



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



INSTITUTO DE QUÍMICA
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Lucas Neres Chagas da Silva

Desenvolvimento de um polímero molecularmente impresso
seletivo a troponina T: uma abordagem teórico-experimental

Araraquara, SP
2020

Lucas Neres Chagas da Silva

Desenvolvimento de um polímero molecularmente impresso seletivo a troponina T:
uma abordagem teórico-experimental

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Química do Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Química.

Orientador: Profa. Dra. Maria del
Pilar Taboada Sotomayor

Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo
Troiano Feliciano

Araraquara, SP
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

S586d Silva, Lucas Neres Chagas da
Desenvolvimento de um polímero molecularmente impresso seletivo a troponina T: uma abordagem teórico-experimental / Lucas Neres Chagas da Silva. – Araraquara : [s.n.], 2020
81 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Maria del Pilar Taboada Sotomayor
Coorientador: Gustavo Troiano Feliciano

1. Marcadores bioquímicos. 2. Dinâmica molecular.
3. Polímeros impressos. 4. Biologia computacional. 5. Funcionais de densidade. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Desenvolvimento de um polímero molecularmente impresso seletivo a troponina T: uma abordagem teórico-experimental"

AUTOR: LUCAS NERES CHAGAS DA SILVA

ORIENTADORA: MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR

COORIENTADOR: GUSTAVO TROIANO FELICIANO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


Prof.^a Dr.^a MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR

Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. NAILTON MONTEIRO DO NASCIMENTO JUNIOR

Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. BRUNO CAMPOS JANEKITZ

Departamento de Ciências da natureza, Matemática e Educação / Universidade Federal de São Carlos - UFSCar - Araras

Araraquara, 03 de março de 2020

DADOS CURRICULARES**IDENTIFICAÇÃO**

Nome: Lucas Neres Chagas da Silva

Nome em citação bibliográfica: Neres L. C. S.; Silva L. N. C.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO:

Graduação em Licenciatura em Química na Universidade Estadual Paulista-Unesp, no Instituto de Química de Araraquara- Concluído em 2017.

APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM CONGRESSO:

SIBEE (Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica) 2019 – Apresentação oral.

PUBLICAÇÕES:

FIGUEIRA, E. C.; NERES, L. C. S.; RUY, M. R. S.; TROIANO, G. F.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Development of a biomimetic sensor for selective identification of cyanide. Analytical Methods (Print), 2016.

ACEITO

PARA

PUBLICAÇÃO:

MASSI, L.; LOPES, J. R.; SILVA, L. N. C. Ciência hoje das crianças no ensino de ciências para os anos iniciais. Núcleo de Ensino Coletânea da UNESP. 2020.

SUPERVISÕES CIENTÍFICAS CONCLUÍDAS E EM ANDAMENTO:

Supervisão científica e auxílio do TCC como co-orientador do aluno José Henrique Marques. Período: julho de 2018 até dezembro de 2019.

Dedicatória

"Dedico esse trabalho à minha família, meus pais Ana e Celso, irmãos, tios e avós, que tanto me ajudaram nessa minha jornada."

Agradecimentos

Inicialmente gostaria de agradecer meus pais Ana e Celso, meus irmãos Pedro, Gabriel e Carol e também todos os meus tios, tias e avós que me acompanharam desde a minha formação no ensino básico dando o suporte necessário para que hoje eu venha obter o título de mestre em química. Agradeço também Dona Delourdes por todo amor incondicional que sempre me deu, esse título é para a senhora.

Agradeço também a república Xikerão por todo apoio e amizade e também as amizades conquistadas além da Xikerão. Em especial, agradeço meus amigos Ricardo, Juliana, Ailton, Rafaela e Pavan por todos os conselhos e apoio durante esses anos na Universidade. Agradeço também meu aluno de IC José pelos ensinamentos e amizade.

Gostaria de agradecer a Casixtranha por me ajudar a explorar meu outro lado além da academia, que foi a arte, fazendo com que eu não ficasse preso somente na bolha universitária. Agradeço também, em especial, as minhas amigas Madu, Sarah e Nathiaga pelas descobertas e amizade.

Agradeço também a minha orientadora Pilar e meu co-orientador Gustavo pelas orientações, amizade e por todas as conquistas que me ajudaram proporcionar na academia durante esses anos. Agradeço a professora Rosa da UFPE pelo apoio durante meu intercâmbio em Recife.

Agradeço a CAPES pelo financiamento durante todo o meu projeto através da bolsa de estudos e ao Instituto de Química UNESP campus Araraquara.

No mais, após todas essas aspirações, gostaria de finalizar enfatizando como é importante, e raro, um corpo como meu, LGBT, não cisheteronormativo, preto e periférico estar ocupando esse espaço acadêmico que, assim como diversos lugares formais e que compõe estruturas de poder, nos é negado indiretamente e diretamente. Nesse contexto, desejo que eu não seja a primeira a estar conquistando esse espaço no IQ e que mais corpos marginalizados adentrem o ambiente acadêmico.

Epígrafe

"A única coisa de que precisamos para nos tornarmos bons filósofos é a capacidade de nos admirarmos com as coisas".

- O mundo de Sofia

Resumo

O projeto se baseia na síntese e otimização de sistemas de reconhecimento seletivo através de polímeros impressos, os MIP's (*molecularly imprinted polymers*), que poderão ser usados como fase de reconhecimento de imunossensores biomiméticos para o analito proposto. A troponina T, proteína responsável pela contração e relaxação muscular, é de grande importância na área da saúde, uma vez que, quantificando e analisando o analito em amostras de sangue humano, a troponina T pode atuar como um biomarcador para o diagnóstico precoce do infarto do miocárdio. Para tal, o projeto teve duas vertentes, sendo uma delas correspondente à obtenção de resultados teóricos, usando a Teoria do Funcional da Densidade para a escolha prévia do solvente de reação e dos monômeros funcionais que melhor interajam com o analito em questão, aumentando assim, a eficiência na síntese. A segunda parte consiste na síntese, sua otimização e caracterização do MIP para o analito, aliado a isso, simulações por dinâmica molecular foram feitas para auxiliar na compreensão do sistema de análise. Os resultados computacionais demonstraram, através da Dinâmica Molecular, o porquê de ser difícil a criação de polímeros biomiméticos para biomacromoléculas e apontam para soluções que possa aumentar a efetividade do material proposto nesse projeto. Testes de adsorção através da ELISA já demonstram uma maior adsorção da troponina T no MIP em relação ao NIP com um limite de detecção e quantificação de 17,18 ng mL⁻¹ e 52,07 ng mL⁻¹ respectivamente numa faixa linear de resposta de 25 ng mL⁻¹ até 100 ng mL⁻¹.

Palavras-chave: Marcadores bioquímicos; Dinâmica Molecular; Polímeros impressos; Biologia computacional; Funcionais de densidade.

Abstract

The project is based on the synthesis and optimization of selective recognition systems through printed polymers, the MIP's (molecularly imprinted polymers), which can be used as a recognition phase for biomimetic immunosensors for the proposed analyte. Troponin T, the protein responsible for muscle contraction and relaxation, is of great importance in the health area, since, by quantifying and analyzing the analyte in human blood samples, troponin T can act as a biomarker for the early diagnosis of infarction of the myocardium. To this end, the project had two aspects, one of which corresponds to obtaining theoretical results, using the Density Functional Theory for the prior choice of the reaction solvent and the functional monomers that best interact with the analyte in question, thus increasing, efficiency in synthesis. The second part consists of the synthesis, its optimization and characterization of the MIP for the analyte, coupled with this, simulations by molecular dynamics were made to assist in the understanding of the analysis system. The computational results demonstrated, through Molecular Dynamics, why it is difficult to create biomimetic polymers for biomacromolecules and point to solutions that can increase the effectiveness of the material proposed in this project. Adsorption tests using the ELISA already demonstrate a greater adsorption of troponin T in MIP in relation to NIP with a detection and quantification limit of 17.18 ng mL⁻¹ and 52.07 ng mL⁻¹ respectively in a linear response range of 25 ng mL⁻¹ to 100 ng mL⁻¹.

Keywords: Biochemical markers; Molecular Dynamics; Printed polymers; Computational biology; Density functionalities.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- A estrutura da TnT no estado ativado por Ca^{2+} e com uma subunidade de TnC no musculo esquelético, obtida por difração de Raio X (código 1YTZ). Fonte: banco de dados de proteínas, PDB 1YTZ.

Figura 2- Perspectiva da DFT para o cálculo de estrutura eletrônica minimizando o problema “de muitos corpos”.

Figura 3- Esquematização de algumas metodologias discutidas, entre elas a DFT e DM colocada num gráfico o qual relaciona o tempo de conta em função da escala do sistema. As estratégias por traz da metodologia estão em azul. Os métodos de escalonamento em vermelho. Os acoplamentos diretos em verde e acoplamento espacial (a transferência de informação) em preto. Abreviações usadas na figura: DFT (Teoria do Funcional da Densidade); PES (Superfície de Energia Potencial); QM/MM (Mecânica Quântica e Mecânica Molecular); DM (Dinâmica Molecular); QC (Quase-Contínuo).

Figura 4- Princípio da impressão molecular: 1) Complexação; 2) Polimerização; 3) Extração; 4) Religação.

Figura 5- Tipos de imunoensaios para ELISA.

Figura 6- Etilenoglicol e ácido metacrílico.

Figura 7- 2-vinilpiridina e 4-vinilpiridina

Figura 8- Aminoácidos escolhidos inicialmente para a simulação computacional por DFT. Entre eles, da esquerda para a direita: Lisina, Glutamato e Alanina.

Figura 9- Exemplo de um arquivo xyz (A) e um arquivo inp (B).

Figura 10- Script feito para converter um arquivo .xyz em .inp.

Figura 11- Complexos formados pela interação entre MF e aminoácido. Em (A) pela interação do MF 4-vinilpiridina com o aminoácido lisina, e em (B) interação do etilenoglicol com o aminoácido glutamato.

Figura 12- Energia em kJ mol^{-1} para os complexos formados em água como solvente.

Figura 13- Estrutura da troponina T extraída do site pdb (protein data bank).

Figura 14- Estrutura da troponina T envolto ao Monômero Funcional (2 vinilpiridina) e Monômero Estrutural (Etilenoglicol Dimetacrilato).

Figura 15- Estrutura da troponina T envolto ao Monômero Funcional (2 vinilpiridina) e Monômero Estrutural (Etilenoglicol Dimetacrilato), clusters sendo formados durante a DM.

Figura 16- Estrutura da troponina T envolto ao MF e ME após a DM com solvente explícito. O MF em azul e o ME em vermelho.

Figura 17- Estrutura da troponina T demonstrando os três aminoácidos escolhidos através da DFT. Lisina (em azul), Glutamato (em vermelho) e Alanina (em verde).

Figura 18- Comparação do rendimento da síntese do NIP em (A) a ordem inversa de síntese proposta e em (B) a ordem comumente usada na literatura.

Figura 19- Caracterização do MIP (A) e NIP (B) por MEV aproximação em 25.000, 50.000 e 100.000 mil vezes.

Figura 20- NIP – Regenerado com troponina 100 ng mL⁻¹.

Figura 21- MIP – Regenerado com troponina 100 ng mL⁻¹.

Figura 22- Plotagem MIP TnT + NIP TnT + Troponina

Figura 23- Filme de esmalte RISQUÉ® (216p).

Figura 24- Filme de esmalte RISQUÉ® com NIP.

Figura 25- espectroscopia por Raman no NIP e MIP após lavados com água e SDS 1% para eliminação da TnT.

Figura 26- Foto do imunoenensaio realizado através da técnica ELISA em diferentes concentrações de TnT-HRP.

Figura 27- Variação da concentração da TnT-HRP.

Figura 28- Relação dos gráficos de adsorção do MIP (A) e NIP (B) através da técnica ELISA.

Figura 29- gráfico de energias em kJ/mol dos monômeros funcionais e aminoácidos escolhidos na NS2B. E demonstração da interação do Pirrol com a Asparagina.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Caracterização do MIP através das técnicas: BET, Langmuir e BJH.

Tabela 2- Caracterização do NIP através das técnicas: BET, Langmuir e BJH.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAPES: (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

BET: Brunauer, Emmett e Teller

BJH: Barrett, Joyner e Halenda

DFT: Teoria do Funcional da Densidade

DSPE: Extração Dispersiva em Fase Sólida

EIS: Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPTLC: Cromatografia de Alta Performance em Camada Delgada

IAM: Infarto Agudo do Miocárdio

LPME: Micro-extração em Fase Líquida

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MFA – Microscopia de Força Atômica

ME: Monômero Estrutural

MF: Monômero Funcional

MIP: Polímero Molecularmente Impresso

NIP: Polímero não Impresso

OPD: O-fenilenodiamina

SBSE: Extração Sortiva em Barra de Agitação

SPE: Extração em Fase Sólida

SPME: Micro-extração em Fase Sólida

CCD: Cromatografia de Camada Delgada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. ASPECTOS COMPUTACIONAIS	14
1.1.1. Simulação por métodos quânticos: Teoria do Funcional da Densidade	14
1.1.2. Simulação por métodos clássicos: Dinâmica Molecular	21
1.2. Condições iniciais, minimização de energia e equilíbrio	28
1.3. Técnicas analíticas para determinação.....	31
2. OBJETIVO GERAL.....	34
2.1. Objetivos Específicos:	35
3. MÉTODOLOGIA EXPERIMENTAL PROPOSTA.....	35
3.1. Reagentes	35
3.2. Síntese do MIP – Troponina.....	36
3.3. Técnicas para avaliar o desempenho do MIP na adsorção da Troponina.....	37
3.3.1. Ensaio colorimétrico Bradford	39
3.3.2. Ensaio colorimétrico com OPD (o-fenilenodiamina).....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1. Simulação Monômeros Funcionais – Teoria do funcional da densidade.....	40
4.2. Linguagem de programação como ferramenta da criação dos arquivos de submissão	42
4.3. Simulação dos complexos.....	45
4.4. Dinâmica Molecular E Síntese do Material	48
4.5. Síntese do polímero molecularmente impresso e caracterização por MEV	54
4.6. FTIR – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier	57
4.7. Caracterização por Raman	60
4.8. Caracterização por BET, Langmuir e BJH	61
4.9. ELISA – imunoenaios	62
5. CONCLUSÃO.....	67
6. REFERÊNCIAS	68
Trabalhos paralelos a este projeto: S estudos teóricos através do DFT (Teoria do Funcional da Densidade) para futuro desenvolvimento do sensor biomimético para a NS2B.	75

1. INTRODUÇÃO

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é de grande preocupação para saúde, levando milhares de pessoas à morte, caracterizando como a manifestação mais grave da doença arterial coronariana. Anualmente, estima-se que mais de 2,4 milhões de pessoas nos EUA e, mais de 4 milhões de mortes na Europa e no norte da Ásia, morrem de IAM. Além disso, mais de um terço das mortes por IAM ocorrem em países desenvolvidos (REED; ROSSI; CANNON, 2017) (IAM 2017). No Brasil, as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte, cerca de 20% das mortes de homens e mulheres acima dos 30 anos são causadas por doenças cardiovasculares (FAVARATO, 2012). Apenas em 2013 estima-se que cerca de 8,6 milhões de pessoas morreram por infarto do miocárdio em todo o mundo (VOS *et al.*, 2015).

A literatura médica indica como fatores de riscos para o infarto do miocárdio: tabagismo, dieta inadequada, baixa atividade física, hipertensão, obesidade, alto colesterol e alta concentração de açúcar no sangue (NEGAHDARY *et al.*, 2016). Segundo a Organização Mundial da Saúde, o diagnóstico do IAM é realizado de acordo com os seguintes critérios: história clínica e desconforto isquêmico no peito, alterações no eletrocardiograma e alterações de marcadores de necrose miocárdica (GOMES-FILHO *et al.*, 2013).

Nesse contexto, as troponinas (Figura 1) são proteínas responsáveis pelo ciclo de contração e relaxação muscular, especificamente no músculo esquelético e cardíaco, sendo compostas por três subunidades: troponina C, troponina T e troponina I. As troponinas T e I, não deveriam ser detectadas no sangue de pacientes saudáveis, dessa maneira, uma elevação em sua concentração na corrente sanguínea pode significar alguma lesão miocárdica. A Troponina T aumenta a sua concentração rapidamente dentro de 3 a 4 horas após o início do IAM (GOMES-FILHO *et al.*, 2013). Além disso, os sintomas podem ser elevados até 14 dias após o episódio do IAM (SILVA *et al.*, 2010). Dessa forma, cada vez mais as troponinas vêm recebendo grande atenção pela comunidade científica para a sua utilização como biomarcadores para a injúria celular (ASSIS *et al.*, 2017; DE GODOY; BRAILE; NETO, 1998).

Um biomarcador é definido, segundo a “Medical Subject Headings”, como: parâmetros biológicos mensuráveis e quantificáveis, tais como a concentração

enzimática específica, concentração específica de hormônios, distribuição do fenótipo gênico em uma população, presença de substâncias biológicas, entre outras, e que servem como índices de avaliações relacionadas à saúde e (ATKINSON *et al.*, 2001).

Figura 1- A estrutura da TnT no estado ativado por Ca^{2+} e com uma subunidade de TnC no músculo esquelético, obtida por difração de Raio X (código 1YTZ).



Fonte: banco de dados de proteínas, PDB 1YTZ (H.M. BERMAN *et al.*, 2000).

Na figura acima (Figura 1) é possível observar a estrutura cristalizada da troponina T no complexo com Ca^{2+} ativado. Nessa estrutura também está presente uma subunidade da troponina C contida no músculo esquelético. O músculo esquelético é constituído por fibras que se associam em cada extremo a um tendão, o qual por sua vez liga-se ao osso ou à aponeurose, portanto, as troponinas possuem uma capacidade natural de se associarem (PINTO; SOUSA; CAMERON, 2004). No complexo troponina-tropomiosina, a troponina T estará presente no complexo Troponina, junto com as subunidades troponina I e troponina C.

Quando uma lesão miocárdica ocorre, a estrutura da fibra muscular começa a se romper ocasionando, assim, na liberação de fragmentos das troponinas. As troponinas T e I são liberadas na corrente sanguínea, permanecendo elevada a sua concentração após o trauma do miocárdio durante semanas (ASSIS *et al.*, 2017).

Além disso, estudos sobre a elevação dos níveis de troponina T medidos dentro das primeiras 24 horas após a admissão em pequenos grupos selecionados

de pacientes com dor precordial, demonstraram uma abundância de eventos cardíacos em pacientes com elevação da troponina T (E. MAGNUS OHMAN, *et al.*, 1996). Portanto, o desenvolvimento de diagnósticos para a troponina, altamente sensíveis e seletivos, denota a possibilidade em mensurar níveis iniciais do aumento deste biomarcador, assim, com grande potencial na detecção precoce do infarto agudo do miocárdio e na predição de risco em pacientes com síndrome coronariana aguda.

1.1. ASPECTOS COMPUTACIONAIS

1.1.1. Simulação por métodos quânticos: Teoria do Funcional da Densidade

A química computacional é um campo já consolidado na área da química e bastante dinâmico. Além disso, a química computacional já contribuiu de forma satisfatória na compreensão em conceitos hoje consolidados na química, entre eles: aromaticidade, ligações de hidrogênio, reatividade química, propriedade físico-químicas de novos materiais, etc (SOLÀ; DE PROFT; BICKELHAUPT, 2019).

Nesse contexto, presumir propriedades moleculares quantitativamente ou tendências qualitativas dessas propriedades e explicar a natureza da ligação química estão entre os principais objetivos da Química Quântica (MORGON, N. H.; CUSTÓDIO, 1995), portanto a química teórica desenvolve modelos que são capazes de racionalizar e interpretar resultados experimentais para prever novos fenômenos (CHAVES, ANDERSON SILVA, 2015). As leis físicas que regem o comportamento dos materiais na escala subatômica estão contidas na equação de Schrödinger, abaixo temos a (equação 1) independente do tempo para o sistema no seu estado fundamental (SCHRÖDINGER, 1926).

$$H\psi = E\psi \quad (1)$$

Explicitando os termos contidos no Hamiltoniano H , para um sistema quântico deve ser descrito da seguinte maneira (equação 2):

$$\hat{H}_T = \hat{T}_n + \hat{T}_e + \hat{V}_{ne} + \hat{V}_{nn} + \hat{V}_{ee} \quad (2)$$

Os termos da equação acima são, respectivamente: T_n , a energia cinética dos núcleos; T_e a energia cinética dos elétrons; V_{ee} , a energia potencial de interação (repulsão) elétron-elétron; V_{ne} a energia potencial de interação (atração) núcleo-elétron; V_{nn} a energia potencial de interação (repulsão) núcleo-núcleo.

Dessa forma, a equação de Schrödinger pode fornecer informações da energia no estado fundamental de um sistema quântico, entretanto, para moléculas não-hidrogenóides os cálculos começam a ficar cada vez mais complexos, sendo necessária uma série de aproximações. Uma aproximação amplamente conhecida, é a aproximação de Born-Oppenheimer (BORN; OPPENHEIMER, 1927). Nessa aproximação, efetua-se o desacoplamento da dinâmica do núcleo e elétron. Assim, considerando que a massa do núcleo é suficientemente grande em relação a massa do elétron, podemos inferir que os núcleos estão estáticos em relação aos elétrons, uma vez que os elétrons se movem a uma velocidade consideravelmente maior do que em relação a velocidade do núcleo. Portanto é possível cortar os termos referentes a: T_n , a energia cinética do núcleo; e V_{nn} , a energia potencial de interação (repulsão) núcleo-núcleo.

Logo, o Hamiltoniano (equação 3), passa a ter a seguinte forma matemática:

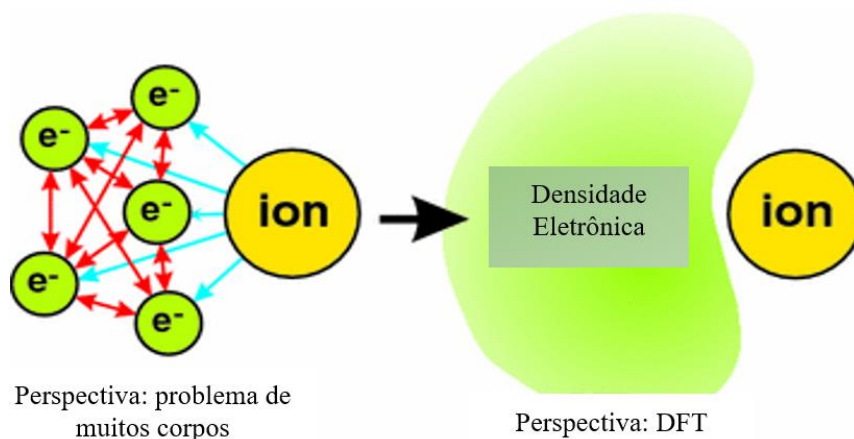
$$\hat{H}_T = \hat{T}_e + \hat{V}_{ne} + \hat{V}_{ee} \quad (3)$$

Essa equação é o Hamiltoniano eletrônico, onde o termo T_n tende a zero e V_{nn} se torna uma constante (AMARAL, 2019; CHAVES, ANDERSON SILVA, 2015).

Nesse contexto, utilizar a equação de Schrödinger para moléculas complexas é inviável mesmo num contexto computacional atual (CHAVES, ANDERSON SILVA, 2015).

Em 1926, com a criação da teoria de Thomas-Fermi (FERMI, 1928; THOMAS, 1927), surge um método de cálculo de estrutura eletrônica de átomos usando apenas a densidade eletrônica do estado fundamental de um único elétron, $r(r)$, porém, ainda muito simples para moléculas complexas (THOMAS; UMEDA, 1957), Thomas e Fermi foram os primeiros a tentar usar a densidade eletrônica como variável chave em vez da função de onda, os dois cientistas derivaram uma relação para a energia cinética em termos de (r) , originando o modelo de Thomas-Fermi. Mais tarde Dirac adicionou a contribuição de troca (CHAVES, ANDERSON SILVA, 2015). Dessa forma, o modelo de Thomas-Fermi não descreve com alta precisão sistemas atômicos, devido à ausência na descrição nas regiões próximas ao núcleo atômico, onde existe uma singularidade devido ao potencial coulombiano; o modelo também é incapaz de descrever corretamente as ligações químicas além de negligenciar os efeitos de troca e correlação, uma vez que o sistema parte de gás de elétrons não-interagentes, tornando o sistema irrealista (SOBRINHO, 2017). Porém, devido a essa quebra de paradigma, são vistos como sendo responsáveis pela primeira versão da DFT, uma vez que partem de uma perspectiva de densidade eletrônica no cálculo de estrutura eletrônica e não mais a partir da função de onda. Em 1950, Slater (1951), de forma intuitiva, combina essa ideia com o método de orbital de Hartree (HARTREE, 1928). Somente em 1964, Hohenberg-Kohn (HOHENBERG, P.; KOHN, 1964), demonstram um método exato baseado em $r(r)$ (densidade eletrônica) (Figura 2) (LUSK; MATTSSON, 2011):

Figura 2- Perspectiva da DFT para o cálculo de estrutura eletrônica minimizando o problema “de muitos corpos”.



Fonte e tradução de LUSK; MATTSSON, 2011.

Nesse contexto, a Teoria do Funcional da Densidade (DFT para o inglês, *Density Functional Theory*) emerge como uma plataforma computacional precisa e útil para prever, desde os primeiros princípios, a estrutura do estado fundamental e as propriedades desses sistemas que podem abranger uma ampla gama de escalas de comprimento de sistemas moleculares (FABIAN *et al.*, 2019; MORGON, N. H.; CUSTÓDIO, 1995). Hohenberg-Kohn, demonstraram que: *o potencial externo, V_{ext} , para um dado sistema de elétrons, pode ser determinado unicamente, exceto por uma constante, pela densidade eletrônica do seu estado fundamental $r(r)$* . Dessa forma, fica explícito que, qualquer observável em um sistema quântico estacionário, pode ser calculado, em princípio, a partir da densidade eletrônica do estado fundamental, logo, todo observável pode ser descrito como um funcional da densidade eletrônica do estado fundamental. (HOHENBERG, P.; KOHN, 1964).

Devido ao aumento no desempenho computacional nas últimas décadas, a química teórica recebe mais avanços, nesse contexto, a DFT surge como uma alternativa para os métodos tradicionais *ab initio*, e semi-empíricos no estudo de propriedades do estado fundamental de sistemas moleculares, fornecendo uma aproximação mais exata para solucionar o problema de muitos corpos quando o sistema possui mais de um elétron. (HEERDT; MORGON, 2011). As principais vantagens da DFT frente a outros métodos padrões *ab initio* (métodos baseados nas equações de Hartree-Fock-Roothaan, o qual não se utiliza de nenhum parâmetro empírico que precisa ser ajustado ou determinado para efetuar os cálculos), estão no ganho de velocidade computacional e espaço em memória (MORGON, N. H.; CUSTÓDIO, R., 1995). A DFT reduz o problema conhecido como “o problema de muitos corpos”, uma vez que descrevendo o sistema através da sua densidade eletrônica, e não mais pela função de onda, o problema de $3N$ graus de liberdade, dados pela função de onda de muitos corpos, decai para apenas três graus de liberdade, a saber, as coordenadas das posições x , y e z da densidade eletrônica. (AMARAL, 2019). Considerando-se um sistema arbitrário qualquer que seja modelada com n função de base, o esforço computacional no estudo de sistemas utilizando a DFT aumenta na ordem de n^3 , enquanto que para outras técnicas, como o método Hartree-Fock, aumenta em n^4 ou n^5 para técnicas de interação de configuração, já que para a DFT deixa de se utilizar função de onda e parte unicamente da densidade

eletrônica. (SOBRINHO, 2017). Além disso, comparando com métodos semi-empíricos, o hamiltoniano da DFT é bem definido e suas características não são obscurecidas por frequentes aproximações no procedimento computacional. (MORGON, N. H.; CUSTÓDIO, R., 1995).

Nesse contexto, a DFT se demonstra ser útil no estudo de sistemas moleculares mais complexos, descrevendo-os realisticamente sistemas orgânicos, inorgânicos, metálicos e semi-condutores. Por essa razão, essa metodologia do funcional da densidade tem sido cada vez mais usada para sistemas moleculares encontrados em pesquisas farmacêuticas, agroquímicas e biotecnológicas; na ciência de materiais e polímeros; em pesquisas de complexos organometálicos e aglomerados típicos em catálise, superfície e estado sólido; em eletroquímica e microeletrônica (MORGON, N. H.; CUSTÓDIO, R., 1995).

Como já pontuado anteriormente, o parâmetro principal utilizado na DFT, que nos dará toda informação do nosso sistema quântico, será a densidade eletrônica, $\rho(r)$, o qual descreverá a distribuição de carga em uma molécula. A mesma deve ser encarada como o “observável” mecânico-quântico, o que possibilitou uma reformulação teórica mais acessível em termos de química descritiva. Portanto, a DFT possui menos abstração (na forma matemática) em sua resolução, contrariando o caráter abstrato da função de onda multieletrônica total que aparece em outros métodos da química quântica quando trazem a resolução da equação de Schrodinger (MORGON, N. H.; CUSTÓDIO, R., 1995).

No artigo de 1964 Hohenberg e Kohn (HOHENBERG, P.; KOHN, 1964), consideram que um sistema quântico de N -elétrons descrito pelo hamiltoniano não relativística da seguinte maneira (Equação 4):

$$\hat{H} = \hat{T} + \hat{V} + \hat{U} \quad (4)$$

Onde $\hat{T}$ é a energia cinética, $\hat{V}$ o operador de repulsão elétron-elétron e que inclui a repulsão Coulombiana e todos os termos não clássicos (troca e correlação) e $\hat{U}$ é o potencial externo com respeito aos elétrons, normalmente devido às cargas dos núcleos Z_α .

Os teoremas de Hohenberg-Kohn podem ser representado por dois postulados básicos que apresentarão o método do funcional para a densidade (TSUNEDA, 2014).

- 1) A função de onda do estado fundamental e todas as propriedades deste estado são funcionais da densidade eletrônica, portanto, a densidade $\rho(r)$ determina o potencial externo;
- 2) A energia do estado fundamental de um sistema multieletrônico é obtida para o valor exato da densidade no estado fundamental $\rho_0(r)$.

$$E_e[\rho(r)] = T_0[\rho(r)] + \int (\hat{V}_{ext}[\rho(r)] + \hat{V}_H[\rho(r)]dr + E_{xc}[\rho(r)]$$

Onde $\hat{V}_{ext}$ é o potencial externo gerado pelo núcleo sobre os elétrons, $\hat{V}_H$ é o potencial de Hartree oriundo do modelo clássico de Coulomb da interação elétron-elétron. O $T_0[\rho(r)]$ é a energia cinética de um gás de elétrons não-interagente e $E_{xc}[\rho(r)]$ é o funcional de troca e correlação.

O primeiro postulado confirma os potenciais externos, dessa forma, o operador hamiltoniano dos estados eletrônicos de baixa energia pode ser determinado exclusivamente apenas pela densidade eletrônica (TSUNEDA, 2014). Já o segundo postulado prova o princípio variacional de que o operador hamiltoniano sendo representado pela densidade de elétrons possuem uma solução de energia mínima (local) (TSUNEDA, 2014).

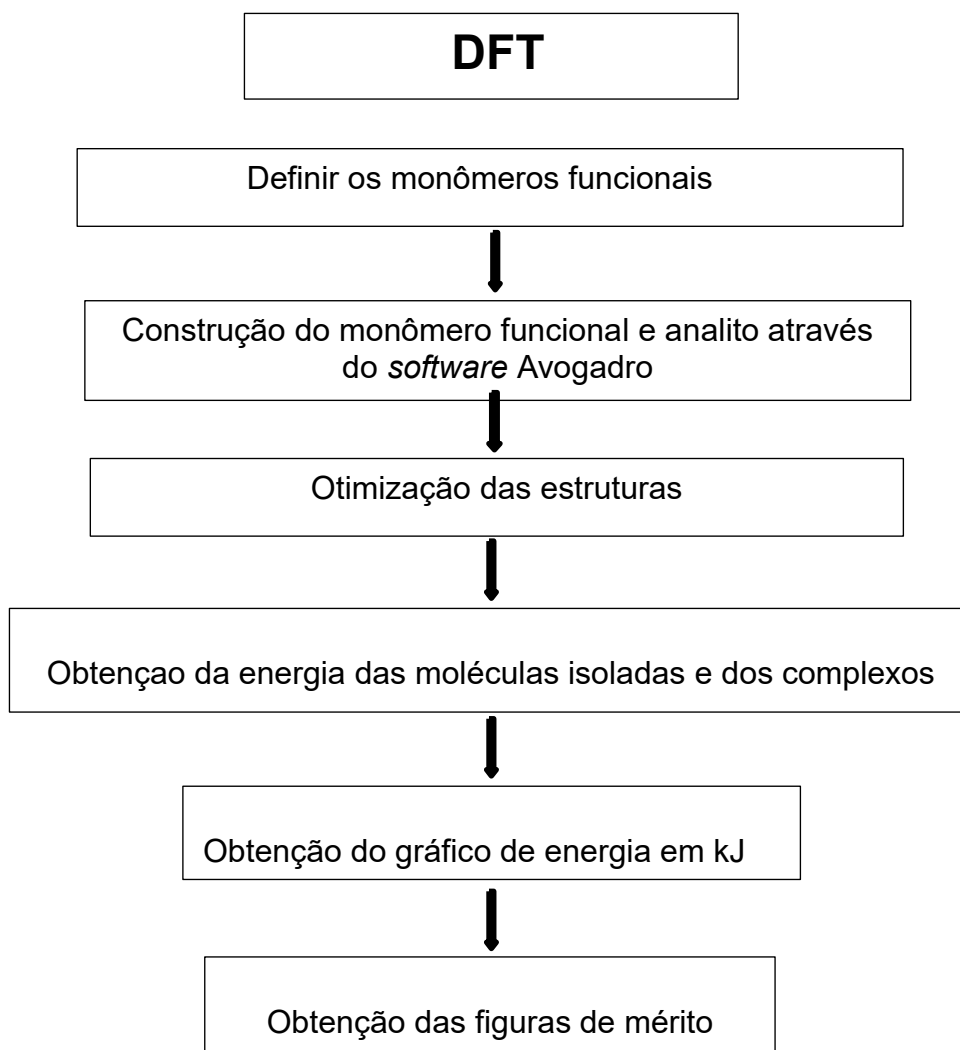
Os dois teoremas de HK demonstram como se pode determinar o estado fundamental de um sistema, através de dado potencial externo, usando a densidade eletrônica tridimensional como variável básica ao invés de usar a função de onda de N-elétrons, o qual muito mais complexa reduzindo o custo computacional (DUARTE, 2001).

O *software* utilizado para efetuar este tipo de simulação, e que foi usado neste trabalho de mestrado, é o Orca, que contém um pacote de programas de química quântica *ab initio*, e diversos métodos modernos para modelagem das

estruturas eletrônicas, entre eles, a DFT, que foi o método utilizado para os cálculos quânticos para a troponina T, nesta dissertação. Além disso, os cálculos foram feitos de forma remota através de clusters de computadores, o GridUnesp, localizado na Barra Funda em São Paulo no Instituto de física teórica (IFT).

Visando diminuir o tempo exigido na criação dos arquivos *input* para os cálculos em DFT na Orca é utilizada a linguagem de programação *Python*, que permite eliminar atividades muito manuais e repetitivas, que podem acabar ocasionando erros operacionais. Abaixo, encontra-se a esquematização do procedimento realizado para os cálculos por DFT:

Esquema 1: fluxograma para aplicação da DFT.



Fonte: autoria própria.

1.1.2. Simulação por métodos clássicos: Dinâmica Molecular

Para sistemas com grande número de átomos como por exemplo, uma proteína, não pode ser utilizado métodos quânticos pois exige um grande custo computacional. Dessa forma, para sistemas complexos, o movimento eletrônico deve ser ignorado. Portanto, na dinâmica molecular (DM), através de métodos empíricos para se obter o campo de força, é possível interpretar o sistema calculando sua energia total através das posições dos núcleos dos átomos, somente. (CLAVERIE, 2019).

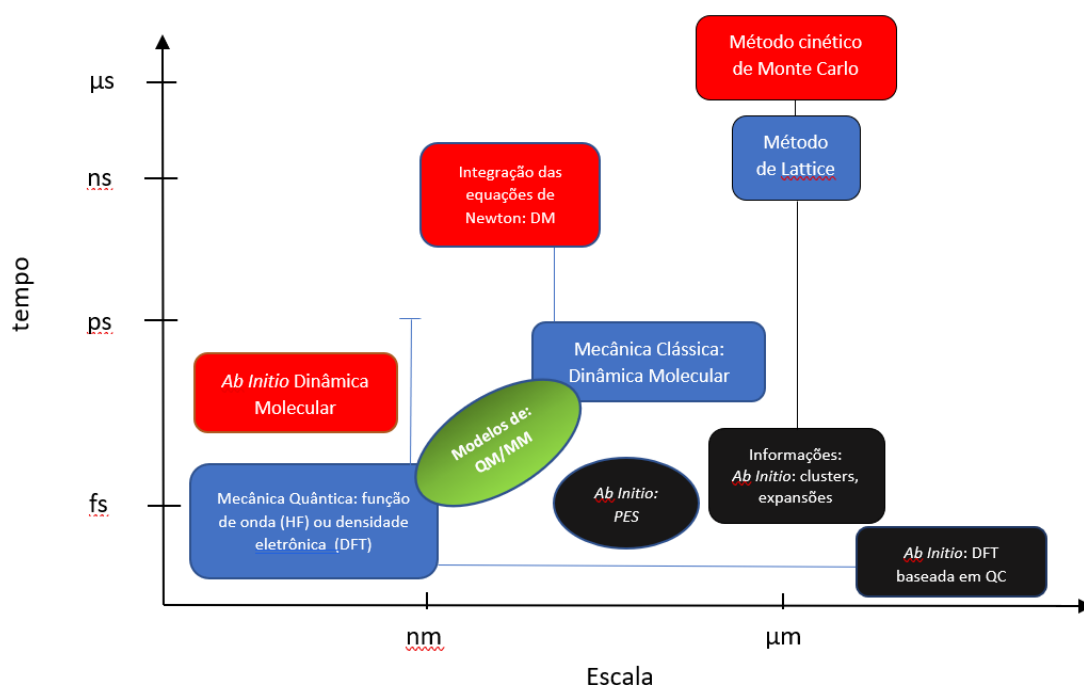
A dinâmica molecular está pautada em duas premissas: será também considerado a aproximação de Born-Oppenheimer, o qual assumi que o núcleo está suficientemente parado em relação ao elétron, este devido a sua alta velocidade. E a segunda é que cada núcleo contido na molécula será tratado como uma partícula clássica. Portanto, ao excluir reações químicas, baixas temperaturas ou detalhes do movimento dos átomos de hidrogênio, é relativamente seguro inferir que o sistema está sendo governado pelas leis da mecânica clássica. (CLAVERIE, 2019; VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1990).

A DM já foi utilizada para simular troponinas cardíacas e suas subunidades individuais para melhor compreensão de seus movimentos dinâmicos e a importância funcional desses movimentos (LINDERT; KEKENES-HUSKEY; MCCAMMON, 2012). A simulação computacional por dinâmica molecular pode fornecer detalhes finais sobre os movimentos de átomos individuais em função do tempo. Dessa forma, podem ser usados para abordar questões específicas sobre as propriedades de um sistema modelo de forma mais simples do que experimentos no sistema real. (M. KARPLUS; J. A. MCCAMMON., 2002). Detalhes de como é feito a ativação do sítio ativo de uma enzima de interesse, por exemplo para o caso das monooxigenase (MIYANISHI *et al.*, 2019), podem ser respondidas através da simulação computacional. Obviamente, a simulação computacional não vem para substituir os experimentos, ambos devem caminhar juntos de forma podem ser validados um através do outro. Dessa forma, aliado a este fato surge o interesse pela DM para o estudo teórico do MIP para a troponina T.

Existem diversas metodologias computacionais para sistemas químicos, eles diferem principalmente na sua teoria, aplicação em um determinado sistema e,

principalmente, a quantidade de átomos possíveis para serem calculados e, dessa forma, o recurso computacional exigido, como já foi abordado anteriormente. Abaixo encontra-se algumas metodologias comumente usadas de acordo com o tempo de conta utilizado na simulação em função do tamanho do sistema, isto é, quantidade de átomos envolvidos (RAMASUBRAMANIAM; CARTER, 2007) (Figura 3).

Figura 3- Esquematização de algumas metodologias discutidas, entre elas a DFT e DM colocada num gráfico o qual relaciona o tempo de conta em função da escala do sistema. As estratégias por traz da metodologia estão em azul. Os métodos de escalonamento em vermelho. Os acoplamentos diretos em verde e acoplamento espacial (a transferência de informação) em preto. Abreviações usadas na figura: DFT (Teoria do Funcional da Densidade); PES (Superfície de Energia Potencial); QM/MM (Mecânica Quântica e Mecânica Molecular); DM (Dinâmica Molecular); QC (Quase-Contínuo).



Fonte: adaptada de Ramasubramaniam (2007).

Como já dito, a metodologia da DM é fundamentada através dos princípios da Mecânica Clássica e, portanto, nos fornece informações sobre o comportamento dinâmico microscópico, dependente do tempo e dos átomos individuais que compõem o sistema (BURKERT, 1982; H. HÖLTJE, W. SIPPL, D. ROGNAN; 2006).

A construção das estruturas necessárias para ambos os métodos, clássicos e quânticos, são feitas através do software AVOGADRO® (HANWELL et al., 2012). A

obtenção das figuras de mérito foi realizada pelo *Visual Molecular Dynamics* (VMD) (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).

Neste projeto, especificamente, o pacote que foi utilizado para o modelo clássico e mimético (MIP-Troponina) foi o GROMACS (BERENDSEN; VAN DER SPOEL; VAN DRUNEN, 1995). Adicionalmente, os métodos quânticos (DFT) serão utilizados para compreender a interação entre os aminoácidos mais abundantes na macromolécula troponina T com os monômeros funcionais mais usados em síntese de polímeros impressos, e assim avaliar/conseguir a interação específica entre um monômero funcional com um dos aminoácidos da troponina T. Já a utilização da DM foi necessária para a avaliação da proteína completa, colocando-a em uma caixa teórica rodeada de monômeros funcionais e moléculas de água. Como esse sistema é complexo, por envolver uma biomacromolécula, para essa escala a mecânica clássica se torna mais adequada. Através da DM irá ser possível determinar as propriedades termodinâmicas macroscópicas desse sistema.

É necessária a utilização da mecânica estatística (o qual terá a função de calcular propriedades observáveis macroscópicas a partir de outras microscópicas) para que se possam obter propriedades macroscópicas de interesse, tais como: pressão, energia interna, volume, temperatura, entropia, energia livre, etc. (A. M. NAMBA; SILVA, 2008).

A perspectiva da DM sobre o sistema irá descrevê-lo por forças newtonianas e, dessa forma, considera que uma coleção de átomos que interagem umas com as outras são feitas por meio de forças (quase) harmônicas ou elásticas, de forma análoga a um sistema composto de pesos unidos por molas. (BOWEN; ALLINGER, 1991).

Nas simulações por DM, é fundamental a determinação da evolução temporal da energia total do sistema (como uma enzima, por exemplo) como uma função de todas as coordenadas de cada átomo presente na molécula. Dessa forma, é necessária uma descrição precisa da energia, uma vez que se espera que os estados de energia mais baixa sejam completados (MOULT, 1997). Portanto, o gradiente da função energética, diferenciável, está inexoravelmente unido às forças que atuam nos átomos individuais. Na química, o conjunto de funções potenciais de energia das quais essas forças derivam é comumente referido como o campo de força (MOULT, 1997).

Um conjunto de parâmetros devem ser acrescentados no campo de força. Os parâmetros são tipicamente obtidos por cálculos mecânicos quânticos semi-empíricos iniciais ou por ajuste a dados experimentais como, por exemplo: difração de raio-X, RMN, infravermelho, espectroscopia Raman, etc. (GONZÁLEZ, 2011).

A energia potencial total do sistema, $V(r)$, é formulado como a soma de vários termos de energia, incluindo os termos para átomos ligados (comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros) assim como os termos para átomos não-ligados (interações de Van der Waals e de Coulomb) (A. M. NAMBA; SILVA, 2008). Um típico campo de força é representado pela equação 4 abaixo:

$$V(r) = \sum V_l + \sum V_q + \sum V_{vdW} + \sum V_{elet} \quad (7)$$

Onde, V_l é a energia de estiramento da ligação em relação a seu valor de equilíbrio (ou ideal), V_q é a energia de deformação do ângulo de ligação em relação a seu valor de equilíbrio, V_{vdW} representa a energia das interações de Van der Waals e V_{elet} representa as energias de atração ou repulsão eletrostática entre duas cargas.

Os potenciais harmônicos são demonstrados na forma padrão de acordo com a Lei de Hooke, explicitando às oscilações dos comprimentos e ângulos de ligação com relação aos valores de equilíbrio, mostrada nas equações abaixo 8 e 9.

$$V_l = k_l(l - l_0)^2 \quad (8)$$

$$V_\theta = k_\theta(\theta - \theta_0)^2 \quad (9)$$

Onde l e θ são os comprimentos e ângulos de ligação, respectivamente, e l_0 e θ_0 são os correspondentes valores de equilíbrio de k_l e k_θ as constantes de força para a restituição aos respectivos valores de equilíbrio. Essa aproximação harmônica só será válida para pequenas distorções com relação aos valores de equilíbrio (A. M. NAMBA; SILVA, 2008).

A forma representativa do potencial de energia para uma torção é dada pela seguinte equação 10:

$$V_{\varphi} = \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\varphi - \gamma)) \quad (10)$$

Onde V_n é a barreira de energia para a torção, n é o número de máximos (ou mínimos) de energia para uma torção completa, f é o ângulo diedro e g é o ângulo de fase (defasagem no ângulo diedro que pode gerar um ponto de mínimo ou de máximo na posição $f=0$). O valor possível de n dependerá do tipo de torção considerada e, geralmente, não excede o valor 3. Para alguns campos de força, é introduzido um quarto potencial harmônico, o qual é descrito para manter a estrutura tridimensional em um conjunto de quatro átomos, definindo ainda as oscilações da mesma. Esse potencial é denominado “potencial torcional impróprio” (A. M. NAMBA; SILVA, 2008).

Como explicitado anteriormente, para as interações entre pares de átomo não-ligados covalentemente (i, j), os potenciais são descritos em termos de Van der Waals e eletrostático, o qual são representados respectivamente pelos potenciais de Lennard-Jones (potencial 6-12, Equação 11) e de Coulomb (Equação 12).

$$V_{vdW} = 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (11)$$

$$V_{elet} = \left(\frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 \varepsilon_r r_{ij}} \right) \quad (12)$$

Na equação 8 ε_{ij} é a profundidade do potencial entre a barreira atrativa e a repulsiva, já o termo σ_{ij} é a distância finita na qual o potencial interpartícula é zero. Esses dois parâmetros podem ser ajustados experimentalmente ou por cálculos teóricos. Para a equação 9, referente as interações eletrostáticas, q_i e q_j correspondem à magnitude das cargas pontuais de cada átomo, r_{ij} à distância entre as cargas, ε_0 a permissividade do espaço livre e ε_r a constante dielétrica relativa do meio. (A. M. NAMBA; SILVA, 2008).

Existem diversos tipos de campos de forças, cada um deles possui sua especificidade de acordo com seus conjuntos de parâmetros. Por exemplo, alguns podem incluir outros termos que descrevam as ligações de hidrogênio, outros campos

de força podem usar diferentes termos no acoplamento de oscilações entre ângulos e comprimentos de ligação, com o objetivo de se obter uma melhor concordância com espectros vibracionais (ACKERMANN, 1987). Portanto, para que se possa obter uma alta confiabilidade nos resultados, é necessária que se conheça o sistema para efetuar uma escolha adequada do campo força, uma vez que o mesmo depende das propriedades que serão investigadas. Existem uma série de campos de força que são usualmente utilizados para sistemas de biomacromoléculas, entre eles, podemos citar: CHARMM (BROOKS *et al.*, 2009), CHARMM36m (HUANG *et al.*, 2016), GROMOS (VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1987), AMBER (CASE *et al.*, 2010), OPLS (JORGENSEN; MAXWELL; TIRADO-RIVES, 1996), CVFF (ASENSIO; MARTIN-PASTOR; JIMENEZ-BARBERO, 1995), entre outros.

A equação 13, não pode ser resolvida diretamente, portanto, a simulação de DM consiste da solução numérica, passo a passo, da equação de movimento proposta por Newton (GONZÁLEZ, 2011), o qual pode ser descrita para um sistema atômico simples. Dessa forma, uma vez que a energia potencial do sistema é definida, as forças podem ser obtidas a partir da 2ª Lei de Newton (equação 13):

$$F_i(t) = m_i a_i \quad (13)$$

$$F_i(t) = \frac{-\partial V(r_i)}{\partial r_i} \quad (14)$$

Onde F_i é a força que atua sobre cada partícula do sistema em um instante de tempo t , e a_i é a aceleração do átomo i de massa m_i .

Tendo escolhido o respectivo campo de força, é possível encontrar as forças que atuam sobre cada átomo, calculando-se a derivada primeira da energia potencial, o qual é extraído pelo campo de força, em relação às posições desses átomos. Através da equação 11 obtém-se a aceleração da partícula. A partir da mesma, integrando-se as equações de movimento, gera as velocidades, o qual utilizando a integral obtém-se a mudança de posição do átomo. Dessa forma, com as novas posições e velocidades de cada partícula, é possível extrair as energias potencial e cinética do sistema (A. M. NAMBA; SILVA, 2008).

À medida que se aplica sucessivamente esse procedimento, gera o que se denomina de “trajetória” da molécula, que nada mais é do que o conjunto de posições e velocidades de cada partícula ao longo do tempo. As equações de movimento são integradas utilizando algoritmos, esses são baseados em métodos de diferenças finitas, o qual consiste em integrações divididas em pequenos intervalos de tempos, ou seja, pequenos passos de integração. A integração das equações de movimento possibilita simular os movimentos de maior frequência contidos no sistema, geralmente são as vibrações das ligações (VERLET, 1968). Dentre os métodos mais utilizados para o cálculos dessas equações na dinâmica molecular é o algoritmo de Verlet (VERLET, 1968), o qual utiliza as posições e acelerações dos átomos no tempo t e as posições do passo anterior, $r(t - \Delta t)$, para determinar as novas posições no tempo $t + \Delta t$, de acordo com a seguinte equação 15.

$$r(t + \Delta t) = 2r(t) - r(t - \Delta t) + a(t)\Delta t^2 \quad (15)$$

É possível obter esse algoritmo através da expansão em série de Taylor, inicialmente expandindo para frente equação 15 e depois para trás equação 16. Somando-se as duas e isolando $r(t + \Delta t)$, chega-se a equação 17.

$$r(t + \Delta t) = r(t) + v(t)\Delta t + \frac{1}{2}a(t)\Delta t^2 + \dots \quad (16)$$

$$r(t - \Delta t) = r(t) - v(t)\Delta t + \frac{1}{2}a(t)\Delta t^2 - \dots \quad (17)$$

A representação de estado do sistema pode possuir um conjunto de configurações e propriedades que permanecem constantes durante o cálculo de integração das equações de Newton, a essa característica do sistema é chamado de *ensemble* (ALLEN; TILDESLEY, 2017). Existem diversos tipos de opções de *ensemble*, o qual irá diferir de acordo com o tipo de variável que estará sendo controlada. Podemos citar como exemplo o *grand*-canônico ou μVT (potencial químico, volume e temperatura constantes durante a simulação). Outros *ensemble* bastante utilizados é o micro-canônico ou NVE (número de partículas, volume e energia total constante); o canônico ou NVT (números de partículas, volume e temperatura constantes); o isobárico-isoentálico ou NPH (números de partículas, pressão e entalpia constantes); o isotérmico-isobárico ou NPT (com números de partículas, pressão e temperatura constantes) (HUANG, 1987).

Durante as simulações de DM, para se obter o controle da temperatura de interesse, é necessária inserção de um termostato, um termostato teórico contido na literatura que é amplamente utilizado é o termostato de Berendsen, no qual insere o sistema em um banho térmico no qual possui T_0 fixa (VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1990). Ao realizar a simulação, as velocidades são re-escaladas em cada passo da integração, para que dessa forma seja possível ajustar a energia cinética do sistema até a temperatura desejada (VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1990). Essa técnica é importante uma vez que permite até acelerar a cinética da reação de acordo com a variação da temperatura. Para o controle da pressão a variável T se torna constante e é substituída pela variável P , e as velocidades dos átomos são substituídas pelas coordenadas atômicas. Os barostatos mais utilizados são os de Berendsen (BERENDSEN *et al.*, 1984) e Parrinello-Rahaman (PARRINELLO; RAHMAN, 1981).

1.2. CONDIÇÕES INICIAIS, MINIMIZAÇÃO DE ENERGIA E EQUILIBRAÇÃO

É necessário conhecer as posições e velocidades iniciais de cada partícula no sistema. A forma para descobrir como proceder isso também dependerá do sistema de análise, por exemplo: no caso de um cristal, as posições estarão normalmente disponíveis na forma de um arquivo cristalográfico (H.M. BERMAN *et al.*, 2000), o qual podemos construir um supercélula combinando várias células unitárias. No caso de um sistema desordenado, as posições podem ser geradas aleatoriamente ou pode ser criado uma estrutura ordenada e depois “derretê-la”. A velocidade de cada partícula é atribuída aleatoriamente a partir de uma distribuição de Maxwell-Boltzmann centrada na temperatura desejada e depois são ajustadas para zerar o momento angular e o centro da velocidade da massa do sistema total (GONZÁLEZ, 2011).

Além disso, é necessário minimizar o sistema, essa técnica consiste em encontrar um conjunto de coordenadas para que se obtenha uma energia potencial baixa no sistema de interesse. Durante a minimização de energia a superfície de potencial é levada na direção em que a energia decresce, de forma que é introduzido a um mínimo de energia local próximo. (A. M. NAMBA; SILVA, 2008). Conforme são feitos os ajustes nas posições atômicas, esse processo relaxa as distorções nas ligações químicas, nos ângulos entre ligações e nos contatos de Van der Waals

(BURKERT, 1982). Entre os algoritmos mais utilizados para a minimização de energia estão: o método steepest descende, o método dos gradientes conjugados e o método de Newton-Raphson (HESTENES; STIEFEL, 1952).

Dessa forma, os primeiros passos na DM, consistem no “período de equilíbrio”. Nesse momento, as propriedades do sistema não se mantêm constantes. O período de equilíbrio será a variável e dependerá do sistema em estudo. Ao atingir o equilíbrio termodinâmico, é considerado finalizado o período de equilíbrio. A partir desse ponto, é possível determinar as trajetórias da DM e calcular as diferentes propriedades para o sistema de análise (A. M. NAMBA; SILVA, 2008).

Portanto, a simulação por DM é uma técnica para produzir uma trajetória dinâmica para um sistema composto de partículas, integrando as equações de movimento de Newton contidas na mecânica clássica. Logo, assume-se que o sistema apresenta pequenas vibrações que são incapazes de alterar o estado eletrônico do mesmo e, por esse motivo, é possível efetuar uma aproximação para descrever as interações covalentes do sistema através do modelo de osciladores harmônicos. Originando assim, um campo de força clássico que descreve as interações inter e intramoleculares em um sistema (GONZÁLEZ, 2011).

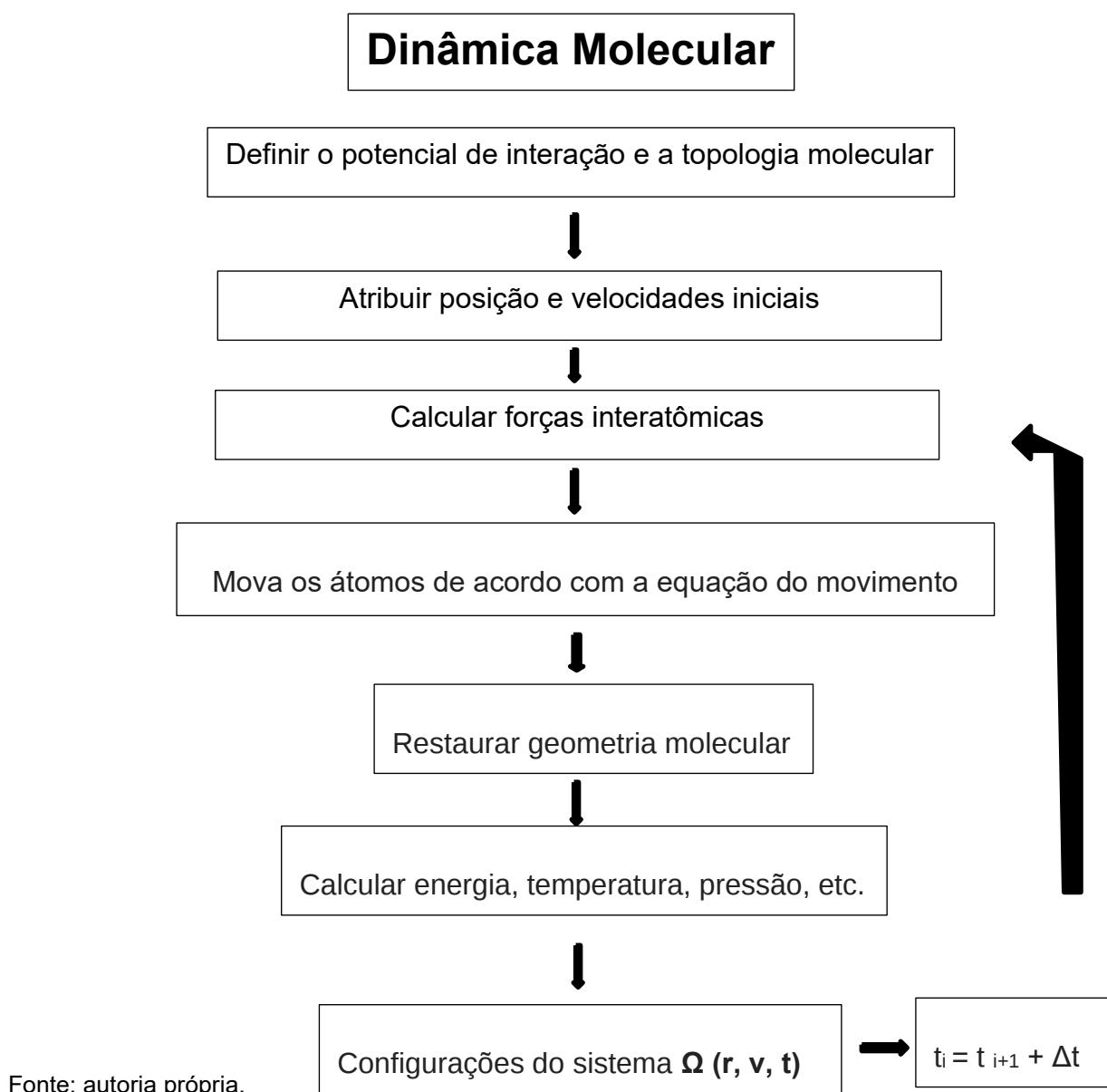
Como já explicitado, para dar início a DM, é necessária um conjunto de condições iniciais (posições e velocidades de cada partícula), um bom modelo para representar as forças que atuam entre as partículas (a partir de cálculos da estrutura eletrônica ou usando campos de força empíricos, como já discutidos) e definir as condições de contorno a qual foi empregado. Feito isso, basta resolver a equação clássica do movimento (equação 18) e a energia potencial dependendo das coordenadas das N partículas (GONZÁLEZ, 2011).

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} = -\vec{\nabla} U(r_1, r_2, \dots, r_N) \quad (18)$$

Este é um sistema de equações diferenciais não lineares de segunda ordem acopladas que não podem ser resolvidas exatamente, e a equação 18 deve ser resolvida numericamente passo a passo, usando um algoritmo de integração apropriado. (GONZÁLEZ, 2011).

Como resultado final da dinâmica molecular, obtém-se uma trajetória especificando as mudanças de velocidade e posição de cada átomo ao longo do tempo. Abaixo temos uma esquematização generalizado do funcionamento para o cálculo da dinâmica molecular:

Esquema 2: fluxograma do funcionamento da Dinâmica Molecular.



Com isso, para que todo o método de Mecânica Molecular seja executado, é necessário somente que seja especificada uma configuração inicial do sistema, a partir da qual todo processo citado acima, é realizado.

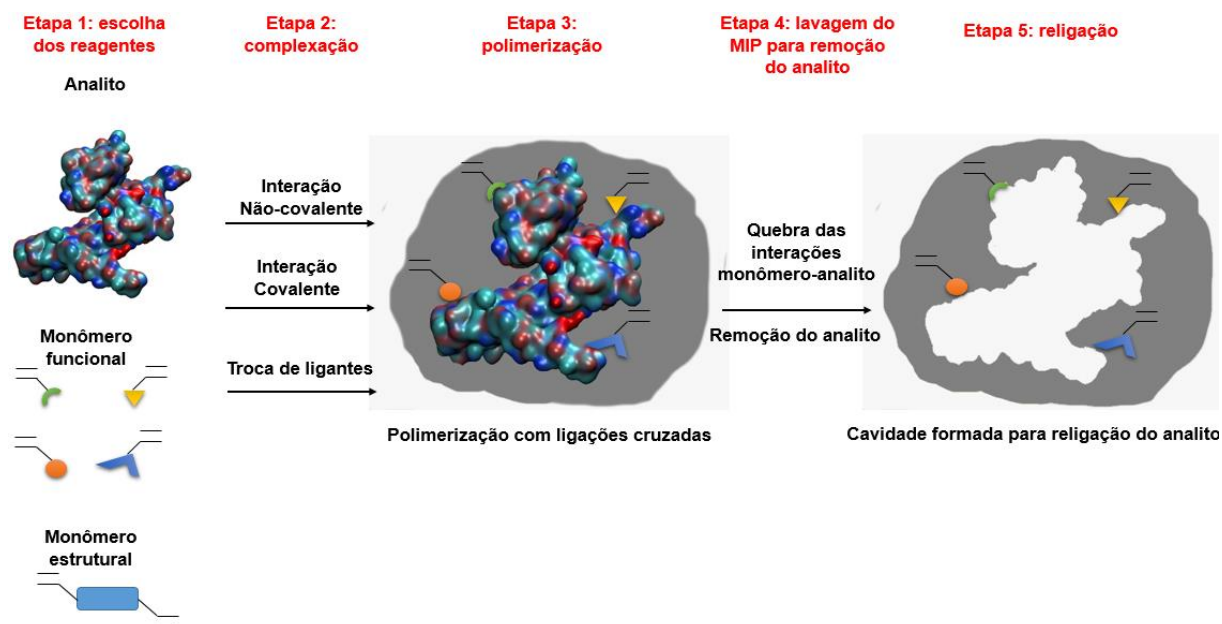
1.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO

Imunossensores recebem grande atenção pois combinam a especificidade inerente de uma imunoreação com a sensibilidade muito alta de diferentes detectores, dessa forma, aliado com seu potencial para um teste de atendimento *in situ* para troponina T, eles são altamente desejáveis, já que esses dispositivos podem ser aplicados em emergências de cardiologia, permitindo um diagnóstico rápido dos pacientes e consequentemente a melhor gestão clínica (FELIX; ANGNES, 2018) (SILVA *et al.*, 2010). Aliado a especificidade do seu reconhecimento biomolecular entre antígenos e anticorpos formando um complexo estável (LUPPA; SOKOLL; CHAN, 2001), pode retornar um tipo de sensor altamente seletivo. Um imunossensor é, por definição, uma combinação de um receptor imunológico imobilizado usado para detectar um analito alvo por complementaridade estrutural, e um transdutor que converte essa interação biológica em um sinal mensurável (CRUZ; ROSA; OLIVA, 2002). Os imunoensaios são testes baseados em imunorreações, enquanto um imunossensor é definido como biossensores baseados em imunorreações. A técnica de imunoensaio é a que mais cresce em tecnologia analítica para a detecção e quantificação de biomoléculas. Aproveita a afinidade ligação entre anticorpos e os antígenos correspondentes que permite a detecção de um deles, mesmo que esteja presente em concentrações muito baixas e em matrizes biológicas, como sangue total, soro e outros fluidos biológicos (CRUZ; ROSA; OLIVA, 2002).

Os anticorpos naturais possuem propriedades notáveis e, por esse motivo, há décadas atraem o interesse de cientistas em estudá-los para desenvolver aplicações. Possuem uma variedade extensa de alvos, os antígenos, e demonstram uma excepcional seletividade. Além disso, eles podem ser produzidos com reprodutibilidade sem precedentes; no entanto, eles são demorados para produzir e, portanto, caros. Portanto, o interesse em desenvolver anticorpos artificiais nas últimas décadas cresceu consideravelmente (WENDT; CAPPUCILLI, 2017). Nesse contexto, a criação de novas técnicas analíticas para a identificação dos mais diversos analitos com alta sensibilidade e seletividade vem se expandindo e trazendo diversas inovações. Dentre essas técnicas, aquelas baseadas nos MIP (do inglês, *Molecularly Imprinted Polymers*), que são materiais seletivos baseados no reconhecimento

biomolecular, cada vez mais vem possuindo seu campo consolidado (MARESTONI *et al.*, 2013) (Figura 4) (ALEXANDER *et al.*, 2006).

Figura 4- Princípio da impressão molecular:



Fonte: autoria própria.

Portanto, a ideia da elaboração dos MIP emerge com o intuito de imitar (até certo ponto) sítios ativos de materiais biológicos (MARESTONI *et al.*, 2013).

Os sítios de ligação dos MIP apresentam afinidades e seletividades aproximadas aos dos sistemas antígeno-anticorpo, designando estes materiais como polímeros biomiméticos (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

O biomimetismo é, por definição, qualquer invenção humana que possui a capacidade de mimetizar uma criação da natureza (ATKINSON *et al.*, 2001). Portanto, não é surpreendente que exista atualmente uma forte tendência do seu uso como elementos de reconhecimento em sensores biomiméticos (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005). A impressão molecular surge através da teoria de Pauling para a formação de anticorpos, onde era atribuído que um antígeno pudesse ser usado como uma molécula molde para moldar a cadeia polipeptídica de anticorpos originando, assim, uma configuração complementar do respectivo antígeno entre a cadeia de

anticorpos (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005). É então, a partir dessa ideia, que surge a necessidade de se criar um material polimérico (que possui estrutura rígida e tridimensional) envolto na molécula molde e que conseguisse atuar de forma similar (mimética) ao do anticorpo permitindo, assim, a criação de um material que pudesse efetuar seletivamente o reconhecimento molecular (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

O primeiro trabalho catalogado na literatura sobre a aplicação de MIP em química analítica é datado de 1972, nesse artigo Wuff e Sarhan (SARHAN; WULFF, 1972), descreveram a síntese do polímero com sítios específicos possibilitando a separação enantiomérica de racematos de açúcares (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005), desde então nas últimas décadas estudos sobre os MIP e aplicações como biosensores vem se expandindo (UZUN; TURNER, 2016). Esses materiais vêm sido usados em técnicas para extração, como extração em fase sólida (SPE- “solid phase extraction”) e microextração em fase sólida (SPME- “solid phase microextraction”), técnicas de separação, entre elas, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC- “high performance liquid chromatography”), eletroforese capilar (CE- “capillary electrophoresis”) entre outras (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005). A utilização de MIP também se aplica nas técnicas eletroanalíticas, focando principalmente no desenvolvimento de sensores seletivos (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005) os quais possuam em sua fase de reconhecimento os MIP. Atualmente, diversos sensores baseados em MIP foram desenvolvidos, contendo mais de 10.000 moléculas e estruturas biológicas foram impressas com sucesso, com tipos de molécula molde diversos, tais como: íons inorgânicos, fármacos, ácidos nucleicos, proteínas, vírus e até mesmo células (AHMAD *et al.*, 2019). Esses sensores podem ser a base de sensores ópticos e eletroquímicos também (AHMAD *et al.*, 2019).

O mecanismo de obtenção dos MIP é baseado na utilização de moléculas com diferentes grupos químicos funcionais e que os mesmos tenham a capacidade de se polimerizar e, dessa forma, colocando esses compostos na presença de determinado analito, interajam com o mesmo formando estruturas que, após polimerizadas, formam um polímero altamente seletivo para a detecção do analito, isso pode ocorrer, por exemplo, quando uma cadeia de um polímero possui carga positiva o qual atrai para perto o analito que possui uma área eletronegativa formando um local de ligação (WENDT; CAPPUCILLI, 2017). Essa interação analito-monômero funcional pode

ocorrer através de ligações covalentes ou não covalentes, ligação de hidrogênio, interação dipolo-dipolo, interação iônica ou por meio da interação hidrofóbica (ANDERSSON; MOSBACH, 1990; HO; LIU; LIN, 2011; WHITCOMBE *et al.*, 1995). Para avaliar a eficiência do MIP é sintetizado um material de controle que ocorre da mesma forma que o MIP exceto pelo fato de não se utilizar a molécula molde (analito) durante a polimerização, ou seja, espera-se que nenhuma cavidade se forme a síntese do polímero ocorra aleatoriamente, esse material é chamado de polímero não-impresso ou NIP (NIP: *non-imprinted polymer*). Dessa forma, nos testes de adsorção é comparado o MIP com o NIP.

Entretanto, a síntese do MIP não é trivial e demanda esforço e consome grande quantidade de reagentes, especialmente durante a escolha do monômero funcional. Além disso, a escolha do monômero funcional é fortemente influenciada pela natureza do analito. Logo, um estudo teórico realizado antes da síntese do MIP é vantajoso, uma vez que permite fazer uma triagem prévia proporcionando economia em esforço e recursos (SINGH; BALASUBRAMANIAN; AMITHA RANI, 2012). Dessa forma, através da simulação computacional, podem ser estudadas as interações dos monômeros funcionais com a molécula alvo utilizando a simulação com cálculos quânticos para compreender as interações específicas entre os aminoácidos presentes na troponina e os monômeros funcionais, bem como toda a proteína envolvida (troponina T) através do método clássico contido na dinâmica molecular.

Para esta dissertação, foi estudada teoricamente a interação do analito (troponina T) com diversos monômeros funcionais através de métodos quânticos e, após a escolha do monômero funcional, o sistema proposto foi estudado através de métodos clássicos. Além disso, foi feito um método de síntese para o material idealizado assim como métodos de caracterização e quantificação.

2. OBJETIVO GERAL

O seguinte projeto possui como objetivo geral a elaboração (teórica e experimental) de MIP seletivos à troponina T, e seu uso como elemento de reconhecimento para futura obtenção de um imunossensor biomimético para a identificação seletiva desse biomarcador.

Para tal, um estudo teórico dos componentes envolvidos na síntese do MIP foi previamente realizado como subsídio da etapa experimental que envolve desde o estudo teórico e a síntese do polímero até a futura aplicação como fase de reconhecimento no imunossensor em amostras biológicas.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Estudo teórico para escolha dos monômeros funcionais e solvente através do método quântico Teoria do Funcional da Densidade.
- Síntese e otimização do MIP para a troponina
- Caracterização do MIP por técnicas morfológicas e físico-químicas de:
 - Infravermelho com transformada de Fourier;
 - Microscopia Eletrônica de Varredura;
 - Difração de Raio - X;
 - Estimativa da área superficial por BET
 - Avaliação da eficiência do MIP (e seu NIP: *non-imprinted polymer*) através de estudos de:
 - Cinética: Adsorção da troponina em função do tempo;
 - Adsorção da troponina em função da massa do polímero;
 - Parâmetros que influenciam na adsorção: pH; meio de solvatação
 - Perfil e ajuste experimental da adsorção (isoterma);
- Estudo teórico das propriedades do sistema através do método clássico Dinâmica Molecular.

3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL PROPOSTA

3.1. REAGENTES

Todos os reagentes serão empregados em grau analítico. Para o MIP para troponina T, a molécula molde utilizada (*template*) foi a troponina T comercializada

pela Sigma-Aldrich® e extraída de coração humano; o monômero funcional foi escolhido através de resultados teóricos para esse MIP; *N,N'*-metileno-*bis*-acrilamida, atuando como monômero estrutural; peróxido de benzoíla, atuando como iniciador radicalar; solução tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 como solvente porogênico. A lavagem do MIP utilizou dodecil sulfato de sódio (SDS do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*) adquiridos pela Sigma-Aldrich. Para o estudo de seletividade serão avaliadas as proteínas albumina de soro bovino e albumina de soro humana, este último presente no sangue em altas concentrações. Para os testes de ELISA os reagentes colorimétricos como *Bradford* e preparo do *o*-fenilenodiamina Sigma-Aldrich®. Outros reagentes foram adicionados a este projeto conforme foi necessário.

3.2. SÍNTESE DO MIP – TROPONINA

Após realizada a análise computacional em função dos três aminoácidos (lisina (LYS), glutamato (GLU) e alanina (ALA)) mais predominantes na molécula da troponina (formada por 19 aminoácidos no total), e dos monômeros funcionais, a síntese do MIP para a troponina utilizou 0,008 mmol do biomarcador (*template*); 0,12 mmol do monômero funcional escolhido através de estudos teóricos, 6,0 mL de tampão PBS pH 7,4 (solvente porogênico). Todos esses reagentes foram adicionados a um tubo de vidro e agitado em vortex por 2 minutos. Sínteses baseadas e adaptadas de trabalhos realizados no grupo de pesquisa GEAr (FOGUEL *et al.*, 2017).

Na seguinte etapa, a mistura é deixada em repouso por duas horas, e a seguir são adicionados 2,4 mmol de *N,N'*-metileno-*bis*-acrilamida (agente de reticulação ou monômero estrutural) e 0,012 mmol de peróxido de benzoíla (iniciador radicalar). A mistura foi borbulhada com nitrogênio por 5 minutos para evitar interferência do oxigênio na polimerização radicalar, o tubo de reação selado e a polimerização feita a 40 °C em banho-Maria (FOGUEL *et al.*, 2017).

Os polímeros obtidos pelo método em *bulk* foram macerados cuidadosa e manualmente com um almofariz, peneirados e submetidos à vácuo em três etapas usando água e SDS 1%; e três etapas usando água até a completa remoção do analito. O NIP (*non-imprinted polymer*) foi sintetizado da mesma maneira, sem a adição da molécula molde, e como polímero controle (FOGUEL *et al.*, 2017).

A seguir, para avaliação do desempenho do MIP e NIP na adsorção da troponina, as técnicas empregadas foram baseadas em imunoensaios típicos de anticorpo-antígeno, ou ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e que será descrito a seguir. Adicionalmente, ressalta-se que esta parte da pesquisa é inédita no grupo de pesquisa (GAN; PATEL, 2013).

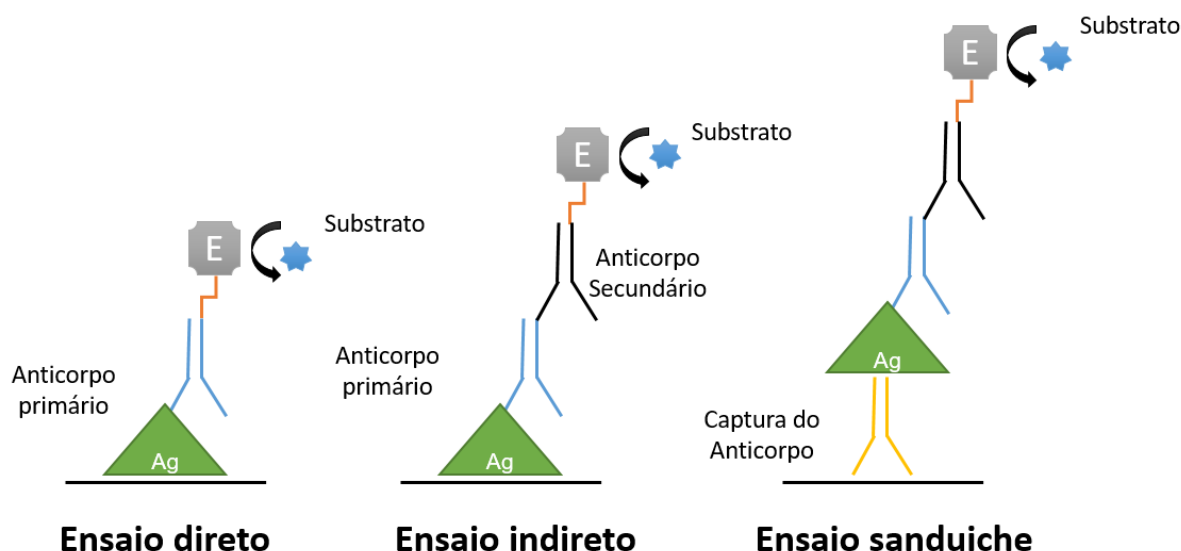
As variáveis independentes nesse projeto são fatores que influenciam a síntese do MIP. Como temperatura, pH, concentração, tempo de síntese, entre outros. A variável dependente será o polímero seletivo formado que sofrerá os efeitos durante a manipulação das variáveis independentes. Também, serão variáveis independentes, os parâmetros adequados a serem escolhidos para construir o imunossensor (tipo de eletrodo, concentração e tipo de imobilização de MIP, etc), e os parâmetros necessários para obter as melhores respostas (eletrólito suporte, técnica eletroquímica, tempo de incubação, entre outros). Todas estas passando por um conjunto amplo de experimentos, antes de conseguir obter os parâmetros de qualidade do dispositivo proposto.

3.3. TÉCNICAS PARA AVALIAR O DESEMPENHO DO MIP NA ADSORÇÃO DA TROPONINA

O ensaio de imuno-adsorção enzimática (Figura 5) é um método analítico quantitativo colorimétrico que demonstra reações antígeno-anticorpo através da mudança de cor obtida. Dessa forma, demonstrando ser possível identificar a presença e concentração de moléculas em fluidos biológicos, e tem sido usada em uma variedade de estratégias de diagnóstico, tais como: teste de HIV, vírus do Nilo Ocidental, malária, doença de Chagas e muitos outros (GRIFFIN *et al.*, 2005).

A utilização de ELISA para fins de diagnóstico ganhou notoriedade significativa nos últimos anos, por ser uma ferramenta poderosa para exames toxicológicos de certas classes de drogas (LEQUIN, 2005). Também é frequentemente usada na indústria de alimentos para a detecção, como amendoim, leite, nozes e ovos.

Figura 5 - Tipos de imunoensaios para ELISA



Fonte, adaptação e tradução de: <http://www.piercenet.com/method/overview-elisa>. Acessado em: 15/04/2019.

Na Figura 4 são esquematizados os imunoenaios mais comuns usando ELISA. No ensaio direto (ou ELISA direto) que é o mais simples desses imunoenaios, um antígeno se liga diretamente no anticorpo marcado com uma enzima em uma etapa de incubação, seguida da adição de um substrato cromogênico na placa ELISA que permite o desenvolvimento de uma coloração característica e que pode servir para detectar a presença do antígeno (analito), tanto qualitativa como quantitativamente (GAN; PATEL, 2013).

Este tipo de imunensaio direto serve para desenvolver ou avaliar novos métodos de análise e foi empregado neste projeto para avaliar a capacidade de adsorção da troponina (antígeno) marcada com HRP após ter interagido com o MIP (anticorpo plástico). A troponina após incubada (tempo a ser estudado) na presença do MIP (quantidade a ser estudada) em uma solução de incubação (solução a ser estudada) foi adsorvida pelo material polimérico, e a fração remanescente (aquela que permanece em solução) foi submetida ao desenvolvimento de cor e medida no equipamento de ELISA, para ser quantificada. Por diferença entre a concentração inicial e a obtida no remanescente pode ser encontrada a quantidade de troponina adsorvida.

Dos outros dois ensaios esquematizados na Figura 4, no imunensaio indireto (ou Elisa indireto) é necessário dois anticorpos, o anticorpo primário e o anticorpo

secundário, sendo este teste mais demorado e dispendioso. (GAN; PATEL, 2013). Já o imunoensaio do tipo sanduíche (ou Elisa sanduiche) é um dos formatos mais eficazes, porém há vários parâmetros e etapas a serem otimizados, adicionalmente este ensaio se limita a moléculas de antígenos com alta massa molecular, uma vez que o antígeno fica entre dois anticorpos, o de captura e o de detecção (GAN; PATEL, 2013; YOLKEN, 1982).

Uma vez que o analito é uma proteína, para o desenvolvimento da cor através do teste de ELISA, foi usado um reagente amplamente conhecido para proteínas, o teste de Bradford (JONES; DANIEL HARE; COMPTON, 1989; KRUGER, 2009). Assim mesmo, foi utilizado para o desenvolvimento da cor a *o*-fenilenodiamina que na presença de HRP (*horseradish* peroxidase) e H_2O_2 , permite obter uma solução de coloração laranja-acastanhada (FORNERA; WALDE, 2010), porém neste caso, deverá ser empregada nos estudos a Troponina marcada com a enzima (HRP) (THERMOFISHER, 2019a; YOLKEN, 1982).

3.3.1. Ensaio colorimétrico Bradford

O reagente Bradford (Scienco Biotech®) é ideal para determinação da concentração de proteínas em solução de maneira simples e precisa. O procedimento é baseado na formação de um complexo entre o corante azul de Comassie e moléculas proteicas presentes no ensaio (JONES; DANIEL HARE; COMPTON, 1989; KRUGER, 2009). Encontra-se pronto para uso, não sendo necessária nenhuma preparação ou diluição adicional. O tempo de incubação com o reagente (proteína em solução) é rápido, apenas de 5 min e a amostra pode ser medida a um comprimento de onda de 595 nm, tanto em espectrofotômetros (em cubetas), como em leitoras de ELISA (microplacas). Sendo a absorbância proporcional à quantidade de proteínas presentes. O intervalo linear deste ensaio utilizando BSA (*bovine serum albumin*) como proteína padrão é de 125 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em microensaios usando leitora de ELISA (JONES; DANIEL HARE; COMPTON, 1989).

Quando escalonados a microensaios, tal como o que foi realizado neste trabalho, as concentrações padrão das proteínas troponina (analito), BSA, HSA e soro humano (respectivos interferentes) estarão na faixa de concentração entre 2,5; 5,0;

7,5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para a construção da curva analítica para quantificação da proteína adsorvida nos testes com os polímeros, usando o microensaio, foram adicionados 500 μL de cada padrão em cada cavidade da placa de ELISA e adicionados 500 μL do reagente de Bradford e misturados usando um misturador adequado para este tipo de experimentos (*shaker*). A reação foi incubada a temperatura ambiente entre 5 minutos e 60 minutos e medida a absorbância a 595 nm, correspondente a uma coloração azul (THERMOFISHER, 2019).

3.3.2. Ensaio colorimétrico com OPD (o-fenilenodiamina)

O OPD é um reagente adequado para a catálise enzimática do peróxido de hidrogênio com a peroxidase, e muito empregado em procedimentos de ELISA. O substrato produz um produto final solúvel de cor laranja-acastanhada e pode ser lido espectrofotometricamente a 450 nm (laranja-acastanhada). Para medidas quantitativas é necessário que a reação catalítica seja cessada em um tempo fixo e pré-estabelecido, o qual é conseguido com a adição de $\text{HCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$ ou $\text{H}_2\text{SO}_4 3 \text{ mol L}^{-1}$ e lida a 492 nm (amarelo alaranjado). (FORNERA; WALDE, 2010).

Para aplicação deste experimento, foi usada a troponina marcada com HRP e a placa foi sensibilizada com ant-HRP, pois este procedimento ocorrerá apenas na presença dessa enzima, seguindo o modelo de ELISA direto da Figura 4.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. SIMULAÇÃO MONÔMEROS FUNCIONAIS – TEORIA DO FUNCIONAL DA DENSIDADE

O método quântico (DFT) foi utilizado para compreender a interação entre os aminoácidos mais abundantes na macromolécula troponina T com os monômeros funcionais mais usados em síntese de polímeros impressos, e assim avaliar/conseguir

a interação específica entre um monômero funcional com um dos aminoácidos da troponina T.

A construção das estruturas necessárias para ambos os métodos, clássicos e quânticos, foram feitas através do software AVOGADRO®.

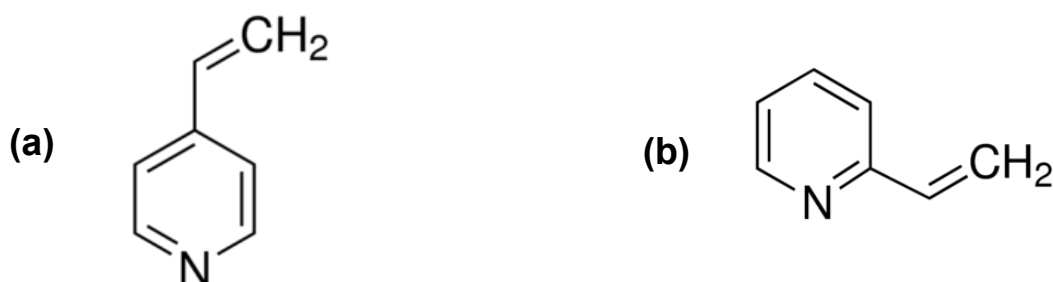
Inicialmente foram feitas simulações computacionais utilizando métodos quânticos através da DFT. Foram desenhadas as estruturas dos monômeros funcionais (MF), que são amplamente empregadas em trabalhos do nosso grupo de pesquisa (FOGUEL *et al.*, 2017; TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005), sendo eles: ácido metacrílico, 4-vinilpiridina, 2-vinilpiridina e etileno glicol. A princípio, escolheram-se esses monômeros variando entre caráter básicos e ácidos. Abaixo encontra-se a estrutura do MF escolhido (Figura 6 e Figura 7):

Figura 6- Etilenoglicol (a) e ácido metacrílico (b)



Fonte: autoria própria.

Figura 7- 4-vinilpiridina (a) e 2-vinilpiridina (b).

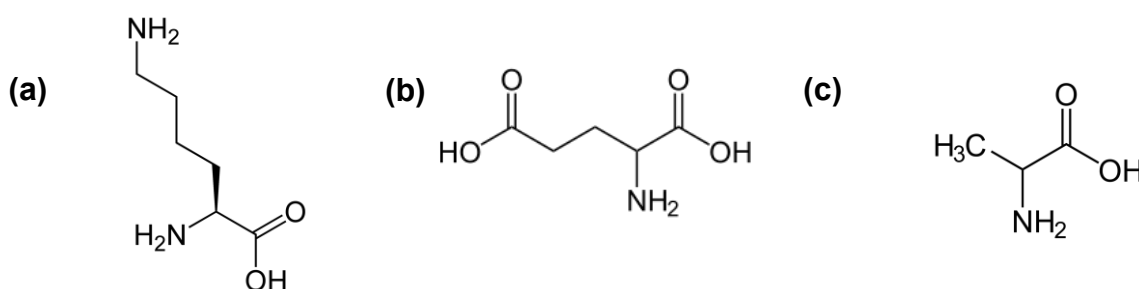


Fonte: autoria própria.

Não foi escolhida a acrilamida para a síntese porque utilizar esse monômero em pH que não fossem ácidos e, principalmente, que fosse em temperaturas baixas seria problemática, uma vez que essa polimerização em baixas temperaturas não ocorre facilmente (LIN, 2001).

Após a “construção” dos monômeros funcionais (MF) realizou os cálculos para cada um dos MF em seis meios diferentes, inicialmente no vácuo, e depois nos solventes: acetonitrila, metanol, etanol, DMSO e água. Finalizado os resultados dos cálculos, pode-se partir para formulação dos complexos, realizando com cada um dos 4 monômeros funcionais entre os 3 aminoácidos (Figura 8), formando assim 12 complexos.

Figura 8- Aminoácidos escolhidos inicialmente para a simulação computacional por DFT. Entre eles, da esquerda para a direita: Lisina (a), Glutamato (b) e Alanina (c).



Obtendo as estruturas de cada um desses complexos, foi feito a criação dos arquivos de entradas e, assim, realizada a simulação computacional para cada um deles no vácuo e nos cinco solventes.

4.2. LINGUAGEM DE PROGRAMAÇÃO COMO FERRAMENTA DA CRIAÇÃO DOS ARQUIVOS DE SUBMISSÃO

As criações dos arquivos de entrada podem ser demasiadamente cansativas e repetitivas, uma vez que, para fazer os cálculos em diferentes solventes é necessário entrar em cada um desses arquivos de entrada (arquivos que são submetidos no *cluster* para os cálculos) e mudar, manualmente, o cabeçalho do

arquivo explicitando o solvente em inglês (por exemplo: *Water*, *Acetonitrile*, *DMSO*, entre outros). Entretanto, realizar esse feito manualmente é exaustivo e pode gerar erros operacionais, uma vez que se tiver um caractere especial, espaçamento a mais, ou qualquer tipo de erro de digitação o software utilizado para os cálculos não conseguirá compreender o arquivo de entrada. Dessa forma, visando minimizar esses erros, foi necessário o aprendizado e utilização da linguagem e programação em *Python* a qual permite criar *scripts* (descrição de um programa). Esses programas criados podem realizar automaticamente essas tarefas, minimizando os problemas e enriquecendo o trabalho no ganho de tempo. Abaixo (Figura 9, (A)) temos um exemplo na conversão de um arquivo em .xyz (arquivo de coordenadas, o qual demonstra as coordenadas de cada átomo da molécula) e a figura 9 (B) que demonstra o arquivo .inp, o qual representa o arquivo *input* que é o arquivo de submissão.

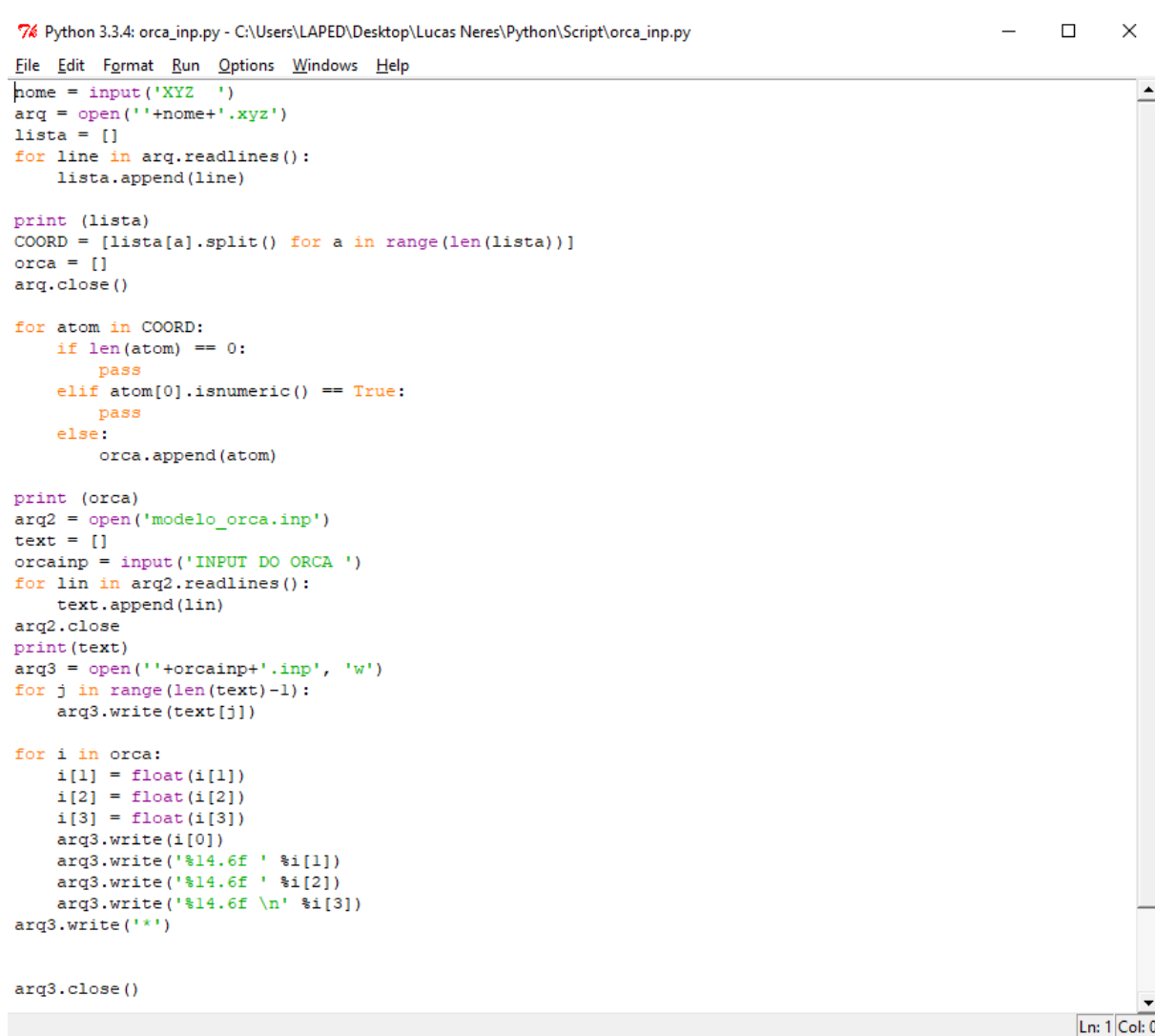
Figura 9- Exemplo de um arquivo xyz (A) e arquivo inp (B) para a Vitamina K2.

VitaminK - Bloco de Notas				*VitaminK - Bloco de Notas			
Arquivo Editar Formatar Exibir Ajuda				Arquivo Editar Formatar Exibir Ajuda			
%scf MaxIter 500 end				73			
! RKS B3LYP SVP Grid4 COSMO(Water)							
! opt							
* xyz 0 1							
C	-2.65321	1.88390	0.00681	C	-2.65321	1.88390	0.00681
C	-2.46256	3.26100	0.08420	C	-2.46256	3.26100	0.08420
C	-1.16649	3.78150	0.14577	C	-1.16649	3.78150	0.14577
C	-0.05182	2.92516	0.12494	C	-0.05182	2.92516	0.12494
C	-0.24375	1.55768	0.03631	C	-0.24375	1.55768	0.03631
C	-1.54666	1.03202	-0.01691	C	-1.54666	1.03202	-0.01691
C	1.31068	3.48358	0.20270	C	1.31068	3.48358	0.20270
C	2.51419	2.56747	0.09059	C	2.51419	2.56747	0.09059
C	2.29988	1.24334	-0.06319	C	2.29988	1.24334	-0.06319
C	0.91516	0.65484	-0.00896	C	0.91516	0.65484	-0.00896
H	-3.66024	1.47321	-0.03675	H	-3.66024	1.47321	-0.03675
H	-3.32112	3.92980	0.09887	H	-3.32112	3.92980	0.09887
H	-1.03103	4.86020	0.20880	H	-1.03103	4.86020	0.20880
H	-1.70504	-0.04369	-0.08013	H	-1.70504	-0.04369	-0.08013
O	1.44551	4.69571	0.32965	O	1.44551	4.69571	0.32965
O	0.73323	-0.55482	-0.00390	O	0.73323	-0.55482	-0.00390
C	3.35305	0.20670	-0.32942	C	3.35305	0.20670	-0.32942
H	4.17405	0.60565	-0.92881	H	4.17405	0.60565	-0.92881
H	2.96000	-0.63023	-0.91796	H	2.96000	-0.63023	-0.91796
H	3.73759	-0.19579	0.61243	H	3.73759	-0.19579	0.61243

Fonte: Autoria própria.

É possível notar a diferença entre um arquivo e outro especialmente na inserção do cabeçalho o qual introduz o tipo de solvente (*Water*) que foi utilizado, funcional utilizado para o cálculo foi o B3LYP, um funcional híbrido bastante utilizado na área de química (WODRICH; CORMINBOEUF; SCHLEYER, 2006). Durante o cálculo entre outras características importantes para definir os parâmetros utilizados na simulação. Abaixo encontra-se a imagem de um *script* criado para converter um arquivo .xyz para um arquivo .inp (Figura 10).

Figura 10- Script feito para converter um arquivo.xyz em inp.



```
Python 3.3.4: orca_inp.py - C:\Users\LAPED\Desktop\Lucas Neres\Python\Script\orca_inp.py
File Edit Format Run Options Windows Help
home = input('XYZ ')
arq = open(''+nome+'.xyz')
lista = []
for line in arq.readlines():
    lista.append(line)

print (lista)
COORD = [lista[a].split() for a in range(len(lista))]
orca = []
arq.close()

for atom in COORD:
    if len(atom) == 0:
        pass
    elif atom[0].isnumeric() == True:
        pass
    else:
        orca.append(atom)

print (orca)
arq2 = open('modelo_orca.inp')
text = []
orcainp = input('INPUT DO ORCA ')
for lin in arq2.readlines():
    text.append(lin)
arq2.close
print(text)
arq3 = open(''+orcainp+'.inp', 'w')
for j in range(len(text)-1):
    arq3.write(text[j])

for i in orca:
    i[1] = float(i[1])
    i[2] = float(i[2])
    i[3] = float(i[3])
    arq3.write(i[0])
    arq3.write('%14.6f ' %i[1])
    arq3.write('%14.6f ' %i[2])
    arq3.write('%14.6f \n' %i[3])
arq3.write('*')

arq3.close()
```

Fonte: Autoria própria.

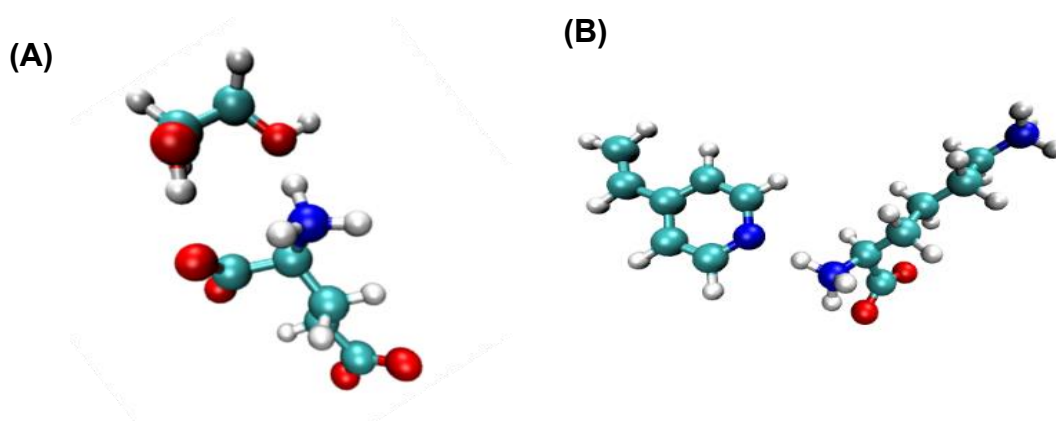
Portanto, automatizar essa tarefa é vantajoso, uma vez que permite fazer isso de forma rápida e precisa para cada um dos complexos analisados.

4.3. SIMULAÇÃO DOS COMPLEXOS

Cada um dos cálculos para os aminoácidos e monômeros funcionais foi obtido computacionalmente e utilizado o resultado energético de cada uma das espécies separadamente. Após isso partiu para a formação dos complexos, o qual visava quantificar energeticamente a interação entre o monômero funcional e o aminoácido. Dessa forma, para que fosse viável essa interação entre a molécula molde e os monômeros funcionais, seria necessário que fosse favorável a interação em relação às moléculas separadas e isoladas calculadas anteriormente.

Os cálculos da energia são realizados para cada uma das moléculas separadas, como dito anteriormente, (aminoácidos e MF), após isso somou essa energia, e subtraía a energia dos cálculos resultantes da simulação para as moléculas juntas, ou seja, após a formação dos complexos, $\Delta E = (E_{ac} + E_{ap}) - (E_{\text{Complexos}})$ com isso obtínhamos uma energia negativa, mostrando que a interação é favorável. Abaixo podemos ver como ocorre a interação entre o MF e o aminoácido, efetivamente (Figura 11).

Figura 11- Complexos formados pela interação entre MF e aminoácido. Em (A) pela interação do MF 4 vinil piridina com o aminoácido lisina, e em (B) interação do etileno glicol com o aminoácido glutamato.



Fonte: autoria própria.

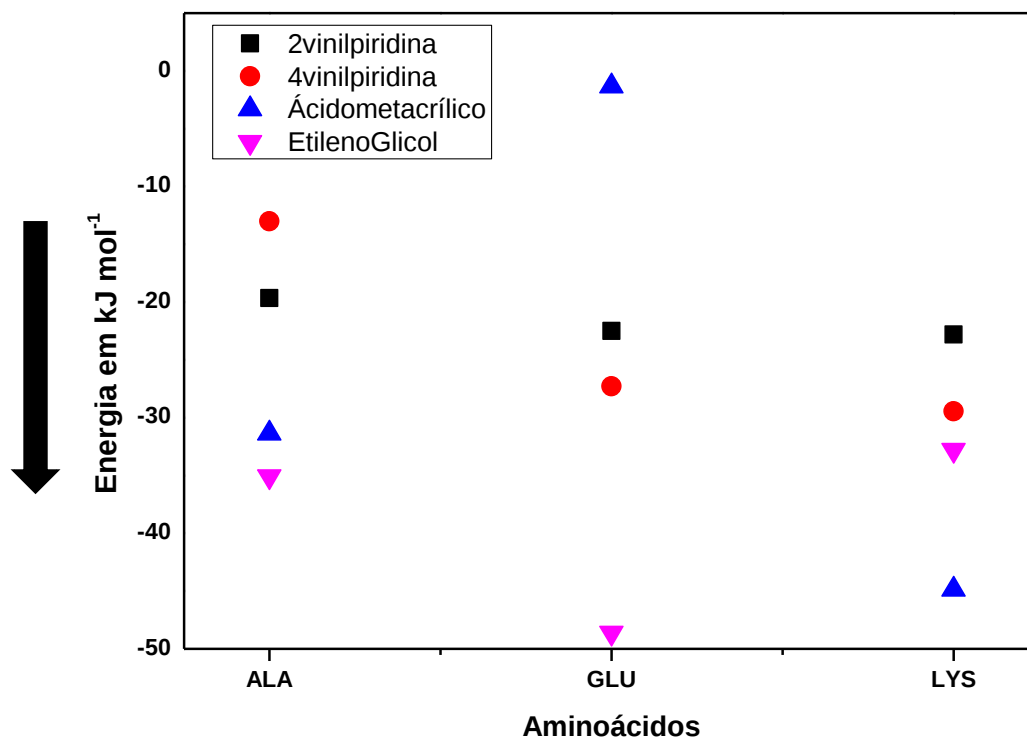
Observando a Figura 12, em que se utilizou a água como solvente, os resultados apontam que independe do meio de síntese dos MF, 4-vinilpiridina e etileno

glicol, apresentam maior interação com os aminoácidos estudados. O MF 4-vinilpiridina apresenta um resultado satisfatório, visto que em qualquer solvente, possui uma boa interação de forma **homogênea** em relação aos aminoácidos presentes na troponina T, tornando como uma boa alternativa como monômero funcional para a síntese do MIP, uma vez que é importante que a polimerização aconteça de uma forma mais homogênea.

Analisando o gráfico (Figura 12) é notado que a energia, em kJ mol^{-1} , após o MF etileno glicol interagir com o glutamato se torna baixa entre os outros complexos formados, isso pode ser explicado por conta das duas ligações de hidrogênio que o etileno glicol executa nas suas extremidades com o glutamato, ao contrário da 4-vinilpiridina, que o seu heteroátomo presente no grupo aromático, o nitrogênio, executa somente uma ligação de hidrogênio com o hidrogênio de uma das extremidades da lisina, embora ainda seja favorável. Para ambos os complexos formados, 4-vinilpiridina e lisina; etileno glicol e glutamato; possuem uma baixa energia ao interagirem em todos os meios trabalhados.

Entretanto, os cálculos realizados possuindo o etanol como solvente apresentaram resultados interessantes, pois para o MF 2-vinilpiridina, possui baixa energia e também ocorre de forma **homogênea**.

Figura 12- Energia em kJ mol^{-1} para os complexos formados em água como solvente.



Fonte: autoria própria.

Analizando o gráfico acima, é possível compreender quimicamente o porquê de algumas energias serem mais favoráveis do que outras. O ácido metacrílico, por exemplo, em água tende a estar desprotonado originando uma carga negativa no oxigênio presente no grupo carboxílico, como o glutamato também possui caráter ácido, por conta do grupamento funcional ácido carboxílico na sua cadeia lateral R, temos que o mesmo também estará desprotonado em solução dependendo do pH existente, originando uma carga negativa. Sendo assim, como os dois possuem cargas iguais, irão se repelir, não favorecendo assim sua interação eletrostática explicando o porquê de termos uma energia não favorável para o glutamato como o ácido metacrílico. Entretanto, a lisina, por possuir caráter básico, vai ter uma carga positiva no grupamento amina presente em sua cadeia lateral R, sendo assim, irá interagir eletrostaticamente de forma bastante favorável com o ácido metacrílico.

Diante desses resultados, pode-se compreender como funciona a interação entre o MF e o aminoácido, e qual é a interação mais favorável em diferentes meios, o que permite a síntese de novos MIPs com um melhor desempenho.

4.4. DINÂMICA MOLECULAR E SÍNTESE DO MATERIAL

A utilização da DM foi necessária para a avaliação da proteína completa, colocando-a em uma caixa teórica rodeada de monômeros funcionais e moléculas de água. Como esse sistema é complexo, por envolver uma biomacromolécula, para essa escala a mecânica clássica se torna mais adequada. Através da DM irá ser possível determinar as propriedades termodinâmicas macroscópicas desse sistema (M. KARPLUS; J. A. MCCAMMON., 2002). Neste projeto, especificamente, o pacote que foi utilizado para o método clássico por DM foi o GROMACS (BERENDSEN; VAN DER SPOEL; VAN DRUNEN, 1995). Inicialmente, foi construída a topologia para o sistema proposto. As estruturas do MF e do monômero estrutural (ME) foram confeccionadas no website do prodrgr. Neste servidor, é possível desenhar as estruturas e gerar a sua topologia para ser aplicada no GROMACS. A criação da topologia e seleção do campo de força é essencial para a DM, além disso não é trivial consome tempo e pode ser específica de acordo com o sistema proposto. Nesse contexto, o campo de força escolhido foi o GROMOS (VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1987).

4.4.1 Campo de força e parâmetros utilizados

Antes de dar início a DM, é importante efetuar um cálculo de minimização de energia, principalmente quando é feita alguma alteração no sistema (o qual foi o caso). Esses cálculos foram realizados utilizando solvente implícito, ou seja, utilizou somente a constante dielétrica do solvente (água), não introduzindo as estruturas das moléculas de água de forma explícita na caixa teórica.

O formalismo utilizado no cálculo das cargas atômicas foram obtidas a partir do SCF (*Self Consistente Field*), as cargas de Mulliken, ou análise populacional do

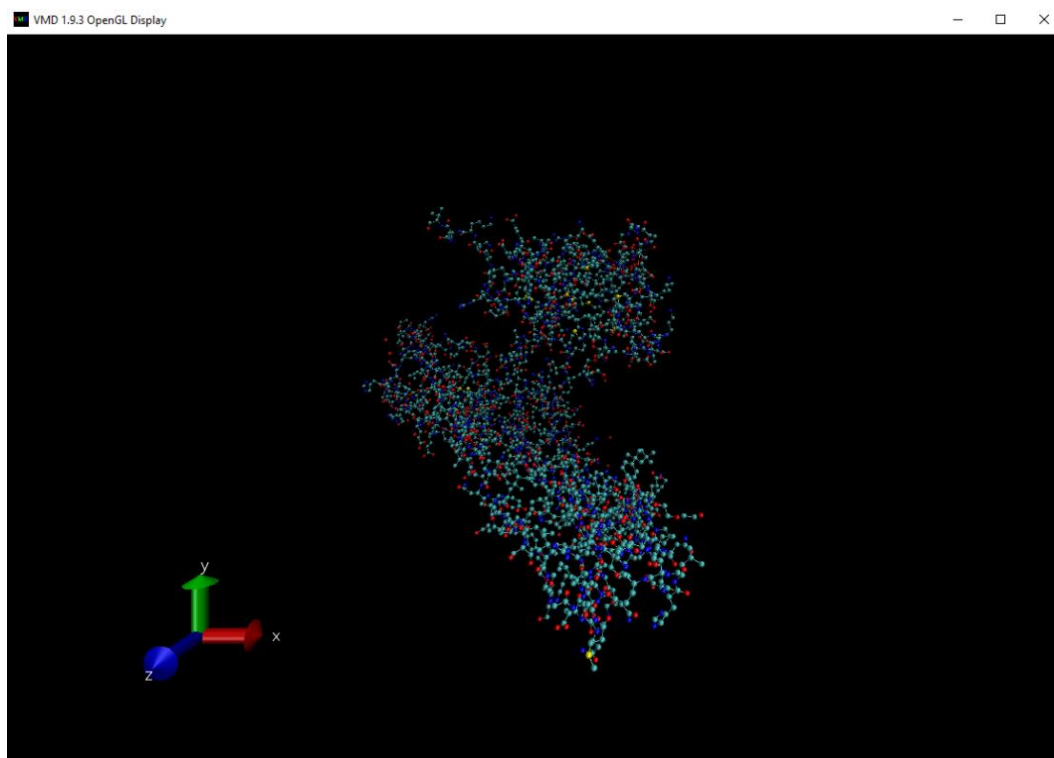
orbital molecular, o qual é um método que utiliza os elétrons de uma molécula em uma malha populacional, n_r , na função de base, x_r , e na população de recobrimento, n_{r-s} , para todos os possíveis pares de função de base conforme a Equação 19 (OLIVEIRA; DE ARAÚJO, 2007).

$$N = \sum_{r=1}^B N_r \quad (19)$$

Onde N é o número total de elétrons do sistema.

A estrutura da proteína foi obtida através do *protein data bank* (H.M. BERMAN *et al.*, 2000), sendo possível visualiza-la no formato .pdb no *software* VMD (Figura 13).

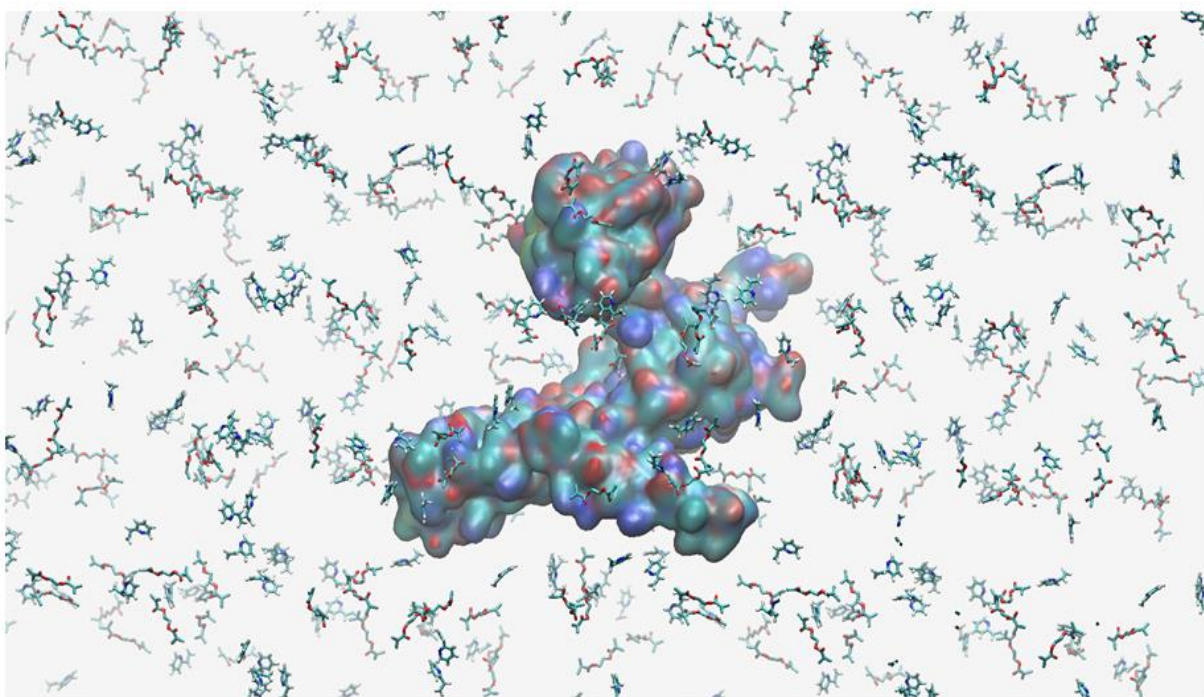
Figura 13- Estrutura da Troponina T extraída do site pdb (protein data bank). (H.M. BERMAN *et al.*, 2000).



Fonte: autoria própria.

Essas cargas de Mulliken foram introduzidas para criar a topologia do MF (2-vinilpiridina) para que, dessa forma, pudesse ser introduzido numa caixa teórica junto com a proteína (Figura 14). Cópias repetidas do MF e ME foram introduzidas na caixa teórica, ficando tudo envolto da proteína. Essa dinâmica molecular foi realizada durante 20 nanossegundos usando o GROMOS como campo de força deixando a proteína estática e aumentando bastante a temperatura do sistema. Ao deixar a proteína estática evita a desnaturação da mesma e é possível ver mais rapidamente a migração dos monômeros funcionais e estruturais para a superfície da proteína de interesse.

Figura 14- Estrutura da Troponina T envolto ao Monômero Funcional (2 vinilpiridina) e Monômero Estrutural (Etileno Glicol Dimetacrilato).

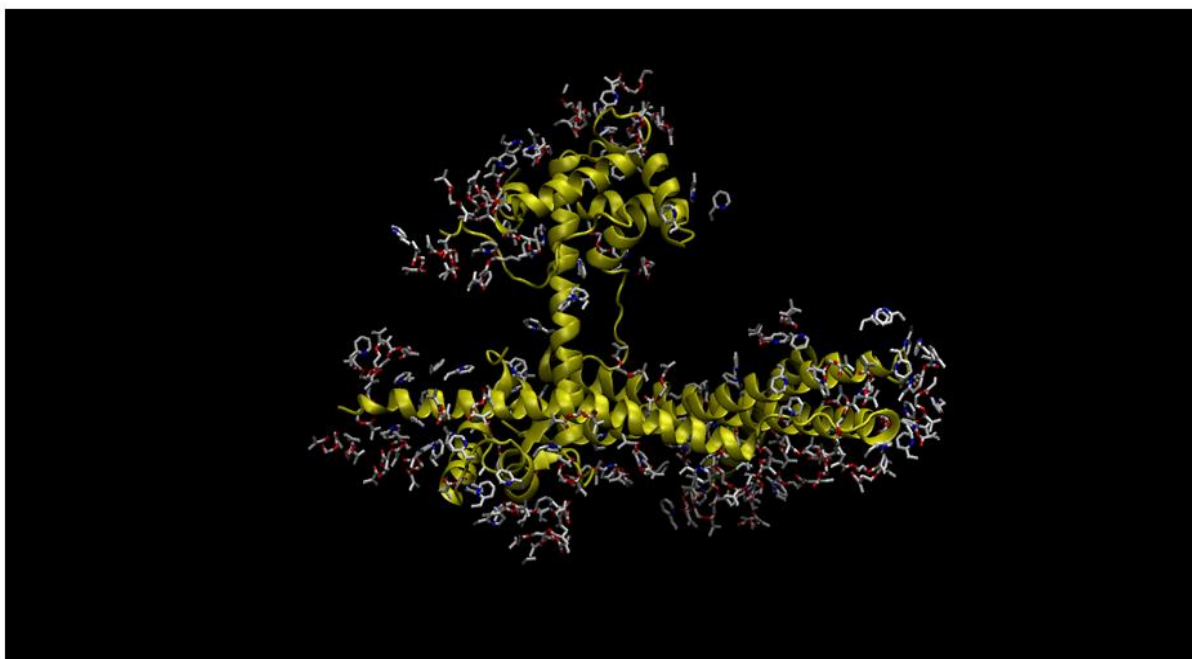


Fonte: autoria própria.

O algoritmo utilizado durante a dinâmica para resolver as equações de movimento e determinar suas posições na variação do tempo foi o Verlet (VERLET, 1968). A proporção dos monômeros funcionais e estruturais foi de 1:1 inicialmente, isso porque o gasto computacional seria menos uma vez que, para esse caso, teríamos menos átomos compondo o sistema.

Observando a Figura 15 é possível observar mini estruturas compostas pelo MF e ME sendo formadas envolto a proteína em amarelo.

Figura 15- Estrutura da Troponina T envolto ao Monômero Funcional (2 vinilpiridina) e Monômero Estrutural (Etileno Glicol Dimetacrilato), clusters sendo formados durante a DM.



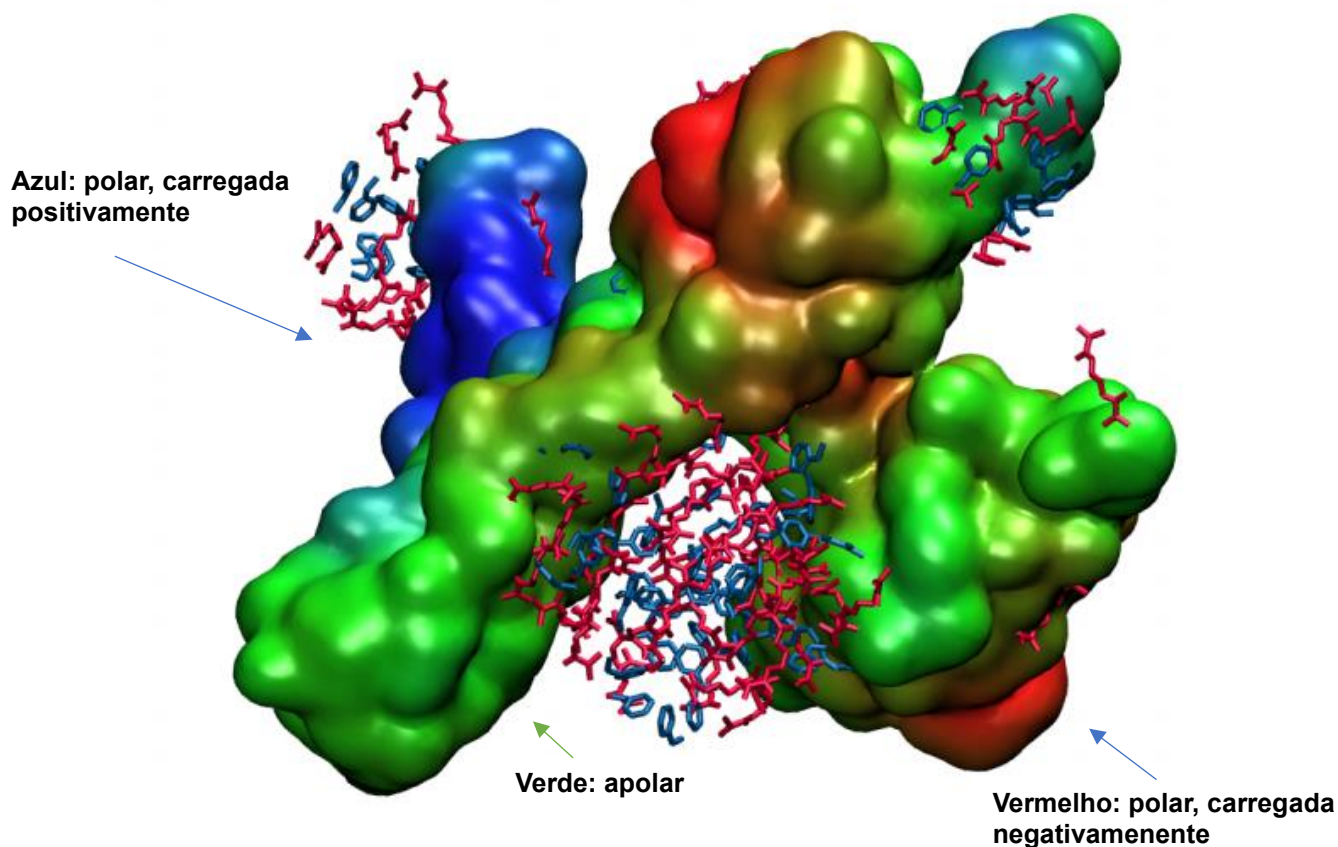
Fonte: autoria própria.

É possível observar na figura 15 que tanto o monômero funcional, como o monômero estrutural, se associou de forma bastante homogênea ao redor da proteína.

Entretanto, para esses casos anteriores, os cálculos foram feitos com solvente implícito, ou seja, sem a estrutura do solvente presente na DM, sendo utilizada somente a constante dielétrica da água. Utilizando o solvente explícito (com as moléculas de água presente na caixa teórica), é possível observar se ao descrever melhor o solvente no nosso sistema, se ele influenciará a distribuição dos monômeros envolto da proteína.

Dessa forma, é necessário avaliar se esse mesmo padrão se repete utilizando solvente explícito durante a dinâmica molecular. Nesse contexto, foi feito uma DM com o solvente explícito e verificado se esse padrão se mantinha (Figura 15):

Figura 16- Estrutura da Troponina T envolto ao MF e ME após a DM com solvente explícito. O MF em azul e o ME em vermelho.



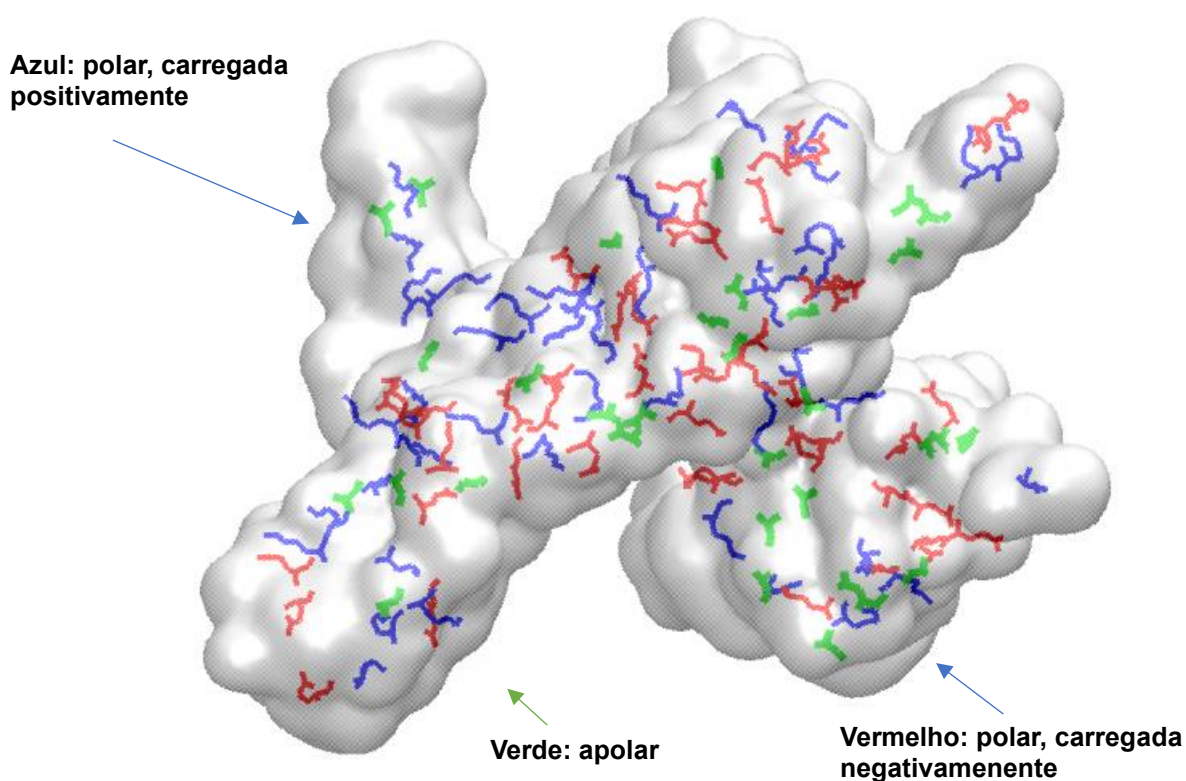
Fonte: autoria própria.

Analisando a figura 16 é notória a diferença no comportamento do rearranjo do monômero estrutural e funcional envolto da proteína. É possível notar que em 20 nanosegundos de cálculo, os monômeros funcionais se associaram com os estruturais e preferiram, majoritariamente, se associar na parte hidrofóbica (apolar) da proteína. Somente estruturas menores dessa mini estruturas de MF-ME se associaram nas regiões polares da proteína.

Portanto, podemos inferir que para esse caso, a simulação com solvente explícito se mostrou importante para avaliarmos o real comportamento desse sistema teórico.

Observando o mapa de potencial na figura 16 e comparando com a figura 17 no qual demonstra a localização dos aminoácidos é possível inferir o porquê de determinadas regiões serem mais hidrofóbicas ou hidrofílicas.

Figura 17- Estrutura da Troponina T demonstrando os três aminoácidos escolhidos através da DFT. Lisina (em azul), Glutamato (em vermelho) e Alanina (em verde).



Fonte: autoria própria.

Por exemplo, nas regiões em azul no mapa de potencial (Figura 16) nota-se que há uma concentração maior de aminoácidos de caráter básico e, portanto, de com carga positiva que no caso é a lisina, Enquanto para o lado mais vermelho do mapa de potencial, é possível observar uma maior concentração de aminoácidos de caráter ácido e, portanto, com carga negativa onde possui maior quantidade do glutamato. Em regiões hidrofóbicas, que está em verde no mapa de potencial, é possível observar uma quantidade aproximadamente equimolar de lisina, glutamato e também de alanina que é um aminoácido neutro.

Vale ressaltar que obviamente essa proteína possui outras classes de aminoácidos que estão omitidos na imagem, porém certamente irão também influenciar em todo o mapa de potencial da proteína.

É necessário escalonar a proporção dos monômeros funcionais e monômeros estruturais para deixar mais próximo da parte experimental assim como avaliar a influência do mesmo durante a DM. A DM realizada foi feita de forma equimolar para reduzir o custo computacional e avaliar o sistema. Portanto, para aproximar melhor o sistema teórico com o do experimental, futuramente irá ser introduzido mais cópias do monômero estrutural e verificado se esse padrão da migração dos clusters permanecem.

4.5. SÍNTESE DO POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESSO E CARACTERIZAÇÃO POR MEV

A síntese do MIP proposto para a troponina T não foi trivial e demonstrou uma dificuldade na realização da síntese. Uma vez que a quantidade da molécula molde (analito) era escassa (100 µg), foi necessário adaptar as quantidades envolvidas dos outros reagentes utilizados na síntese (monômero funcional, monômero estrutural e iniciador radicalar). A quantidade inicial proposta teve que ser aumentada em 50 vezes para que se pudesse obter uma quantidade adequada para a utilização do MIP para futuros testes e caracterização.

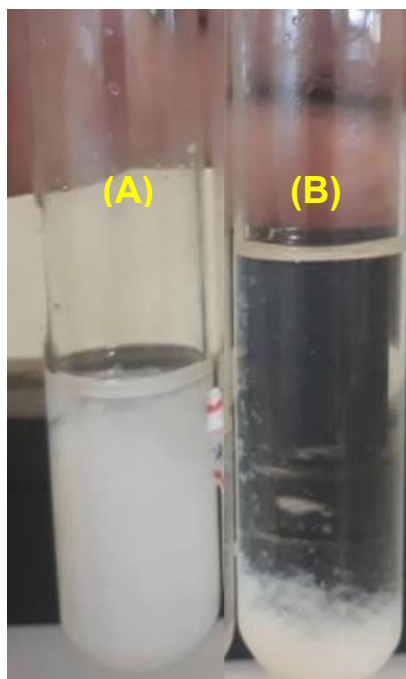
Entretanto, na literatura, o método padrão consiste em adicionar o analito, depois o monômero funcional e deixar homogeneizando para que, dessa forma, ocorra a interação e formação do complexo molécula molde–monômero funcional. Após isso, adiciona-se o monômero estrutural e iniciador radicalar sob borbulhação de nitrogênio para que ocorra a polimerização (FOGUEL *et al.*, 2017, 2015; TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

Porém, diversas dificuldades foram encontradas durante a síntese. Em alguns momentos conseguia-se a polimerização em outras não, além disso, na maioria das vezes não formava uma quantidade significativa do polímero, uma vez que deveria ser formada uma quantidade razoável para que pudesse ser feita as análises de caracterização, e testes de adsorção futuros. É importante enfatizar que todo esse processo de otimização da síntese foi feito através dos NIP's, uma vez que este não

se utiliza da molécula molde e evita o desperdício do analito. Sendo assim, após várias tentativas, optou-se por seguir um caminho inverso, adicionar o monômero estrutural primeiro e, após isso, foi gotejado o monômero funcional em cima do monômero estrutural. Surpreendentemente, formou muito mais NIP, chegando a mais do que duplicar a quantidade de rendimento em relação ao método padrão.

Dessa forma, a fim de garantir a interação e ocorrer a formação do complexo molécula molde-monômero funcional na síntese do MIP, decidiu-se homogeneizar em um *ependorf* a molécula molde e monômero funcional com uma pequena quantidade do solvente. Em seguida, adicionou-se gota a gota no monômero estrutural contido no tubo onde ocorreria a polimerização (Figura 18).

Figura 18- Comparação do rendimento da síntese do NIP em (A) a ordem inversa de síntese proposta e em (B) a ordem comumente usada na literatura.



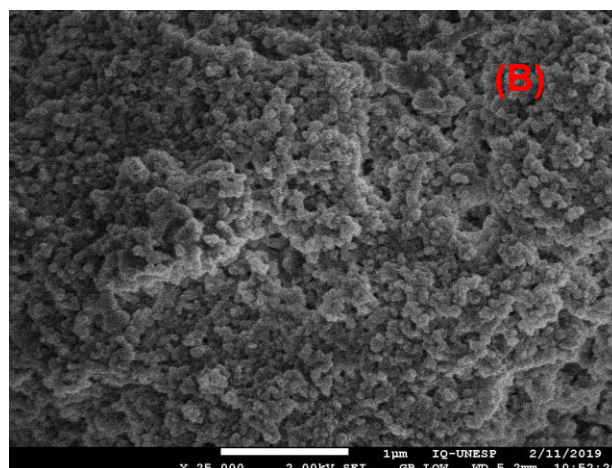
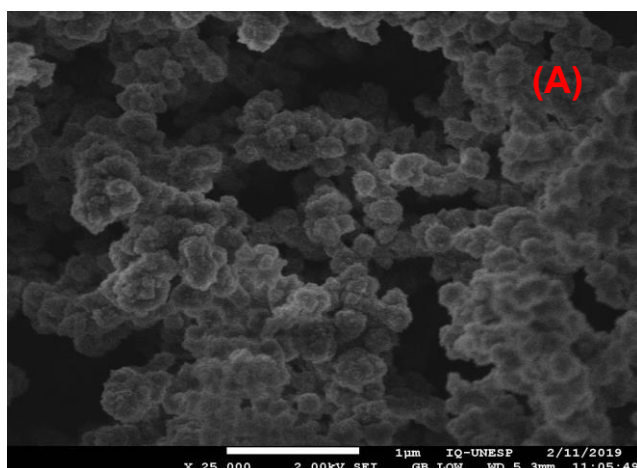
Fonte: autoria própria.

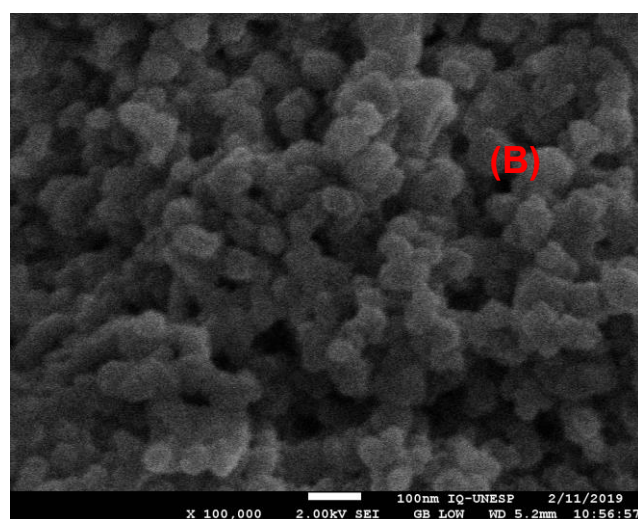
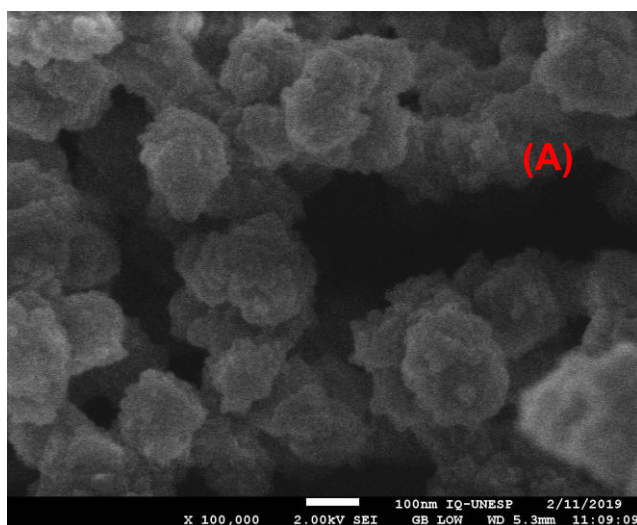
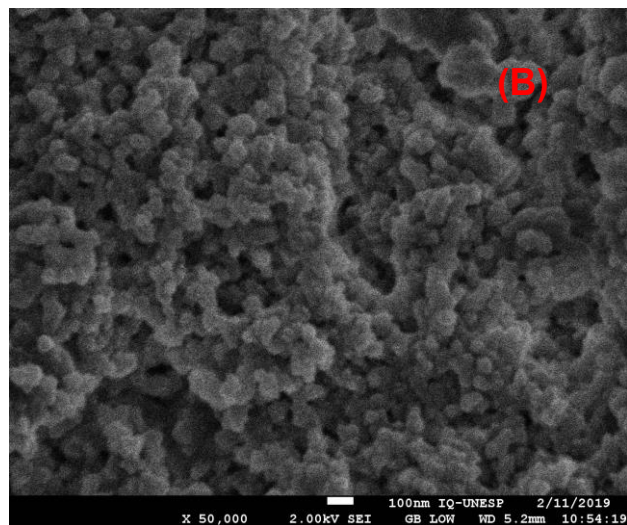
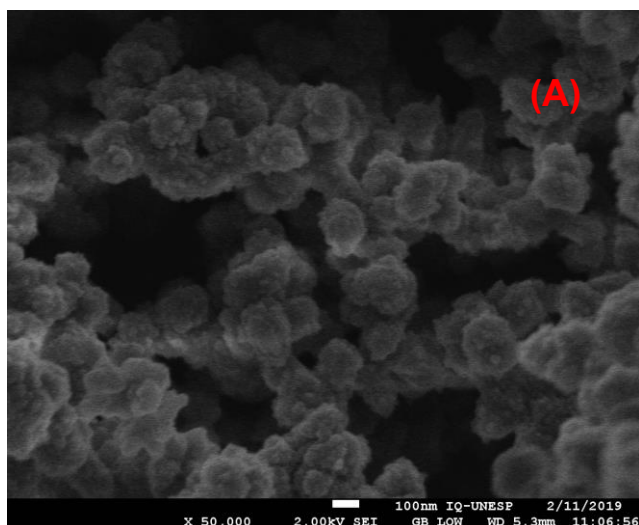
Observando a figura 18 é possível notar uma grande diferença na formação do polímero no NIP na ordem inversa (A) em relação ao MIP na ordem comumente usada (B) (FOGUEL *et al.*, 2017, 2015). Portanto, podemos inferir que uma mudança na ordem de síntese, ao menos para essa situação, ocasionou num aumento

significativo do rendimento do material proposto, favorecendo assim, uma economia em reagentes.

Após a síntese do MIP e do NIP utilizou-se o MEV (Microscópio Eletrônico de Varredura) para efetuar a sua caracterização. Resultados preliminares demonstram a formação de cavidades no MIP (Figuras 19 do lado esquerdo) após a retirada da molécula molde, enquanto que, para o NIP, não foi observado nenhuma cavidade (Figura 19), uma vez que o mesmo não possuiu a utilização a molécula molde em sua síntese.

Figura 19- Caracterização do MIP (A) e NIP (B) por MEV aproximação em 25.000, 50.000 e 100.000 mil vezes, respectivamente.





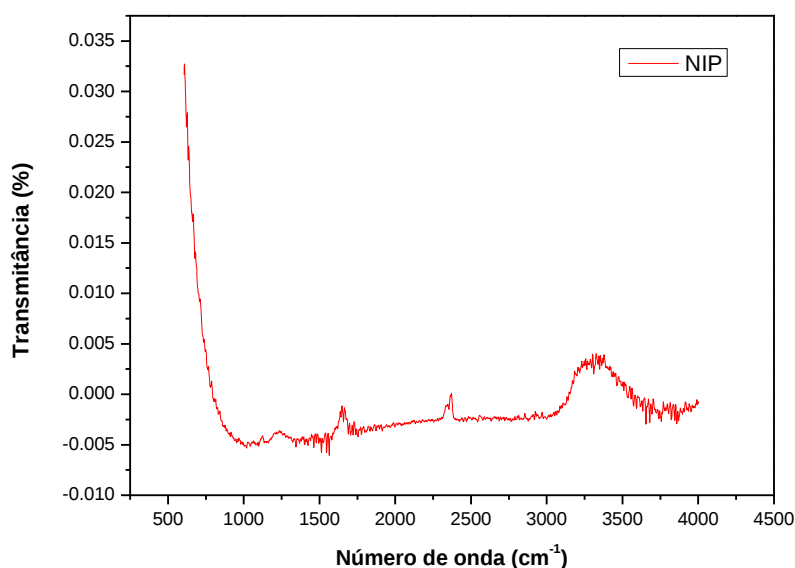
Fonte: autoria própria.

4.6. FTIR – ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

Durante o intercambio na UFPE, o Laboratório da Profa. Rosa Dutra da continha os equipamentos FTIR e MFA os quais foram utilizados para tentar caracterizar a morfologia e área superficial do material biomimético sintetizado.

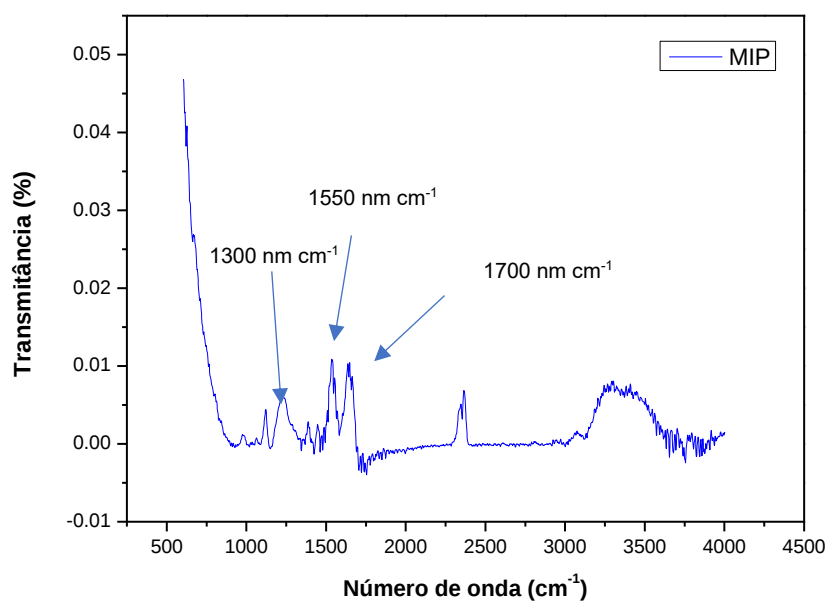
Para o FTIR foi utilizado o módulo ATR (Reflexão Total Atenuada) por se tratar de uma amostra em pó. Inicialmente, o teste foi feito com amostras separadas de MIP e NIP sem proteína, as quais foram lavadas com SDS 1% (Dodecil sulfato de sódio) que é comumente utilizado, segundo a literatura, como desnaturação de proteínas, uma vez que esse composto permite romper as ligações não-covalentes das proteínas, causando sua desnaturação (alteração na conformação estrutural natural). Após isso, efetuaram-se testes com amostras de NIP e MIP com a proteína religada com a finalidade de se observar uma mudança no espectrograma. Figuras (20, 21 e 22).

Figura 20- NIP – Espectro de FTIR Regenerado com Troponina 100ng mL⁻¹. Fonte: autoria própria.



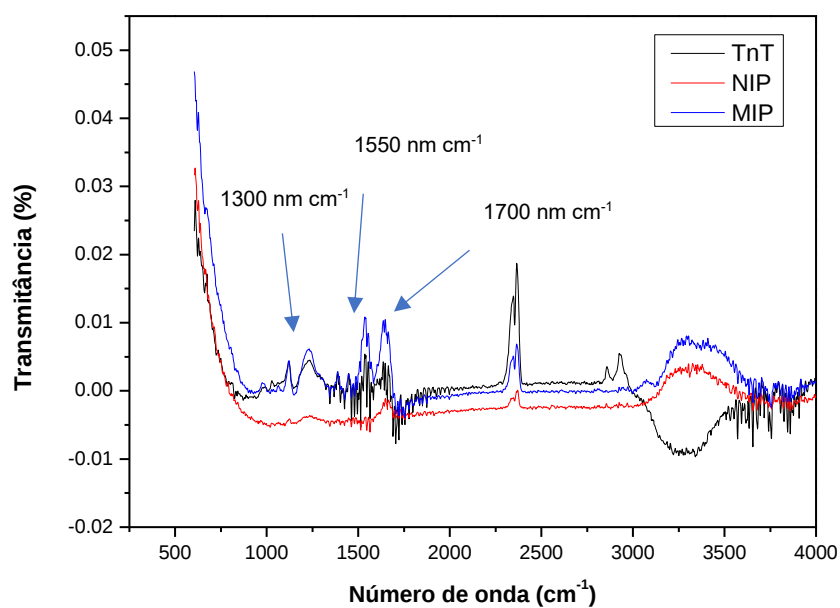
Fonte: autoria própria.

Figura 21- MIP – Espectro de FTIR Regenerado com Troponina 100ng mL⁻¹. Fonte: autoria própria.



Fonte: autoria própria.

Figura 22- Espectro de FTIR Plotagem MIP TnT + NIP TnT + Troponina. Fonte: autoria própria.



Fonte: autoria própria.

Analisando o espectro de infravermelho para o NIP com 100 ng mL^{-1} de TnT e MIP com 100 ng mL^{-1} de TnT o MIP demonstrou, de forma qualitativa, que há uma possível presença da TnT religada ao polímero biomimético. Uma vez que os picos são relativos aos estiramentos de diferentes grupos funcionais orgânicos, é possível identificar substâncias comumente presentes em proteínas. É possível não só identificar os grupos funcionais como também as principais ligações presentes. Observando a Figura 22, nota-se a presença de grupamentos como a amida primária, secundária e terciária, que se dão próximas de 1700 nm cm^{-1} , 1550 nm cm^{-1} e 1300 nm cm^{-1} respectivamente (HARIS; SEVERCAN, 1999), o que é coerente com o que se espera, uma vez que nas proteínas estão presentes grupamentos amins por conter aminoácidos.

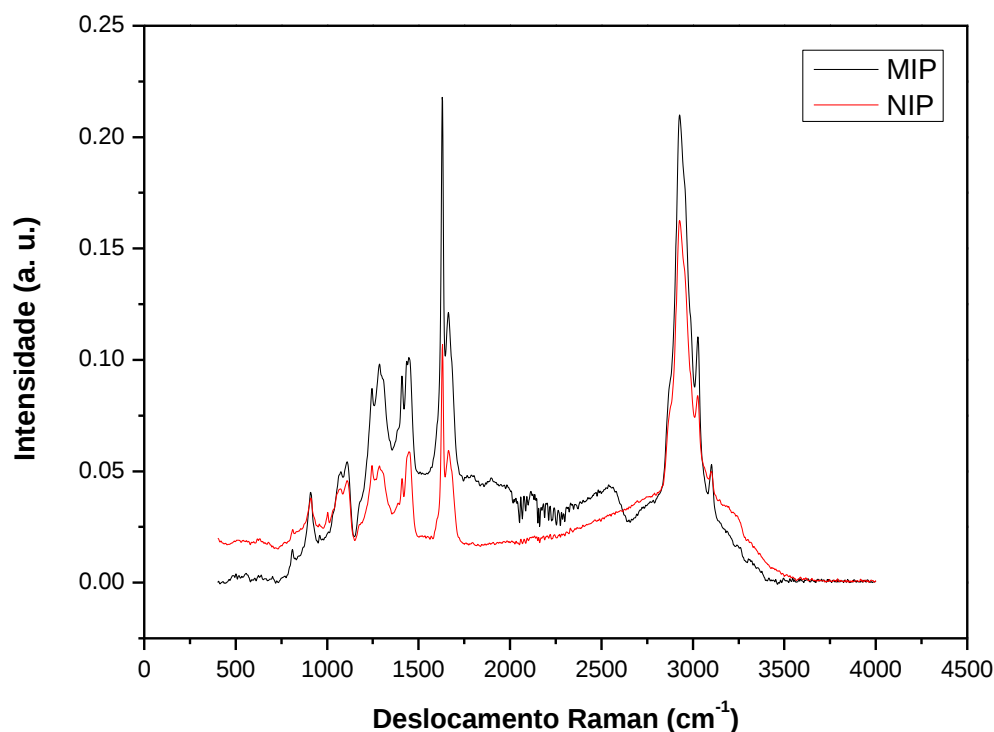
4.7. CARACTERIZAÇÃO POR RAMAN

Foi feita a caracterização por espectroscopia por Raman no NIP e MIP após lavados com água e SDS 1% para eliminação da TnT do MIP e das substâncias que não reagiram completamente Figura 25.

Ao analisar o gráfico, percebe-se que o sinal tanto para o MIP como para o NIP é parecido, indicando assim, a remoção completa da TnT pela lavagem com SDS 1%.

Adicionalmente, após retorno do intercâmbio foram realizadas outras caracterizações da morfologia usando técnicas de adsorção/dessorção de N_2 (BET) para obter a área superficial e o tamanho de poro no MIP, e foram realizados os estudos que visam a construção do sensor, conforme o plano de atividades.

Figura 23- Espectroscopia por Raman no NIP e MIP após lavados com água e SDS 1% para eliminação da TnT.



Fonte: autoria própria.

Analisando a figura acima, é possível identificar a banda por volta de 1600cm^{-1} respectivo a banda da poli-2-vinilpiridina (WANG *et al.*, 2017), evidenciando assim que tanto o NIP como o MIP possuem estruturas similares na ausência da troponina T.

4.8. CARACTERIZAÇÃO POR BET, LANGMUIR E BJH

Foram feitas outras caracterizações da morfologia do material proposto utilizando técnicas de adsorção/dessorção de N_2 (BET) pois, dessa forma, pode-se obter a área superficial e o tamanho do poro no MIP e do material de controle NIP (Tabela 1 e 2).

Tabela 1: Caracterização do MIP através das técnicas: BET, Langmuir e BJH. Fonte: autoria própria.

MIP	
Área superficial por BET	$36,2 \pm 0,9 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$
Área superficial por Langmuir	$49,3 \pm 2,0 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$
Tamanho do poro (BJH)	544,5 nm

Fonte: autoria própria.

Tabela 2: Caracterização do NIP através das técnicas: BET, Langmuir e BJH.

NIP	
Área superficial por BET	$37,5 \pm 0,6 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$
Área superficial por Langmuir	$56,4 \pm 1,6 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$
Tamanho do poro (BJH)	168,5 nm

Fonte: autoria própria.

Analisando as Tabelas 1 e 2, pode-se observar uma diferença grande do tamanho do poro (BJH) do MIP em relação ao NIP. Isso é esperado, uma vez que para o caso do MIP durante a sua síntese utiliza a molécula molde (TnT) e depois da retirada do analito pelo processo de lavagem com SDS 1%, espera-se a formação de poros no material polimérico. No NIP o processo de lavagem foi feito da mesma forma que o MIP, entretanto não houve a formação de um grande poro quando comparado com o MIP, isso provavelmente se deve porque na síntese do NIP não se utiliza nenhuma molécula molde.

Além disso, a área superficial do NIP é maior do que a do MIP quando comparamos por Langmuir. Isso também é esperado, uma vez que o NIP, por não conter os poros grandes iguais aos do MIP, terá uma área superficial maior de contato.

4.9. ELISA – IMUNOENSAIOS

Os primeiros resultados de Elisa consistiam em 3 fases para o imunoensaio completo, sendo eles:

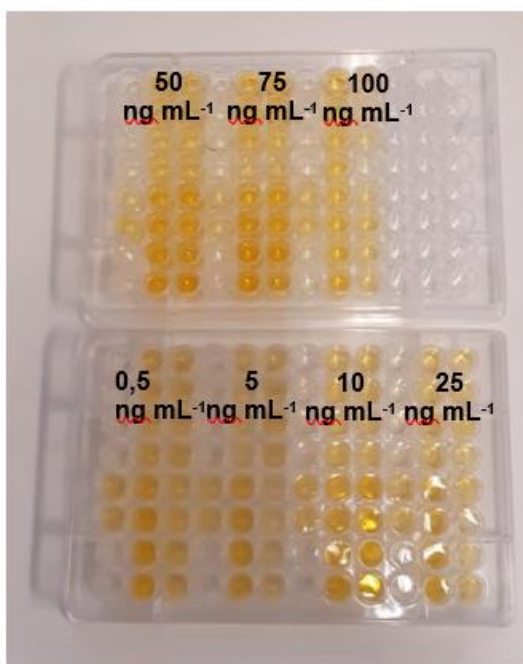
1º Fase: adição de controle; solução mãe de TnT (100 ng mL^{-1}) seguida de 4 lavagens com PBS;

2º Fase: adição da ant HRP. Tempo de incubação: 2 horas sob 37°C ;

3º Fase: adição de OPD. Tempo de reação: 30 minutos no escuro usando ácido sulfúrico para parar a reação.

Abaixo (Figura 26) temos a imagem da placa de ELISA após a adição do revelador OPD:

Figura 24- Foto do imunoensaio realizado através da técnica ELISA em diferentes concentrações de TnT-HRP.



Fonte: autoria própria.

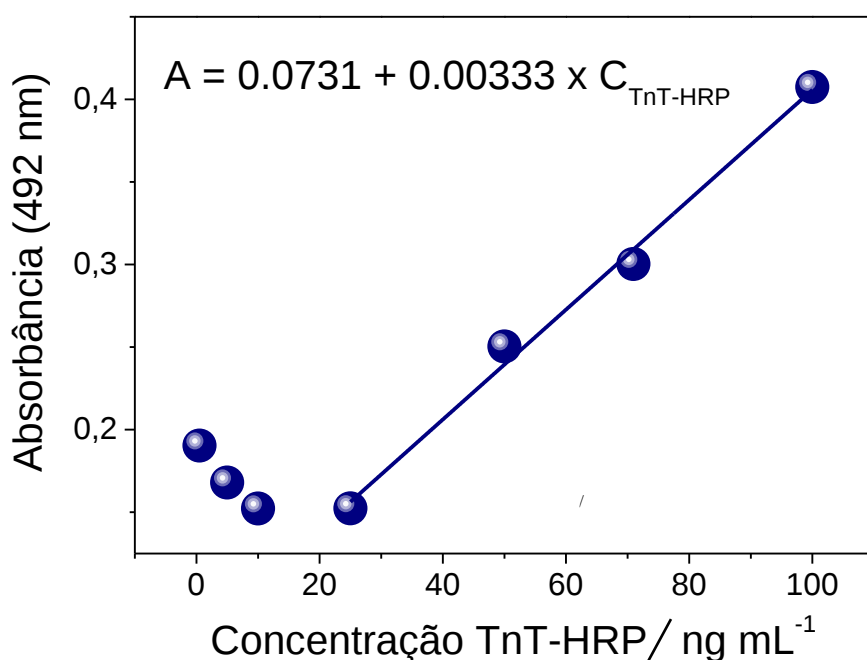
A solução mãe de TnT-HRP 100 ng mL^{-1} foi feita em quadruplicada utilizando 100 uL para cada poço da placa de ELISA, parte dessa solução mãe (600 uL) foi aliquoteada e deixada num *ependorf* com 6 mg de MIP e outra porção em um outro *ependorf* com 6 mg de NIP. Após isso, introduziu o *ependorf* com a solução para centrifugar e o sobrenadante foi capturado adicionando 100 uL do sobrenadante em cada poço. Foram realizados testes do branco que consistia somente na solução PBS

e também outros testes de controle o qual consistia somente da Ant-HRP e TnT 100 ng mL⁻¹.

Fazendo uma média obtemos 0,462 de absorbância com desvio padrão de 0,0297 para o sobrenadante que entrou em contato com o MIP. Para o NIP excluiu o ponto H3 (erro operacional), obtendo uma média de 0,528 com desvio padrão de 0,00311 para o sobrenadante que entrou em contato com o NIP.

Foi realizado um imunoensaio variando a concentração da TnT o qual se encontra abaixo (Figura 27). Durante os imunoensaios ocorreram problemas na quantificação do analito, possivelmente por conta de erro operacional (uma vez que havia o desafio de se adequar nas práticas de imunoensaio) e também por conta da concentração do analito ser bastante baixa, sendo assim, necessário encontrar o mínimo da faixa de trabalho que poderia ser utilizada.

Figura 25- Variação da concentração da TnT-HRP. O teste colorimétrico pela ELISA foi feito com OPD.



Fonte: autoria própria.

Um parâmetro que pode ser obtido através dos métodos analíticos é a linearidade, o qual pode fornecer respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração da substância a ser determinada. Para esse caso a faixa linear de resposta encontra-se em 25 ng mL⁻¹ até 100 ng mL⁻¹. Os Limites de Detecção (LD) e

Limites de Quantificação (LQ) que são dependentes da curva analítica ou, nesse caso, da reta linear foram calculados. A definição do LD é a menor quantidade de analito que pode ser detectada, entretanto, não necessariamente pode ser quantificada com recomendável grau de confiabilidade. Os motivos podem ser devido a um sinal analítico ruidoso ou não possuindo um sinal suficientemente grande em relação ao branco, por exemplo. Já o LQ, é a menor concentração de analito para a sua quantificação adequada com um grau de confiabilidade elevado. Esses parâmetros puderam ser calculados de acordo com as equações x e x , onde S_b é o desvio padrão da medição de 10 sinais brancos para o LQ, 3 para o LD e m é o coeficiente angular de 0,0033 representando a sensibilidade da curva (HARTMANN *et al.*, 2007).

$$LD = 3 \frac{S_b}{m}$$

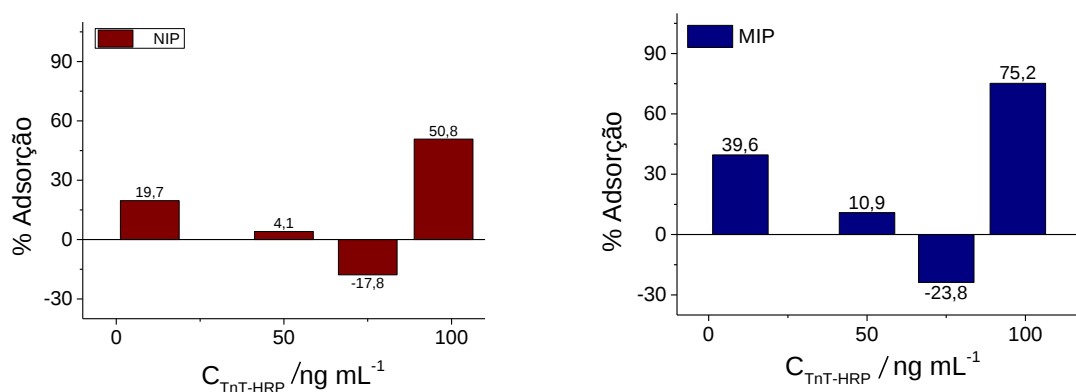
$$LQ = 10 \frac{S_b}{m}$$

Limites de detecção e limites de quantificação	
LD em ng mL ⁻¹	17.18
LQ em ng mL ⁻¹	52.07

Testes de interferência também foram feitos utilizando a BSA, HSA e Soro humano. Uma vez que a proteína BSA é bem mais barata que a TnT, aproveitou a utilização da BSA como início para aprender a técnica de imunoensaio e averiguar se a mesma adsorvia no MIP e NIP. Tanto para a BSA como HSA o MIP não reteve o material.

Os imunoensaios para averiguar adsorção do analito no material proposto foram realizados utilizando as mesmas condições tanto para o MIP como para o material de controle NIP. Observando o gráfico abaixo (Figura 28) nota-se que o MIP apresentou uma adsorção relativamente maior do que a do NIP, entretanto, o NIP ainda está adsorvendo uma quantidade de analito razoável quando comparado com o MIP.

Figura 26- Relação dos gráficos de adsorção do NIP (lado esquerdo) e MIP (lado direito) através da técnica ELISA.



Fonte: autoria própria.

Outras técnicas visando obter as figuras de mérito para a quantificação do analito foram utilizadas, como o *Nanodrop* durante o intercâmbio em Recife. Essa técnica que consiste na “pesagem da proteína” seguida de uma análise espectrométrica. Para ambos os sistemas de NIP e MIP, foi deixado interagir com uma solução de TnT de concentração conhecida com tempo em *overnight*, após isso foi analisado o sobrenadante no *nanodrop*, entretanto, não foi possível quantificar o analito nesse equipamento devido a sua faixa de resposta não ser satisfatória para o experimento proposto.

Técnicas eletroanalíticas também foram utilizadas para tentar quantificar o analito. Entre elas foram feitas análises utilizando sonda de ferri-ferro para observar se ocorria uma queda na corrente após a inserção do analito na célula eletroquímica, uma vez que a proteína em questão não era eletroativa. Um fator que podem ter corroborado para esses resultados inesperados pode ser devido à baixa difusão do analito até a interface do eletrodo-solução.

5. CONCLUSÃO

Embora ainda seja um desafio a síntese de MIP para biomacromoléculas por conta de sua perda na seletividade, a teoria do funcional da densidade demonstra ser uma ferramenta promissora no auxílio da síntese desses materiais, uma vez que a mesma permitiu fazer uma triagem prévia durante a escolha do monômero funcional proporcionando um entendimento químico teórico do material desenvolvido. A dinâmica molecular também pode fornecer informações microscópicas do sistema proposto, como a formação de mini estruturas envoltas da proteína e explicando o porquê da religação do MIP com a Troponina T ainda não foi concluída, uma vez que os clusters formado ao redor da proteína aparentemente não foi estratégico. Para as próximas etapas de síntese foi introduzido um outro monômero funcional além da 2vinilpiridina visando a formação de clusters em outras partes da proteína em questão.

Além disso, aliada a simulação computacional, a execução da síntese inversa do MIP (algo inédito na literatura) também pode fornecer economia em esforço e reagentes, uma vez que foi demonstrado um grande aumento no rendimento da síntese para o material polimérico.

Pode-se dizer que até este ponto, este trabalho que foi desafiador e novo na literatura tem como perspectivas futuras, propor a quantificação do analito através de ensaios de adsorção para averiguar a real efetividade do material desenvolvido para que assim possa ser desenvolvido o imunossensor futuramente.

Como perspectivas futuras temos como:

- Desenvolver uma nova síntese com mais de um monômero funcional;
- Novos metodologias para quantificação;
- Aplicação do MIP na fase sensora do sensor eletroquímico ou sensor biomimético.

6. REFERÊNCIAS

- A. M. NAMBA, V. B. DA S.; SILVA, C. H. T. P. DA. Dinâmica molecular: Teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Ecletica Quimica**, v. 33, n. 4, p. 13–24, 2008.
- ACKERMANN, T. Bei der Schriftleitung zur Besprechung eingegangene Bücher. **Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie**, v. 91, n. 12, p. 1404–1404, 1987.
- AHMAD, O. S. et al. Molecularly Imprinted Polymers in Electrochemical and Optical Sensors. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 294–309, 2019.
- ALEXANDER, C. et al. Molecular imprinting science and technology: A survey of the literature for the years up to and including 2003. **Journal of Molecular Recognition**, v. 19, n. 2, p. 106–180, 2006.
- ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. **Computer simulation of liquids**. [s.l.] Oxford university press, 2017.
- AMARAL, R. C. **Estudo ab initio da adsorção de metanol, etanol e glicerol sobre superfícies de platina com defeitos e ligas de Pt 3 Ni com tensões**. [s.l.] USP, 2019.
- ANDERSSON, L. I.; MOSBACH, K. Enantiomeric resolution on molecularly imprinted polymers prepared with only non-covalent and non-ionic interactions. **Journal of Chromatography A**, v. 516, n. 2, p. 313–322, 1990.
- ASENSIO, J. L.; MARTIN-PASTOR, M.; JIMENEZ-BARBERO, J. The use of CVFF and CFF91 force fields in conformational analysis of carbohydrate molecules. Comparison with AMBER molecular mechanics and dynamics calculations for methyl α -lactoside. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 17, n. 3–4, p. 137–148, 1995.
- ASSIS, A. R. DE et al. Troponina , biomarcador de injúria cardíaca , na medicina veterinária : Revisão Troponin , a cardiac injury biomarker , in veterinary medicine : Review Troponina , biomarcador veterinaria : Revisión de cardiaca , en medicina. **Pubvet**, v. 11, n. 9, p. 928–934, 2017.
- ATKINSON, A. J. et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 69, n. 3, p. 89–95, 2001.

- BERENDSEN, H. J. C. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 8, p. 3684–3690, 1984.
- BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, v. 91, n. 1–3, p. 43–56, 1995.
- BORN, M.; OPPEMHEDMER, R. Zur Quantentheorie der Molekeln. **ANNALEN DER PHYSIK**, v. 20, p. 457, 484, 1927.
- BOWEN, J. P.; ALLINGER, N. L. Molecular Mechanics: The Art and Science of Parameterization. **Reviews in Computational Chemistry**, v. 2, p. 81–97, 1991.
- BROOKS, B. R. et al. CHARMM: Molecular dynamics simulation package. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 10, p. 1545–1614, 2009.
- BURKERT, U. Molecular mechanics. **ACS monograph 177**, 1982.
- CASE, D. A. et al. **AMBER 11USA**, 2010.
- CHAVES, ANDERSON SILVA, J. L. F. DA S. **Estudo teórico das propriedades estruturais, eletrônicas e reatividade de clusters de metais de transição**. [s.l.] USP, 2015.
- CLAVERIE, J. **Molecular dynamics investigation of the mechanical , thermal and surface properties of tricalcium silicate and its early hydration**. [s.l.] UNESP, 2019.
- CRUZ, H. J.; ROSA, C. C.; OLIVA, A. G. Immunosensors for diagnostic applications. **Parasitology Research**, v. 88, n. SUPPL. 1, p. 4–7, 2002.
- DE GODOY, M. F.; BRAILE, D. M.; NETO, J. P. A troponina como marcador de injúria celular miocárdica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 71, n. 4, p. 629–633, 1998.
- DUARTE, H. A. ÍNDICES DE REATIVIDADE QUÍMICA A PARTIR DA TEORIA DO FUNCIONAL DE DENSIDADE: FORMALISMO E PERSPECTIVAS. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 501–508, 2001.
- FABIAN, M. D. et al. Stochastic density functional theory. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 9, n. 6, p. 1–15, 2019.
- FELIX, F. S.; ANGNES, L. **Electrochemical immunosensors – A powerful tool for analytical applications**. [s.l.] Elsevier B.V., 2018. v. 102
- FERMI, E. Eine statistische Methode zur Bestimmung einiger Eigenschaften des Atoms und ihre Anwendung auf die Theorie des periodischen Systems der Elemente.

Zeitschrift für Physik, v. 48, n. 1–2, p. 73–79, 1928.

FOGUEL, M. V. et al. Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer for selective adsorption and quantification of Acid Green 16 textile dye in water samples.

Talanta, v. 170, p. 244–251, 2017.

FOGUEL, M. V. et al. A molecularly imprinted polymer-based evanescent wave fiber optic sensor for the detection of basic red 9 dye. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 218, p. 222–228, 2015.

FORNERA, S.; WALDE, P. Spectrophotometric quantification of horseradish peroxidase with o-phenylenediamine. **Analytical Biochemistry**, v. 407, n. 2, p. 293–295, 2010.

GAN, S. D.; PATEL, K. R. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 9, p. 1–3, 2013.

GOMES-FILHO, S. L. R. et al. A carbon nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiac troponin T. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 10–15, 2013.

GONZÁLEZ, M. A. Force fields and molecular dynamics simulations. v. 12, p. 169–200, 2011.

H.M. BERMAN, J. et al. **The Protein Data Bank**.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, p. 17, 2012.

HARIS, P. I.; SEVERCAN, F. FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 7, n. 1–4, p. 207–221, 1999.

HARTMANN, A. et al. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. **INMETRO**, v. DOQ-CGCRE-, p. 01–24, 2007.

HARTREE, D. R. The Wave Mechanics of an Atom with a Non-Coulomb Central Field Part I Theory and Methods. **Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society**, v. 24, n. 1, p. 89–110, 1928.

HEERDT, G.; MORGON, N. H. Validação computacional de métodos compostos no estudo de propriedades moleculares. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 868–873, 2011.

HESTENES, M. R.; STIEFEL, E. Methods of conjugate gradients for solving linear systems. **Journal of Research of the National Bureau of Standards**, v. 49, n. 6, p. 409, 1952.

HO, W. L.; LIU, Y. Y.; LIN, T. C. Development of molecular imprinted polymer for

selective adsorption of benz[a]pyrene among airborne polycyclic aromatic hydrocarbon compounds. **Environmental Engineering Science**, v. 28, n. 6, p. 421–434, 2011.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. INHOMOGENEOUS ELECTRON GAS. **PHYSICAL REVIEW**, v. 136, n. 3, p. 864–871, 1964.

HUANG, J. et al. CHARMM36m: An improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. **Nature Methods**, v. 14, n. 1, p. 71–73, 2016.

HUANG, K. Statistical mechanics. **Statistical Mechanics, 2nd Edition, by Kerson Huang, pp. 512. ISBN 0-471-81518-7. Wiley-VCH, April 1987.**, p. 512, 1987.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD - Visual Molecular Dynamics. **J. Molec. Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996.

JONES, C. G.; DANIEL HARE, J.; COMPTON, S. J. MEASURING PLANT PROTEIN WITH THE BRADFORD ASSAY. **Journal of Chemical Ecology**, v. 15, n. 3, p. 979–992, 1989.

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 American Chemical Society**, v. 118, n. 45, p. 11225–11236, 1996.

KRUGER, N. J. The Bradford Method For Protein Quantitation. **Basic Protein and Peptide Protocols**, p. 17–24, 2009.

LEQUIN, R. M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 2415–2418, 2005.

LIN, H.-R. Solution polymerization of acrylamide using potassium persulfate as an initiator: kinetic studies, temperature and pH dependence. **European polymer journal**, v. 37, n. 7, p. 1507–1510, 2001.

LINDERT, S.; KEKENES-HUSKEY, P. M.; MCCAMMON, J. A. Long-timescale molecular dynamics simulations elucidate the dynamics and kinetics of exposure of the hydrophobic patch in troponin C. **Biophysical Journal**, v. 103, n. 8, p. 1784–1789, 2012.

LUPPA, P. B.; SOKOLL, L. J.; CHAN, D. W. Immunosensors - Principles and applications to clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 314, n. 1–2, p. 1–26, 2001.

LUSK, M. T.; MATTSSON, A. E. High-performance computing for materials design to advance energy science. **MRS Bulletin**, v. 36, n. 3, p. 169–174, 2011.

- M. KARPLUS; J. A. MCCAMMON. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature Structural Biology**, v. 9, n. 9, p. 646–652, 2002.
- MARESTONI, L. D. et al. Polímeros impressos com íons: Fundamentos, estratégias de preparo e aplicações em química Analítica. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1194–1207, 2013.
- MIYANISHI, M. et al. Role of Amino Acid Residues for Dioxygen Activation in the Second Coordination Sphere of the Dicopper Site of pMMO. **Inorganic Chemistry**, v. 58, n. 18, p. 12280–12288, 2019.
- MORGON, N. H.; CUSTÓDIO, R. **The Density Functional Theory (DFT)** **Química Nova**, 1995.
- MOULT, J. Comparison of database potentials and molecular mechanics force fields. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 7, n. 2, p. 194–199, 1997.
- NEGAHDARY, M. et al. The importance of the troponin biomarker in myocardial infarction. **Journal of Biology and Today's World**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2016.
- OLIVEIRA, B. G.; DE ARAÚJO, R. C. M. U. Relação entre transferência de carga e as interações intermoleculares em complexos de hidrogênio heterocíclicos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 791–796, 2007.
- PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. **Journal of Applied Physics**, v. 52, n. 12, p. 7182–7190, 1981.
- PINTO, V. S.; SOUSA, V. P. DE; CAMERON, L. C. As bases estruturais e moleculares da contração muscular. **Fisioterapia Brasil**, v. 5, n. 4, p. 298–306, 2004.
- RAMASUBRAMANIAM, A.; CARTER, E. A. Coupled quantum-atomistic and quantum-continuum mechanics methods in materials research. **MRS Bulletin**, v. 32, n. 11, p. 913–918, 2007.
- REED, G. W.; ROSSI, J. E.; CANNON, C. P. Acute myocardial infarction. **The Lancet**, v. 389, n. 10065, p. 197–210, 2017.
- SARHAN, A.; WULFF, G. On the Use of Enzyme-Analogous Polymers for Racemate Separation. **Angew. Chem., Int. Ed.**, v. 84, n. 669, p. 364, 1972.
- SCHRÖDINGER, E. An undulatory theory of the mechanics of atoms and molecules. **Physical Review**, v. 28, n. 6, p. 1049–1070, 1926.
- SILVA, B. V. M. et al. Disposable immunosensor for human cardiac troponin T based on streptavidin-microsphere modified screen-printed electrode. **Biosensors and**

Bioelectronics, v. 26, n. 3, p. 1062–1067, 2010.

SINGH, K.; BALASUBRAMANIAN, S.; AMITHA RANI, B. E. Computational and Experimental Studies of Molecularly Imprinted Polymers for Organochlorine Pesticides Heptachlor and DDT. **Current Analytical Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 562–568, 2012.

SLATER, J. C. A simplification of the Hartree-Fock method. **Physical Review**, v. 81, n. 3, p. 385–390, 1951.

SOBRINHO, D. G. **Estudo ab Initio dos Efeitos de Ligantes e Temperatura na Estabilidade e Meta-estabilidade de Nanoclusters Metálicos**. [s.l.] USP, 2017.

SOLÀ, M.; DE PROFT, F.; BICKELHAUPT, F. M. Special Collection: Computational Chemistry. **ChemistryOpen**, v. 8, n. 7, p. 814–816, 2019.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiéticos em química analítica. Parte 1: Preparo e aplicações de MIP em técnicas de extração e separação. **Quim. Nova**, v. 28, n. 6, p. 1076–1086, 2005.

THERMOFISHER. **Horseradish peroxidase**.

THERMOFISHER. **Bradford Assay**.

THOMAS, L. H. The calculation of atomic fields. **Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society**, v. 23, n. 5, p. 542–548, 1927.

THOMAS, L. H.; UMEDA, K. Atomic scattering factors calculated from the TFD atomic model. **The Journal of Chemical Physics**, v. 26, n. 2, p. 293–303, 1957.

TSUNEDA, T. **Density functional theory in quantum chemistry**. [s.l.: s.n.]. v. 9784431548

UZUN, L.; TURNER, A. P. F. Molecularly-imprinted polymer sensors: Realising their potential. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 76, p. 131–144, 2016.

VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Groningen Molecular Simulation (GROMOS) Library Manual. **Groningen Molecular Simulation (GROMOS) Library Manual**, p. 1–221, 1987.

VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Molecular dynamics computer simulation. Method, application and perspectives in chemistry. **Section Title: Physical Organic Chemistry**, v. 102, n. 9, p. 1020–1055, 1990.

VERLET, L. Computer “experiments” on classical fluids. II. Equilibrium correlation functions. **Physical Review**, v. 165, n. 1, p. 201–214, 1968.

WANG, W. et al. Poly(2-vinylpyridine) brushes as a reaction chamber to fabricate spiky gold nanoparticles. **RSC Advances**, v. 7, n. 45, p. 28024–28028, 2017.

WENDT, M.; CAPPUCCILLI, G. Synthetic Antibodies. v. 1575, 2017.

WHITCOMBE, M. J. et al. A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 27, p. 7105–7111, 1995.

WODRICH, M. D.; CORMINBOEUF, C.; SCHLEYER, P. V. R. Systematic errors in computed alkane energies using B3LYP and other popular DFT functionals. **Organic Letters**, v. 8, n. 17, p. 3631–3634, 2006.

YOLKEN, R. H. Enzyme immunoassays for the detection of infectious antigens in body fluids: current limitations and future prospects. **REVIEWS OF INFECTIOUS DISEASES**, v. 4, n. 1, p. 35–68, 1982.

Apêndice

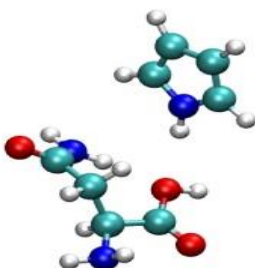
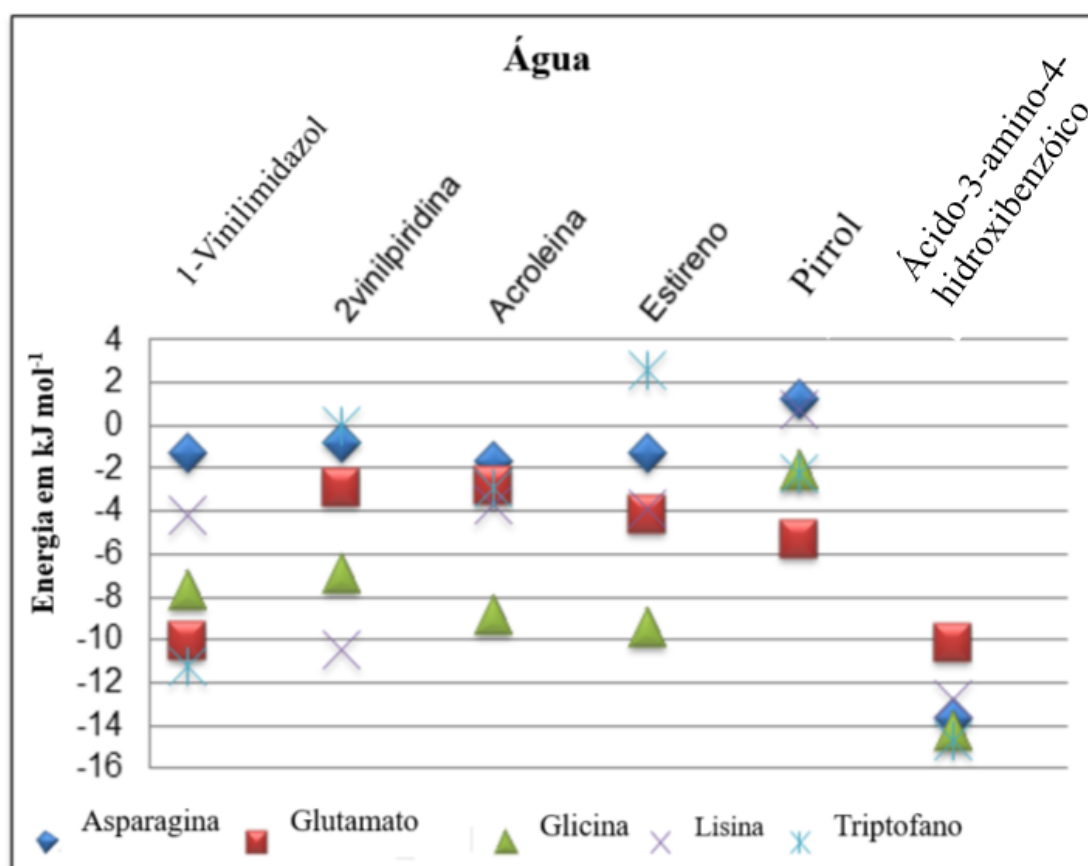
TRABALHOS PARALELOS A ESTE PROJETO: S ESTUDOS TEÓRICOS ATRAVÉS DO DFT (TEORIA DO FUNCIONAL DA DENSIDADE) PARA FUTURO DESENVOLVIMENTO DO SENSOR BIOMIMÉTICO PARA A NS2B.

Adicionalmente a este trabalho com a troponina T, estudos teóricos para a proteína NS2B foi realizada em Recife.

A proteína não estrutural NS2B pode ser considerada um biomarcador para o zika vírus uma vez que a mesma é essencial para o ciclo replicativo do vírus da zika. A fim de averiguar qual seria o monômero funcional que possua uma interação favorável com o analito NS2B e, além disso, pudesse ser efetuada a retirada da molécula molde (NS2B) para a formação das cavidades, introduziram-se estudos computacionais para analisar o nosso sistema. Existem diversos tipos de monômeros funcionais que são utilizados na síntese de MIP, sendo assim, uma análise prévia, proporciona uma economia em reagentes assim como uma compreensão química do nosso sistema. Como queremos compreender a reatividade do nosso sistema, devemos utilizar um método quântico para podermos descrevê-lo, que foi feito através da Teoria do Funcional da Densidade (DFT).

Como através do método quântico não é possível descrever para moléculas complexas (como o caso de uma proteína), escolheu-se os aminoácidos mais frequentes na NS2B. Sendo assim, selecionaram-se os aminoácidos mais frequentes na estrutura da NS2B. A água foi escolhida como solvente porque na síntese desse MIP por eletropolimerização foi feito em tampão PBS.

Figura 27- gráfico de energias em kJ mol^{-1} dos monômeros funcionais e aminoácidos escolhidos na NS2B. E demonstração da interação do Pirrol com a Asparagina.



Fonte: autoria própria.

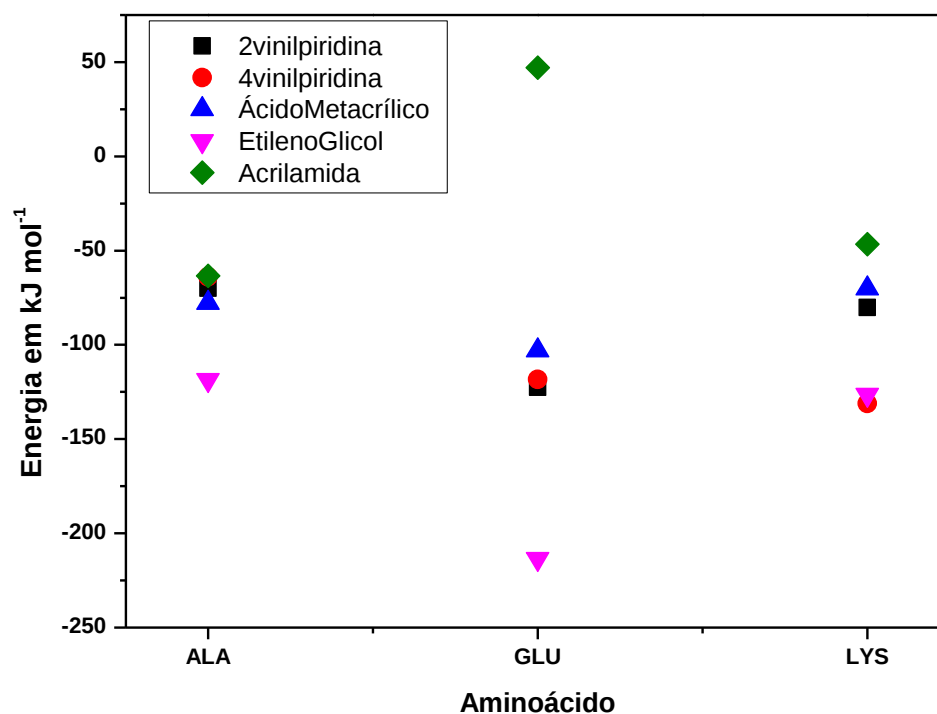
Analisando o gráfico observa-se que o monômero funcional ácido-3-amino-4-hidroxibenzoico (AAHB) demonstra uma interação favorável e melhor do que em relação aos outros monômeros funcionais, dessa forma, podemos inferir que o AAHB se mostrou possuir uma boa interação com todos os aminoácidos presentes, além disso, o AAHB possui um poder de condução significativo devido ao seu anel aromático que contém o fenômeno da ressonância devido aos seus elétrons π deslocalizados, portanto, escolheu esse monômero funcional para a síntese por eletropolimerização do MIP. É importante que a formação do complexo aminoácido-AAHB ocorra para que após a polimerização e retirada da molécula molde (AAHB) seja formada as cavidades que seriam seletivas para a proteína em questão, uma vez que a forma desses sítios de ligação seria características da NS2B.

Já está em andamento a criação de um MIP para NSB2 feito por eletropolimerização diretamente na superfície do eletrodo de carbono vítrio utilizando a AAHB como monômero funcional. É importante enfatizar que a conciliação da simulação computacional com a experimentação é importante, uma vez que uma validaria a outra. Além disso, o monômero AAHB ainda não possui nenhum MIP feito a partir dele na literatura, sendo assim esse trabalho possui caráter inovador, além da utilização da DFT como estudos teóricos prévios para a síntese de MIP.

Gráfico para os aminoácidos da troponina T interagindo com os monômeros funcionais escolhidos inicialmente calculados no vácuo.

Inicialmente os testes foram feito em vácuo, abaixo (Figura 30) se encontra o gráfico respectivo a este cálculo:

Figura 28- gráfico de energias em kJ mol^{-1} dos monômeros funcionais e aminoácidos escolhidos inicialmente para a troponina T calculados no vácuo.



Fonte: autoria própria