693, 1995.
- 68 SOPER, A. K.; HOWELLS, W. S.; HANNON, A. C. ATLAS : a suite of programs for the analysis of time-of-flight neutron diffraction Data from Liquid and Amorphous Samples. **Institute of Physics Conference Series**, Bristol, n. 107, p. 193-211, 1990.
- 69 SOPER, A. K. Tests of the empirical potential structure refinement method and a new method of application to neutron diffraction data on water. **Molecular Physics**, London, v. 99, n. 17, p. 1503-1516, 2001.
- 70 SOPER, A. K. Partial structure factors from disordered materials diffraction data: An approach using empirical potential structure refinement. **Physical Review**, New York, v. 72, p. 104204-104216, 2005.
- 71 MCGREEVE, S. E. Reverse Monte Carlo modeling. **Journal of Physics - Condensed matter**, Bristol, v. 13, p. 887-913, 2001.
- 72 ISRAELACHVILI, J. N. **Intermolecular and surface forces**. London: Academic Press, 1985.
- 73 CORDEIRO, J. M. M.; CORDEIRO, M. A. M. Structure and weak hydrogen bonds in liquid acetaldehyde. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 351-357, 2004.
- 74 McLAIN, S. E.; SOPER, A. K.; WATTS, A. Structural studies on the hydration of L-glutamic acid in solution.. **Journal of Physical Chemistry, B - Condensed matter, materials, surfaces, interfaces and biophysical chemistry**, Washington, v. 110, p. 21251-21258, 2006.
- 75 McLAIN, S. E.; SOPER, A. K.; Watts, A. Water structure around dipeptides in aqueous solutions. **European Biophysics Journal**, New York, v. 37, p. 647-655, 2008.
- 76 HULME, E. C. et al. The hydration of the neurotransmitter acetylcholine in aqueous solution. **Biophysical Journal**, New York, v. 91, p. 2371-2380, 2006.

- 77 MASON, P. E. et al. Structure of aqueous glucose solutions as determined by neutron diffraction with isotopic substitution experiments and molecular dynamics calculations. **Journal of Physical Chemistry, B - Condensed matter, materials, surfaces, interfaces and biophysical chemistry**, Washington, v. 109, p. 13104-13111, 2005.
- 78 MASON, P. E. et al. Determination of a hydroxyl conformation in aqueous xylose using neutron scattering and molecular dynamics. **Journal of Physical Chemistry, B - Condensed matter, materials, surfaces, interfaces and biophysical chemistry**, Washington, v. 110, p. 2981-2983, 2006.
- 79 McLAIN, S. E. et al. Structure and hydration of L-proline in aqueous solutions. **Journal of Physical Chemistry, B - Condensed matter, materials, surfaces, interfaces and biophysical chemistry**, Washington, v. 111, p. 4568-4580, 2007.
- 80 SOPER, A. K.; SILVER, R. N. Hydrogen-hydrogen pair correlation function in liquid water. **Physical Review Letters**, New York, v. 49, p. 471-474, 1982.
- 81 BOTTI, A. et al. Solvation shell of H<sup>+</sup> ions in water. **Journal of Molecular Liquids**, Amsterdam, v. 117, p. 77-79, 2005.
- 83 SOPER, A. K.; FINNEY, J. L. Hydration of Methanol in Aqueous Solution. **Physical Review Letters**, New York, v. 71, p. 4346-4349, 1993.
- 84 SOPER, A. K.; LUZAR, A. Orientation of water molecules around small polar and non-polar groups in solution: A neutron diffraction and computer simulation study. **Journal of Physical Chemistry**, Ithaca, v. 100, p. 1357-1367, 1996.
- 85 JEFFREY, G. A. **An introduction to hydrogen bonding**. New York: Oxford University Press, 1997.
- 86 FREITAS, L. C. G. DIADORIM: a Monte Carlo program for liquid simulations including quantum mechanics and molecular mechanics QM/MM facilities: applications to liquid ethanol. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 8, p. 1541-1548, 2009.
- 87 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. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 118, p. 11225-11236, 1996.
- 88 MARCUS, Y. Ion solvation. **Berichte der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie**, New York, v. 111, p. 1245-1250, 1985.
- 89 ISAACS, N. **Physical organic chemistry**. 4. ed. Essex: Longman Scientific & Technical, 1992.
- 90 BENNETO, H. P.; CALDIN, E. F. Kinetics of solvent exchange and ligand substitution reactions of metal ions in relation to structural properties of the solvent. **Journal of the Chemical Society, A - Inorganic, physical, theoretical**, London, p. 2191-2198, 1971.

- 91 SINOTI, L. L.; POLITI, J. R. S.; GOMIDE, F. L. C. Monte Carlo Simulation of water-pyridine mixtures. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 133-141, 1996.
- 92 JORGENSEN, W. L. Optimized intermolecular potential functions for liquid alcohols. **Journal of Chemical Physics**, New York, v. 90, n. 7, p. 1276-1284, 1986.
- 93 ZAICHIKOV, A. M.; GOLUBINSKII, O. E. Enthalpy of mixing of water with some primary and secondary amides. **Russian Journal of Physical Chemistry**, London, v. 70, p. 1175-1179, 1996.
- 94 SEYFFERT, U.; FRANCKE, K.; QUITZSCH, K. Studies of thermodynamics of binary liquid mixtures with homolog formamides. 11. Mixed phase thermodynamics of binary-systems acetone(1) and N-monomethylformamide(2) and methanol(1) and N-monomethylformamide(2). **Zeitschrift für Physikalische Chemie**, Leipzig, v. 255, p. 969-973, 1974.
- 95 NIKOLIC, A.; GOBOR, L.; DESPOTOVIC, V.; MAJKIC, S. Excess molar volumes of N-methylformamide + tetrahydrofuran, + 2-butanone, + ethylacetate at the temperatures between 303.15 K and 318.15 K. **Journal of Molecular Liquids**, Amsterdam, v. 126, n. 1, p. 95-98, 2006.
- 96 SÓBIOLOGIA. Porto Alegre: Grupo Virtuoso, 2008. Disponível em: <[http://www.sobiologia.com.br/conteudos/quimica\\_vida/quimica9.php](http://www.sobiologia.com.br/conteudos/quimica_vida/quimica9.php)>. Acesso em: 20 out. 2010.
- 97 SOUZA, K. A. F. D.; NEVES, V. A. **Experimentos de Bioquímica**. Araraquara: Unesp, 2010. Disponível em: <[http://www.fcfa.unesp.br/alimentos/bioquimica/introducao\\_proteinas/introducao\\_proteinas\\_tres.htm](http://www.fcfa.unesp.br/alimentos/bioquimica/introducao_proteinas/introducao_proteinas_tres.htm)>. Acesso em: 20 out. 2010.
- 98 CARLA. **Estrutura das proteínas**. Niterói: Blog UNIPLI Medicina Veterinária, 24 ago. 2009. Disponível em: <<http://unipli0209.blogspot.com/>>. Acesso em: 20 out. 2010.
- 99 WIKIPÉDIA. **N-Methylformamide**. San Francisco, 2011. Disponível em: <[http://en.wikipedia.org/wiki/Moore-Penrose\\_pseudoinverse](http://en.wikipedia.org/wiki/Moore-Penrose_pseudoinverse)>. Acesso em: 21 maio 2011.
- 100 BÔSSO, A. R. S. A. **Estudos da mistura DMSO/NMF por simulação Monte Carlo**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais) - Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2005.
- 101 STRAATHOF, A. J. J.; PANKE, S.; SCHMID, A. **The production of fine chemicals by biotransformations**. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, n. 6, p. 548-556, 2002.

- 102 VERLI, H. **Métodos de mecânica molecular**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia, Grupo de Bioinformática Estrutural, 2009. Disponível em: <[http://www.cbiot.ufrgs.br/bioinfo/aula\\_6.pdf](http://www.cbiot.ufrgs.br/bioinfo/aula_6.pdf)>. Acesso em: 20 maio 2010.
- 103 COSTA; L. T.; RIBEIRO, M. C. C. Propriedades dinâmicas de fluidos por simulação computacional: métodos híbridos atômico-contínuo. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. p. 938-944, 2010. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422010000400032&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422010000400032&script=sci_arttext) >. Acesso em: 20 maio 2010.

TRABALHO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NO  
JOURNAL OF BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY