

ALEXANDRE CESAR DOURADO NEVES

EFEITOS DE OSMÓLITOS E SOLVATAÇÃO NA
TERMODINÂMICA DO ENovelAMENTO DE PROTEÍNAS
EM MODELOS NA REDE E SUA CORRELAÇÃO COM
EXPERIMENTOS



1910001324





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE
MESQUITA FILHO" - UNESP.

ALEXANDRE CESAR DOURADO NEVES

**EFEITOS DE OSMÓLITOS E SOLVATAÇÃO NA
TERMODINÂMICA DO ENovelAMENTO DE PROTEÍNAS
EM MODELOS NA REDE E SUA CORRELAÇÃO COM
EXPERIMENTOS**

Tese apresentada para obtenção do grau de
Doutor em Física, Área de Concentração em
Biofísica Molecular. Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho" - UNESP.



São José do Rio Preto - SP

2003



20801017

577.112

N518e

13/01/2005

Doação

R\$ 29,00

Autor(a)

076/2005

Neves, Alexandre Cesar Dourado.

Efeitos de osmólitos e solvatação na termodinâmica do enovelamento de proteínas em modelos na rede e sua correlação com experimentos / Alexandre Cesar Dourado Neves – São José do Rio Preto : [s.n.], 2004

154f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Márcio Francisco Colombo

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Proteínas. 2. Proteínas - Simulação. 3. Proteínas - Enovelamento. 4. Método Monte Carlo. 5. CBMC. 6. SAW. 7. Repesagem de histograma. I. Colombo, Márcio Francisco. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.112

Orientador: Prof. Dr. Márcio Francisco Colombo

Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Chahine

Este trabalho foi realizado no Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, com auxílio financeiro da Capes.

ALEXANDRE CESAR DOURADO NEVES

EFEITOS DE OSMÓLITOS E SOLVATAÇÃO NA
TERMODINÂMICA DO ENVELAMENTO DE PROTEÍNAS EM
MODELOS NA REDE E SUA CORRELAÇÃO COM
EXPERIMENTOS

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof.Dr.Márcio Francisco Colombo.....

2º Examinador: Prof.Dr.Antônio Caliri.....

3º Examinador: Prof.Dr.Marco Antônio Alves da Silva.....

4º Examinador: Prof.Dr.Augusto Agostinho Neto.....

5º Examinador: Prof.Dr.Elso Drigo Filho.....

Este trabalho foi realizado no Departamento de Física do
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, com auxílio
financeiro da Capes.



DADOS: ALEXANDRE CESAR DOURADO NEVES

*EFEITOS DE OSMÓLITOS E SOLVATAÇÃO NA
TERMODINÂMICA DO ENOVELAMENTO DE PROTEÍNAS EM
MODELOS NA REDE E SUA CORRELAÇÃO COM
EXPERIMENTOS*

NASCIMENTO: 15/04/1971 - São Paulo-SP

COMISSÃO JULGADORA

FILIAÇÃO: Waldir José de Almeida Dourado Neves

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

1990/1993: Curso de Graduação

Presidente e Orientador: Prof.Dr.Márcio Francisco Colombo.....

2º Examinador: Prof.Dr.Antônio Caliri.....

3º Examinador: Prof.Dr.Marco Antônio Alves da Silva.....

1994/1996: Curso de pós-graduação Stricto Sensu

4º Examinador: Prof.Dr.Augusto Agostinho Neto.....

Área de concentração: Biofísica Molecular

5º Examinador: Prof.Dr.Elso Drigo Filho.....

Unidade de pesquisa: Laboratório de Biofísica Molecular

Departamento de Física, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP),

Câmpus de São José do Rio Preto-SP.

São José do Rio Preto, 21 de novembro de 2003.



DADOS CURRICULARES

Alexandre Cesar Dourado Neves

NASCIMENTO: 15/04/1971 - São Paulo-SP.

FILIAÇÃO: Waldir Wilson Neves e Ana Rita Dourado Neves

1990/1993: Curso de Graduação

Ciências Físicas e Biológicas com habilitação plena em Física

Faculdade Riopretense de Filosofia, Ciências e Letras.

1994/1996: Curso de pós-graduação Stricto Sensu.

Mestrado em Física;

Área de concentração: Biofísica Molecular;

Linha de pesquisa: Biofísico-química de Macromoléculas;

Departamento de Física, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Câmpus de São José do Rio Preto-SP.

Para Magna

Toda Ciência é Física ou é coleção de selos.

Ernest Rutherford (1871-1937) – Físico:

Prêmio Nobel de Química



AGRADECIMENTOS

Esta obra somente pôde ser concluída graças à colaboração, direta ou indireta, de todos aqueles que de diferentes formas estiveram envolvidos neste trabalho.

É com carinho especial que agradeço ao Prof.Dr. Márcio Francisco Colombo, amigo e orientador, pela oportunidade que me deu, colocando-me em contato com as "Ciências", cujos ensinamentos transmitidos serão sempre lembrados. MEU MUITO OBRIGADO!

Ao Prof.Dr.Jorge Chafim, por sua excepcional colaboração prestada neste trabalho e por sua amizade, meus mais sinceros agradecimentos. Seus ensinamentos jamais serão esquecidos!

*Ao Dr. **Toda Ciência é Física ou é coleção de selos.***
agradeço pelos ensinamentos transmitidos.

Ernest Rutherford (1871-1937) – Físico:

Ao Prof.Dr.Elso Drigo Filho, amigo e professor, cujo exemplo de postura científica muito me estimula.
Prêmio Nobel de Química

Ao Prof.Dr.Augusto Agostinho Neto pela admiração de sua incrível capacidade intelectual que muito me encoraja para que eu possa continuar no caminho do saber.

AGRADECIMENTOS

Esta obra somente pôde ser concluída graças à colaboração, direta ou indireta, de todos aqueles que de diferentes formas estiveram envolvidos neste trabalho.

É com carinho especial que agradeço ao Prof.Dr. Márcio Francisco Colombo, amigo e orientador, pela oportunidade que me deu, colocando-me em contato com as "Ciências", cujos ensinamentos transmitidos serão sempre lembrados. MEU MUITO OBRIGADO!

Ao Prof.Dr.Jorge Chafine, por sua excepcional colaboração prestativa neste trabalho e por sua amizade, meus mais sinceros agradecimentos. Seus ensinamentos jamais serão esquecidos!

Ao Prof.Dr.José Roberto Ruggiero, amigo e professor, Físico admirável, agradeço pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Prof.Dr.Elso Drigo Filho, amigo e professor, cujo exemplo de postura científica muito me estimula.

Ao Prof.Dr.Augusto Agostinho Neto pela admiração de sua incrível capacidade intelectual que muito me encoraja para que eu possa continuar no caminho do saber.

Ao Prof.Dr.João Ruggiero Neto, pela admiração que tenho e pela afetuosa amizade.

Ao Prof.Dr.Marcelo Fossey, pelos ensinamentos e amizade.

Ao Prof.Dr.Gustavo Orlando Bonilla Rodrigues pela amizade..

Ao Prof.Dr.Jonny Rizzieri, pelo excelente professor que é e pela sua amizade

Recebi críticas construtivas ou outra assistência valiosa de diversas pessoas, especialmente dos professores: Prof.Dr.Marinônio Cornélio, Prof.Dr.José Ramom Abrego, Prof.Dr.Eloi Feitosa, Prof.Dr.Raguvir Arni, Prof.Dr.Victor Barbanti, Prof.Dr.Valter Figueira e Prof.Dr.Marco Antônio (in memorian).

Sou grato aos técnicos do departamento de Física, Paulinho e Barbosa, cujo auxílio foi de fundamental importância.

Agradeço também a Ilva, secretária do departamento de Física, por sua excepcional cooperação.

Aos meus pais Waldir Wilson e Ana Rita, que lutaram, acompanharam e torceram muito para que eu pudesse chegar até aqui; sorriram e choraram comigo ao longo deste caminho. Seus ensinamentos transmitidos são maiores que qualquer ensinamento acadêmico. Muito obrigado por terem acreditado em mim.

Agradeço aos familiares que sempre me incentivaram: meus irmãos Kátia, Tânia (in memorian), Sandra, Márcia e Rodrigo, que acompanharam de perto minha luta para poder chegar até aqui; agradeço as minhas tias Terezinha e Edna pelo importante apoio dado num período muito difícil da minha vida. Agradeço aos meus cunhados pela torcida para que eu vencesse esta batalha.

À minha princesa Magna, não tenho palavras. "Sem você eu não teria suportado os espinhos que surgiram ao longo deste caminho, e que não foram poucos". Eu te amo!

Aos meus queridos sobrinhos Danilo, Sabrina e Paula, cuja torcida para que eu vencesse esta etapa de minha vida foi de fundamental apoio, meus sinceros agradecimentos. Torço para que vocês, através dos estudos, se tornem cidadãos críticos, capazes e competentes. Muito obrigado.

Aos amigos Alexandre Teso e Luis Paulo, pelos auxílios computacionais prestados e pela amizade.

Aos meus queridos amigos Adriana, Andrés, Benatti, Bernadete, Fátima, Flávio, Fernanda, Glaucia, Ocimar, Osmar, Priscila, Renato, Sabrina, Sandra, Selma, Giovanni e Uderlei, pelo companheirismo, carinho e dedicação constantes, sem os quais este trabalho não seria possível.

Quero reiterar meus agradecimentos ao companheiro de pós-graduação Renato Caetano (Carinha), sendo que começamos juntos, passamos pelas mesmas dificuldades e terminamos juntos. Os espinhos ao longo desta jornada foram muitos, mas nós conseguimos. Lembre-se sempre desta frase: "Se não fosse a noite, como veríamos as estrelas?". Meu muito obrigado.

Ao departamento de Física pela oportunidade. Aos funcionários da biblioteca pela colaboração, paciência e amizade, meu muito obrigado. Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação pela paciência comigo ao longo desses anos e pela amizade conquistada; meus profundos agradecimentos. Em especial a Supervisora da Seção de Pós-Graduação Rosemar Rosa de Carvalho Brena, pessoa altruísta e de conduta invejável com quem pude contar; meus mais sinceros agradecimentos.

A direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, meu muito obrigado.

Ao departamento de Ciências Exatas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, pela oportunidade de trabalhar com vocês. Especialmente as secretárias Juliana e Zezé, com quem tive o privilégio de trabalhar, meu muito obrigado. Aos professores Prof.Dr.Adhemar Sanches, Prof.Dr.Genner Tadeu, Prof.Dr.Newton La Scala, Prof.Dr. João Ademir, Prof.Dr. Euclides Braga, Prof.Dr.Dilermano Perecim, Prof.Dr.Clovis

Volpe, Prof.Dr.Antônio Ferraudó, Prof.Dr.Orlando Piza e Prof.Dr.José Barbosa meus mais profundos agradecimentos. A todos os funcionários e colegas do departamento de Ciências Exatas da FCAV, especialmente a Shirley, ao Rogério Bissolli, ao Norival e ao Carlos; muito obrigado pela convivência e amizade.

Gostaria de reiterar meus agradecimentos ao Prof.Dr.Orlando Piza, amigo e colega de trabalho de caráter invejável, meu muito obrigado. Ao amigo e Prof.Dr.Newton La Scala Jr, que além da amizade, pude aprender muito sobre ensino e pesquisa. Sua amizade foi, é e será imprescindível para minha formação; meu muito obrigado.

Ao Prof.Dr.José Liberato Ferreira Caboclo, médico e amigo, cuja ajuda foi de fundamental importância para que eu pudesse chegar até aqui. Muito obrigado.

Aos demais e nem por isso menos importantes colegas do Curso de Pós-Graduação, estagiários e funcionários do departamento de Física pelo ambiente de trabalho saudável e convivência harmoniosa.

A Capes pelo suporte financeiro.

Sumário

<i>Resumo</i>	24
Capítulo 1	
<i>Introdução</i>	26
<i>Efeitos de Solutos Neutros no Enovelamento Protéico</i>	30
<i>Objetivos</i>	33
Capítulo 2	
<i>Polímeros</i>	35
Capítulo 3	
<i>Física de Polímeros</i>	37
<i>RW com Volume Auto-Excluído</i>	41
Capítulo 4	
<i>Método Monte Carlo</i>	46
<i>Peso de Rosenbluth</i>	50
Capítulo 5	
<i>Modelo e Métodos</i>	55
Capítulo 6	
<i>Resultados e Discussão – Homopolímero</i>	63
<i>Efeito de Volume Excluído Solutos-Polímero nas Dimensões</i> do SAW	71
<i>Discussão – Homopolímeros</i>	86
<i>Descrição da Dependência do Potencial Químico de</i> <i>Excesso do Polímero SAW com o Raio de Giração da Configuração,</i> <i>com a Densidade de Partículas do Solutos na Rede, e com o Volume</i> <i>do Solutos</i>	90

<i>Resultados e Discussão – Heteropolímero.....</i>	<i>102</i>
<i>Simulações do Modelo de Proteína para Solutos de</i> <i>Tamanhos distintos.....</i>	<i>114</i>
<i>Análise Termodinâmica do Efeito de Solutos no</i> <i>Enovelamento do Modelo via Técnica da Repesagem do</i> <i>Histograma.....</i>	<i>118</i>
<i>Resultados desta Análise</i>	<i>123</i>
<i>Conclusão.....</i>	<i>133</i>
<i>Apêndice.....</i>	<i>135</i>
<i>Referências Bibliográficas</i>	<i>148</i>

Lista de Figuras

- Figura-01:** Representação de um polímero numa rede bidimensional, cuja distância entre 2 monômeros consecutivos vale b e é denominado comprimento de ligação..... 37
- Figura-02:** Representação da metodologia CBMC. Uma vez construído o polímero (quadro superior), selecionamos um monômero J e a partir do monômero $(J+1)$ apagamos todo o restante do polímero (quadro direito). Em seguida, a partir do monômero J , reconstruímos o polímero introduzindo os monômeros de $(J+1)$, N de maneira aleatória (quadro esquerdo)..... 49
- Figura-03:** Modelo de um heteropolímero no estado de mínima energia, contendo 27 monômeros numa rede cúbica simples. Cada monômero A, B e C é representado, respectivamente, pelas cores azul, verde e preto. A sequência é ABABBBBCBACBABABACACBACAACAB..... 59
- Figura-04:** Representação dos possíveis movimentos internos realizados pelo polímero na rede. A trajetória do movimento se faz da haste cinza para a haste preta. O movimento terminal está representado em (1), o movimento de canto em (2) e o movimento de manivela em (3)..... 61
- Figura-05:** Histogramas normalizados do R_g quadrático para polímeros de tamanhos 16 (vermelho), 32 (verde) e 64 (azul). Estas simulações foram realizadas na ausência de soluto com 100000 MCS..... 64
- Figura-06:** Relação linear do logaritmo da distância quadrática de ponta-a-ponta com o logaritmo do comprimento da cadeia na ausência de solutos..... 67
- Figura-07:** Média do R_g^2 , incrementada a cada novo passo de Monte Carlo. O

resultado mostra que 5000 MCS já são suficientes para que $\langle Rg^2 \rangle$ não flutue significativamente..... 68

Figura-08: Lei de escala para simulação da cadeia polimérica na ausência de soluto com e sem o peso de Rosenbluth. O ajuste representa a lei de escala predita para um "bom" solvente..... 69

Figura-09: Histograma normalizado do Rg^2 para polímero de tamanho 08 na ausência de soluto (linha azul) e na presença de 5% (linha verde clara), 15% (linha verde escura) e 25% (linha vermelha) de soluto. O raio do soluto vale 3..... 73

Figura-10: Histograma normalizado para polímero de tamanho 16 na ausência de soluto (linha azul) e na presença de 5% (linha verde clara), 15% (linha verde escura) e 25% (linha vermelha) de soluto. O raio do soluto vale 3..... 74

Figura-11: Histograma Normalizado do Rg^2 para polímero de tamanho 32 na ausência de soluto (linha azul) e na presença de 5% (linha verde clara), 15% (linha verde escura) e 25% (linha vermelha). O raio do soluto vale 3..... 75

Figura-12 : Variação do $\langle Rg^2 \rangle$ de cada partição pelo logaritmo do peso médio de Rosenbluth $\langle W \rangle$ da respectiva partição. Este $\langle Rg^2 \rangle$ e $\langle W \rangle$ foram obtidos particionando a matriz de Rg e W em intervalos iguais e calculando a média para cada intervalo. (o) corresponde a simulação na ausência de soluto para polímero tamanho 16. Os demais símbolos correspondem a simulação do mesmo polímero em concentração de soluto 15%, para raio do soluto igual a 0.5 (V), igual a 1,5 (*) e igual a 3 (+)..... 81

Figura-13 : Variação do $\langle Rg^2 \rangle$ de cada partição pelo logaritmo do peso médio de Rosenbluth $\langle W \rangle$ da respectiva partição. Os valores de $\langle Rg^2 \rangle$ e $\langle W \rangle$ foram obtidos particionando a matriz de Rg e W em intervalos iguais e calculando a média para cada intervalo. (o) corresponde a simulação na ausência de soluto para

polímero de tamanho 08. Os demais símbolos correspondem a simulação do mesmo polímero para fração de soluto igual a 5% (.), igual a 15% (+) e igual a 25% (*). O raio do soluto foi mantido constante e vale 3.0. Nota-se neste caso que não há efeito do soluto sobre o polímero, uma vez que o valor médio do R_g é da mesma ordem do raio do soluto..... 83

Figura-14: Variação do $\langle R_g^2 \rangle$ de cada partição pelo logaritmo do peso médio de Rosenbluth $\langle W \rangle$ da respectiva partição. Os valores de $\langle R_g^2 \rangle$ e $\langle W \rangle$ foram obtidos particionando a matriz de R_g e W em intervalos iguais e calculando a média para cada intervalo. (o) corresponde a simulação na ausência de soluto para polímero tamanho 32. Os demais símbolos correspondem a simulação do mesmo polímero para fração de soluto igual a 5% (.), igual a 15% (+) e igual a 25% (*). O raio do soluto foi mantido constante e vale 3.0..... 84

Figura- 15: Ajuste exponencial assintótico do peso de Rosenbluth médio do polímero versus o comprimento da cadeia polimérica. Estas simulações foram feitas na ausência de soluto (■), na concentração de 15% de soluto com raio 3.0 (Δ) e na concentração de soluto 25% com raio 3.0 (○)..... 85

Figura-16: Logaritmo natural do $\langle W \rangle / \langle W_0 \rangle$ em função da fração relativa de volume $\phi = n_s V_s / n_w V_w$, para $\langle R_g^2 \rangle = 6.0$ (O), $\langle R_g^2 \rangle = 8.5$ (□), $\langle R_g^2 \rangle = 13$ (□) e $\langle R_g^2 \rangle = 15$ (*) de um polímero de tamanho 32,. As inclinações valem respectivamente 7.39, 8.72, 9.21 e 9.40. As frações relativas valem $\phi = 0.052$, $\phi = 0.176$ e $\phi = 0.333$ 91

Figura-17: Valores de g , obtidos das inclinações das retas da figura-16, versus R_g^2 . O ajuste desta função nos fornece a relação $g = a \cdot (1 - \exp[-k \cdot (R_g^2 - R_{g0}^2)])$, com $a = (9.50 \pm 0.06)$, $k = (0.37 \pm 0.03)$ e $R_{g0}^2 = (1.9 \pm 0.4)$

0.4).....	98
<i>Figura-18: Variação do raio de giração com a fração de soluto para interações ± 1, ± 2 e ± 3 a $T=1.9$. O tamanho do soluto é $3 \times 3 \times 3$ unidades da rede.....</i>	104
<i>Figura-19: Variação da energia média do polímero com a fração de soluto. A energia do estado nativo vale -84.....</i>	105
<i>Figura-20: Variação da Energia média do polímero com a fração de soluto na rede para interação ± 2, $T=1.9$. O tamanho do soluto vale $3 \times 3 \times 3$.....</i>	107
<i>Figura-21: Variação da Energia média do polímero com a fração de soluto na rede para interação ± 1, $T=1.9$. O tamanho do soluto vale $3 \times 3 \times 3$.....</i>	107
<i>Figura-22: Correlação entre raio de giração quadrático médio e energia média do polímero na presença de concentrações variadas de soluto tamanho $3 \times 3 \times 3$.....</i>	108
<i>Figura-23: Variação da energia média do polímero com o raio de giração quadrático médio por unidade monomérica e com a fração de soluto. Nota-se uma nítida transição de fase entre a região de alta energia (alto R_g quadrático e baixa fração de soluto) e a região de baixa energia (menor R_g quadrático e maior fração de soluto).....</i>	111
<i>Figura-24: Variação de energia com o número de contatos favoráveis para uma simulação com interação ± 3 com concentrações variadas de soluto tamanho $3 \times 3 \times 3$. A concentração de soluto varia de 0% (região de alta energia e baixo Q) até 30% (região de baixa energia e alto Q).....</i>	113
<i>Figura-25: Poço e barreira de potencial na transição $D \rightarrow N$.</i>	114
<i>Figura-26a: Variação da população de estados conformacionais possuindo certa</i>	

____) e tamanho 16 (____) na concentração de 20% em $T=2.0$
 129

Figura-32: Entropia como função de Q . Estas simulações foram feitas a temperatura constante e igual 2.0 na presença de soluto de tamanho 08 com concentrações variando de 0% (____), 25% (____), 33% (____), e 50% (____). 130

Lista de Tabelas

<i>Tabela-01: Valores dos $\langle R_g^2 \rangle$ e $\langle R^2 \rangle$ obtidos dos histogramas da figura-01.....</i>	65
<i>Tabela-01a: Valores do raio de giração quadrático médio $\langle R_g^2 \rangle$, da distância ponta-a-ponta quadrática média $\langle R^2 \rangle$ e do peso de Rosenbluth médio $\langle W \rangle$, obtidos da simulação para o polímero de tamanhos 08, 16, 32 e 64, na ausência de soluto.....</i>	70
<i>Tabela-02: Valores do raio de giração quadrático médio $\langle R_g^2 \rangle$, da distância ponta-a-ponta quadrática média $\langle R^2 \rangle$ e do peso de Rosenbluth médio $\langle W \rangle$, obtidos da simulação para o polímero de tamanho $tpol=08$, na presença de soluto com concentração $fsol$ e tamanho do soluto $R_0=0.5$, $R_0=1.5$ e $R_0=3.0$ unidades da rede.....</i>	77
<i>Tabela-03: Valores do raio de giração quadrático médio $\langle R_g^2 \rangle$, da distância ponta-a-ponta quadrática média $\langle R^2 \rangle$ e do peso de Rosenbluth médio $\langle W \rangle$, obtidos da simulação para o polímero de tamanho $tpol=16$, na presença de soluto com concentração $fsol$ e tamanho do soluto $R_0=0.5$, $R_0=1.5$ e $R_0=3.0$ unidades da rede.....</i>	78
<i>Tabela-04: Valores do raio de giração quadrático médio $\langle R_g^2 \rangle$, da distância ponta-a-ponta quadrática média $\langle R^2 \rangle$ e do peso de Rosenbluth médio $\langle W \rangle$, obtidos da simulação para o polímero de tamanho $tpol=32$, na presença de soluto com concentração $fsol$ e tamanho do soluto $R_0=1.5$ e $R_0=3.0$ unidades da rede.....</i>	79
<i>Tabela-05: Valores do raio de giração quadrático médio $\langle R_g^2 \rangle$, da distância ponta-a-ponta quadrática média $\langle R^2 \rangle$ e do peso de Rosenbluth médio $\langle W \rangle$, obtidos da simulação para o polímero de tamanho $tpol=64$, na presença de soluto com concentração $fsol$ e tamanho do soluto $R_0=1.5$ e $R_0=3.0$ unidades da rede.....</i>	79
<i>Tabela-06: Valores dos parâmetros obtidos dos ajustes do gráfico $\langle W \rangle \times tpol$ por um decaimento exponencial de primeira ordem $W = A \cdot \exp(-tpol / t)$</i>	86

Lista de Abreviaturas e Símbolos

$\langle \rangle$: Valor médio de uma grandeza física

δ_{mn} : Tensor delta de Kronecker

b : Comprimento da ligação entre dois monômeros

$b_i, b_{\alpha}, b_{\beta}$: Comprimento da ligação para o i -ésimo monômero e para o i -ésimo monômero nas condições α e β , respectivamente

CBMC: Configurational Bias Monte Carlo Methods

C-C: Ligação carbono-carbono

dR : Elemento infinitesimal do raio

dV : Elemento infinitesimal do volume

$f(RN)$: Função de distribuição radial que define a probabilidade

MCS: Passos de Monte Carlo; do inglês, "Monte Carlo Step"



N : Número de ligações do polímero (comprimento da cadeia)

N : Número de passos

$P(\mathcal{R}, N)$: Probabilidade de estar na posição $\mathcal{R}$ após N passos

R : Escalar da distância de ponta-a-ponta

R_n, r_m : Distância entre o primeiro e o n -ésimo (m -ésimo) monômero

RW : Modelo de Random Walk (Caminho Aleatório) para cadeia ideal

SAW : Modelo de Self Avoiding Random Walk (Caminho Aleatório com Auto Exclusão)

W : Peso de Rosenbluth

$W(\mathcal{R})$: Número de cadeias por comprimento

z : Número de coordenação da rede

v_c : Volume de um elemento da rede

μ : Potencial Químico

Resumo

O objetivo deste trabalho consiste em investigar o efeito osmólitos no enovelamento protéico via simulação Monte Carlo, sendo que a única interação entre proteína-osmólito destes modelos se faz por volume excluído.

Resultados de simulação molecular de um homopolímero numa rede cúbica na presença de concentrações variadas de solutos de diferentes tamanhos evidenciam que o homopolímero não colapsa com o aumento de concentração e tamanho do soluto, isto é, o $\langle R_g^2 \rangle$ não é afetado enquanto a probabilidade de uma dada configuração aparecer aumenta com fração soluto. Um potencial de interação de volume excluído é encontrado, a partir do qual o potencial químico de excesso é determinado pela fração molar do solvente, indicando que a diferença de potencial químico da proteína na presença e ausência de soluto é proporcional a diferença da área de superfície acessível ao solvente entre as formas N e D. O modelo SAW para homopolímero descreve bem o estado D.

O modelo usado para descrever o N foi simulado, sendo este um modelo exato de heteropolímero com 27 monômeros e $E = -84$ (unidades de $k.T$) para estado nativo. Simulações foram realizadas na presença e ausência de solutos de diferentes tamanhos, a $T = 1.9$, cujo resultado da análise termodinâmica pela técnica de repesagem do histograma é aplicado, sugerindo que o colapso do modelo de proteína na presença de soluto é entropicamente dirigido, desestabilizando o estado desnaturado em relação ao estado nativo.

Capítulo 1

Abstract

In this work, the main purpose is investigated the effect of osmolytes in the folding of protein models in lattice by Monte Carlo simulation, where the only interaction there is between protein-osmolytes is the interaction by excluded volume effect.

Monte Carlo simulations of a lattice polymer are used to determine the conformational and thermodynamics properties within explicit solute. The homopolymer is modeled by SAW where we observed that the presence of solute in the lattice is not affect the ratio of gyration of homopolymer. A alternative formulation for the measure of the chemical potential of lattice polymers is determined by Rosenbluth weight , where this new formulation showed that the chemical potential is directly proportional the solvent accessible surface area.

Next, we used a simple exact three dimensional lattice heteropolymer model within the presence of solute by $T=1.9$. We find that now there is collapse of polymer where entropy is the decrease and free energy of polymer increase with solute concentration by volume excluded effect. The internal energy is not affected for solute, suggests that the collapse of heteropolymer is entropy driven.



Capítulo 1

Introdução

A capacidade que uma cadeia polipeptídica apresenta de se compactar e enovelar-se numa estrutura de mínima energia livre é o que a distingue de polímeros inertes. Estas cadeias polipeptídicas são, especialmente, proteínas globulares cujo estado termodinamicamente estável que estes protídios apresentam é denominado estado Nativo.

Proteínas se encontram no estado nativo em meio aquoso próximo de pH neutro entre 20 °C e 40 °C, sendo esta a condição típica do ambiente celular (Chan & Dill, 1993). Em condições não fisiológicas, as proteínas globulares perdem sua conformação transitando para um estado altamente desordenado denominado estado desnaturado.

A transição do estado Nativo para o estado desnaturado pode ser induzida alterando-se as condições fisiológicas do meio, como a acidez, basicidade, concentração de sal ou temperatura.

Anfisen, trabalhando com ribonuclease desnaturada por uréia, mostrou que ao restaurar as condições fisiológicas do meio, a ribonuclease transitava reversivelmente para sua conformação nativa. Após este trabalho, vários pesquisadores começaram a investigar quais as forças que estabilizam o estado nativo e, até então, acreditava-se que o caminho da transição do estado desnaturado para o estado nativo fosse aleatório (Anfisen, 1973).



Uma proteína globular com 100 resíduos de aminoácidos, devido ao alto grau de liberdade das ligações entre os monômeros, pode gerar até 10^{130} configurações distintas. Caso a busca do estado nativo fosse aleatória, o tempo necessário para atingir este estado é da ordem de grandeza da idade do universo.

Então surge um paradoxo. Como proteínas globulares atingem um estado único de mínima energia livre de maneira aleatória, num tempo da ordem de poucos segundos no interior da célula? Isto sugere que a busca pelo estado nativo não seja aleatória, mas sim dirigida, onde a força diretora do enovelamento está codificada na estrutura primária da proteína (Ptitsyn, 1993).

Na busca das interações que estabilizam o estado nativo, Kausmann mostrou que a interação hidrofóbica favorece a compactação da cadeia polipeptídica e que pontes de hidrogênio e interações locais determinam o detalhe da arquitetura interna da estrutura nativa (Chan & Dill, 1993). Diversos outros estudos indicam que a hidrofobicidade e as interações não locais são os principais fatores responsáveis pela estabilidade da conformação protéica em ambiente fisiológico; fatores estes que dependem diretamente da interação proteína-solvente (Dill, 1990; Colombo *et al.*, 1992; Arakawa *et al.*, 1990).

Na tentativa de se entender não apenas as forças responsáveis pela estabilização do estado nativo, mas a hierarquia destas forças, usa-se duas abordagens distintas e complementares. Uma das formas de abordar o problema se faz por teoria via simulação computacional e a outra forma se faz por experimentação via análises físico-químicas.



A abordagem teórica utiliza-se de métodos computacionais para concepção de um espaço bi ou tridimensional virtual, podendo ser este espaço discreto (rede) ou contínuo (fora da rede) onde, em seu interior, representamos a macromolécula a ser analisada com intuito de desenvolver modelagem molecular por comparação de diferentes estruturas ou com intuito de simular o comportamento de uma macromolécula num determinado meio. Através destes métodos, podem-se medir parâmetros termodinâmicos e cinéticos que informam a respeito da estrutura, estabilidade e cinética de enovelamento da macromolécula. O problema do enovelamento protéico na abordagem teórica se faz baseado na Teoria de colapso de homopolímeros e de heteropolímeros.

Para se investigar o enovelamento protéico do ponto de vista experimental, utilizam-se diversas técnicas como espectrofotometria, calorimetria diferencial, troca de Hidrogênio por Deutério monitorada por ressonância magnética nuclear (NMR) dentre tantas outras, cuja finalidade é o entendimento das forças que estabilizam o estado nativo. Para tal, uma maneira de fazê-lo é promover a desestabilização do estado nativo de forma reversível e medir a energia da transição $N \leftrightarrow D$.

Através de experimentos de desnaturação protéica por análise de cinética e equilíbrio conformacional, tem-se mostrado que existem estados intermediários estáveis entre a forma nativa e desnaturada de proteínas globulares. A caracterização destes estados intermediários estáveis foi feita pela primeira vez por Ohgushi e Wada no início dos anos 80, sendo batizado como Glóbulo Derretido (Molten Globule ou



MG) por não estar nem no estado nativo, nem no estado desnaturado (Ohgushi & Wada, 1983, 1984). Após o trabalho de Ohgushi *et al.*, o estado de Glóbulo Derretido (MG) foi encontrado para outras proteínas, sendo que os resultados das análises para estes estados intermediários revelam que os mesmos apresentam estrutura secundária, mas não se evidencia estrutura terciária (Kuroda *et al*, 1992, Kuroda, 1993).

Estudos recentes mostram que há duas classes de Glóbulo Derretido que são observados experimentalmente como aqueles que são encontrados numa desnaturação parcial a baixo ou alto pH e em baixa concentração de desnaturantes e, outra classe que aparece quando uma proteína desnaturada é colocada em condições que favoreçam o enovelamento sendo que as propriedades destas duas classes encontradas são similares (Pain, 1996).

A estabilidade conformacional tanto do estado Nativo quanto do estado de Glóbulo Derretido dependem diretamente das interações intra-cadeia polipeptídica e da interação cadeia-solvente.

A fim de entender a contribuição do solvente para a estabilidade da conformação protéica, especificamente da água que é o solvente típico do meio intracelular, buscou-se relacionar parâmetros termodinâmicos tais como variações de energia livre, entalpia e entropia do enovelamento protéico com a diferença da área de superfície acessível ao solvente, entre a conformação nativa e desnaturada. Outra abordagem é considerar a água da camada de hidratação da proteína como um ligante comum e investigar e a



dependência do equilíbrio e cinética com a atividade de água, atividade esta tamponada por solutos neutros (Colombo, 1996).

Efeitos de Solutos Neutros no Enovelamento Protéico

Sabe-se que os seres vivos, quando submetidos a condições ambientais extremas como mudanças agudas de temperatura, perda de água por desidratação, variação da concentração salina intra-celular e etc, produzem, como forma de proteção para a manter sua homeostasia, diversos compostos de baixo peso molecular no interior da célula, sendo que a maioria destes compostos produzidos são açúcares e poliois, conhecidos pelo nome genérico de osmólitos.

A perda da atividade, associada à ocorrência natural de osmólitos, foi caracterizada através da atividade e estabilidade enzimática na presença de até 1 M de osmólito protetor quando o sistema estava sujeito ao estresse térmico ou na presença de uréia (Yancey *et al*, 1982, apud Marão, 2000). Estudos recentes sugerem que estes osmólitos estabilizam a estrutura nativa das proteínas contra a desnaturação induzida por calor e/ou agentes desnaturantes (Santoro *et al*, 1992).

Estudos de desnaturação e renaturação de proteínas globulares na presença de diferentes osmólitos têm contribuído para o entendimento da energética da transição $N \leftrightarrow MG \leftrightarrow D$, mas as interpretações do efeito estabilizador das conformações MG e N divergem. Há três interpretações possíveis: A primeira hipótese afirma que os osmólitos agem de maneira não específica com o solvente



atuando como um meio dielétrico e, conseqüentemente, alterando as forças que estabilizam a estrutura da proteína; a segunda hipótese afirma que os osmólitos se ligam preferencialmente à proteína, estabilizando as formas mais compactas; a terceira hipótese afirma que estes osmólitos são solutos neutros, isto é, não interagem diretamente com a proteína a não ser via volume excluído, alterando o potencial químico da água da solução em relação à água de hidratação, desestabilizando assim, o estado desnaturado da proteína.

A primeira hipótese vem sendo descartada por diversos pesquisadores. Estudos recentes mostraram que a diminuição da afinidade do oxigênio pela Hemoglobina medida na presença de glicina e glicose (osmólitos) é independente da constante dielétrica da solução (Colombo & Bonilla, 1996), indicando que a primeira hipótese não é verdadeira.

Medidas de termodinâmica do enovelamento e desenovelamento de Citocromo-c (Cyt-c) na presença de sorbitol (osmólito), monitorando o grupo heme do Cyt-c por espectroscopia de absorção na banda de Soret mostraram que o sorbitol não se liga ao Cyt-c, mas ao contrário, varia a atividade da água de hidratação alterando o potencial químico entre fase de água da solução em relação a fase de água de hidratação deslocando o equilíbrio $D \leftrightarrow I$ para um estado intermediário estável, com características de Glóbulo Derretido (Neves, 1996), confirmando a terceira hipótese e descartando a segunda hipótese. Marão (Marão, 2000) analisou o reenovelamento da Apomioglobina sob condições de estresse osmótico e mostrou que a variação da hidratação (Δn_w) na transição



D→I depende do tamanho do soluto usado, sugerindo que a cooperatividade da transição é determinada pelo tamanho do soluto. Mostrou também que esta variação de hidratação é uma função linear do volume do soluto (V_s), e que o valor da atividade de água na metade da transição diminui com o volume do soluto. Nesta análise, Marão mostrou que a variação da energia livre de desnaturação (ΔG_D) com a concentração molar do soluto (C_s), que corresponde a diferença de potencial químico ($\Delta\mu$) na transição de D→I, é expressa por:

$$\frac{\partial \Delta G_D}{\partial C_s} = \mu_I - \mu_D = -RT \cdot (U_I - U_D)$$

sendo R a constante universal dos gases, T a temperatura absoluta e U o covolume da conformação protéica, expressa, segundo o modelo de Winzor (Shearwin & Winzor, 1990) por:

$$U = \frac{4}{3} \pi \cdot N \cdot (R_e + r_o)^3$$

sendo N o número de Avogadro, R_e o raio da esfera que representa a conformação protéica e r_o o raio do osmólito. Os resultados apresentados por Marão confirmam a terceira hipótese, sendo indicativo de um efeito de volume excluído entre soluto e proteína.

Para a terceira hipótese, há uma análise alternativa que a transição D→I é determinada exclusivamente por efeito de volume excluído proteína-solvente, considerando que o aumento da concentração e/ou tamanho do soluto resulta num aumento da repulsão estérica entre as espécies em solução, cujo tratamento se faz pela análise de Winzor. Sob esta interpretação tanto Neves e Marão quanto Pielak *et al* mostraram que solutos neutros como alguns



açúcares (sacarose, sorbitol, glicose) e poliois (etilenoglicol, glicerol, polietilenoglicol), quando adicionados à solução de Cyt-c tamponada em pH ácido (meio desnaturante), faz com que esta proteína se enovele para uma conformação intermediária entre a forma nativa e desnaturada, com características de Glóbulo Derretido (Neves, 1996; Marão, 2000; Pielak *et al*; 1998). Gekko *et al* , utilizando-se de técnicas de dicroísmo circular de calorimetria diferencial, mostraram que a adição de poliois (etilenoglicol, eritritol, xilitol, sorbitol e inositol) a solução de Cyt-c desnaturado induz a transição de D→I, estabilizando o estado intermediário com característica de Glóbulo Derretido, sendo que o efeito cresce tanto com o aumento da concentração de poliol como com o tamanho da cadeia de poliol (Gekko *et al*, 1999).

Objetivos

O objetivo deste trabalho é investigar os mecanismos de estabilização de estruturas enoveladas de proteínas, via simulação Monte Carlo. Para tal, analisaremos primeiramente um homopolímero de cadeia com auto exclusão numa rede cúbica na presença de concentrações variadas de soluto de geometria esférica, sendo que a única interação existente na simulação é por efeito de volume excluído (hard core) polímero-soluto. Como não há energia de interação intracadeia, este sistema representa bem o estado desnaturado.

Na seqüência, utilizaremos um modelo exato e simples de heteropolímero na presença de concentrações variadas de solutos de



diferentes tamanhos e em diferentes temperaturas onde, além da interação de volume excluído, há também interação entre monômeros da cadeia, descrevendo bem o estado nativo.

Modelos exatos e simples de heteropolímeros são modelos cuja função de partição é conhecida, permitindo computar as propriedades físicas sem a necessidade de aproximações, e onde a baixa resolução da cadeia do heteropolímero é compensada pela possibilidade de se contar todas as possíveis configurações da cadeia (Dill *et al*, 1995). Este heteropolímero foi projetado para possuir uma única configuração de mínima energia (degenerescência $g=1$) e energia igual a -84 (em unidades de ϵ/k , sendo ϵ o valor da energia e k a constante de Boltzmann), sendo esta a configuração que representa o estado nativo.

Capítulo 2

Polímeros

Polímeros são longas moléculas formadas por unidades repetitivas e idênticas, ligadas covalentemente entre si, denominadas monômeros. Dois monômeros ligados formam um dímero; três formam um trímero, quatro um tetrâmero, entre quatro e cem ligados formam o que se chama de oligômero e mais de 100 denominam-se polímero.

Os polímeros constituem cadeias ditas poliméricas, que são longas e flexíveis, com grande liberdade rotacional entre as ligações C-C podendo gerar um grande número de configurações tal que, os materiais formados de polímeros adquirem propriedades físicas muito particulares como flexibilidade e elasticidade, podendo formar fibras e filmes finos.

Em simulações de polímeros em rede, a cadeia construída corresponde a um oligômero, mas é hábito referir-se a ela como polímero. A partir de agora, sempre nos referiremos às cadeias geradas na rede como cadeias poliméricas ou simplesmente polímero.

Os polímeros estão classificados em duas categorias: os homopolímeros, onde todos os monômeros são idênticos, isto é, não há distinção entre o monômero i e o monômero $(i+1)$; e os heteropolímeros (copolímeros), no qual há mais de um tipo de monômero na cadeia.



Os homopolímeros em solução exibem várias conformações dependendo das condições do solvente. Denomina-se “bom solvente” aquele meio onde o polímero adota uma conformação estendida e denomina-se “solvente pobre” o meio onde o polímero adota uma conformação colapsada.

É observado experimentalmente que o poliestireno, uma cadeia homopolimérica apolar, colapsa para um glóbulo compacto quando colocada num solvente orgânico pobre (Sun *et al*, 1980, apud Dill *et al*, 1995). Simulações na rede mostram que homopolímeros não colapsam em um estado único (degenerescência $g > 1$) e, portanto, não descrevem bem o enovelamento de proteínas (Dill *et al*, 1995). Ao contrário, simulações de colapsos de heteropolímeros são as que melhor descrevem o enovelamento de proteínas (Dill *et al*, 1995).

Um modelo de heteropolímero muito comum na literatura é o chamado modelo HP (hidrofóbico-polar). Neste modelo o polímero é descrito por apenas dois tipos de monômeros, um hidrofóbico (H), que interage desfavoravelmente com o solvente, mas interage favoravelmente entre si e, monômeros polares (P), que interage favoravelmente com o solvente.

Simulações em rede mostram que diferentemente dos homopolímeros, os heteropolímeros colapsam para poucas conformações de menor energia (baixa degenerescência g), podendo até colapsar para uma única conformação de mínima energia (degenerescência $g=1$, correspondendo ao estado nativo).



Capítulo 3

Física de Polímeros

Vamos considerar um homopolímero numa rede quadrada (bidimensional), onde colocamos um monômero aleatoriamente na rede e, a partir deste, inserimos novos monômeros ligados ao anterior com comprimento de ligação b (fig-01), cujos movimentos possíveis são “para frente”, “para trás”, “para cima”, “para baixo”.

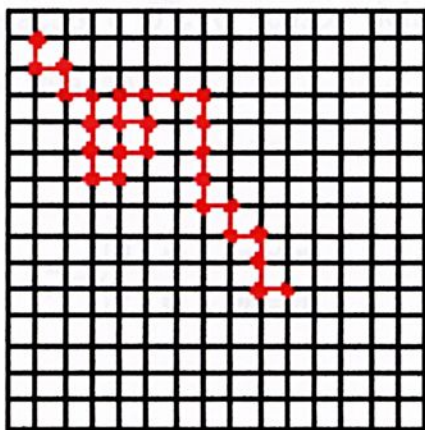


Figura-01: Representação de um polímero numa rede bidimensional. A distância entre 2 monômeros consecutivos é constante e denomina-se “comprimento de ligação”.

Após crescer todo o polímero, medimos a distância de ponta-a-ponta (do inglês, end to end distance) $\mathbf{R}$, sendo:

$$\vec{R} = \sum_{n=1}^N \vec{r}_n \quad (1)$$

onde $\mathbf{r}_n$ é o vetor “end-to-end” (distância ponta a ponta) entre o primeiro e o n -ésimo monômero. Como a probabilidade de encontrarmos $\mathbf{R}$ e $-\mathbf{R}$ é a mesma, o valor médio de $\mathbf{R}$ é nulo ($\langle \mathbf{R} \rangle = 0$). Para contornarmos isto, calculamos $\langle \mathbf{R}^2 \rangle$, sendo:

$$\langle \mathbf{R}^2 \rangle = \sum_{n=1}^N \sum_{m=1}^N \langle \mathbf{r}_n \cdot \mathbf{r}_m \rangle \quad (2)$$

onde o produto $\mathbf{r}_n$ por $\mathbf{r}_m$ é dado pelo produto $b^2 \cdot \delta_n^m$, sendo b o comprimento de ligação e δ_n^m o tensor delta de Kronecker, que estabelece a seguinte relação:

$$\delta_n^m = \begin{cases} 0, & \text{se } m \neq n \\ 1, & \text{se } m = n \end{cases} \quad (3)$$

Logo, como não há correlação entre as direções dos vetores de ligação teremos,

$$\langle \mathbf{R}^2 \rangle = \sum_{n=1}^N \langle \mathbf{r}_n^2 \rangle \quad (4)$$

portanto,

$$\langle \mathbf{R}^2 \rangle = N \cdot b^2 \quad (5)$$

Assim, concluímos que para cadeias ideais, a distância de ponta-a-ponta média é proporcional ao comprimento da cadeia elevado a meio, como mostrado:

$$\langle \vec{R} \rangle \propto N^{1/2} \quad (6)$$

Agora vamos supor que um polímero de N ligações tenha uma extremidade fixada na origem. Qual a probabilidade $P(\mathbf{R}, N)$ para que a outra extremidade esteja na posição $\mathbf{R}$ após N passos?

Fixado o primeiro monômero e supondo a cadeia ideal (cadeia polimérica que permite a sobreposição de monômeros), a probabilidade de colocarmos o próximo monômero é $1/z$, onde z é o número de coordenação da rede (Doi, 1996). Logo:

$$P(\vec{R}, N) = \frac{1}{z} \sum_{i=1}^z P(\vec{R} - \vec{b}_i, N-1) \quad (7)$$

Se $N \gg 1$ $|\mathbf{R}| \gg |\mathbf{b}|$, podemos expandir a expressão (7) numa série de Taylor, conforme mostrado a seguir:

$$P(\vec{R} - \vec{b}_i, N-1) = P(\vec{R}, N) - \frac{\partial P}{\partial N} - \frac{\partial P}{\partial R_\alpha} b_{i\alpha} + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 P}{\partial R_\alpha \partial R_\beta} b_{i\alpha} b_{i\beta} + \dots \quad (8)$$

sendo R_α , R_β , $b_{i\alpha}$, $b_{i\beta}$ as componentes dos vetores $\mathbf{b}_i$ e $\mathbf{R}$ cuja soma se faz sobre os índices α e β .

Substituindo (8) em (7) e notando que:

$$\frac{1}{Z} \sum_{i=1}^Z \mathbf{b}_{i\alpha} = 0 \quad (9)$$

obtemos uma equação de difusão em termos de N e $\mathbf{R}$, mostrado a seguir:

$$\frac{\partial P}{\partial N} = \frac{b^2}{6} \frac{\partial^2 P}{\partial \vec{R}^2} \quad (10)$$

A resolução da equação (10) na condição de que $\mathbf{R}$ está na origem quando $N=0$ (Butkov, 1988) é dada por:

$$P(\vec{R}, N) = \left(\frac{3}{2\pi N b^2} \right)^{3/2} \cdot \exp\left(-\frac{3\vec{R}^2}{2Nb^2} \right) \quad (11)$$

Logo, concluímos que a distribuição de probabilidade para o vetor $\mathbf{R}$ (distância de ponta-a-ponta) é gaussiana, resultado este conhecido como “caminho aleatório” (random walk-RW).



RW com Volume Auto-Excluído

No modelo de RW, nós permitíamos que o polímero (cadeia ideal) se auto-cruzasse; isto é, que houvesse sobreposição entre dois monômeros. Agora, vamos alterar o modelo de tal forma que não é permitido que o polímero transpasse por ele mesmo (auto-exclusão) e está proibido o monômero dar um passo atrás e se sobrepor com monômero precedente. Desta forma, a cadeia polimérica não é mais uma cadeia ideal e este novo modelo é conhecido como SAW, do inglês, Self Avoiding Random Walk, ou seja, caminho aleatório auto-excluso (Bruns *et al*, 1981; Binder & Heermann, 1988).

No RW de cadeia ideal, a orientação dos vetores de ligação é independente da posição do vetor anterior (cadeia não Markoviana), o que permite que o vetor atual possa se superpor à posição do anterior enquanto que no SAW, esta superposição está proibida, produzindo uma auto-exclusão de curto alcance.

Para uma cadeia com volume excluído, o valor médio de R é maior que o de uma cadeia ideal, pois para esta, há maior possibilidade dos segmentos do polímero se sobreporem quando estiver aleatoriamente compactada, sobreposição esta proibida para cadeia com volume excluído (Doi, 1996).

Agora analisaremos cadeias não ideais, crescendo aleatoriamente numa rede quadrada. Vamos supor que após N passos de crescimento, o número total de cadeias com volume excluído que estejam entre R e $R+dR$, a partir da origem, seja $W(R).dR$, onde



$W(\mathbf{R})$ corresponde a função de distribuição de $\mathbf{R}$. Podemos calcular então a probabilidade de encontrar uma extremidade do polímero a uma distância entre $\mathbf{R}$ e $\mathbf{R}+d\mathbf{R}$ da outra extremidade, dada pela função de distribuição radial da distância de ponta-a-ponta e expressa por:

$$P(\bar{\mathbf{R}}, N).dV \quad (12)$$

onde dV é a diferencial do volume, que para uma distribuição esfericossimétrica, é da por:

$$dV = 4\pi R^2 . dR \quad (13)$$

onde $d\mathbf{R}$ é o elemento infinitesimal da distância ponta-a-ponta. Para um polímero sem volume excluído (RW), a função de distribuição é dada por:

$$W_o(\bar{\mathbf{R}}).d\bar{\mathbf{R}} = 4\pi R^2 \cdot \left(\frac{3}{2\pi.N.b^2}\right)^{3/2} \cdot \exp\left(-\frac{3\bar{\mathbf{R}}^2}{2Nb^2}\right) . d\bar{\mathbf{R}} \quad (14)$$

onde devemos corrigir a equação anterior multiplicando a probabilidade Gaussiana $P(\mathbf{R}, N).4\pi R^2 . d\mathbf{R}$ pelo número total de conformações de cadeias possíveis para cadeias de N passos (z^N);

$$W_o(\bar{\mathbf{R}}) = z^N \cdot 4\pi \bar{\mathbf{R}}^2 \cdot \left(\frac{3}{2\pi.N.b^2}\right)^{3/2} \cdot \exp\left(-\frac{3\bar{\mathbf{R}}^2}{2Nb^2}\right) \quad (15)$$

onde z^N corresponde ao número de configurações de cadeias ideais, sendo z o número de coordenação da rede.

Levando-se em conta o volume excluído, o número total de cadeias geradas $W(\mathbf{R})=W_o(\mathbf{R}).P(\mathbf{R})$ será menor que $W_o(\mathbf{R})$, pois um certo número de configurações estará proibido. Então, para calcularmos a probabilidade $P(\mathbf{R})$ de uma cadeia polimérica ser aceita com volume excluído, temos que calcular a probabilidade de sobreposição quando colocamos N segmentos do polímero num dado elemento de volume v_c da rede.

Suponhamos que os segmentos do polímero estejam distribuídos numa região de volume R^3 e que, neste volume existam um certo número de elementos de volume da rede v_c ; logo, existirão R^3/v_c elementos neste volume. Então, a probabilidade de não sobreposição é dada por:

$$P(\bar{\mathbf{R}}) = \left(1 - \frac{v_c}{R^3}\right)^{\frac{N(N-1)}{2}} \quad (16)$$

ou seja, como há $N(N-1)/2$ combinações possíveis de pares de segmentos, a probabilidade de não ocorrer sobreposição será:

$$\left\langle \left(1 - \frac{v_c}{R^3}\right) \cdot \left(1 - \frac{v_c}{R^3}\right) \cdot \left(1 - \frac{v_c}{R^3}\right) \cdots \left(1 - \frac{v_c}{R^3}\right) \right\rangle_{\frac{N(N-1)}{2} \text{ vezes}} \quad (17)$$

A equação-16 pode ser rearranjada na forma exponencial:

$$P(R) = \exp\left[\frac{1}{2}N \cdot (N-1) \cdot \ln\left(1 - \frac{v_c}{R^3}\right)\right] \quad (18)$$

e assumindo que $R^3 \gg v_c$, expandimos o logaritmo neperiano da equação-18 tal que:

$$\ln\left(1 - \frac{v_c}{R^3}\right) \approx -\frac{v_c}{R^3} \quad (19)$$

e supondo ainda que $N \gg 1$, podemos escrever:

$$P(R) = \exp\left(-\frac{N^2 v_c}{2R^3}\right) \quad (20)$$

Logo, o número de cadeias geradas aceita com volume excluído é dado por:

$$W(R) = W_o(R) \cdot P(R) \quad (21)$$

isto é, o número de estados $W(R)$ é proporcional a probabilidade de a distância de ponta-a-ponta com volume excluído ser R (Doi, 1996), e é expresso por:

$$W(\vec{R}) \propto \vec{R}^2 \cdot \exp\left(-\frac{3\vec{R}^2}{2Nb^2} - \frac{N^2 v_c}{2\vec{R}^3}\right) \quad (22)$$

A distribuição de $W(R)$ tem um máximo para um dado R que é obtido minimizando o fator exponencial da equação (22), expresso por:

$$\frac{-3\vec{R}}{Nb^2} + \frac{3N^2 v_c}{2\vec{R}^4} = 0 \quad (23)$$

multiplicando a equação (23) por R^4 e rearranjando-a, obtemos:

$$\vec{R} \approx \left(\frac{1}{2} b^2 v_c\right)^{1/5} \cdot N^{3/5} \quad (24)$$

onde a distância de ponta-a-ponta para um polímero numa rede com volume excluído é proporcional a N elevado a 0.6.

Esta lei de escala de R sendo proporcional a $N^{0.6}$ também se aplica a polímeros construídos em redes cúbicas.



Capítulo 4

Método Monte Carlo

O Método Monte Carlo utiliza a técnica de amostragem por números aleatórios (método estocástico) para chegar à solução aproximada de certos problemas matemáticos sem a determinação da solução analítica do sistema (Pacitti & Atkinson, 1983; Bruns *et al.*, 1981). Uma das primeiras utilizações deste método foi feita por Comte de Buffon (1707-1788), publicado em sua *Histoire naturelle*, onde ele propôs que se lançarmos muitas vezes, de maneira aleatória, uma agulha fina de comprimento L sobre uma área plana coberta por retas paralelas eqüidistantes d uma da outra, a probabilidade de a agulha cair cortando uma das retas é dada por $2L/\pi.d$. Através deste método estocástico, Buffon determinou o valor do número π (Gridgeman, 1960; apud Boyer, 1985).

O Método Monte Carlo computacional foi desenvolvido em 1949 por Metrópolis e Ulam (Metrópolis & Ulam, 1949, apud Bruns *et al.*, 1983), mas já era de conhecimento de vários cientistas que iniciaram a moderna computação digital, tais como Metrópolis, Ulam, Von Neumann, Kahn, Fermi, entre outros (Kalos & Whitlock, 1986). Estes autores investigaram este método estocástico quando trabalhavam no desenvolvimento de armamento nuclear no laboratório científico de Los Alamos para o departamento de Defesa dos Estados Unidos, durante a segunda guerra mundial. O nome Monte Carlo se deve por ser um método estocástico, fazendo lembrar os jogos de azar



do mundialmente famoso cassino de Monte Carlo. Como a essência do método é probabilística, a precisão do método depende de um bom gerador de números aleatórios.

O Método Monte Carlo consiste em gerar uma sequência de valores pseudo-aleatórios, sendo que para cada valor gerado utiliza-se um critério de aceitação e, após um número N de valores gerados (passos de Monte Carlo – MCS), faz-se uma análise estatística obtendo-se valores médios e seus respectivos desvios.

Neste trabalho, o Método Monte Carlo foi usado para gerar cadeias poliméricas numa rede cúbica com condições de contorno periódicas utilizando-se a metodologia SAW; metodologia esta que é usada para modelar propriedades em grande escala de macromoléculas longas e flexíveis em solução (Binder & Heermann, 1988).

Primeiramente, escolhe-se aleatoriamente um ponto da rede; verifica-se se este ponto está ocupado ou vazio. Caso esteja vazio, um monômero é colocado neste ponto e se estiver ocupado, sorteia-se um novo ponto da rede para inserir o monômero, com o critério que para cada monômero inserido, o monômero seguinte não pode dar um passo para trás (sobreposição com o monômero antecessor) e nem se sobrepor com outro monômero deste polímero (SAW). A inserção de monômeros na rede termina quando o polímero atingiu seu tamanho previamente definido. Na sequência, medimos o raio de giração e a distância “ponta-a-ponta” do polímero bem como um fator que é o produtivo de fatores calculados na inserção de cada monômero;



produtório este conhecido como peso de Rosenbluth. Voltaremos a comentar nas próximas seções sobre o peso de Rosenbluth.

Em seguida, aplicamos o algoritmo denominado “Método Monte Carlo com Tendência Configuracional” (Frenkel & Smit, 1996), ou como é conhecido na literatura clássica, CBMC (Configurational Bias Monte Carlo Method). O CBMC, exemplificado na figura-02, consiste em selecionar um dos monômeros do polímero já crescido na rede (monômero j) e, a partir deste monômero, apagamos todos os monômeros seguintes (deletamos os monômeros $(j+1)$, $(j+2)$, ..., até o último monômero). Na sequência, crescemos o polímero a partir do monômero j , isto é, inserimos de maneira aleatória os monômeros $(j+1)$, $(j+2)$, $(j+3)$, até completarmos o polímero. O CBMC permite que o polímero mude de configuração para cada passo de Monte Carlo (MCS)



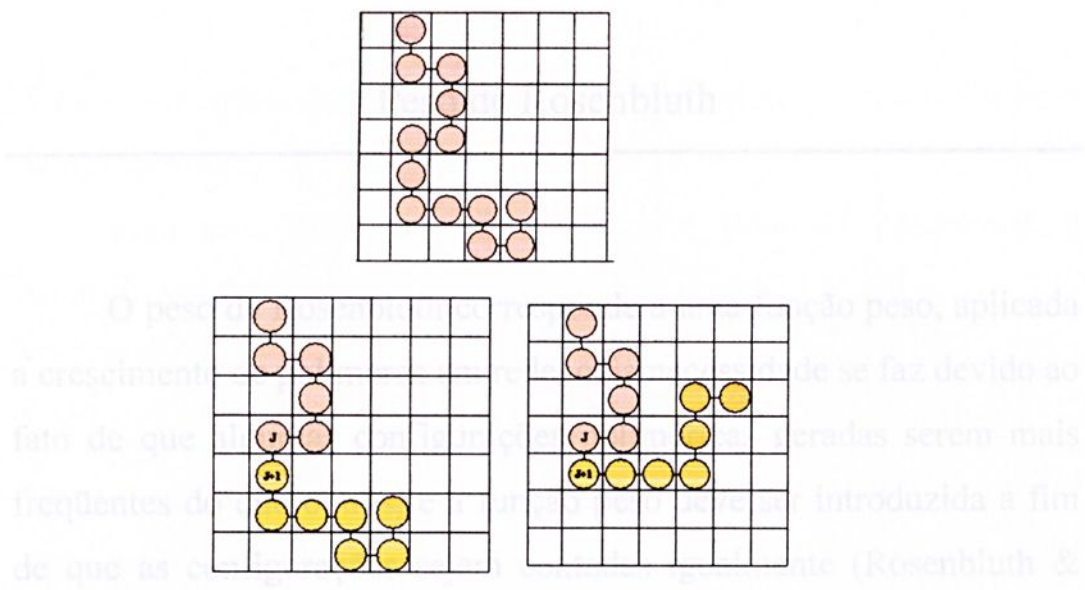


Figura-02:Representação da metodologia CBMC. Uma vez construído o polímero (quadro superior), selecionamos um monômero J e a partir do monômero (J+1) apagamos todo o restante do polímero (quadro esquerdo). Em seguida, a partir do monômero J, reconstruímos o polímero introduzindo os monômeros de (J+1), N de maneira aleatória (quadro direito).

Ao crescermos o polímero, para cada monômero inserido determinamos o peso de Rosenbluth, dado pela seguinte expressão:

$$W_{m+1} = \frac{n}{5} W_m \quad (25)$$

onde n corresponde ao número de sítios vizinhos vazios ao monômero m na condição SAW; W_m corresponde ao peso de Rosenbluth do passo anterior e W_{m+1} o peso de Rosenbluth do passo imediatamente posterior. Se para o passo posterior todas as posições estiverem ocupadas e o passo para a posição anterior estiver proibido (SAW), o peso de Rosenbluth é tomado como $W=0$ e o polímero não tem para onde crescer, ficando armadilhado.

Para formar a primeira ligação entre os dois primeiros monômeros inseridos na rede, o peso de Rosenbluth é tomado como $W_{m-1}=W_m=1$ para $m=1$, ou seja; $W_1=W_2=1$. A partir destes dois primeiros monômeros, os seguintes serão calculados pela equação-25

Peso de Rosenbluth

O peso de Rosenbluth corresponde a uma função peso, aplicada a crescimento de polímeros em rede, cuja necessidade se faz devido ao fato de que algumas configurações poliméricas geradas serem mais freqüentes do que outras, e a função peso deve ser introduzida a fim de que as configurações sejam contadas igualmente (Rosenbluth & Rosenbluth, 1955), isto é, o peso de Rosenbluth evita com que algumas configurações sejam privilegiadas em detrimento das outras, privilégio este conhecido como “bias” (tendência).

Ao crescermos o polímero, para cada monômero inserido determinamos o peso de Rosenbluth, dado pela seguinte expressão:

$$W_{m+1} = \frac{n}{5} W_m \quad (25)$$

onde n corresponde ao número de sítios vizinhos vazios ao monômero m na condição SAW; W_m corresponde ao peso de Rosenbluth do passo anterior e W_{m+1} o peso de Rosenbluth do passo imediatamente posterior. Se para o passo posterior todas as posições estiverem ocupadas e o passo para a posição anterior estiver proibido (SAW), o peso de Rosenbluth é tomado como $W=0$ e o polímero não tem para onde crescer, ficando armadilhado.

Para formar a primeira ligação entre os dois primeiros monômeros inseridos na rede, o peso de Rosenbluth é tomado como $W_{m+1}=W_m=1$ para $m=1$, ou seja; $W_2=W_1=1$. A partir destes dois primeiros monômeros, os seguintes serão calculados pela equação-25



e; para cada novo monômero inserido ao polímero, calculamos o peso de Rosenbluth.

Para uma rede com dimensão d , o peso de Rosenbluth é determinado por:

$$W = \prod_{i=1}^N \frac{n_i}{(2d-1)^{N-1}} \quad (26)$$

sendo n_i o número de vizinhos vazios em cada novo passo i no qual pode-se introduzir o novo monômero; N o comprimento do polímero e d é a dimensionalidade da rede, o que implica que $2d$ corresponde ao número de coordenação z da rede (Binder & Heermann, 1988). Podemos notar facilmente que para uma rede cúbica simples, a expressão 26 se torna equivalente à expressão 25.

O peso de Rosenbluth pode ser combinado com o algoritmo de crescimento de cadeia (CBMC), o que nos permite obter a probabilidade de transição que governa o crescimento da cadeia (Frenkel & Smit, 1996; Gan *et al.*, 2000).

Primeiramente, vamos supor que o crescimento da cadeia ocorra sem trocas de calor (meio atérmico). A probabilidade de inserirmos o monômero i na rede uma vez que $(i-1)$ monômeros já tenham sido colocados é dado por:

$$P_i(\vec{R} + \vec{v}_K \mid \vec{R}_1, \dots, \vec{R}_i) = \frac{1}{n_i} \quad (27)$$

sendo que $\vec{v}_K$ e n_i denotam, respectivamente, o vetor da rede para a direção escolhida K no passo i , e o número de sítios vazios no passo i , entre os $(2d-1)$ sítios possíveis.



Para uma cadeia com N ligações, a probabilidade de gerar uma cadeia completa é dada por:

$$P_{\Lambda} = \prod_{i=1}^N P_i(\bar{R}_i + v_K | \bar{R}_1, \dots, \bar{R}_i) = \frac{1}{n_{\Lambda}} \quad (28)$$

onde n_{Λ} é expresso por:

$$n_{\Lambda} = \prod_{i=1}^N n_i \quad (29)$$

Para cadeias dependentes de temperatura, a probabilidade de transição P_{Λ} foi modificada por Meirovitch, introduzindo um fator de Boltzmann para pesar a configuração do polímero para uma dada temperatura (Gan, Tropsha, Schlick, 2000), sendo expresso por:

$$P_{\Lambda} = \frac{e^{-\beta \cdot E_{\Lambda}}}{\prod_{i=1}^N \left[\sum_{K_i=1}^{C_i} e^{-\beta \cdot u_i(\bar{R} + v_K)} \right]} \quad (30)$$

onde E_{Λ} corresponde a energia para uma dada configuração Λ e o denominador da equação-30 corresponde ao peso estatístico $W_{\Lambda}(\beta)$, dado por:

$$W_{\Lambda}(\beta) = \prod_{i=1}^N \left[\sum_{K_i=1}^{C_i} e^{-\beta \cdot u_i(\bar{R} + v_K)} \right] \quad (31)$$

sendo $\beta = 1/k_B \cdot T$, e k_B é a constante de Boltzmann e u_i é a energia potencial associada a direção de crescimento da cadeia k_i . Desta forma, o peso estatístico pode ser escrito como:

$$W_{\Lambda} = P_{\Lambda}^{-1} \cdot e^{-\beta \cdot E_{\Lambda}} \quad (32)$$

No limite atérmico, $\beta=0$ ou $E_{\Lambda}=0$, notamos que $W_{\Lambda}=n_{\Lambda}=P_{\Lambda}^{-1}$ e a equação-32, para a probabilidade de transição, se torna igual ao Peso

de Rosenbluth (W) multiplicado pelo fator 5^{N-1} numa rede cúbica simples, dado por:

$$P_{\Lambda}^{-1} = W \cdot 5^{N-1} \quad (33)$$

onde 5^{N-1} corresponde ao número de configurações geradas na rede cúbica sendo que, no limite atômico, P_{Λ}^{-1} corresponde ao verdadeiro número de configurações de comprimento N gerados (Rosenbluth & Rosenbluth, 1955). Logo, a probabilidade de gerar uma cadeia está relacionada com o inverso do peso de Rosenbluth, conforme apresentado na equação-33.

Na simulação de um polímero na rede usando CBMC atômico, para cada cadeia gerada é calculado um peso de Rosenbluth e em seguida é comparado o peso de Rosenbluth da cadeia “antiga” com o peso de Rosenbluth da “nova” cadeia. Esta “nova” configuração da cadeia será aceita na rede segundo o critério (acc) dado por:

$$acc = \min \left[1, \frac{W(novo)}{W(antigo)} \right] \quad (34)$$

isto é, se $W(novo) < W(antigo)$ a “nova” configuração será aceita na rede com a probabilidade $W(novo)/W(antigo)$; caso contrário, será aceito com probabilidade 1 (Frenkel & Smit, 1996).

Uma vez que determinamos a probabilidade de transição e o peso estatístico de cada configuração polimérica criada; após N passos de Monte Carlo, teremos um conjunto de pesos estatísticos através do qual, podemos calcular a média de qualquer parâmetro físico, quer seja mecânico-estatístico, quer seja configuracional como raio de giração, distância ponta-a-ponta, energia, etc... . Chamando o



parâmetro físico que temos interesse em calcular de A , o valor médio de A será expresso por:

$$\langle A \rangle = \frac{\sum_i A_i W_i}{\sum_i W_i} \quad (35)$$

isto é, $\langle A \rangle$ é ponderado pelo peso estatístico ou peso de Rosenbluth.

Capítulo 5

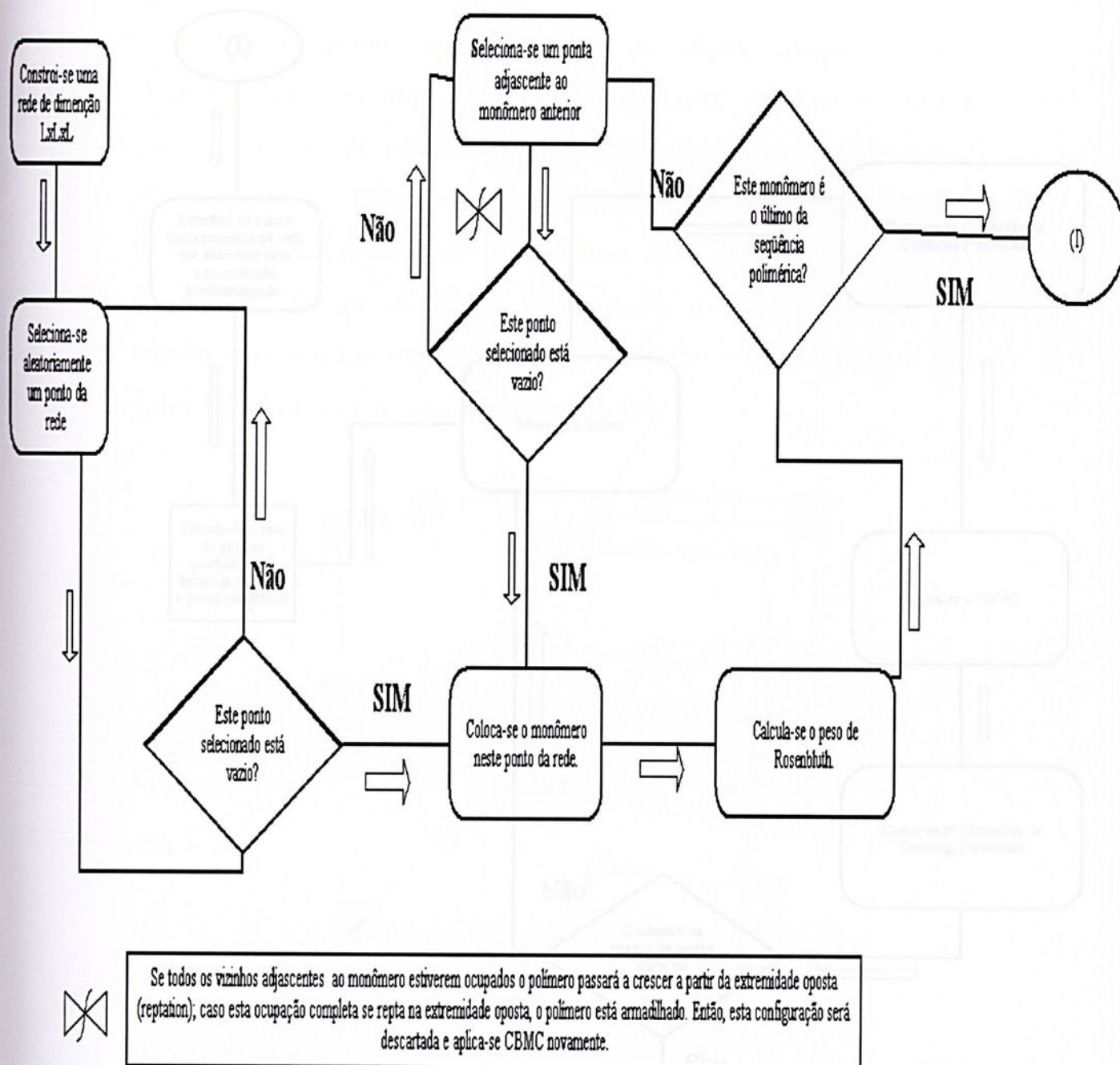
Modelo e Métodos

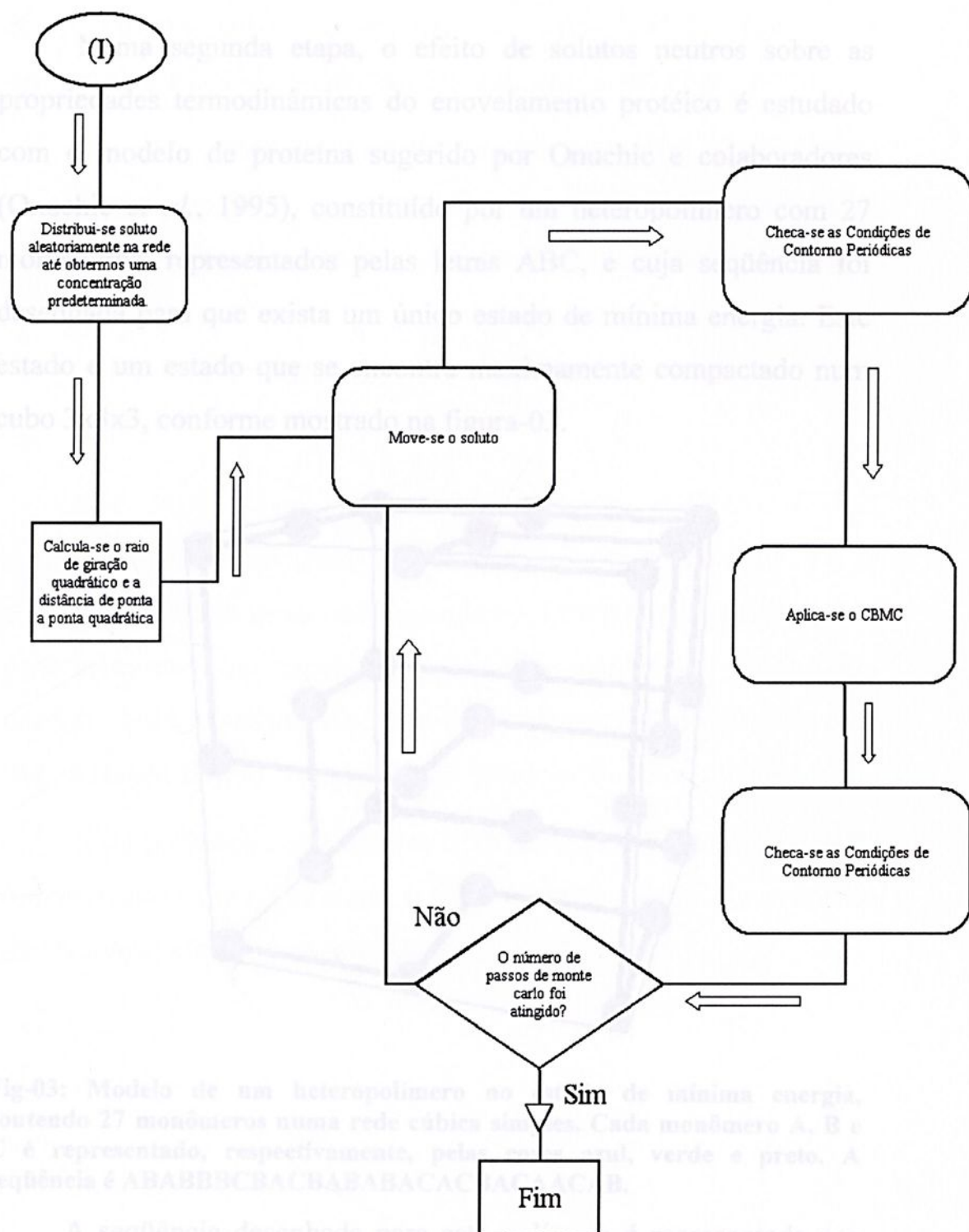
O objetivo deste trabalho será simular o efeito que a presença de pequenos solutos exercem sobre a reação de desenovelamento de proteínas. Para tal, utilizaram-se como modelo de proteína desnaturada o SAW de um homopolímero numa rede tridimensional (rede cúbica simples) com condições de contorno periódicas. A dimensão linear da rede é 30% maior que o tamanho do polímero simulado. Neste modelo, não há interação entre os monômeros; apenas auto-exclusão (SAW), onde simulamos um homopolímero na presença de solutos cuja interação entre soluto e polímero é de volume excluído. Usamos um algoritmo de crescimento de cadeia onde para cada passo Monte Carlo, um monômero é selecionado ao acaso e, a partir deste, apaga-se o polímero restante e cresce-o novamente de maneira aleatória (CBMC).

Para cada crescimento do polímero, calculamos o peso de Rosenbluth da cadeia, o raio de giração e a distância ponta-a-ponta. O programa foi desenvolvido numa Workstation com sistema operacional AIX Unix em linguagem C e posteriormente adaptado e complementado para linguagem Matlab e/ou Octave, sendo que o software Matlab 6.0 Realease 12 da “The Mathworks” é de domínio da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp e o software Octave é livre, instalado em plataforma Linux. A análise estatística foi feita no Matlab e/ou Octave e/ou Origin 6.0 da Microcal Origin de domínio da Unesp. O programa de simulação do



homopolímero na rede cúbica na presença de solutos encontra-se documentado no apêndice, cujo diagrama de fluxo da simulação do homopolímero na rede é mostrado a seguir:





Numa segunda etapa, o efeito de solutos neutros sobre as propriedades termodinâmicas do enovelamento protéico é estudado com o modelo de proteína sugerido por Onuchic e colaboradores (Onuchic *et al.*, 1995), constituído por um heteropolímero com 27 monômeros, representados pelas letras ABC, e cuja seqüência foi desenhada para que exista um único estado de mínima energia. Este estado é um estado que se encontra maximamente compactado num cubo 3x3x3, conforme mostrado na figura-03.

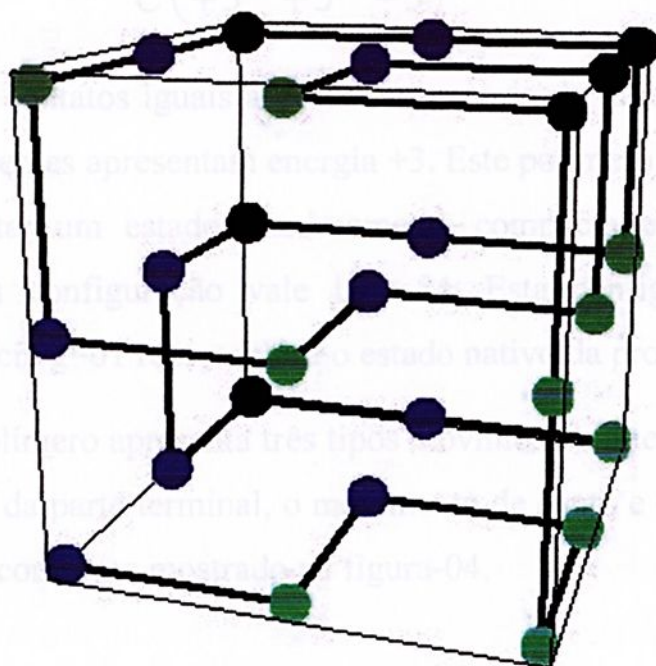


Fig-03: Modelo de um heteropolímero no estado de mínima energia, contendo 27 monômeros numa rede cúbica simples. Cada monômero A, B e C é representado, respectivamente, pelas cores azul, verde e preto. A seqüência é ABABBBCBACBABABACACBACAACAB.

A seqüência desenhada para este polímero é representada por ABABBBCBACBABABACACBACAACAB. Embora não seja simples enumerar todas as configurações distintas que a cadeia polimérica possa formar, é simples contar todas as configurações

compactas formadas no interior do cubo $3 \times 3 \times 3$, cujo valor corresponde a 103346 conformações distintas (Socci *et al.*, 1996).

Nesta sequência polimérica, há um potencial atrativo entre monômeros iguais e um potencial repulsivo entre monômeros diferentes. O potencial é dado explicitamente, em unidades k.T, por:

$$U = \begin{matrix} & \begin{matrix} A & B & C \end{matrix} \\ \begin{matrix} A \\ B \\ C \end{matrix} & \begin{pmatrix} -3 & +3 & +3 \\ +3 & -3 & +3 \\ +3 & +3 & -3 \end{pmatrix} \end{matrix} \quad (36)$$

sendo que os contatos iguais apresentam energia de interação -3 e os contatos diferentes apresentam energia +3. Este polímero foi projetado para apresentar um estado maximamente compacto e único, cuja energia desta configuração vale $U = -84$. Esta configuração com degenerescência $g=01$ representará o estado nativo da proteína.

Este polímero apresenta três tipos movimentos internos na rede; o movimento da parte terminal, o movimento de canto e o movimento de manivela, conforme mostrado na figura-04.

1) Calcula-se a energia de uma configuração do polímero

2) Move-se o soluto; verifica-se as condições de contorno periódicas, realiza-se movimentos internos do polímero e calcula-se a energia para a nova configuração.

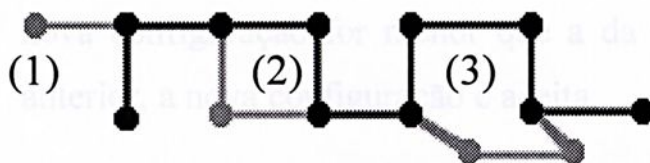


Fig-04: Representação dos possíveis movimentos internos realizados pelo polímero na rede. A trajetória do movimento se faz da haste cinza para a haste preta. O movimento terminal está representado em (1), o movimento de canto em (2) e o movimento de manivela em (3).

Nesta simulação foram inseridos numa rede cúbica simples de $L \times L \times L$ com $L=120$, solutos de tamanhos $2 \times 2 \times 1$, $2 \times 2 \times 2$ e $2 \times 2 \times 3$, onde para cada simulação há apenas um tamanho de soluto na rede com uma concentração constante, cuja interação com o polímero se faz por volume excluído. Para cada movimento interno que o polímero realiza, é verificado se não há sobreposição com o polímero e/ou com o soluto; verifica-se as condições de contorno periódicas e então, decide-se sobre a aceitação da nova configuração. Entre uma configuração do polímero e a seguinte, o soluto é movimentado aleatoriamente na rede.

O critério de aceitação da nova configuração se faz via algoritmo de Metrópolis, que é representado pelos seguintes passos:

- 1) Calcula-se a energia de uma configuração do polímero
- 2) Move-se o soluto; verifica-se as condições de contorno periódicas; realiza-se movimentos internos do polímero e calcula-se a energia para a nova configuração.

3) Se a variação da energia for negativa ($\Delta U < 0$), isto é, se a energia da nova configuração for menor que a da configuração imediatamente anterior, a nova configuração é aceita.

4) Se $\Delta U > 0$, então um número aleatório entre zero e um ($0 \leq n < 1$) é gerado em comparado com o peso de Boltzmann ($\exp(-\beta \cdot \Delta U)$). A nova configuração é aceita se, e somente se, $n < \exp(-\beta \cdot \Delta U)$.

5) O procedimento é repetido a partir do passo 2.

Capítulo 6

Resultados e Discussão - Homopolímero

Foram simuladas com modelo SAW configurações médias de homopolímeros para tamanhos variando de 08 até 64 monômeros, na ausência e presença de concentrações de soluto, para três tipos de soluto com geometria esférica e raios 0.5, 1.5 e 3.0 unidades da rede. Das simulações, obtivemos o raio de giração quadrático médio $\langle R_g^2 \rangle$ e a distância ponta-a-ponta quadrática média $\langle R^2 \rangle$. A figura-05 mostra os histogramas normalizados de simulações realizadas na ausência de soluto para polímeros de três tamanhos distintos de $\langle R_g^2 \rangle$.

Os valores do $\langle R_g^2 \rangle$ e $\langle R^2 \rangle$ para polímeros de comprimento de cadeia (n_{pel}) igual a 08, 16, 24, 32, 40, 48, 56 e 64, obtidos das simulações na ausência de soluto estão mostrados na tabela-01.



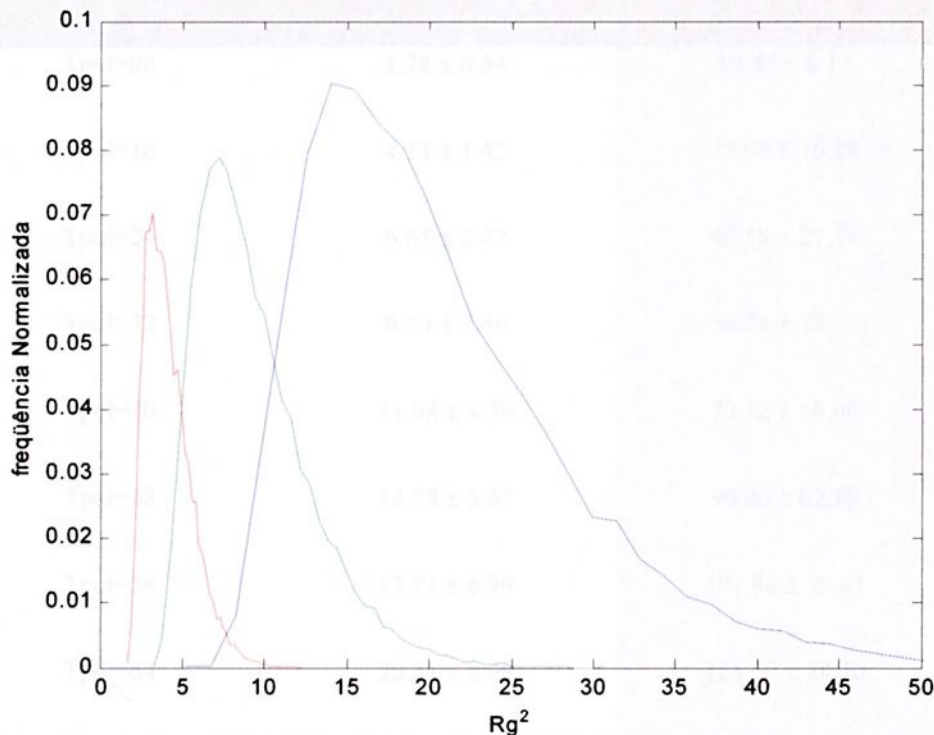


Figura-05: Histogramas normalizados do R_g quadrático para polímeros de tamanhos 16 (vermelho), 32 (verde) e 64 (azul) . Estas simulações foram realizadas na ausência de soluto com 100000 MCS

Os valores do $\langle R_g^2 \rangle$ e $\langle R^2 \rangle$ para polímeros de comprimento de cadeia (tpol) igual a 08, 16, 24, 32, 40, 48, 56 e 64, obtidos das simulações na ausência de soluto estão mostrados na tabela-01.

	$\langle R_g^2 \rangle$	$\langle R^2 \rangle$
Tpol=08	1.78 ± 0.54	10.47 ± 6.13
Tpol=16	4.13 ± 1.42	25.08 ± 16.18
Tpol=24	6.65 ± 2.42	40.58 ± 27.14
Tpol=32	9.30 ± 3.46	56.74 ± 38.51
Tpol=40	11.98 ± 4.59	73.12 ± 56.00
Tpol=48	14.78 ± 5.67	90.06 ± 62.19
Tpol=56	17.71 ± 6.89	107.94 ± 75.61
Tpol=64	20.43 ± 8.09	124.50 ± 88.50

Tabela-01: Valores dos $\langle R_g^2 \rangle$ e $\langle R^2 \rangle$ obtidos dos histogramas apresentados na figura-01 para polímeros de tamanhos (tpol) entre 08 e 64 monômeros.

A figura-06 mostra o teste da lei de escala [$\log \langle R^2 \rangle$ versus $\log(\text{tpol})$] feito para ausência de soluto e sem o peso de Rosenbluth, cujo expoente obtido vale $2\nu=1.19$, que concorda com o expoente universal da lei de escala (expoente de Flory) para cadeias não ideais, mostrado na equação-24 (Flory, 1953, De Gennes, 1991).

Implementamos o cálculo do peso de Rosenbluth e simulamos o crescimento do polímero na presença e ausência de solutos. A inserção do peso de Rosenbluth na simulação se faz necessária, uma



vez que este corresponde a um peso estatístico que evita com que algumas configurações sejam privilegiadas em detrimento das outras, fazendo uma contagem igualitária para todas as configurações do polímero.



Figura-06: Relação linear do logaritmo da distância quadrática ponta-a-ponta com o logaritmo do comprimento da cadeia na ausência de solvente. A inclinação da reta fornece o expoente de Flory, e vale $2\nu-1$, 1,19, conforme equação-24.

Testes iniciais mostraram que após 5000 MCS, o raio de giração quadrático médio apresentava flutuações muito pequenas, conforme mostrado na figura-07. A lei de escala (equação-24) para simulação com e sem o peso de Rosenbluth está mostrada na figura-08, onde o

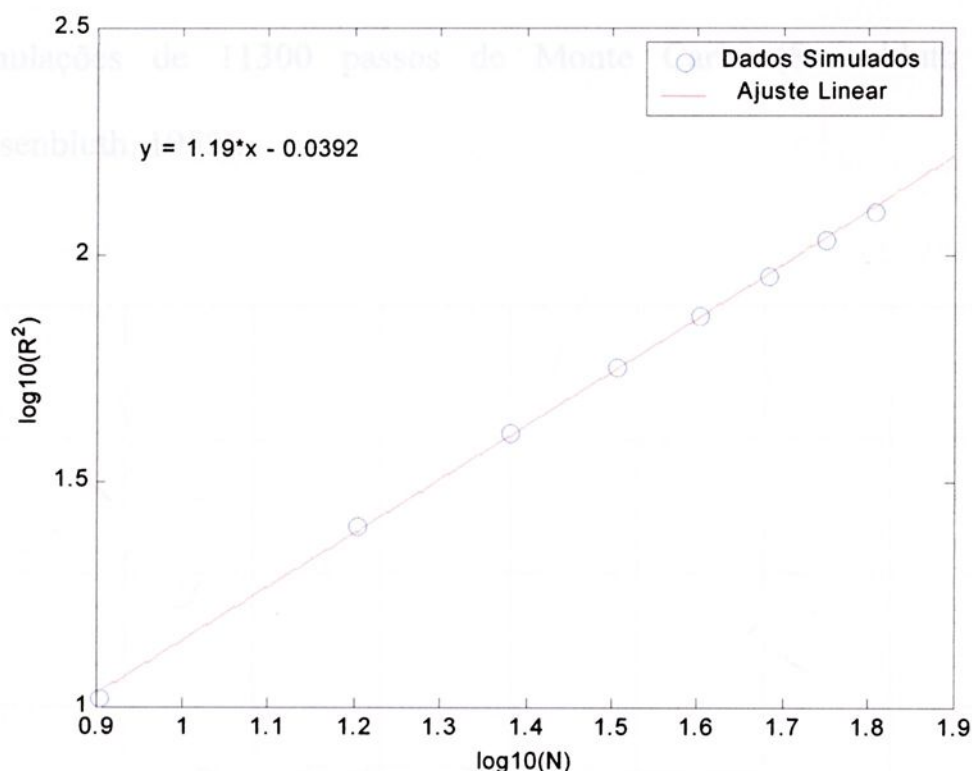


Figura-06: Relação linear do logaritmo da distância quadrática ponta-a-ponta com o logaritmo do comprimento da cadeia na ausência de solutos. A inclinação da reta fornece o expoente de Flory e vale $2\nu=1.19$, conforme equação-24.

Testes iniciais mostraram que após 5000 MCS, o raio de giração quadrático médio apresenta flutuações muito pequenas, conforme mostrado na figura-07. A lei de escala (equação-24) para simulação com e sem o peso de Rosenbluth está mostrada na figura-08, onde o

expoente de Flory com peso vale 1.44, sendo este ligeiramente maior que o obtido das médias sem o peso. Este valor é também ligeiramente maior que o obtido por Rosenbluth & Rosenbluth ($2\nu=1.22$) em simulações de 11300 passos de Monte Carlo (Rosenbluth & Rosenbluth, 1955).

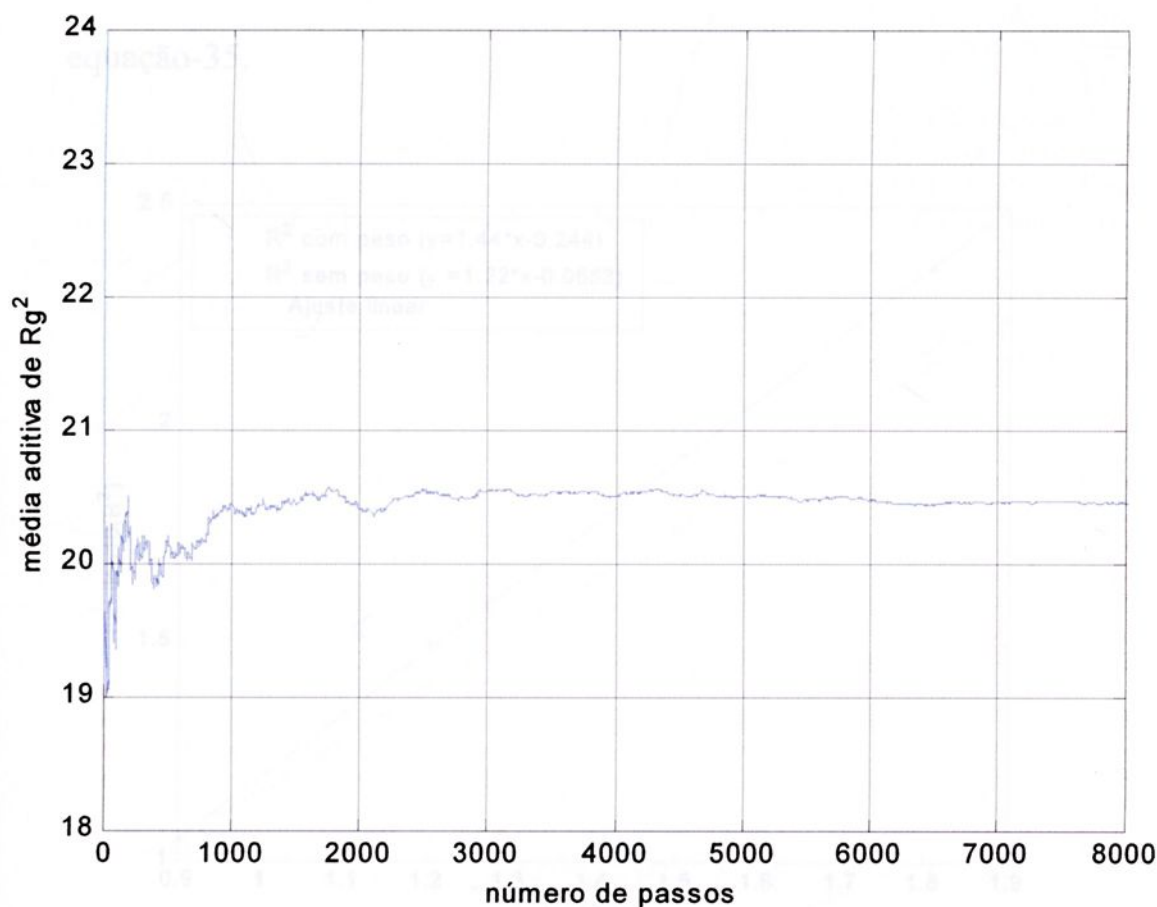


Figura-07: Média do R_g^2 , incrementada a cada novo passo de Monte Carlo. O resultado mostra que 5000 MCS já são suficientes para que $\langle R_g^2 \rangle$ não flutue significativamente

Nossas simulações foram realizadas com um número de passos da ordem de grandeza dez vezes maior em relação ao trabalho de Rosenbluth & Rosenbluth de 1955, implicando em uma melhor estatística.

Destas simulações foram calculados o valor do peso de Rosenbluth médio e os valores de $\langle R_g^2 \rangle$ e $\langle R^2 \rangle$ foram obtidos da equação-35.

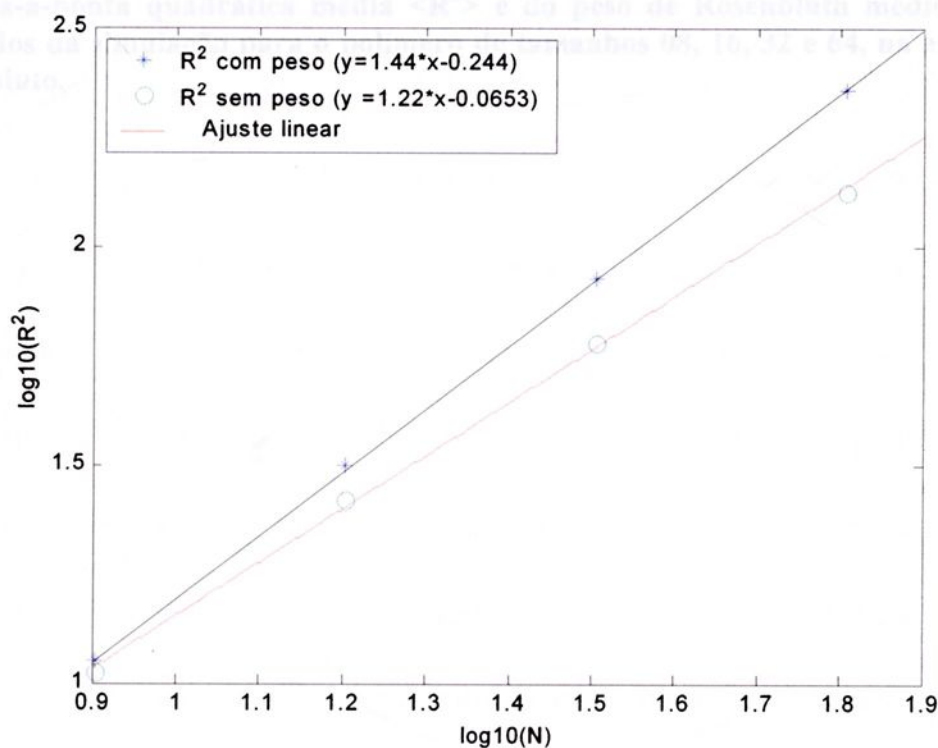


Figura-08: Lei de escala para simulação da cadeia polimérica na ausência de soluto com e sem o peso de Rosenbluth. O ajuste representa a lei de escala predita para um “bom” solvente.

A tabela-02 mostra estes valores médios para as configurações poliméricas de tamanhos 08, 16, 32 e 64.

tpol	$\langle R_g^2 \rangle$	$\langle R^2 \rangle$	$\langle W \rangle$
08	1.85 ± 0.55	11.26 ± 6.27	0.590 ± 0.258
16	4.77 ± 1.41	30.89 ± 16.22	0.332 ± 0.216
32	11.98 ± 3.41	80.76 ± 38.45	0.055 ± 0.078
64	30.26 ± 8.34	211.23 ± 93.37	0.0017 ± 0.0050

Tabela-01a: Valores do raio de giração quadrático médio $\langle R_g^2 \rangle$, da distância ponta-a-ponta quadrática média $\langle R^2 \rangle$ e do peso de Rosenbluth médio $\langle W \rangle$, obtidos da simulação para o polímero de tamanhos 08, 16, 32 e 64, na ausência de soluto.

Efeito de Volume Excluído Sóluto-Polímero nas Dimensões do *SAW*

A segunda etapa corresponde a adição de solutos na rede, cuja única interação entre o soluto e o polímero se faz via volume excluído.

Simulações dos parâmetros dimensionais (R_g e R) e pesos de Rosenbluth (W) das configurações de polímeros de diferentes tamanhos ($tpol$ igual a 08, 16, 32 e 64) foram realizadas na presença de distintas concentrações de soluto na rede, cujo soluto apresenta raios igual a $R_o=0.5$, $R_o=1.5$ e $R_o=3.0$ unidades de espaçamento da rede. Para cada tamanho do polímero e cada raio de soluto foram feitas simulações com diferentes concentrações de soluto ($fsol$); isto é, para cada simulação usamos um único polímero de comprimento fixo ($tpol=constante$) na presença de uma concentração fixa ($fsol=constante$) de soluto de tamanho invariável ($R_o=constante$).

As concentrações de soluto na rede foram expressas em termos da fração de volume ocupado pelos solutos em relação ao volume total da rede (V_T), isto é :

$$fsol = \frac{n_s \cdot V_s}{V_T}$$

sendo n_s o número de partículas de soluto na rede e V_s o volume do soluto, expresso por :

$$V_s = \frac{4}{3}\pi \cdot R_o^3$$

Os histogramas normalizados para os raios de giração quadráticos médios determinados na ausência e presença de solutos foram construídos, e estão mostrados nas figuras 09, 10 e 11. Nota-se que os histogramas se superpõem, não havendo, dentro do erro, diferença entre os raios de giração quadráticos médios na ausência e presença de solutos. Esta superposição se repete para os histogramas normalizados dos polímeros de outros tamanhos, bem como para outros tamanhos de solutos usados. Estes dados sugerem que a presença do soluto não altera o tamanho médio do polímero com SAW.



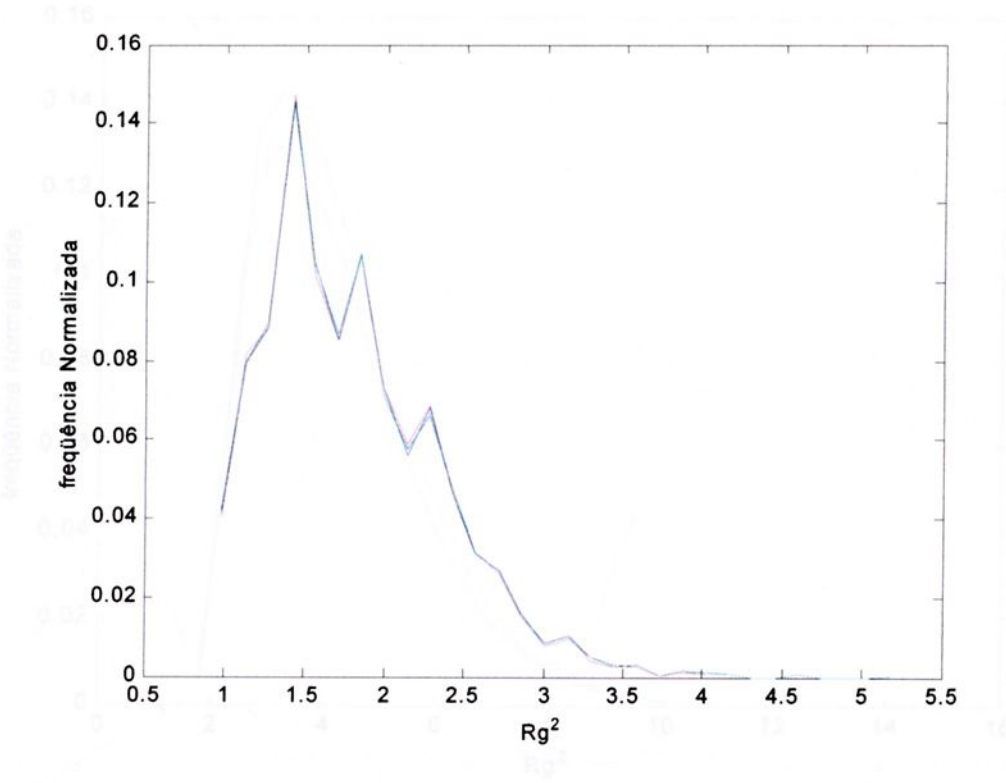


Figura-09: Histograma normalizado do R_g^2 para simulação do polímero de tamanho 08 na ausência de soluto (linha azul) e na presença de 5% (linha verde clara), 15% (linha verde escura) e 25% (linha vermelha) de soluto. O raio do soluto para esta simulação vale 3.



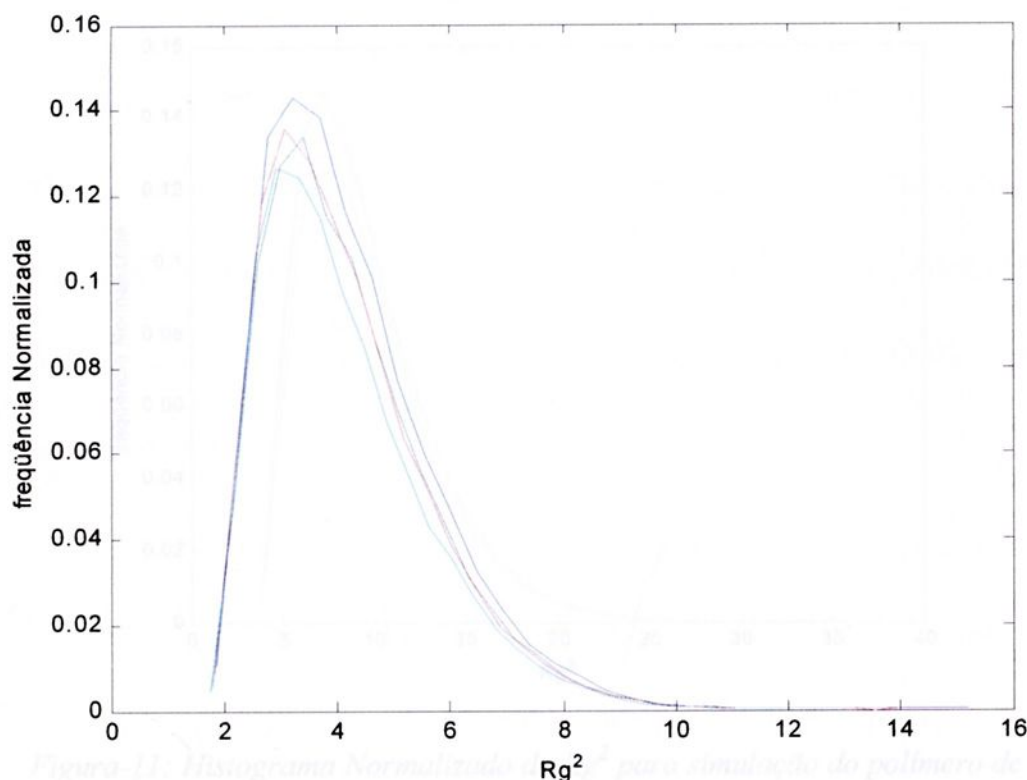


Figura-10: Histograma normalizado para simulação do polímero de tamanho 16 na ausência de soluto (linha azul) e na presença de 5% (linha verde clara), 15% (linha verde escura) e 25% (linha vermelha) de soluto. O raio do soluto nesta simulação vale 3.

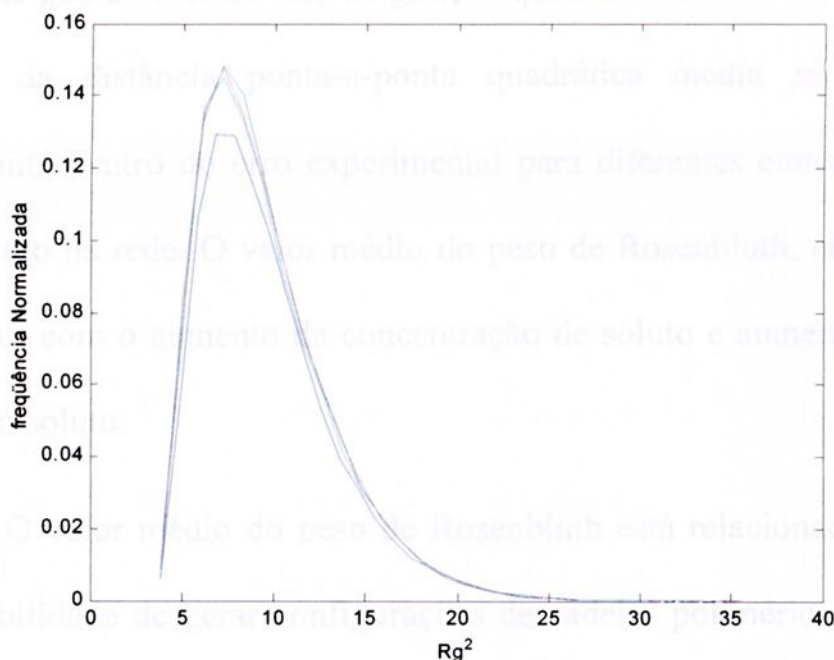


Figura-11: Histograma Normalizado do Rg^2 para simulação do polímero de tamanho 32 na ausência de soluto (linha azul) e na presença de 5% (linha verde clara), 15% (linha verde escura) e 25% (linha vermelha). O raio do soluto simulado vale 3.

Estas simulações permitiram determinar os valores do raio de giração quadrático médio, da distância ponta-a-ponta quadrática média e do peso de Rosenbluth médio. As tabelas 02, 03, 04 e 05 mostram os respectivos valores para polímeros de tamanhos 08, 16, 32 e 64 em concentrações 0%, 5%, 15% e 25% de solutos de raios 0.5, 1.5 e 3.0 unidades de espaçamento da rede.

Na tabela-02 estão mostrados os resultados da simulação para o tamanho do polímero igual a 08 em distintas concentrações de soluto.

Nota-se que o valor do raio de giração quadrático médio bem como o valor da distância ponta-a-ponta quadrática média se mantém constante dentro do erro experimental para diferentes concentrações de soluto na rede. O valor médio do peso de Rosenbluth, entretanto, diminui com o aumento da concentração de soluto e aumenta com o raio do soluto.

O valor médio do peso de Rosenbluth está relacionado com a probabilidade de gerar configurações de cadeias poliméricas, onde a diminuição no valor de $\langle W \rangle$ implica no aumento desta probabilidade. Portanto, os dados mostrados nas tabelas 03, 04 e 05 sugerem que a probabilidade de cada uma das configurações do polímero aparecer aumenta com a concentração do soluto e diminui com o raio do soluto.



R_0	tpol	fsol	$\langle Rg^2 \rangle$	$\langle R^2 \rangle$	$\langle W \rangle$
0	0.8	0%	1.85 ± 0.55	11.26 ± 6.27	0.590 ± 0.258
0.5	08	05%	1.88 ± 0.54	11.52 ± 6.20	0.377 ± 0.157
0.5	08	15%	1.89 ± 0.54	11.58 ± 6.23	0.096 ± 0.085
0.5	08	25%	1.89 ± 0.55	11.55 ± 6.40	0.015 ± 0.018
1.5	08	05%	1.86 ± 0.55	11.32 ± 6.21	0.598 ± 0.231
1.5	08	15%	1.84 ± 0.55	11.06 ± 6.22	0.356 ± 0.230
1.5	08	25%	1.83 ± 0.57	10.92 ± 6.38	0.145 ± 0.122
3.0	08	05%	1.86 ± 0.54	11.27 ± 6.21	0.601 ± 0.257
3.0	08	15%	1.88 ± 0.54	10.27 ± 6.20	0.601 ± 0.257
3.0	08	25%	1.86 ± 0.54	11.25 ± 6.19	0.600 ± 0.257

Tabela-02: Valores do raio de giração quadrático médio $\langle Rg^2 \rangle$, da distância ponta-a-ponta quadrática média $\langle R^2 \rangle$ e do peso de Rosenbluth médio $\langle W \rangle$, obtidos da simulação para o polímero de tamanho tpol=08, na presença de soluto com concentração fsol e tamanho do soluto $R_0=0.5$, $R_0=1.5$ e $R_0=3.0$ unidades da rede.



R_o	tpol	fsol	$\langle R_g^2 \rangle$	$\langle R^2 \rangle$	$\langle W \rangle$
0	16	0%	4.77 ± 1.41	30.89 ± 16.22	0.332 ± 0.216
0.5	16	05%	4.82 ± 1.45	31.66 ± 16.82	0.074 ± 0.068
0.5	16	15%	4.73 ± 1.46	30.77 ± 16.96	0.003 ± 0.006
0.5	16	25%	5.63 ± 1.47	35.51 ± 17.49	0.0001 ± 0.0032
1.5	16	05%	4.76 ± 1.46	31.11 ± 16.74	0.212 ± 0.181
1.5	16	15%	4.68 ± 1.47	30.45 ± 16.78	0.059 ± 0.077
1.5	16	25%	4.59 ± 1.47	29.56 ± 16.62	0.009 ± 0.018
3.0	16	05%	4.74 ± 1.45	30.98 ± 16.60	0.280 ± 0.213
3.0	16	15%	4.66 ± 1.44	30.17 ± 16.54	0.167 ± 0.176
3.0	16	25%	4.54 ± 1.44	29.19 ± 16.54	0.080 ± 0.115

Tabela-03: Valores do raio de giração quadrático médio $\langle R_g^2 \rangle$, da distância ponta-a-ponta quadrática média $\langle R^2 \rangle$ e do peso de Rosenbluth médio $\langle W \rangle$, obtidos da simulação para o polímero de tamanho tpol=16, na presença de soluto com concentração fsol e tamanho do soluto $R_o=0.5$, $R_o=1.5$ e $R_o=3.0$ unidades da rede.

R_o	tpol	fsol	$\langle R_g^2 \rangle$	$\langle R^2 \rangle$	$\langle W \rangle$
0	32	0%	11.98 ± 3.41	80.76 ± 38.45	0.055 ± 0.078
1.5	32	05%	12.18 ± 3.54	82.90 ± 40.10	0.022 ± 0.043
1.5	32	15%	12.03 ± 3.57	82.91 ± 40.18	0.0016 ± 0.0058
1.5	32	25%	11.08 ± 3.59	72.47 ± 40.59	0.0001 ± 0.0007
3.0	32	05%	12.17 ± 3.54	82.53 ± 39.73	0.041 ± 0.068
3.0	32	15%	11.88 ± 3.56	80.20 ± 39.98	0.013 ± 0.033
3.0	32	25%	11.58 ± 3.60	77.70 ± 40.27	0.0032 ± 0.0132

Tabela-04: Valores do raio de giração quadrático médio $\langle R_g^2 \rangle$, da distância ponta-a-ponta quadrática média $\langle R^2 \rangle$ e do peso de Rosenbluth médio $\langle W \rangle$, obtidos da simulação para o polímero de tamanho tpol=32, na presença de soluto com concentração fsol e tamanho do soluto $R_o=1.5$ e $R_o=3.0$ unidades da rede.

R_o	tpol	fsol	$\langle R_g^2 \rangle$	$\langle R^2 \rangle$	$\langle W \rangle$
0	64	0%	30.26 ± 8.34	211.23 ± 93.37	0.0017 ± 0.0050
1.5	64	15%	31.74 ± 8.22	235.75 ± 91.70	$2.12 \times 10^{-6} \pm 3.20 \times 10^{-5}$
3.0	64	25%	31.96 ± 8.31	237.97 ± 91.80	$6.93 \times 10^{-6} \pm 1.37 \times 10^{-4}$

Tabela-05: Valores do raio de giração quadrático médio $\langle R_g^2 \rangle$, da distância ponta-a-ponta quadrática média $\langle R^2 \rangle$ e do peso de Rosenbluth médio $\langle W \rangle$, obtidos da simulação para o polímero de tamanho tpol=64, na presença de soluto com concentração fsol e tamanho do soluto $R_o=1.5$ e $R_o=3.0$ unidades da rede.



Tendo em vista que os histogramas e os valores médios do raio de giração do polímero com auto-exclusão de cadeia (SAW) não são alterados pela presença do soluto, decidimos investigar qual o efeito da adição de soluto sobre o valor médio do peso de Rosenbluth de diferentes conformações do SAW. Para tanto, as configurações geradas foram separadas em valores para raio de giração (R_g) entre R_{g_i} e $R_{g_i}+dR_g$, onde dR_g corresponde ao intervalo que define as partições (“bins”) do histograma de R_g . A média dos valores de W_i das configurações dentro de cada partição R_i foi calculado. A figura 12 mostra os gráficos de $\langle R_{g_i} \rangle$ versus $\langle W_i \rangle$ para polímero de tamanho 16, determinados na ausência e presença de 15% de soluto na rede, para diferentes raios de soluto.

Os gráficos desta figura mostram que a adição de solutos diminui consistentemente os valores de $\langle W_i \rangle$ para todas as configurações do polímero. À mesma fração de soluto, a diminuição dos valores $\langle W_i \rangle$ são maiores para os solutos de menor tamanho.



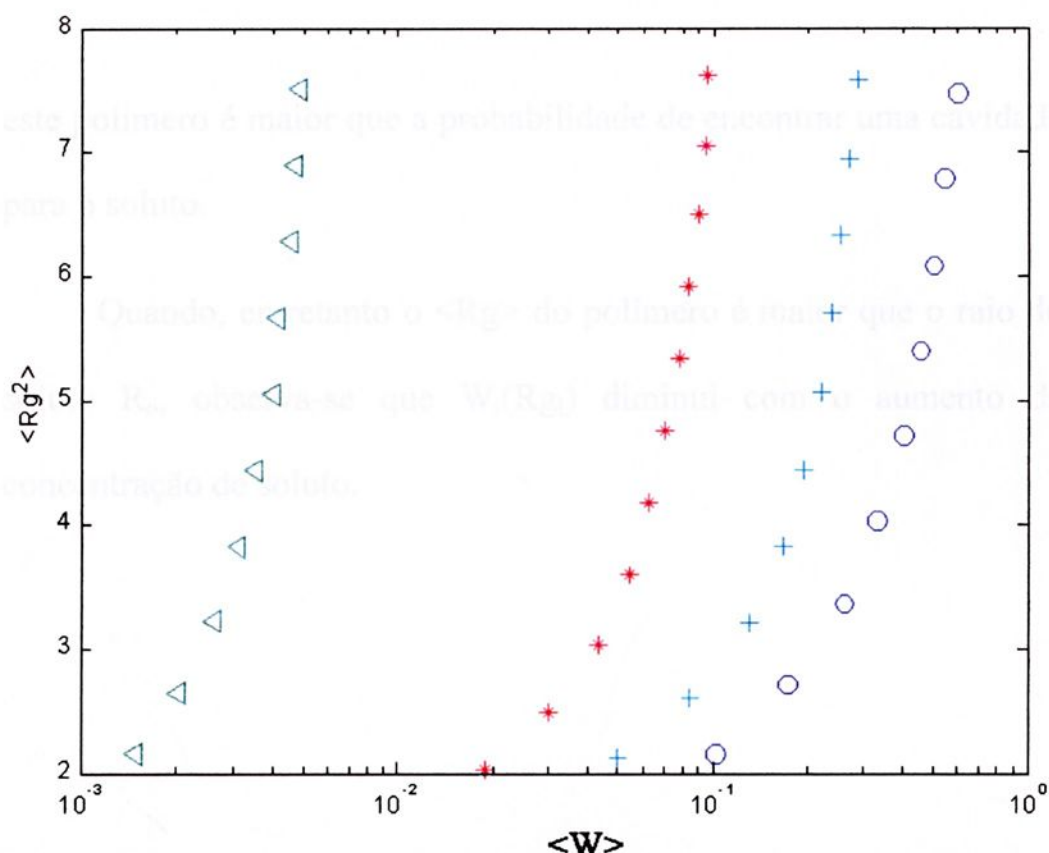


Figura-12: Variação do $\langle R_g^2 \rangle$ de cada partição pelo peso médio de Rosenbluth $\langle W \rangle$ da respectiva partição. Este $\langle R_g^2 \rangle$ e $\langle W \rangle$ foram obtidos particionando a matriz de R_g e W em intervalos iguais e calculando a média para cada intervalo. (o) corresponde a simulação na ausência de soluto para polímero tamanho 16. Os demais símbolos correspondem a simulação do mesmo polímero em concentração de soluto 15%, para raio do soluto igual a 0.5 (∇), igual a 1,5 (*) e igual a 3 (+).

As figuras 13 e 14 mostram o efeito da concentração de soluto de tamanho fixo sobre os valores de $W_i(R_{gi})$ para polímeros de tamanho 08 e 32, respectivamente. Na figura-13 observa-se que os valores de W_i não são alterados pela presença do soluto. A razão para isto é que o raio de giração médio do polímero de tamanho 08, que é igual a 1.84, é menor que o raio do soluto utilizado. Nestas condições, a probabilidade de se encontrar uma cavidade na rede que acomode

este polímero é maior que a probabilidade de encontrar uma cavidade para o soluto.

Quando, entretanto o $\langle R_g \rangle$ do polímero é maior que o raio do soluto R_o , observa-se que $W_i(R_{g_i})$ diminui com o aumento da concentração de soluto.



Figura-13: Variação do $\langle R_g^2 \rangle$ de cada partição pelo peso médio de Rosenbluth $\langle W \rangle$ da respectiva partição. Os valores de $\langle R_g^2 \rangle$ e $\langle W \rangle$ foram obtidos particionando a matriz de R_g e W em intervalos iguais e calculando a média para cada intervalo. (o) corresponde a simulação na ausência de soluto para polímero de tamanho 08. Os demais símbolos correspondem a simulação do mesmo polímero para fração de soluto igual a 5% (Δ), igual a 15% (+) e igual a 25% (*). O raio do soluto foi mantido constante e vale 3,0. Nota-se neste caso que não há efeito do soluto sobre o polímero, uma vez que o valor médio do R_g é da mesma ordem do raio do soluto.

A figura-14 mostra um exemplo típico deste fenômeno. Neste exemplo, o raio do soluto vale $R_o=3,0$ e o tamanho do polímero vale $n_{pol}=32$. É possível notar que o aumento de fração de soluto na rede aumenta a probabilidade de todas as configurações do polímero.

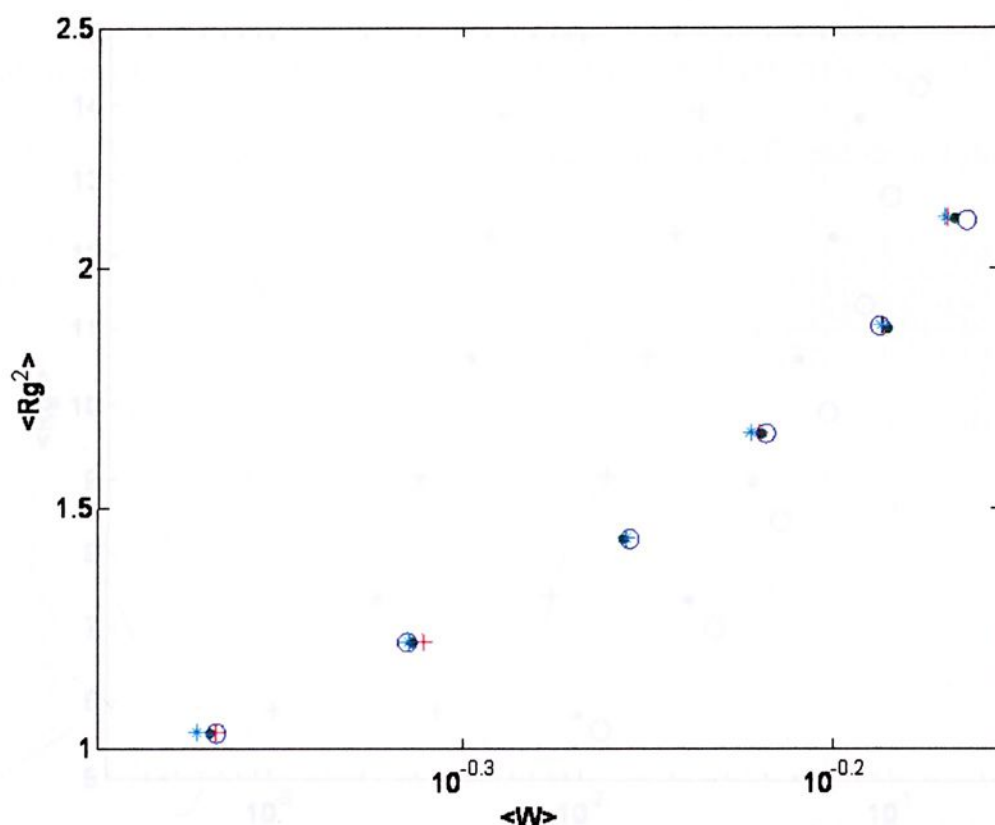


Figura-13 : Variação do $\langle R_g^2 \rangle$ de cada partição pelo peso médio de Rosenbluth $\langle W_i \rangle$ da respectiva partição. Os valores de $\langle R_g^2 \rangle$ e $\langle W \rangle$ foram obtidos particionando a matriz de R_g e W em intervalos iguais e calculando a média para cada intervalo. (o) corresponde a simulação na ausência de soluto para polímero de tamanho 08. Os demais símbolos correspondem a simulação do mesmo polímero para fração de soluto igual a 5% (.), igual a 15% (+) e igual a 25% (*). O raio do soluto foi mantido constante e vale 3.0. Nota-se neste caso que não há efeito do soluto sobre o polímero, uma vez que o valor médio do R_g é da mesma ordem do raio do soluto

A figura-14 mostra um exemplo típico deste fenômeno. Neste exemplo, o raio do soluto vale $R_o=3.0$ e o tamanho do polímero vale $tpol=32$. É possível notar que o aumento da fração de soluto na rede aumenta a probabilidade de todas as configurações do polímero.

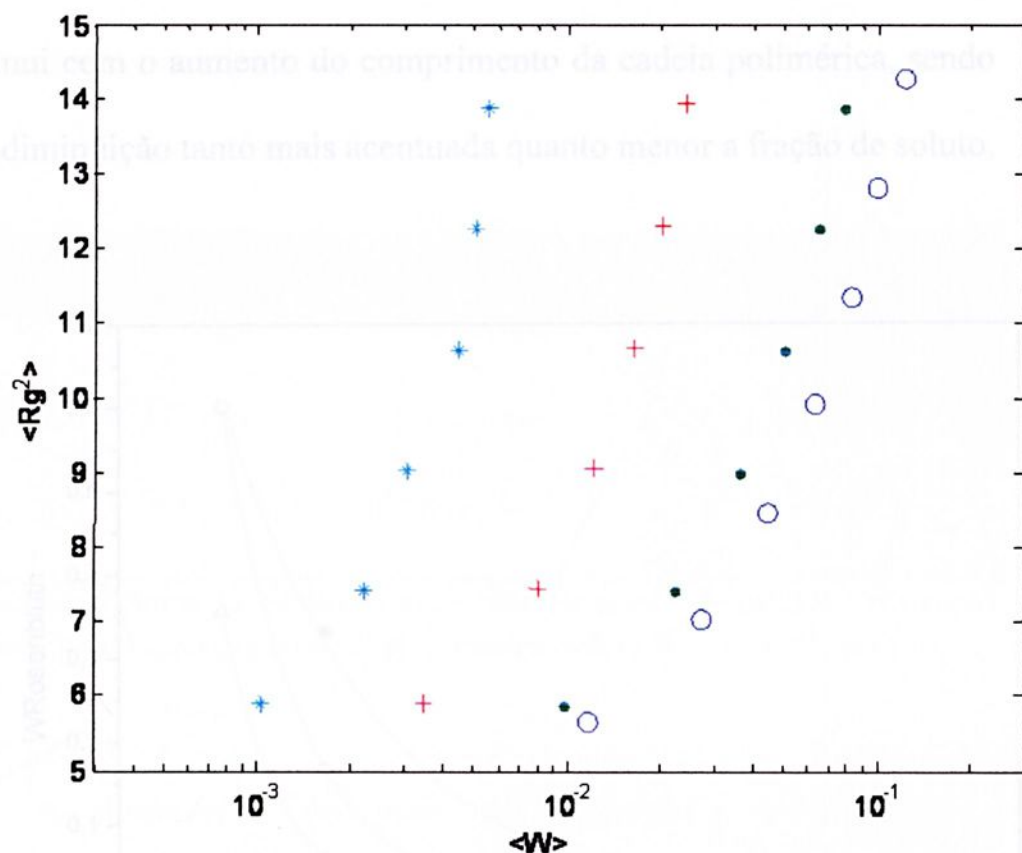


Figura-14: Variação do $\langle R_g^2 \rangle$ de cada partição pelo peso médio de Rosenbluth $\langle W_i \rangle$ da respectiva partição. Os valores de $\langle R_g^2 \rangle$ e $\langle W \rangle$ foram obtidos particionando a matriz de R_g e W em intervalos iguais e calculando a média para cada intervalo. (o) corresponde a simulação na ausência de soluto para polímero tamanho 32. Os demais símbolos correspondem a simulação do mesmo polímero para fração de soluto igual a 5% (.), igual a 15% (+) e igual a 25% (*). O raio do soluto foi mantido constante e vale 3.0.

Uma vez mostrada a variação do $\langle W \rangle$ com o raio do soluto e fração de soluto, verificamos a dependência de $\langle W \rangle$ com o tamanho do polímero.

Na figura-15 mostra-se que o peso de Rosenbluth médio diminui com o aumento do comprimento da cadeia polimérica, sendo esta diminuição tanto mais acentuada quanto menor a fração de soluto.

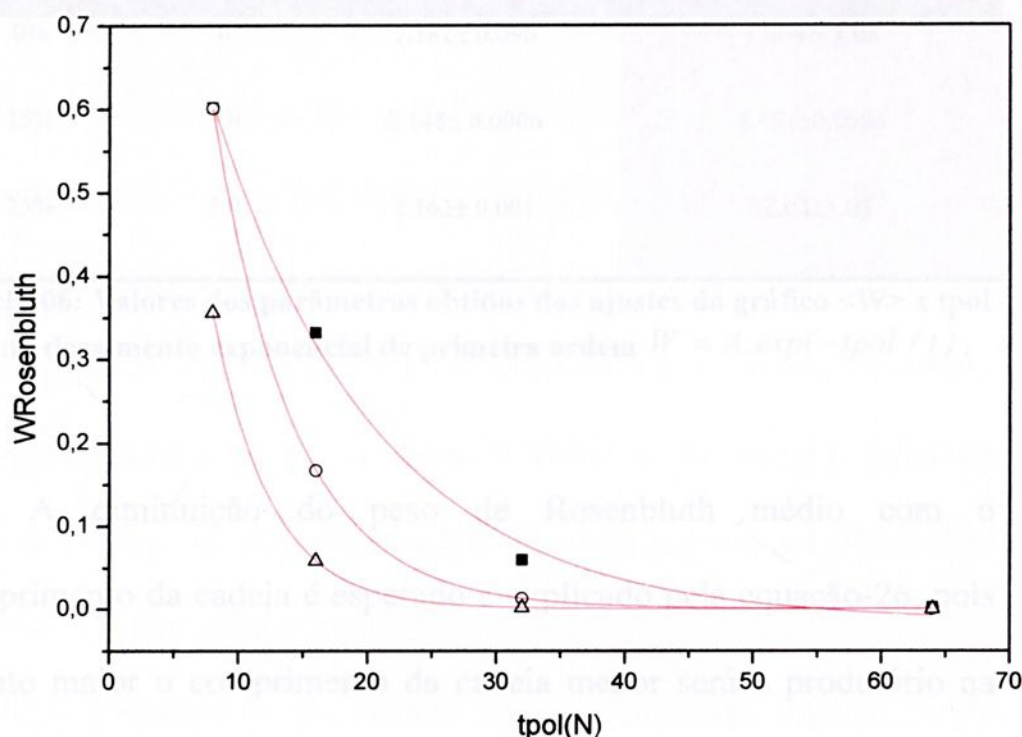


Figura-15: Ajuste exponencial assintótico do peso de Rosenbluth médio do polímero versus o comprimento da cadeia polimérica. Estas simulações foram feitas na ausência de soluto ($\blacksquare$), na concentração de 15% de soluto com raio 3,0 (Δ) e na concentração de soluto 25% com raio 3,0 ($\circ$)

Os gráficos da figura-15 foram ajustados por uma função decaimento exponencial de primeira ordem $W = A \cdot \exp(-tpol / t)$

utilizando-se o software Origin 6.0. Os parâmetros do ajuste estão mostrados na tabela-06.

fsol	Ro	Λ	t
0%	0	1.182 ± 0.096	12.04 ± 1.08
15%	3.0	2.148 ± 0.0006	4.451 ± 0.0006
25%	3.0	2.162 ± 0.001	12.04 ± 1.08

Tabela-06: Valores dos parâmetros obtidos dos ajustes do gráfico $\langle W \rangle$ x $tpol$ por um decaimento exponencial de primeira ordem $W = A.exp(-tpol / t)$.

A diminuição do peso de Rosenbluth médio com o comprimento da cadeia é esperado e explicado pela equação-26, pois quanto maior o comprimento da cadeia menor será o produtório na equação-26.

Discussão –Homopolímero

As simulações das configurações de polímeros SAW de diferentes tamanhos, realizadas na ausência e presença de diferentes concentrações de solutos de raios distintos, mostraram que o raio de giração quadrático médio $\langle Rg^2 \rangle$ e a distância ponta-a-ponta



quadrática média $\langle R^2 \rangle$ destes modelos não são alterados pelas interações de corpo rígido estabelecidas entre o polímero e o soluto distribuído na rede. Estes resultados foram extensivamente confirmados, procedendo-se simulações por dois métodos distintos: o método de crescimento de cadeia, e o método de movimentos internos; de canto, de manivela e de extremidade.

Resultados distintos, entretanto, foram reportados por simulação de Monte Carlo realizados por Luna-Barcenas e colaboradores (Luna-Barcenas *et al*, 1996). Utilizando um modelo de polímero, construído pela justaposição de m monômeros cúbicos, de volume igual ao volume unitário da rede, em uma rede ocupada por solutos prismáticos ocupando várias células contíguas da rede tridimensional, mostraram o colapso atérmico de um modelo SAW da cadeia polimérica. Neste modelo é permitido que o soluto e polímero compartilhem uma mesma face, sem que isto rompa a condição de volume exclusivo. Este é a principal diferença entre o modelo destes autores e o modelo SAW aqui estudado, onde o polímero não pode ocupar o mesmo ponto da rede ocupado por um soluto. Esta diferença pode explicar a discordância entre os resultados aqui apresentados e os publicados por Luna-Barcenas e colaboradores. Em contraposição a estes resultados,



outros estudos não têm mostrado evidências de colapso atérmico de polímeros SAW induzida pela presença de partículas rígidas, especialmente no regime de baixas concentrações (Escobedo & Pablo, 1996). Dijkstra *et al* encontraram colapso do homopolímero somente para muito alta fração de empacotamento do solvente (acima de 70%), um valor para o qual um solvente de esferas rígidas se encontra na fase sólida (Dijkstra *et al*; 1994a, 1994b).

Os resultados obtidos neste trabalho, e outros reportados na literatura permitem, portanto, concluir que interações de volume exclusivo, pelo menos a baixas concentrações de soluto utilizadas neste trabalho, não levam ao colapso atérmico do polímero. Como veremos na segunda parte deste trabalho, o colapso ocorrerá no sistema térmico, onde interações atrativas e repulsivas entre monômeros do polímero foram ligadas. Embora a presença de solutos não altere os valores médios das grandezas dimensionais, $\langle R_g^2 \rangle$ e $\langle R^2 \rangle$, o valor médio do peso de Rosenbluth (W) diminui com o aumento da fração de volume da rede ocupado por este. Esta diminuição do espaço configuracional do polímero na presença do soluto é esperada: enquanto na ausência de soluto o único fator limitante do crescimento do polímero é a ocupação da vizinhança por um outro monômero; na



presença do soluto a probabilidade de uma posição livre para o polímero estar ocupada pelo soluto é proporcional à fração do volume da rede ocupado pelo soluto. Com isto, o número de maneira de crescer um polímero SAW diminui sem, entretanto, privilegiar qualquer configuração.

A restrição do espaço configuracional do polímero SAW pela presença do soluto tem como consequência o aumento do potencial químico do polímero, dado por:

$$\beta\mu_{ex} = -\ln \frac{\langle W \rangle}{\langle W_o \rangle}$$

onde μ_{ex} é a diferença entre o potencial químico do polímero na presença e ausência de solutos, e $\langle W \rangle$ e $\langle W_o \rangle$ são os valores do peso de Rosenbluth nestas condições respectivas (Frenkel & Smit; 1996). Qualitativamente, este resultado é consistente com medidas do efeito da adição de vários solutos neutros no potencial químico de proteínas dissolvidas em solução aquosa, determinadas tanto por medidas de densidade da solução (Timasheff & Lee, 1981; Timasheff & Xie, 1996), quanto por medidas de espalhamento de luz destas soluções (Gast *et al*; 1994). Os gráficos representativos mostrados na figura-14,



de $\langle Rg_i^2 \rangle$ versus $\langle W_i \rangle$, mostraram também que o peso de Rosenbluth aumenta com o raio de giração do polímero. Este resultado também é consistente com os dados experimentais acima mencionados, que mostram que o aumento do potencial químico de proteínas dissolvidas em co-soluções de solutos neutros é tanto maior quanto maior a área de superfície protéica exposta ao solvente (Timasheff & Lee, 1981; Arakawa *et al.*, 1990).

Descrição da Dependência do Potencial Químico de Excesso do Polímero SAW com o Raio de Giração da Configuração, com a Densidade de Partículas do Solute na Rede e com o Volume do Solute.

Uma análise quantitativa dos efeitos de soluto sobre o potencial químico do modelo de proteína estudado pode ser feita simplesmente considerando que, enquanto os valores médios do raio de giração do polímero não variam, tanto o peso destas configurações (W_i) como o raio de giração são bastante afetados pela presença de uma dada concentração ϕ de soluto na rede. O gráfico a seguir mostra a variação do logaritmo da relação do peso de Rosenbluth na presença e ausência de soluto em função da concentração do soluto.



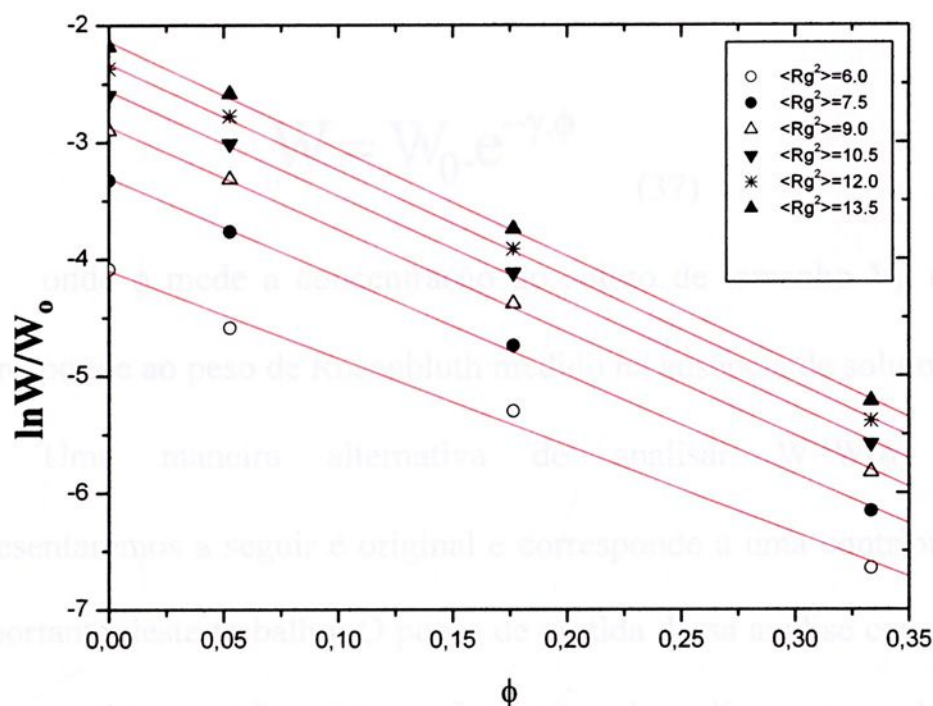


Figura-16: Logaritmo natural de W/W_0 em função da fração relativa de volume $\phi = n_s V_s / n_w V_w$. As frações relativas valem $\phi=0$; $\phi=0.052$; $\phi=0.176$ e $\phi=0.333$.

Do gráfico da figura-16, a inclinação das retas (γ) é expressa

por:

$$-\frac{d \ln(W / W_0)}{d\phi} = \gamma$$

$$d \ln(W / W_0) = -\gamma \cdot d\phi$$

cuja solução é dada por:

$$W = W_0 \cdot e^{-\gamma \cdot \phi} \quad (37)$$

onde ϕ mede a concentração do soluto de tamanho V_s , e W_0 corresponde ao peso de Rosenbluth medido na ausência de solutos.

Uma maneira alternativa de analisar $W=W(\phi)$ que apresentaremos a seguir é original e corresponde a uma contribuição importante deste trabalho. O ponto de partida dessa análise considera que os valores médios das configurações do polímero na rede são dados por:

$$\langle Rg^2 \rangle = \frac{\sum W \cdot Rg^2}{\sum W} \quad (38)$$

e que a derivada do valor médio do raio de giração ao quadrado em relação à concentração ϕ é nula. Lembrando que $\langle Rg_i^2 \rangle$ é independente de ϕ , e que o peso $\langle W_i \rangle$ desta configuração é dependente de ϕ ; a derivada da equação acima:

$$\frac{d \langle Rg^2 \rangle}{d\phi} = \frac{d}{d\phi} \left(\frac{\sum W \cdot Rg^2}{\sum W} \right) = 0 \quad (39)$$



leva à igualdade

$$\frac{\sum W' \cdot Rg^2}{\sum W'} = \frac{\sum W \cdot Rg^2}{\sum W} \quad (40)$$

onde $W' = \frac{dW}{d\phi}$.

Esta equação mostra que o valor do raio de giração quadrático médio calculado pela média ponderada pelo peso W fornece o mesmo resultado que o valor calculado com o peso W' : isto implica que $W = \text{cte} \cdot W'$. Uma das funções candidatas a solução e que satisfaz esta igualdade é uma função exponencial expressa por:

$$W = W_0 \cdot e^{-\gamma \cdot \phi}$$

onde $-\gamma$ é uma constante.

A fração de soluto usada nas análises anteriores deve levar em conta que W é função tanto de V_s quanto de n_s . Portanto, $\phi = \phi(n_s, V_s, n_w, V_w)$, tal que o volume total seja $V_T = n_s \cdot V_s + n_w \cdot V_w$. As grandezas de concentração possíveis são:

- fração de volume ocupado $\phi = \frac{n_s \cdot V_s}{V_T}$

- concentração molar $\phi = \frac{n_s}{V_T}$

- fração relativa do volume ocupado pelo soluto em relação ao

solvente. $\phi = \frac{n_s \cdot V_s}{n_w \cdot V_w}$

Do ponto de vista formal, a mudança de uma unidade para outra, implica em valores diferentes de γ . Como veremos a frente γ é uma função do raio de giração, e pode ser determinado a partir dos gráficos de $\langle Rg_i^2 \rangle$ versus $\langle W_i \rangle$ mostrados na figura-14. Para cada tipo de unidade de concentração ϕ , a função que descreve γ em função de Rg^2 é diferente. O valor de ϕ que escolhemos foi a fração relativa:

$$\phi = \frac{n_s \cdot V_s}{n_w \cdot V_w}$$

onde, neste caso, γ é simplesmente uma função linear de Rg^2 .

A outra motivação para escolher esta expressão para ϕ é experimental, onde se tem demonstrado em vários trabalhos que a adição de diferentes solutos neutros à solução de Apo-mioglobina e Citocromo-c, desnaturadas em pH ácido, leva ao enovelamento destas proteínas (Marão, 2001; Gekko *et al*, 1999; Pielak *et al*; 1998; Neves,



1996). Os resultados destes estudos mostram também que a taxa de variação da energia livre de enovelamento é diretamente proporcional ao volume do soluto utilizado, e à taxa de variação do potencial químico da água ($\mu_w - \mu_{w0} = RT \ln a_w$, onde a_w é a atividade de água da solução) promovida pela adição do soluto (Marão, 2001). Vamos mostrar que esta escolha de ϕ reproduz naturalmente estes resultados experimentais. Para tanto vamos relembrar que o potencial químico de excesso do modelo de proteína é dado por

$$\beta\mu^{ex} = -\ln \frac{W}{W_0}$$

substituindo nesta expressão:

$$W = W_0 \cdot e^{-\gamma \cdot \phi} \quad \text{e} \quad \phi = \frac{n_s \cdot V_s}{n_w \cdot V_w}$$

temos que:

$$\beta\mu^{ex} = \gamma \cdot \left(\frac{n_s V_s}{n_w V_w} \right)$$

Lembrando que a razão entre número de moles de soluto dissolvidos em $n_w V_w$ moles de água esta diretamente relacionado à atividade do solvente pela expressão:



$$\ln a_w = -\frac{n_s}{n_w} \quad (41)$$

onde n_s/n_w é a osmolalidade da solução (Colombo, 1996), temos que o potencial químico de excesso para uma proteína dissolvida em uma solução de n_s partículas rígidas de raio V_s e n_w moléculas de água é dado por:

$$\beta\mu^{ex} = -\gamma \cdot \frac{V_s}{V_w} \ln a_w \quad (42)$$

Devemos notar que, para baixas concentrações de soluto, a escolha de ϕ em termos da razão entre $n_s V_s / n_w V_w$, leva ao resultado acima. Como se pode notar, $\beta\mu^{ex}$ aumenta com V_s , e varia linearmente com $\ln(a_w)$. Este resultado é exatamente o que é observado, por exemplo, no re-novelamento de Apo-Mb (Marão, 2001) e Citocromo-c (Pielak *et al*, 1998) induzido por diferentes solutos. O aspecto mais notável é que a reprodução destes resultados experimentais ocorre sem a necessidade de qualquer tipo de qualquer aproximação no modelo.

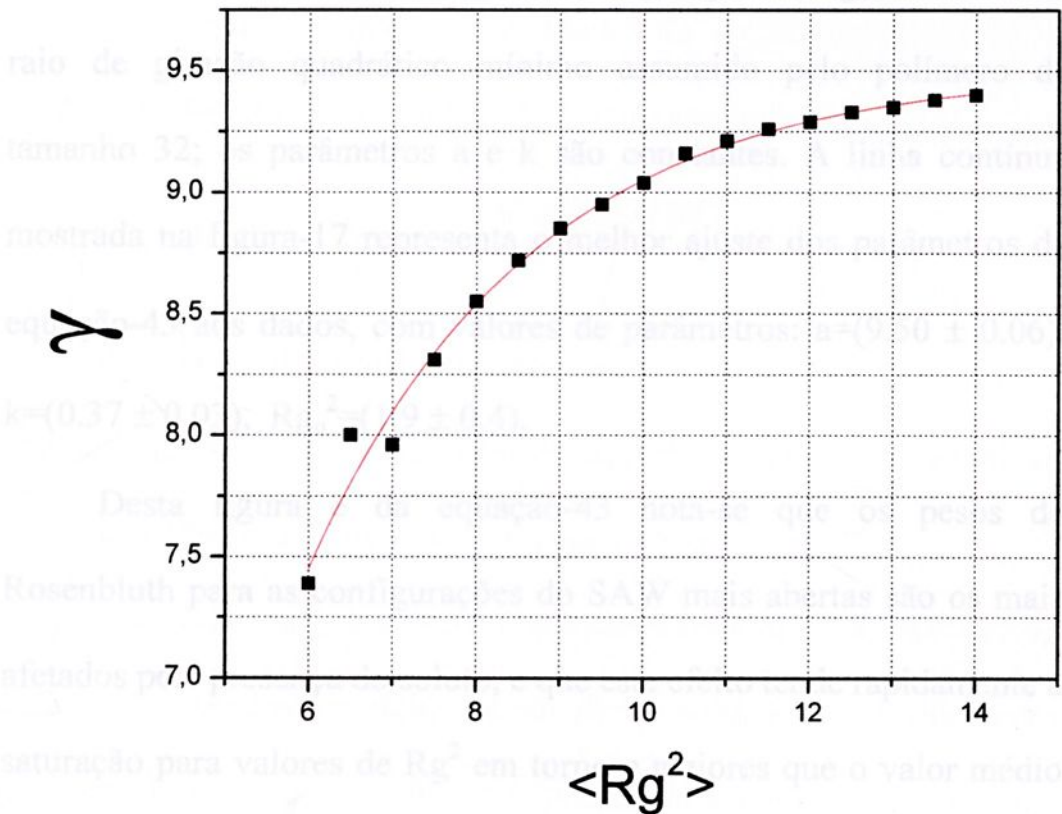


Os resultados experimentais antes mencionados tem sido, entretanto, analisados de maneiras distintas. A interpretação de Marão et. al. (manuscrito em redação), relaciona o fator γ à hidratação da superfície exposta da proteína ao solvente numa dada configuração. Outros autores sugerem que este fator é determinado pelo volume excluído entre a proteína e o soluto, e é calculado como sendo proporcional a $\frac{4\pi}{3} \cdot (R_p + r_s)^3$, onde R_p e r_s são, respectivamente, os raios da proteína e do soluto.

Com o objetivo de investigar se o modelo SAW na presença de solutos é capaz de distinguir entre estas duas possibilidades consideramos o gráfico de $\langle R_g^2 \rangle$ versus $\langle W_i \rangle$ mostrado na figura-14. Este gráfico mostra que para raios de giração menores, a mudança no valor médio de $\langle W_i \rangle$ é menor que a observado em raios de giração maiores. Estas diferenças podem ser quantificadas a partir dos gráficos de $\langle W_i \rangle$, medidos a valor de raio de giração constante, com a concentração ϕ . A figura-16 mostra estes gráficos representativos para quatro valores de raio de giração distintos. De acordo com a equação-37, $\ln \langle W \rangle / \langle W_0 \rangle$ é diretamente proporcional a ϕ : por outro lado, os gráficos da figura-16 mostram que $\ln \langle W \rangle / \langle W_0 \rangle$ é linearmente



dependente de ϕ , quando $\phi = n_s V_s / n_w V_w$. Estes mesmos tipos de gráfico foram construídos utilizando ϕ em outras unidades, sendo que nestes



outros casos, este tipo de linearidade não foi observado.

Figura-17: Valores de γ , obtidos das inclinações das retas da figura-16, versus R_g^2 . O ajuste desta função nos fornece a relação $\gamma = a.(1 - \exp[-k.(R_g^2 - R_{g_0}^2)])$, com $a = (9.50 \pm 0.06)$, $k = (0.37 \pm 0.03)$ e $R_{g_0}^2 = (1.9 \pm 0.4)$

A constante de proporcionalidade, γ , entre $\ln \langle W \rangle / \langle W_0 \rangle$ e ϕ foi determinada por regressão linear para cada valor de $\langle R_g^2 \rangle$. Estes

resultados são mostrados na figura-17, no gráfico de γ versus Rg^2 . A dependência de γ com Rg^2 foi ajustada à função exponencial:

$$\gamma = a \cdot \left(1 - e^{-k \cdot (Rg^2 - Rg_0^2)}\right) \quad (43)$$

onde Rg^2 é o valor de Rg^2 em qualquer ponto, Rg_0^2 é o valor de raio de giração quadrático mínimo assumido pelo polímero de tamanho 32; os parâmetros a e k são constantes. A linha contínua mostrada na figura-17 representa o melhor ajuste dos parâmetros da equação-43 aos dados, com valores de parâmetros: $a = (9.50 \pm 0.06)$, $k = (0.37 \pm 0.03)$, $Rg_0^2 = (1.9 \pm 0.4)$.

Desta figura e da equação-43 nota-se que os pesos de Rosenbluth para as configurações do SAW mais abertas são os mais afetados pela presença do soluto, e que este efeito tende rapidamente a saturação para valores de Rg^2 em torno e maiores que o valor médio do raio de giração quadrático de todas as configurações (da tabela-04, o valor $\langle Rg^2 \rangle = 11.8$ para o polímero de tamanho 32). O valor de Rg_0^2 , determinado no ajuste, corresponde às configurações cujos valores de W não são afetadas pela presença do soluto. Do ajuste, $Rg_0^2 = 1.9 \pm 0.4$, que para o polímero de tamanho 32 é próximo ao raio de giração das configurações maximamente compactadas.

A equação-43 nos permite avaliar se o efeito de soluto no potencial químico do polímero é um fenômeno associado à superfície de hidratação, ou ao volume excluído proteína-soluto. Para qualquer configuração do polímero, a exponencial da equação-43 pode ser expandida, uma vez que $k < 1$ e abaixo da região de saturação, o produto $k.(Rg^2 - Rg_0^2)$ é da ordem de 1, cujo resultado é:

$$\gamma \cong a.k.(Rg^2 - Rg_0^2) + a.\frac{k^2.(Rg^2 - Rg_0^2)^2}{2} + \dots \quad (44)$$

Portanto, para dada configuração do polímero, o valor de γ cresce com Rg^2 , ou escala com a área do polímero acessível ao solvente e não com o covolume polímero-soluto.

Este resultado, junto ao resultado expresso pela equação-42 permite-nos prever o efeito da adição de solutos no enovelamento protéico como sendo devido à diminuição do espaço configuracional do polímero devido à interação de corpo rígido. Como consequência, o potencial químico destas configurações aumenta na presença do soluto em proporção ao seu raio de giração quadrático, desestabilizando mais as configurações com maior área de superfície acessível ao solvente, que as configurações mais compactas e de menor área. Como visto, o efeito escala-se linearmente com o

T. 1324/05



100



tamanho do soluto e com o potencial químico do solvente. Portanto, um modelo simples, do polímero SAW na rede interagindo com solutos via interações de corpo rígido é capaz de reproduzir as características termodinâmicas essenciais observadas em experimentos de indução do re-enovelamento de proteínas por solutos neutros, e as características do comportamento termodinâmico de soluções ternárias compostas de água, proteínas desnaturadas e solutos de diferentes tamanhos.

Diferente do modelo SAW, este modelo incorpora formas de energia de interação entre os 27 monômeros que constituem o modelo de proteína a ser investigado. A intenção destes estudos é, então, verificar como a mudança do potencial químico do polímero promovido pela presença de solutos afeta as propriedades termodinâmicas do modelo de proteína.

Este modelo corresponde a um heteropolímero formado por três tipos de monômeros distintos (ABC), simulado numa rede cúbica simples. Este heteropolímero está representado na figura 03, sendo sua temperatura de enovelamento igual a $T=1.5$ (unidades de kT) para

Capítulo 7

Resultado e Discussão - Heteropolímero

Nesta segunda parte do trabalho, analisamos o efeito de solutos neutros no enovelamento protéico utilizando um modelo de rede exato, sugerido por Socci e Onuchic (Socci & Onuchic, 1994,1996). Diferente do modelo SAW, este modelo incorpora formas de energia de interação entre os 27 monômeros que constituem o modelo de proteína a ser investigado. A intenção destes estudos é, então, verificar como o aumento do potencial químico do polímero promovido pela presença de solutos altera as propriedades termodinâmicas do modelo de proteína.

Este modelo corresponde a um heteropolímero formado por três tipos de monômeros distintos (ABC), simulado numa rede cúbica simples. Este heteropolímero está representado na figura-03, sendo sua temperatura de enovelamento igual a $T=1.9$ (unidades de $k.T$) para



interação entre os monômeros igual a ± 3 , cujo potencial de interação entre os monômeros é representado pela matriz dada pela equação-36.

Estas simulações foram realizadas na presença de solutos de diferentes tamanhos a diferentes concentrações, numa rede de $120 \times 120 \times 120$ e com um número de passos de Monte Carlo igual a $MCS = 2 \times 10^9$. Os solutos usados nestas simulações são prismas de tamanhos 27 ($3 \times 3 \times 3$), 12 ($2 \times 2 \times 3$), 08 ($2 \times 2 \times 2$) e 04 ($2 \times 2 \times 1$).

Destas simulações, os parâmetros físicos medidos são Raio de giração quadrático médio $\langle R_g^2 \rangle$, energia de interação média $\langle E \rangle$ entre os monômeros do polímero ligados não covalentemente, e número de contatos médios favoráveis para formar o estado nativo $\langle Q \rangle$.

A figura-18 apresenta a variação do raio de giração do polímero com a fração de soluto de tamanho 27, para três tipos de interação entre os monômeros, interação ± 1 , ± 2 e ± 3 .



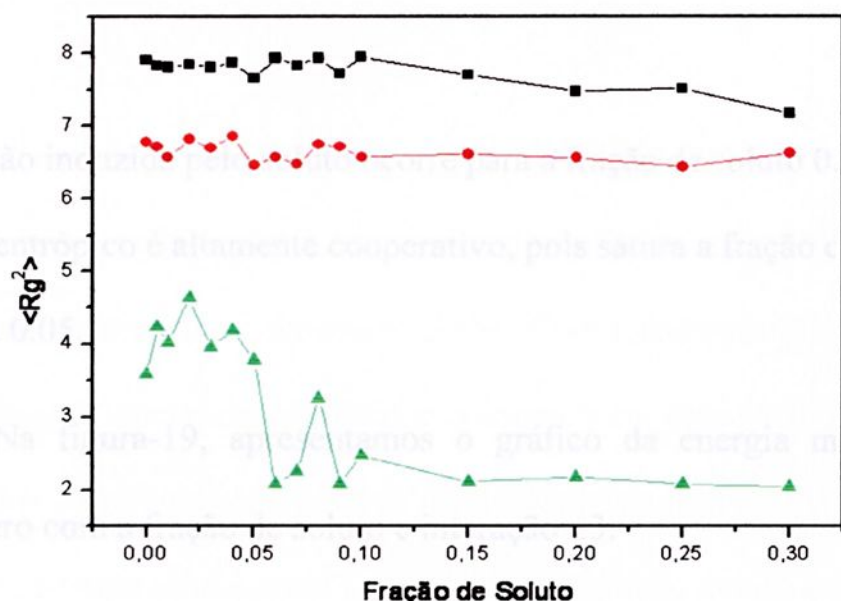


Figura-18: Variação do raio de giração com a fração de soluto para interações ± 1 (■), ± 2 (●) e ± 3 (▲) a $T=1.9$. O tamanho do soluto é $3 \times 3 \times 3$ unidades da rede.

Com a temperatura da simulação fixa, e igual a 1.9, o aumento do módulo da energia de interação corresponde à diminuição de temperatura. Nesta figura nota-se que a baixa energia de interação (± 1 , ± 2), ou equivalentemente à alta temperatura, o polímero encontra-se esticado ($\langle Rg^2 \rangle \approx 7$), e que o aumento da concentração de soluto pouco afeta o raio de giração. Este resultado é consistente com as simulações do SAW sem interações térmicas. Para o modelo com energia ± 3 , o efeito da concentração de soluto a temperatura de enovelamento é o de favorecer fortemente a estabilização do estado nativo, deslocando o equilíbrio na direção do estado nativo com a adição de pequenas quantidades de soluto de tamanho $3 \times 3 \times 3$, sendo que a metade da

transição induzida pelo soluto ocorre para a fração de soluto 0.07. Este efeito entrópico é altamente cooperativo, pois satura a fração de soluto igual a 0.05.

Na figura-19, apresentamos o gráfico da energia média do polímero com a fração de soluto e interação ± 3 .

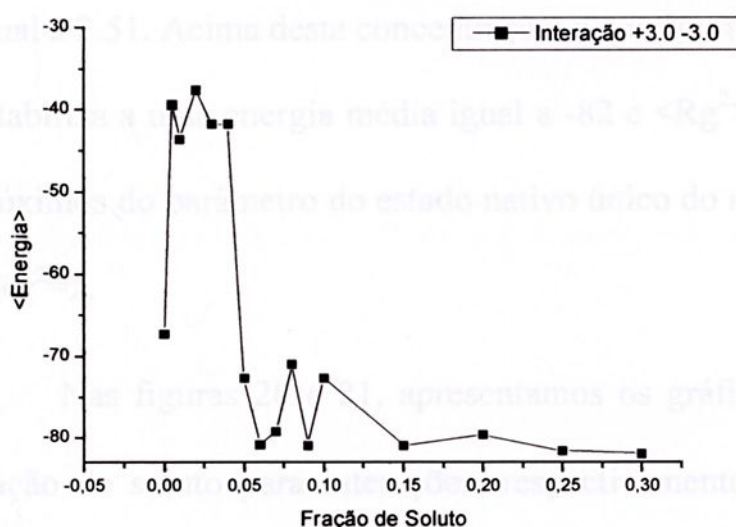


Figura-19: Variação da energia média do polímero com a fração de soluto. A energia do estado nativo vale -84.

Observa-se nesta figura que a primeira adição de soluto promove a desestabilização do estado nativo, com um pequeno aumento do raio de giração médio de cerca de 7%. A subsequente adição de soluto estabiliza a energia e o raio de giração até o ponto de transição, extremamente cooperativa na fração de soluto 0.05.

É provável que o primeiro salto da energia com a adição de soluto esteja relacionado ao aumento do potencial químico do polímero observado na simulação SAW. Com o aumento posterior da concentração do soluto acontece o colapso, para estados muito mais próximos da estrutura nativa que o observado na ausência do soluto; que tem energia média igual à -68 e raio de giração médio quadrático igual a 3.51. Acima desta concentração, a configuração do polímero se estabiliza a uma energia média igual a -82 e $\langle Rg^2 \rangle = 2$, que são muito próximos do parâmetro do estado nativo único do modelo, com $E = -84$ e $Rg^2 = 2$.

Nas figuras 20 e 21, apresentamos os gráficos de $\langle E \rangle$ versus fração de soluto para interações, respectivamente, ± 2 e ± 1 . Nestes casos, a razão energia de interação do modelo por temperatura é muito baixa e o efeito do soluto sobre o sistema se assemelha ao caso sem interação. Portanto só a restrição do espaço configuracional é insuficiente para estabilizar o estado nativo.

Figura 21. Variação da energia média do polímero com a fração de soluto no caso para interação ± 1 . Temperatura do soluto vale 3.513.

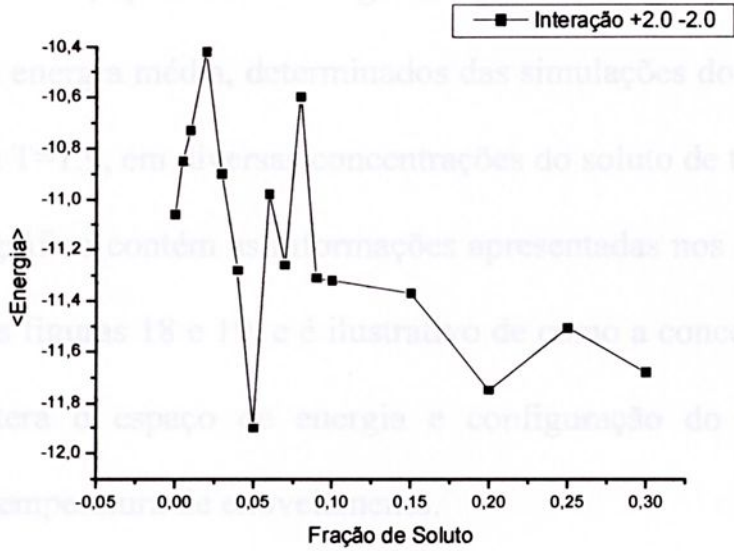


Figura-20: Variação da Energia média do polímero com a fração de soluto na rede para interação ± 2 , $T=1.9$. O tamanho do soluto vale $3 \times 3 \times 3$.

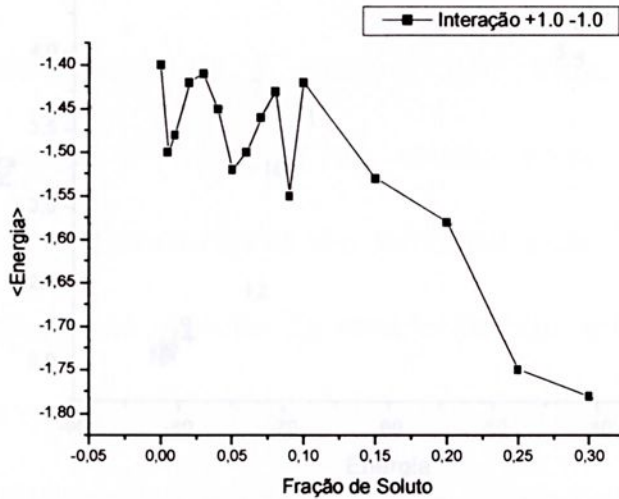


Figura-21: Variação da Energia média do polímero com a fração de soluto na rede para interação ± 1 , $T=1.9$. O tamanho do soluto vale $3 \times 3 \times 3$.

Na figura-22, apresentamos o gráfico do raio de giração médio em função da energia média, determinados das simulações do modelo de proteína, a $T=1.9$, em diversas concentrações do soluto de tamanho $3 \times 3 \times 3$. Este gráfico contém as informações apresentadas nos gráficos mostrados nas figuras 18 e 19, e é ilustrativo de como a concentração de soluto altera o espaço de energia e configuração do modelo simulado na temperatura de enovelamento.

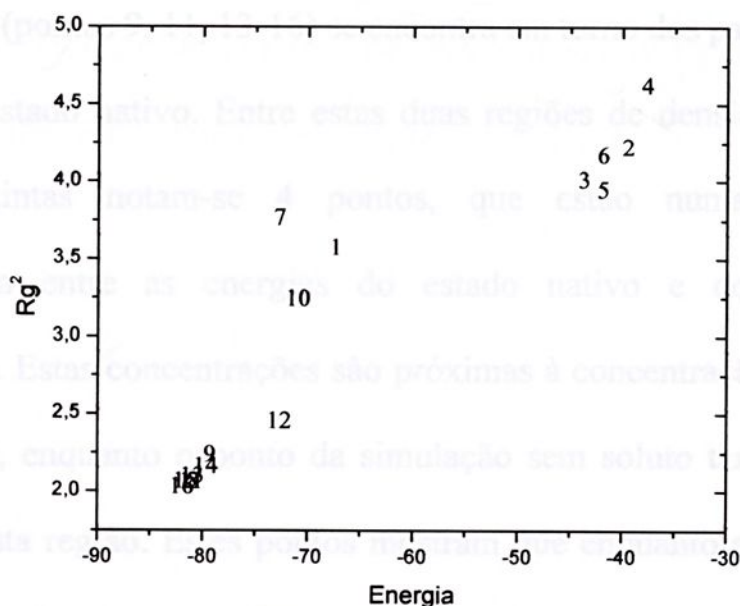


Figura-22: Correlação entre raio de giração quadrático médio e energia média do polímero na presença de concentrações variadas de soluto tamanho $3 \times 3 \times 3$.

Os pontos do gráfico da figura-22 estão numerados em ordem crescente de acordo com a concentração de soluto, isto é, o ponto 1 corresponde a uma fração de soluto igual a zero, o ponto 2 corresponde a uma fração de soluto igual a 0.5%, e assim sucessivamente até o ponto 16 cuja fração de soluto equivale a 30% de ocupação da rede. Nesta figura nota-se nitidamente que a adição de soluto a concentrações maiores que 0.5% (pontos de 2 a 6) desloca a distribuição do modelo na simulação para energias entre -40 e -45. Para concentração de soluto maior e/ou igual a 0.5%, toda a distribuição (pontos 9, 11, 13-16) se encontra em torno dos parâmetros típicos do estado nativo. Entre estas duas regiões de densidades de pontos distintas notam-se 4 pontos, que estão numa região intermediária entre as energias do estado nativo e do estado desnaturado. Estas concentrações são próximas à concentração média da transição, enquanto o ponto da simulação sem soluto também se encontra nesta região. Estes pontos mostram que enquanto a energia média nestas simulações, típicas ao estado de transição, tem energia média em torno de -70, o raio de giração médio varia bastante entre os estado segregados pela presença do soluto.



Há ainda uma grande região compreendida entre os valores de energias -65 e -45, para o qual não encontramos ponto algum. Esta é uma região com características de uma barreira de potencial ao longo da transição $N \rightarrow D$. Estes resultados sugerem portanto que o estado de transição para este modelo tem energia interna próxima a -70. A análise posterior dos dados da simulação baseadas na repesagem pelo método do histograma suporta esta interpretação.

Por fim, para melhor visualizar esta transição de fase, foi feito um gráfico tri-dimensional onde os eixos correspondem ao raio de giração quadrático médio por unidade monomérica, energia média e fração de soluto. Este gráfico está mostrando na figura-23.

Figura-23: Variação da energia média do polímero e do raio de giração quadrático médio por unidade monomérica e com a fração de soluto. Há uma nítida transição de fase entre a região de alta energia média e quadrático médio (baixa fração de soluto) e a região de baixa energia média e quadrático médio (alta fração de soluto).

Na figura-23 evidenciamos que o aumento da fração de soluto na rede conduz o polímero para conformações mais compactas (baixo raio de giração médio) e próximas ao estado nativo (energia próxima de -84).

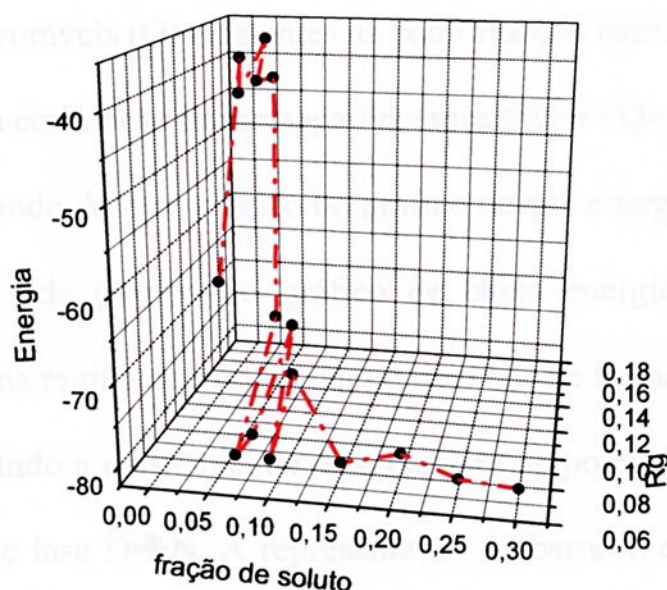


Figura-23: Variação da energia média do polímero e do raio de giração quadrático médio por unidade monomérica e com a fração de soluto. Nota-se uma nítida transição de fase entre a região de alta energia (alto Rg quadrático e baixa fração de soluto) e a região de baixa energia (menor Rg quadrático e maior fração de soluto)

Na figura-23 evidenciamos que o aumento da fração de soluto na rede conduz o polímero para conformações mais compactas (baixo raio de giração médio) e próximas ao estado nativo (energia próxima de -84).

Uma análise similar se faz correlacionando a energia média de interação dos monômeros ligados não covalentemente com o número de contatos favoráveis (Q) existentes na conformação nativa. A figura-24 mostra uma correlação linear negativa entre $\langle E \rangle$ e $\langle Q \rangle$ para fração de soluto variando de zero (região do gráfico de alta energia) até 30% de soluto na rede (região do gráfico de baixa energia). Nota-se, novamente, uma região do gráfico para o qual não se formam contatos nativos, sugerindo a existência de uma barreira de potencial ao longo da transição de fase $D \rightarrow N$. A representação da barreira de potencial está mostrada na figura-25, que representa a energia em função de uma coordenada de reação da transição $D \rightarrow N$.

Figura 24. Variação de energia com o número de contatos favoráveis para uma simulação com interação ϕ_1 com concentrações variáveis de soluto comunita 1x1x1. A concentração de soluto varia de 0% (região de alta energia e baixa Q) até 30% (região de baixa energia e alta Q).



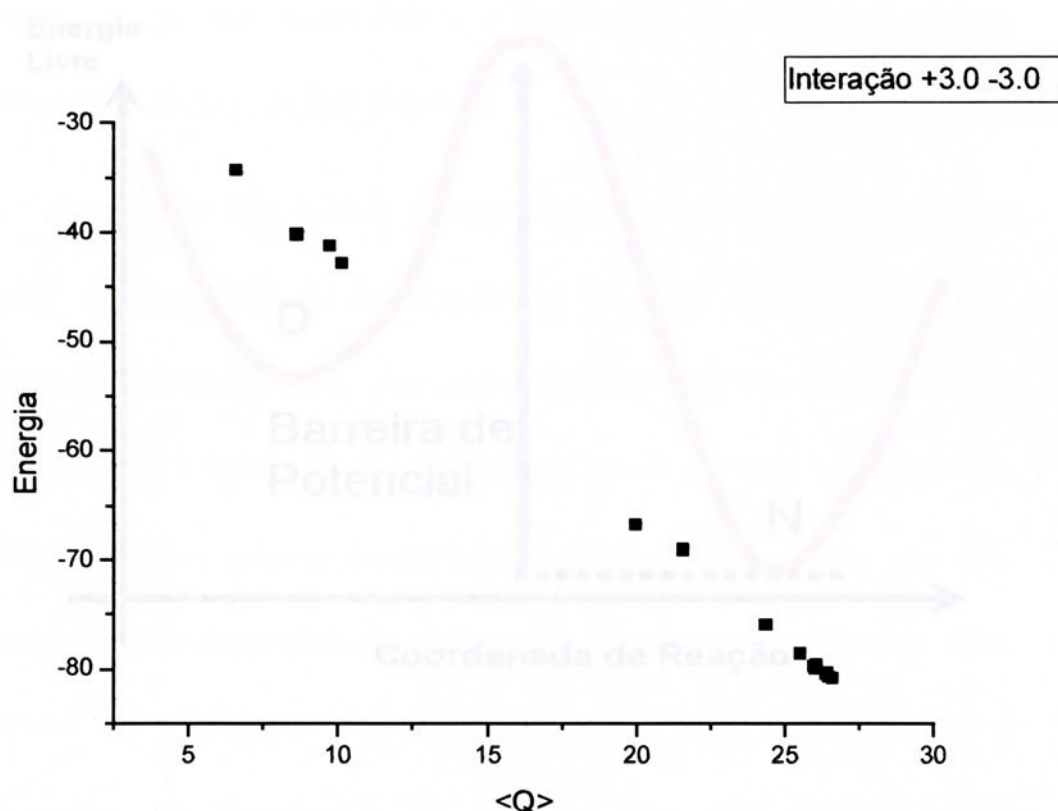


Figura-23: Poço e barreira de potencial na transição D $\rightarrow$ N. A barreira de potencial que o polímero tem de vencer para ir do estado desnaturalizado para o estado nativo.

Figura-24: Variação de energia com o número de contatos favoráveis para uma simulação com interação ± 3 com concentrações variadas de soluto tamanho 3x3x3. A concentração de soluto varia de 0% (região de alta energia e baixo Q) até 30% (região de baixa energia e alto Q)

Simulações do Modelo de Proteína para Solutos de Tamanhos Diferentes

Analisaremos agora a variação da energia média do polímero com a fração de soluto na temperatura de enovelamento $T=1.9$.

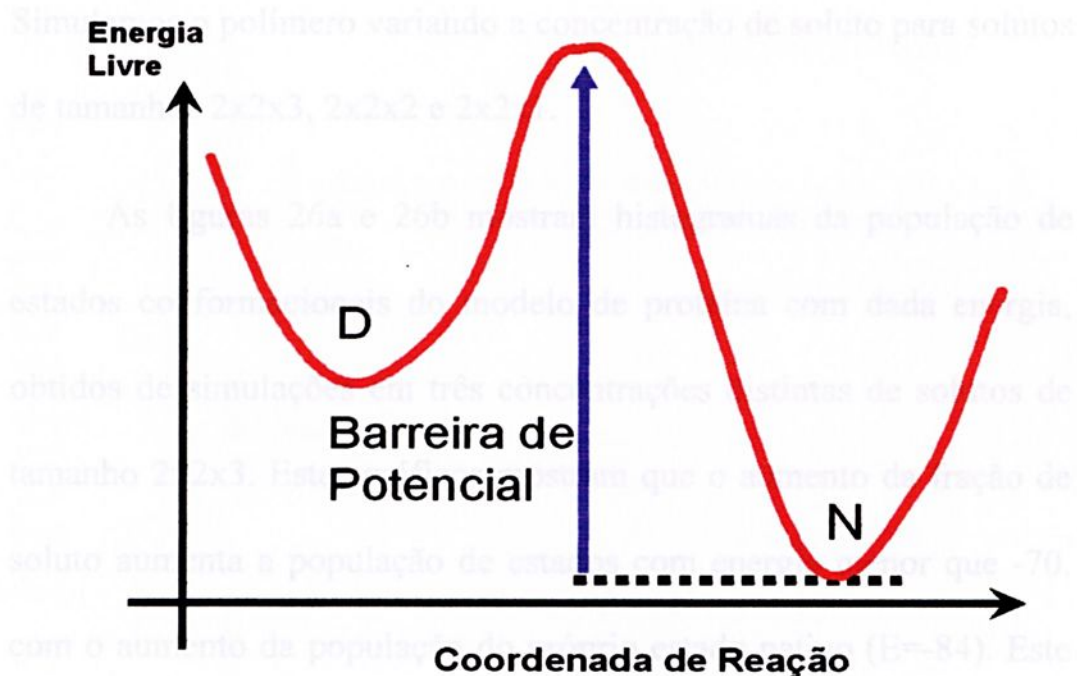


Figura-25: Poço e barreira de potencial na transição $D \rightarrow N$. A barreira de potencial que o polímero tem de vencer para ir do estado desnaturado para o estado compacto está representada.

Simulações do Modelo de Proteína para Solutos de Tamanhos Distintos

Analisaremos agora a variação da energia média do polímero com a fração de soluto na temperatura de enovelamento $T=1.9$.

Simulamos o polímero variando a concentração de soluto para solutos de tamanhos $2 \times 2 \times 3$, $2 \times 2 \times 2$ e $2 \times 2 \times 1$.

As figuras 26a e 26b mostram histogramas da população de estados conformacionais do modelo de proteína com dada energia, obtidos de simulações em três concentrações distintas de solutos de tamanho $2 \times 2 \times 3$. Estes gráficos mostram que o aumento da fração de soluto aumenta a população de estados com energia menor que -70, com o aumento da população do próprio estado nativo ($E=-84$). Este aumento de população próxima ao estado nativo ocorre com a diminuição da população de estados com alta energia, cuja distribuição larga está centrada em torno de $E=-40$. É interessante notar que este valor de energia ($E=-40$) é o valor de energia médio observado nos gráficos das figuras 18 e 22, em torno do qual o polímero está segregado quando na presença de concentrações de soluto menores que a concentração da transição.



Frequência

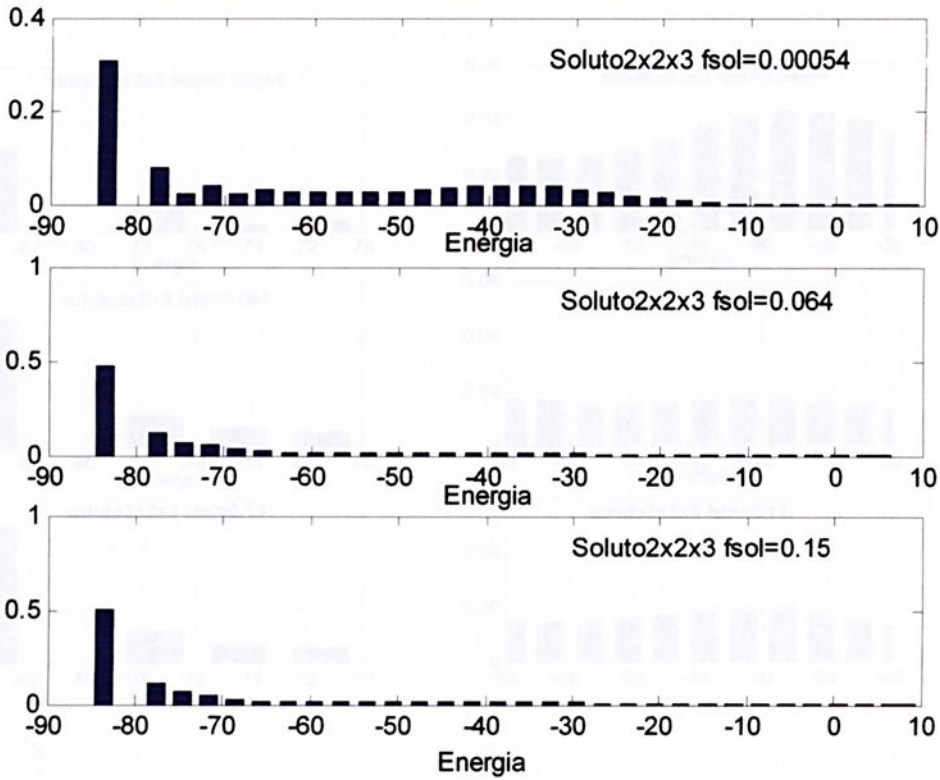


Figura-26a: Variação da população de estados conformacionais possuindo certa energia E com a fração de soluto. Verifica-se que o aumento da fração de soluto na rede aumenta a população de estados de baixa energia e diminui a população de estados de alta energia.

Frequência

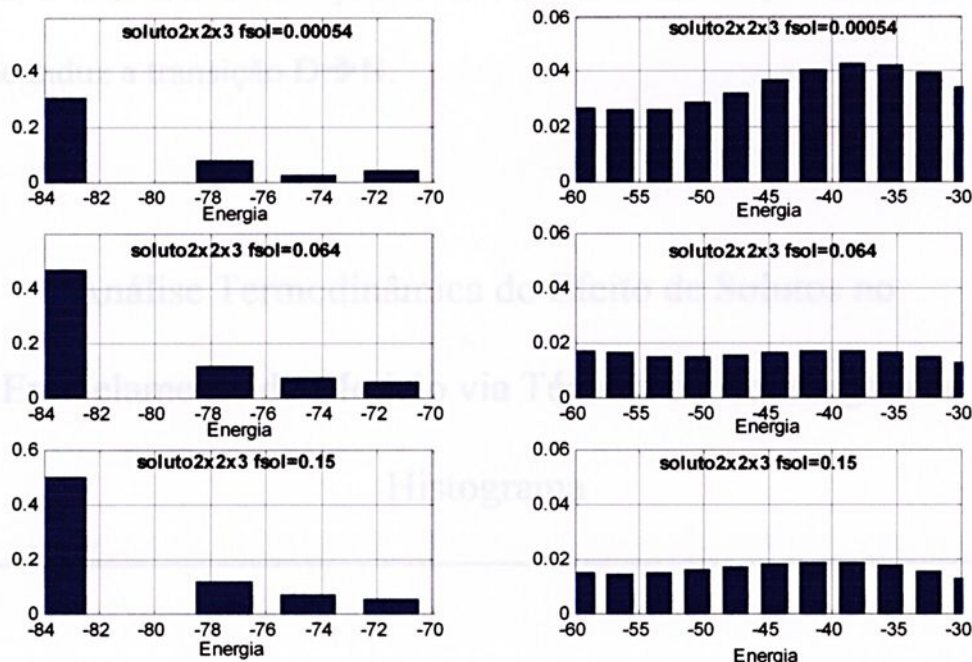


Figura-26b: Partição dos histogramas da figura-26a para melhor visualização da mesma, para solutos tamanho 2x2x3.

Também observamos que o aumento da concentração de soluto de tamanho 2x2x2 facilita o enovelamento de nosso modelo de proteína.

Estes histogramas deixam claro que para um tamanho fixo de soluto, a medida em que se aumenta a concentração de soluto na rede ocorre uma diminuição da população de configurações estendidas do polímero e um aumento de população com configurações mais

compactas, informando que o aumento da concentração de soluto na rede induz a transição $D \rightarrow N$.

Análise Termodinâmica do Efeito de Solutos no Enovelamento do Modelo via Técnica da Repesagem do Histograma

A técnica de repesagem do histograma consiste em separar o efeito de temperatura (que é um parâmetro da simulação) dos efeitos entrópicos, característicos do sistema e independentes da temperatura (Ferrenber & Swendsen, 1988 e 1989; Silva & Felício, 2002).

Numa simulação Monte Carlo, o número de vezes que cada estado aparece obedece à distribuição de Boltzmann, mas a contagem do número de vezes que uma dada energia é encontrada é proporcional ao produto do fator de Boltzmann pela degenerescência daquele nível de energia, conforme a definição de probabilidade normalizada (Hill, 1964, Macedo & Luiz, 1975) mostrada na equação-45:

$$P(E) = \frac{\Omega(E) \cdot e^{-\beta \cdot E}}{Z} \quad (45)$$



sendo $\Omega(E)$ o número de estados com energia E (degenerescência), $\beta=1/k_B.T$, onde T é a temperatura absoluta e k_B é a constante de Boltzmann, e Z a função de partição do sistema, expressa por:

$$Z = \sum_E \Omega(E) \cdot e^{-\beta.E} \quad (46)$$

Na simulação Monte Carlo, se o histograma de energia para uma dada temperatura cobrir uma ampla faixa de energia, garantindo que todas as configurações tenham sido visitadas, então a frequência deste histograma pode ser confundida com a probabilidade de uma dada configuração com energia E aparecer nesta temperatura. Assim, uma única simulação (longa o suficiente para cobrir toda a faixa de energia) basta para conhecermos a probabilidade de uma dada configuração numa certa temperatura.

Se for utilizado um modelo de proteína exato no qual existe um único estado enovelado de mínima energia, será possível determinar a função de partição e medir a probabilidade com que uma dada configuração com energia E apareça a temperatura T' . O que se faz nesse caso é "repesar" o histograma para obtê-lo em uma outra temperatura, sem a necessidade de repetir a simulação (Ferrenberg & Swendsen, 1988). Vamos exemplificar esta técnica aplicado-a



especificamente a um modelo exato de polímero na rede, que é o caso do heteropolímero usado neste trabalho.

Simulações longas deste heteropolímero foram realizadas para se obter o histograma em uma ampla faixa de energia. Se pudermos assumir que o histograma de energia $H(E)$ se confunda com $P(E)$, dado pela equação-45, isto é, $H(E) \approx P(E)$, como o estado nativo do modelo é único e com energia $E = -84$, temos que a densidade de estados para este estado nativo é unitária ($\Omega(-84) = 1$). Portanto, a probabilidade medida no histograma normalizado para o estado nativo ($P(-84)$) deve ser igual a:

$$H(E_N) = \frac{1 \cdot e^{-\beta E_N}}{Z}$$

onde β é calculado na temperatura da simulação. Desta forma, temos que a função de partição a temperatura T é igual a:

$$Z = \frac{e^{-\beta E_N}}{H(E_N)}$$

Conhecendo-se Z , podemos determinar $\Omega(E)$ que é independente da temperatura. Como o histograma $H(E)$ é dado por:

$$H(E) = \frac{\Omega(E) \cdot e^{-\beta E}}{Z_\beta}$$

temos que:



$$\Omega(E) = \frac{H(E)}{e^{-\beta E}} \cdot Z_{\beta} = \frac{H(E)}{e^{-\beta E}} \cdot \frac{e^{-\beta E_N}}{H(-84)} \quad (47)$$

esta é a função de distribuição de estados determinado na temperatura de simulação, que deve ser a mesma em qualquer temperatura.

Agora podemos calcular a probabilidade de encontrar um estado de energia E a qualquer temperatura β' . Este valor é dado por:

$$P_{\beta'}(E) = \frac{\Omega(E) \cdot e^{-\beta' E}}{\sum_E \Omega(E) \cdot e^{-\beta' E}}$$

Substituindo $\Omega(E)$ encontrado acima, temos que:

$$P_{\beta'}(E) = \frac{H(E) \cdot e^{-(\beta' - \beta)E}}{\sum_E H(E) \cdot e^{-(\beta' - \beta)E}} \quad (48)$$

onde, lembramos que, $H(E)$ é o histograma determinado na simulação a temperatura β .

Com a equação-48, pode-se determinar o valor médio da energia do polímero $\langle E \rangle$ na temperatura desejada, conforme equação-49:

$$\langle E \rangle = \sum_E P_{\beta'}(E) \cdot E \quad (49)$$

e a energia livre média do sistema $\langle F \rangle$, expressa por:

$$\langle F \rangle = k_B T \ln Z \quad (50)$$



Tendo os valores de $\langle E \rangle$ e $\langle F \rangle$ calculados, a entropia média $\langle S \rangle$ é determinada pela relação termodinâmica:

$$\langle F \rangle = \langle E \rangle - T \cdot \langle S \rangle \quad (51)$$

Obviamente, tendo os valores médios da energia podemos calcular o calor específico do polímero, expresso por:

$$C_V = \frac{\langle E^2 \rangle - \langle E \rangle^2}{k_B \cdot T^2} \quad (52)$$

Logo, a utilização da técnica de repesagem de histograma aplicada a um modelo exato de um polímero na rede nos permite obter os parâmetros termodinâmicos necessários à análise da transição deste polímero do estado desnaturado para o estado nativo.

Através do método de repesagem, determinamos a probabilidade de encontrarmos uma dada configuração do polímero com energia E , com número de contatos nativos Q e número de contatos quaisquer Z , ou seja, $P(E, Q, Z)$ e $\Omega(E, Q, Z)$, sendo que nestas simulações foram usados solutos de diferentes tamanhos e em diferentes concentrações.

Resultados desta Análise

Na figura-27 apresentamos o gráfico do calor específico em função da temperatura para concentração de soluto variando de zero a 50% do volume da rede, para soluto tamanho 08.

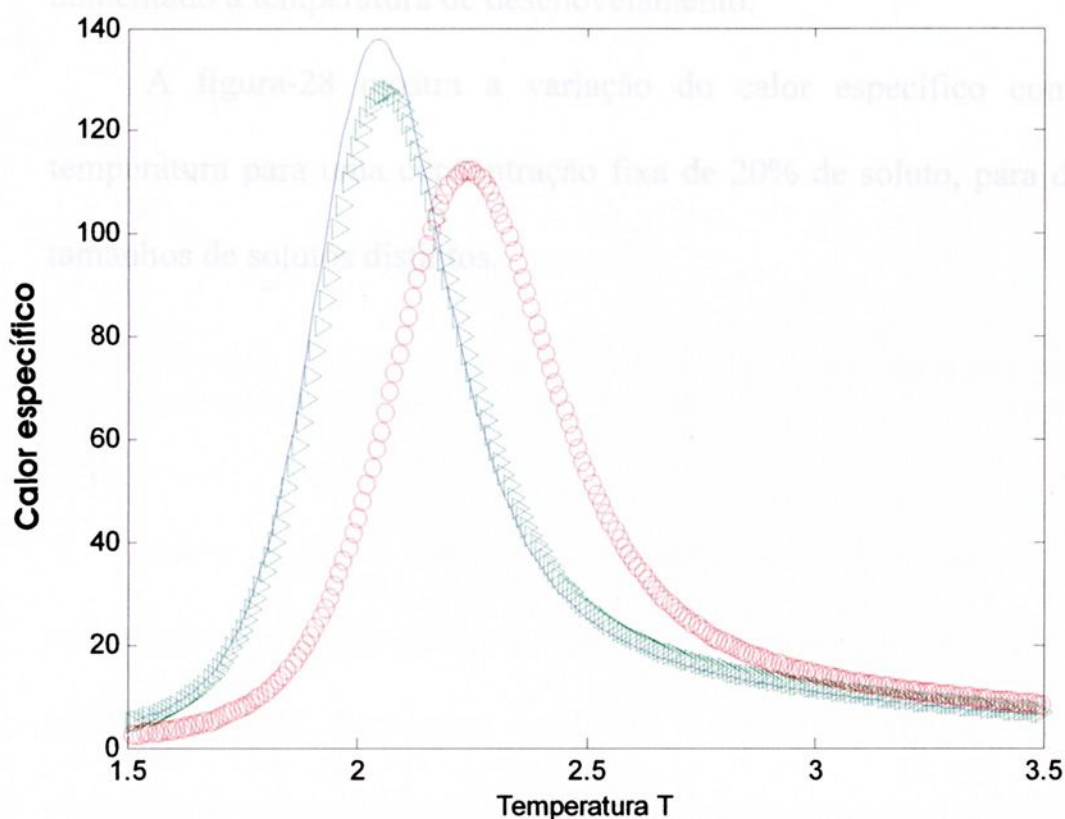


Figura-27: Calor específico como função da temperatura. O pico de absorção de calor reflete o aumento da energia na quebra das ligações dos contatos nativos não covalentes. Estas simulações foram feitas na presença de concentrações 0% (—), 20% (Δ) e 50% (O) de soluto tamanho 08.

Nesta figura observa-se que o pico do calor específico se desloca para temperaturas maiores com o aumento da concentração de soluto na rede, evidenciando a estabilização do modelo de proteína induzida pela presença do soluto. Este resultado é consistente com experimentos de desnaturação térmica (Sanchez-Ruiz *et al*; 1995), que demonstram que solutos neutros estabilizam o estado nativo, aumentando a temperatura de desenovelamento.

A figura-28 mostra a variação do calor específico com a temperatura para uma concentração fixa de 20% de soluto, para dois tamanhos de solutos distintos.

Figura 28: Calor específico em função da temperatura cujas simulações foram feitas na presença de 20% de soluto tamanho 08 (____) e tamanho 16 (____).

Nesta figura, o aumento do tamanho do soluto sugere uma maior estabilização do polímero, uma vez que o pico de absorção de calor se desloca para uma região de maior temperatura quando passamos de soluto de tamanho 08 para soluto de tamanho 16. Nota-se que esta análise é qualitativa, para fazer uma análise quantitativa deve-se tomar o cuidado de ter em conta o número de solutos na rede, sendo que para a mesma fração de soluto, são duas vezes maior para soluto maior.

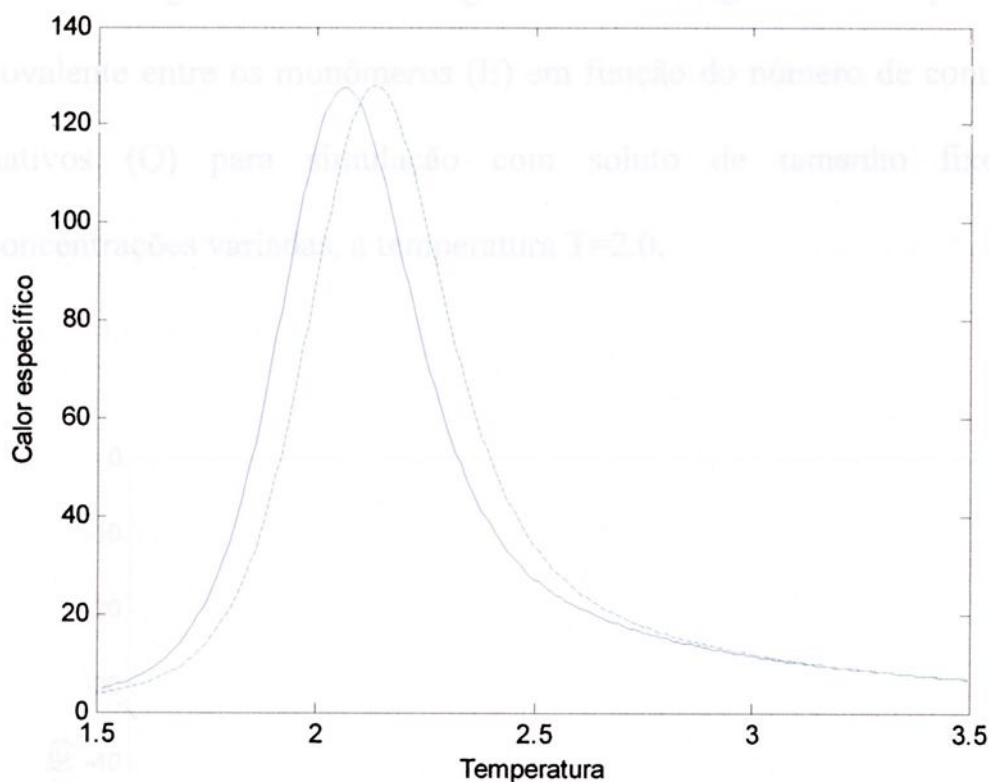


Figura 28: Calor específico em função da temperatura cujas simulações foram feitas na presença de 20% de soluto tamanho 08 (____) e tamanho 16 (____)

Nesta figura, o aumento do tamanho do soluto sugere uma maior estabilização do polímero, uma vez que o pico de absorção de calor se desloca para uma região de maior temperatura quando passamos de soluto de tamanho 08 para soluto de tamanho 16. Nota-se que esta análise é qualitativa; para fazer uma análise quantitativa deve-se tomar o cuidado de ter em conta o número de solutos na rede, sendo que para a mesma fração de soluto, são duas vezes maior para soluto maior.

Na figura-29 temos os gráficos da energia de interação não covalente entre os monômeros (E) em função do número de contatos nativos (Q) para simulação com soluto de tamanho fixo e concentrações variadas, a temperatura $T=2.0$.

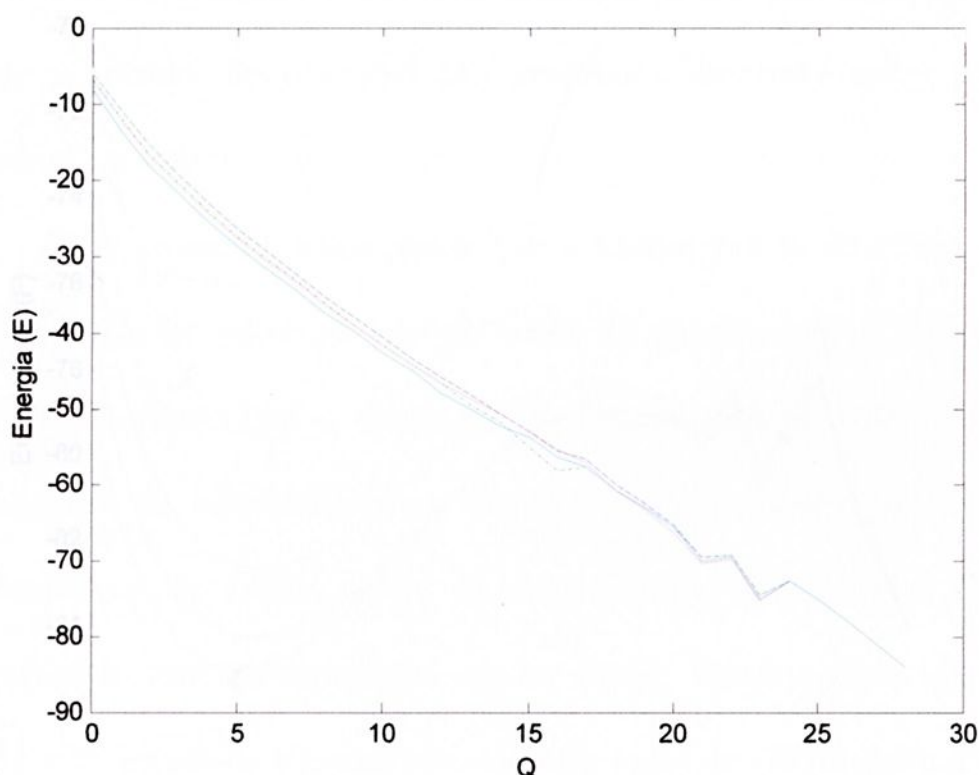


Figura-29: Energia de contato entre monômeros não ligados covalentemente em função de Q. Estas simulações foram feitas em temperatura constante e igual a $T=2.0$ na presença de soluto de tamanho 08 com concentrações variando de 0% (____), 20% (-----), 33% (-.-.-) e 50% (____)

Nota-se nesta figura que a média da energia das configurações com Q contatos nativos é pouco afetada pela presença do soluto.

A figura-30 apresenta a variação da energia livre em função do número de contatos nativos com a concentração do soluto de tamanho 08 e temperatura $T=2.0$.

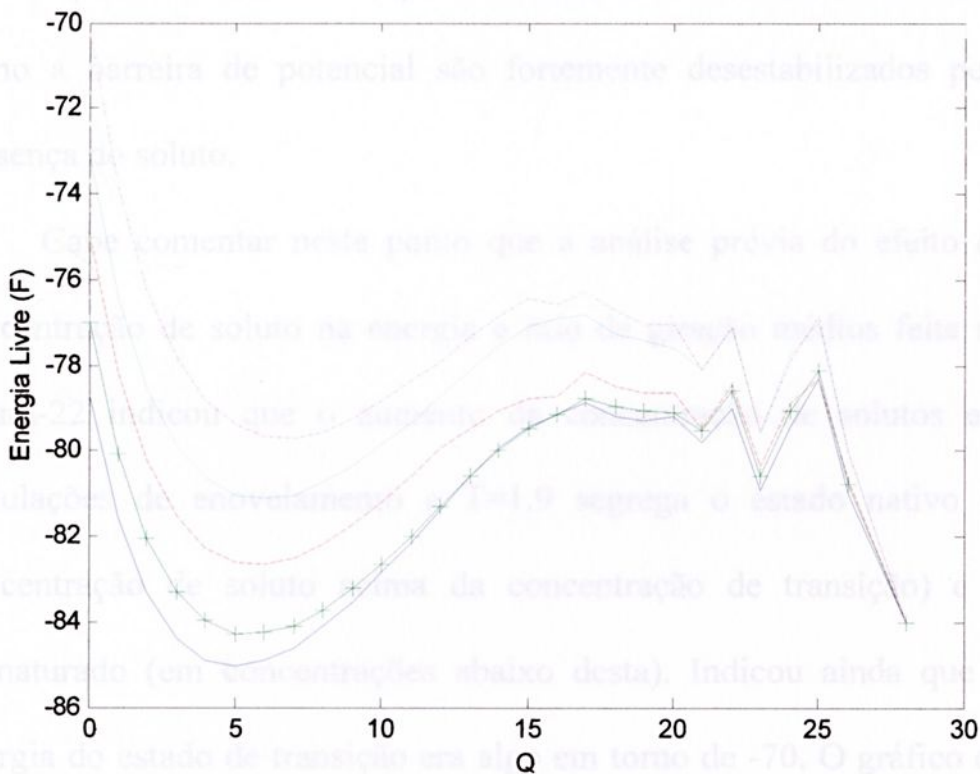


Figura-30: Energia Livre como função de Q . Estas simulações foram feitas a temperatura constante e igual a $T=2.0$ na presença de soluto de tamanho 08 com concentrações variando de 0% (____), 20% (_x_x_x_x_), 25% (____), 33% (-----) e 50% (_-_-_-).

Esta figura evidencia o aumento da energia livre do polímero com o aumento da concentração de soluto para todos os estados, com

excessão do estado nativo. Nota-se também que o estado desnaturado é muito mais desestabilizado pela presença de soluto que os estados próximos ao estado nativo. Observa-se ainda que a barreira de potencial para transitar do estado desnaturado para o estado nativo não é alterada significativamente até uma concentração de soluto igual a 25%. A partir desta concentração de soluto, tanto o estado desnaturado como a barreira de potencial são fortemente desestabilizados pela presença do soluto.

Cabe comentar neste ponto que a análise prévia do efeito da concentração de soluto na energia e raio de giração médios feita na figura-22 indicou que o aumento da concentração de solutos em simulações de enovelamento a $T=1.9$ segrega o estado nativo (à concentração de soluto acima da concentração de transição) e o desnaturado (em concentrações abaixo desta). Indicou ainda que a energia do estado de transição era algo em torno de -70. O gráfico da figura-30 mostra que o estado de transição está mais ou menos centrado em $Q=20$ (o estado de transição aqui é bastante largo). O gráfico da energia média em função do número de contatos Q (figura-29) mostra que a energia média do modelo com aproximadamente 20



contatos é igual a -70. Este resultado é consistente com a análise prévia.

A figura-31 apresenta a variação da energia livre (F) em função do número de contatos nativos (Q) com o aumento do tamanho do soluto para uma concentração fixa de 20% de soluto em $T=2.0$.

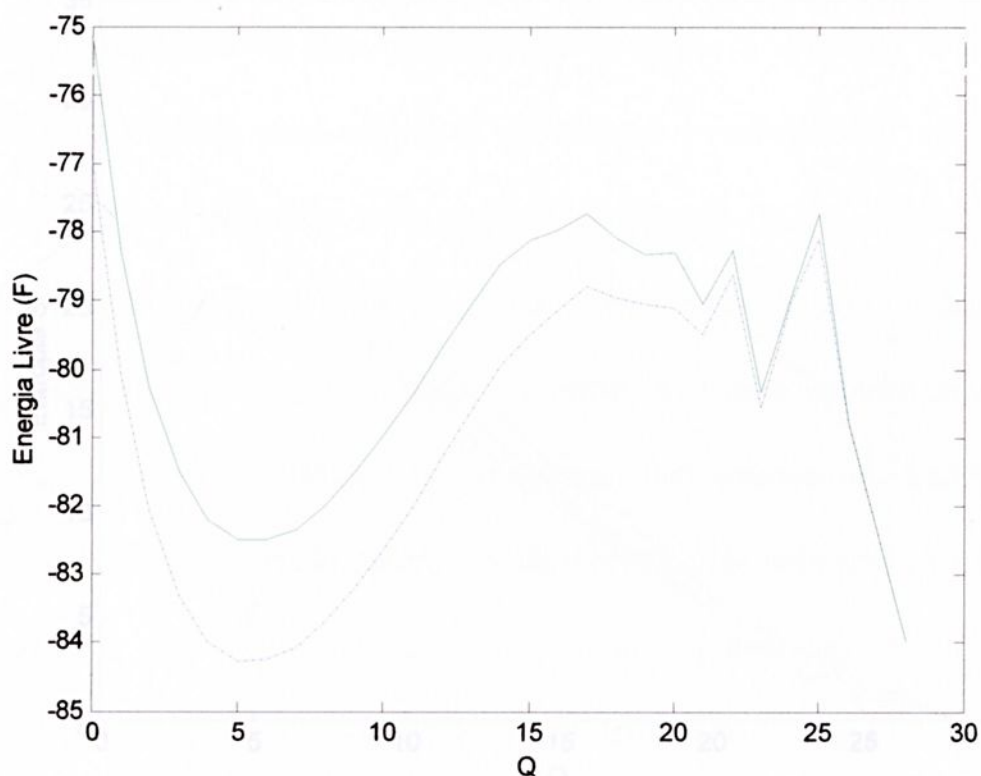


Figura-31 : Energia Livre como função de Q para solutos de tamanho 08 (---) e tamanho 16 (—) na concentração de 20% em $T=2.0$

Nota-se nesta figura que com o aumento do tamanho do soluto a concentração de 20% fixa, o estado desnaturado é desestabilizado,

enquanto que a barreira do potencial da transição praticamente não é afetada.

Na figura-32 são mostrados os gráficos da variação de entropia (S) em função do número de contatos nativos (Q) com a variação da concentração de soluto de tamanho 08 em $T=2.0$.

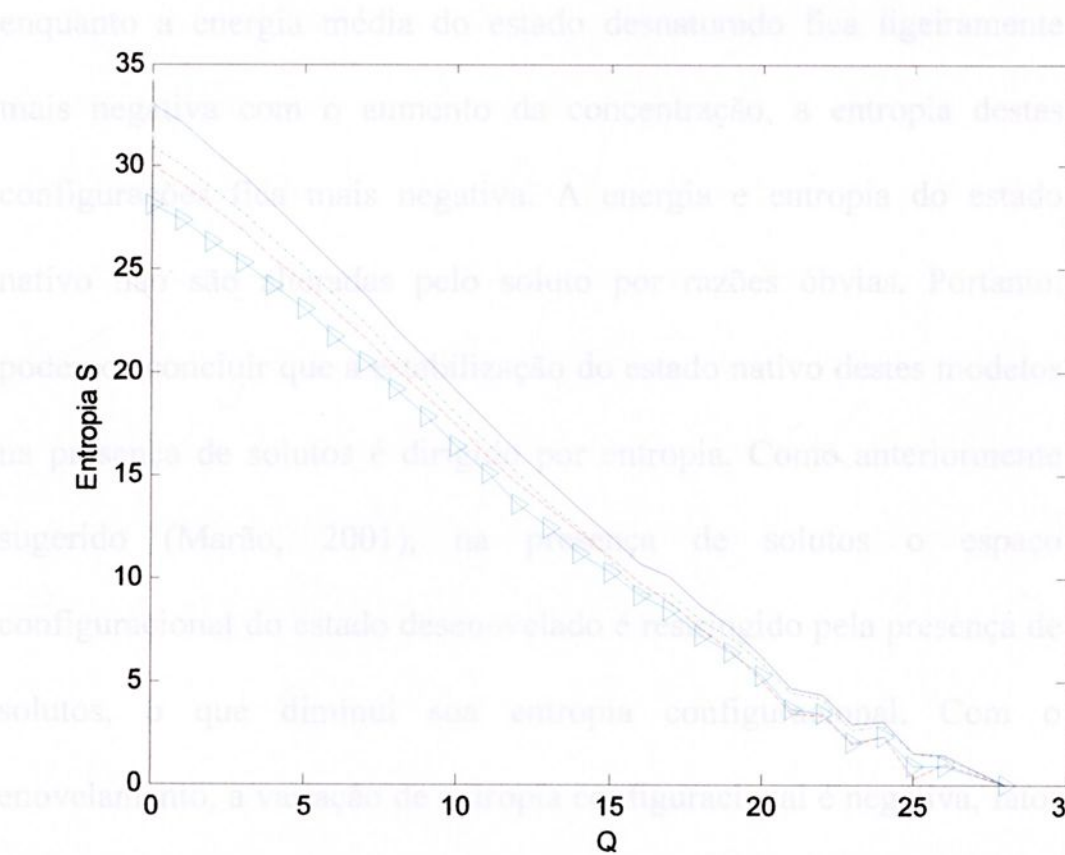


Figura-32: Entropia como função de Q . Estas simulações foram feitas a temperatura constante e igual 2.0 na presença de soluto de tamanho 08 com concentrações variando de 0% (———), 25% (. . . .), 33% (— — —), e 50% (□ □ □ □).

Observa-se nesta figura que a entropia do polímero diminui significativamente com o aumento da concentração de soluto para o



polímero desnaturado ($Q < 15$), afeta menos o estado de transição ($Q \approx 20$) e não altera a entropia do estado nativo.

Finalmente pode-se notar, da comparação do efeito do aumento da concentração do soluto na energia e entropia médias das configurações desnaturadas (figuras 29 e 32), respectivamente, que enquanto a energia média do estado desnaturado fica ligeiramente mais negativa com o aumento da concentração, a entropia destas configurações fica mais negativa. A energia e entropia do estado nativo não são alteradas pelo soluto por razões óbvias. Portanto, podemos concluir que a estabilização do estado nativo destes modelos na presença de solutos é dirigido por entropia. Como anteriormente sugerido (Marão, 2001), na presença de solutos o espaço configuracional do estado desenovelado é restringido pela presença de solutos, o que diminui sua entropia configuracional. Com o enovelamento, a variação de entropia configuracional é negativa, fator que é mais do que compensado com o aumento de entropia do soluto disperso no meio.

Logo, das análises dos parâmetros termodinâmicos (calor específico, energia, energia livre e entropia) como função do número de contatos nativos estudados na presença e ausência de concentrações



variadas de solutos de diferentes tamanhos à temperatura constante, conclui-se que a desestabilização do estado desnaturado na presença do soluto se deve exclusivamente a fatores entrópicos, uma vez que a energia livre na presença de soluto aumenta e a energia de interação não covalente entre os monômeros não é alterada, implicando que a entropia do polímero deva diminuir. A figura-32 confirma esta diminuição da entropia na presença de soluto.

Vale ressaltar que este tipo de análise para os parâmetros termodinâmicos $\langle F \rangle$, $\langle E \rangle$ e $\langle S \rangle$ que vem sendo feita até o momento presente, com modelo de polímero exato na rede, estudam apenas o comportamento do heteropolímero com a temperatura, sendo que o efeito de soluto explícito sobre o modelo exato de proteína na rede ainda não foi apresentado.



Conclusão

A investigação do mecanismo de estabilização de estruturas enoveladas de modelos de proteínas por osmólitos, via simulação Monte Carlo, utilizando-se de um modelo de homopolímero atérmico com SAW na rede cúbica simples e de um modelo exato de um heteropolímero de 27 monômeros com sequência de três letras na rede, com interação entre os monômeros ± 3 , nos permite concluir que:

- 1) A interação de volume excluído polímero-soluto a baixa concentração de soluto não leva ao colapso atérmico do polímero.
- 2) Na rede com homopolímero, o aumento da concentração de soluto causa uma mudança do peso de Rosenbluth, evidenciando que a presença de soluto muda a probabilidade com que as configurações do polímero apareçam, sendo que para um mesmo raio de giração quadrático médio, o peso de Rosenbluth cai exponencialmente com a fração relativa de soluto na rede.
- 3) Um potencial de interação polímero-soluto foi proposto em termos da razão (fração de soluto)/(fração de solvente) na rede. Este potencial nos permite prever que o efeito de solutos neutros no enovelamento

protéico se deve a diminuição do espaço configuracional do polímero devido à interação de corpo rígido.

4) O efeito de solutos neutros sobre o potencial químico do polímero aumenta na presença do soluto em proporção direta com o seu raio de giração quadrático médio, desestabilizando mais as configurações com maior área de superfície acessível; sendo, portanto, um fenômeno associado à superfície de hidratação do polímero.

5) Simulação de um modelo exato de proteína na rede a temperatura constante com concentrações variadas de soluto indicam que o estado desnaturado do polímero é desestabilizado com a presença do soluto.

6) Esta desestabilização do estado desnaturado na presença do soluto se deve exclusivamente a fatores entrópicos, uma vez que a energia livre na presença de soluto aumenta e a energia interna não é alterada, implicando que a entropia do polímero deva diminuir.



Apêndice

Programa para simulação de um homopolímero em uma rede cúbica com condições de contorno periódicas na presença de soluto feito em linguagem matlab.

Glossário do programa

e_to_e2=distância ponta a ponta quadrática (end to end distance);

focup=fração de ocupação;

pol=polímero;

RG ou rg=raio de giração;

R_o=raio do soluto;

sol=soluto;

tpol=tamanho do polímero;

W=peso estatístico (Rosenbluth);

Alguns comandos matlab/octave

%=comentário

*.=multiplicação matricial

.*=multiplicação escalar

./=divisão escalar

\=divisão à esquerda

ceil= arredonda para o inteiro mais próximo de $+\infty$

clc=limpa a tela;

find=retorna os índices dos elementos da matriz que forem diferentes de zero ou que satisfazem a condição determinada

floor= arredonda para o inteiro mais próximo de $-\infty$

function=palavra reservada que indica o início de definição de função
 isempty=teste retorna verdadeiro se a matriz que está sendo testada é vazia
 length=retorna o comprimento do vetor ou dimensão máxima da matriz.
 max=retorna valor máximo
 mean=retorna a média
 min=retorna valor mínimo
 plot=produz gráfico bidimensional com eixos x e y lineares
 rand=produz uma matriz de números pseudo-aleatórios uniformemente distribuídos entre 0 e 1
 round=arredonda para o inteiro mais próximo
 size=retorna um vetor contendo o tamanho de cada dimensão da matriz
 sparse=converte uma matriz comum em matriz esparsa
 std=retorna o desvio padrão
 sum=retorna o somatório dos elementos da matriz

PS: para mais detalhes de comando, vide referência Matsomoto, 2002.

Nome das subrotinas

- 1) ADDSOL = esta rotina adiciona o soluto um após o outro.
- 2) growpol_cbmc = cresce o polímero segundo a regra CBMC.
- 3) Fillbox_v2 = gera uma caixa de lado $N+2*dssmin$.
- 4) addnewsol_cbmc= coloca um novo soluto na rede com o polímero.
- 5) RaioGiro_cbmc = calcula o raio de giração quadrático, a distância ponta-a-ponta e o peso estatístico W.
- 6) Exchangesol = gera duas posições aleatórias para o soluto na rede. Se uma destas posições está vazia e outra ocupada, a



- rotina apaga o soluto ocupado e o transfere para a nova posição vazia. Caso contrario, a condição não se altera.
- 7) Contornopol = aplica as condições de contorno para o polímero.
 - 8) Vizinhança = esta função retorna as linhas da matriz do polímero que contem pontos contidos na região em torno do ponto $Po=[x \ y \ z]$ definida por $x-dmin:x+dmin$.
 - 9) reordena_pol_rg = reordena o polímero revertendo as condições de contorno para o cálculo do raio de giracção.
 - 10) Analise_W_RG = cálculo dos valores médios de RG, end-to-end W a partir do bin de RG^2 .
 - 11) Media_rosenbluth = calcula os valores médios de RG e end_to_end usando o fator de rosenbluth.

PROGRAMA

% ROTINA PRINCIPAL PARA SIMULAÇÃO POLIMERO NA REDE NA PRESENÇA DE SOLUTOS COM O BOX DE CONDIÇÃO DE CONTORNO

```
clear all %limpa a tela para iniciar o programa.
clc
% vamos criar um polímero tamanho tpol
tpol = 64;
% em passos de crescimento definidos por
passo = [1 0 0; -1 0 0; 0 1 0; 0 -1 0; 0 0 1; 0 0 -1];
% dentro da rede de tamanho
N=floor(1.3*tpol);
% define o tamanho do soluto Ro, e dssmin e dspmin as distancias de mínima
aproximação sol-sol e pol-sol, respectivamente
Ro=3.0; dssmin=2*Ro; dspmin=0.5+Ro;
% defina o numero de solutos na rede a partir da fração de ocupação focup desejada
focup=0.0
% dado que focup=(Ns*(4/3)*pi*Ro^3)/N^3
Ns = ceil(focup*(N^3)/((4/3)*pi*Ro^3));
%Variaveis de inicialização
RG= []; % RG guarda RaioGiro^2 e end-to-end^2
```




```

alocacao_pot = [1 2 3 4 5 6];

% vamos crescer o pol inicialmente na rede livre
Sxy = sparse(N,N); Syz = sparse(N,N); Sxz = sparse(N,N);
x= ceil(N/2); y=ceil(N/2); z=ceil(N/2); % define a posição inicial do polímero.
w = 1; % define a probabilidade de colocar o 1o. elemento de pol
% guardo as coordenadas e o peso do passo

pol=[x+1 y z w; x y z w ];

Sxy(x,y)=1; Sxy(x+1,y)=1;
Syz(y,z)=1;
Sxz(z,x)=1; Sxz(z,x+1)=1;

growpol_cbmc
plot3(pol(:,1),pol(:,2),pol(:,3),'-o')

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% ADDSOL - esta rotina adiciona o soluto um apos o outro.
% nós vamos usar o núcleo da rotina (entre o while) para
% movimentar o soluto na rede.

sol=[1 1 1];
xs=1; ys=1; zs=1;
box=[];
% coloco sol no box - rotina fillbox

fillbox_v2

% a rotina abaixo coloca os Ns solutos na rede

addnewsol_cbmc
solold=sol;

% FINAL DA ROTINA QUE COLOCA O SOLUTO NA PRESENÇA DO POLÍMERO

plot3(sol(:,1),sol(:,2),sol(:,3),'.',pol(:,1),pol(:,2),pol(:,3),'-o')

%Calcule o raio de giração
% RaioGiro calcula o quadrado do raio de giração e o quadrado da distancia ponta a
ponta
% e as coordenadas do centro de massa

RaioGiro_cbmc
RG = [RG; dimensoes];

% para um melhor controle, guardar-se sol e pol

% DAQUI PARA FRENTE VAMOS FAZER INTERAGIR Nint

Nint=10000;

```




```

for int=1:Nint
    int

    % vamos redistribuir 1 soluto por troca

    exchangesol

    % vamos diminuir o tamanho do polímero aleatoriamente
    polold=pol;

    dpol=ceil(rand*tpol/2);
    if rand<0.5
        pol(1:dpol,:)=[]; pol(1:2,4)= 1;
    else
        pol(tpol-dpol:tpol,:)=[];
    end

    % agora vamos fazer o polímero crescer ate tpol na presença do soluto com growpolsol

    growpolsol_cbmc

    % calcula o raio de giro do novo polímero
    if isempty(find(diff(pol(:,1:3))>1 | diff(pol(:,1:3))<-1)) %checar se há necessidade de
    % reordenar pol
        RaioGiro_cbmc
    else
        reordena_pol_rg
    end

    RG = [RG; dimensoes];

    %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

    % testar as condições periódicas de contorno para o pol

    Sxy = sparse(N,N); Syz = sparse(N,N); Sxz = sparse(N,N); %cria-se novamente a matriz de
    % alocação para o polímero

    for lastp=1:size(pol,1)
        Sxy(pol(lastp,1),pol(lastp,2))=1;
        Syz(pol(lastp,2),pol(lastp,3))=1;
        Sxz(pol(lastp,3),pol(lastp,1))=1;
    end

    x=pol(lastp,1);
    y=pol(lastp,2);
    z=pol(lastp,3);
    clear lastp;

    while size(pol,1)< tpol % inicia o crescimento

```



```

alocacao_pos = alocacao_pot;

for i=1:6

    p=[x y z] + passo(i,:);
    xn=p(1,1); yn=p(1,2); zn=p(1,3);
    if Sxy(xn,yn)*Syz(yn,zn)*Szx(zn,xn)==1
        alocacao_pos(i)=0;
    end
end

alocacao_pos = find(alocacao_pos>0); % contém o índice da linha de passo possível

if isempty(alocacao_pos) % caiu em armadilha
    pol=pol(1:2,:);
    Sxy = sparse(N,N); Syz = sparse(N,N); Szx = sparse(N,N);
    for lastp=1:size(pol,1)
        Sxy(pol(lastp,1),pol(lastp,2))=1;
        Syz(pol(lastp,2),pol(lastp,3))=1;
        Szx(pol(lastp,3),pol(lastp,1))=1;
    end
    x=pol(lastp,1);
    y=pol(lastp,2);
    z=pol(lastp,3);
else
    w = length(alocacao_pos);
    per=ceil(rand*w); % escolhe uma das linhas de alocação_pos e atualiza-a

    x=x+passo(alocacao_pos(per),1);
    y=y+passo(alocacao_pos(per),2);
    z=z+passo(alocacao_pos(per),3);

    Sxy(x,y)=1;
    Syz(y,z)=1;
    Szx(z,x)=1;

    pol=[pol; x y z w/5];
end
end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

%rotina fill box_v2 gera uma caixa de lado N+2*dssmin

for i=-1:1
    for j=-1:1
        for k=-1:1
            box=[box; xs+i*N ys+j*N zs+k*N];
        end
    end
end
end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

```

% addnewsol - coloca um novo soluto na rede com o polímero

```
while length(sol)<Ns
    vazio=0;
```

% este while gera um sol=srandon que não se colapsa com pol

```
    while vazio==0
        srandon=ceil(rand(1,3)*N); %gera uma posição para o soluto
        xs=srandon(1,1); ys=srandon(1,2);zs=srandon(1,3);
        % checar se está próximo a alguma coordenada de pol
        [k]=find(pol(:,1)>=xs-dspmin & pol(:,1)<=xs+dspmin);
        [l]=find(pol(k,2)>=ys-dspmin & pol(k,2)<=ys+dspmin);
        [m]=find(pol(k(l),3)>=zs-dspmin & pol(k(l),3)<=zs+dspmin);

        if isempty(m) % srandon não esta perto de ninguém
            vazio=1; % vazio=1 sai do while com as coordenadas xs ys zs
        else
            klm=k(l(m));
            dt=[];
            for i=1:length(klm)
                dt(i,1)=norm([xs ys zs]-pol(klm(i),1:3));
            end
            out=find(dt<dspmin);
            vazio=isempty(out); % se out=[], isempty==1 sai do while com as
coodenadas xs ys zs
        end
    end
```

% fim do while. retorna coordenadas xs ys zs que não colidem com as de pol

```
%%%%%%%%%
```

% a rotina abaixo vai testar se a nova posição xs ys zs do soluto
% não colapsa com outro soluto

```
    out=[1];
    [k]=find(box(:,1)>=xs-dssmin & box(:,1)<=xs+dssmin);
    [l]=find(box(k,2)>=ys-dssmin & box(k,2)<=ys+dssmin);
    [m]=find(box(k(l),3)>=zs-dssmin & box(k(l),3)<=zs+dssmin);

    if isempty(m) % srandon não esta perto de ninguém
        sol=[sol; xs ys zs];
        fillbox_v2
    else
        klm=k(l(m));
        dt=[];
        for i=1:length(klm)
            dt(i,1)=norm([xs ys zs]-box(klm(i),:));
        end
```



```

        out=find(dt<dssmin); % out=[] se não há vizinhos próximos
    end

    if isempty(out)
        sol=[sol; xs ys zs];
        fillbox_v2
    end
end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% coordenadas do centro de massa

xo=sum(pol(:,1))/tpol;
yo=sum(pol(:,2))/tpol;
zo=sum(pol(:,3))/tpol;

% valor do Raio de Giro quadrático

rg2 = sum((pol(:,1)-xo).^2 + ...
          (pol(:,2)-yo).^2 + ...
          (pol(:,3)-zo).^2)/tpol;

% valor da distancia end-to-end ao quadrado

e_to_e2 = sum((pol(1,1) - pol(tpol,1))^2 + ...
              (pol(1,2) - pol(tpol,2))^2 + ...
              (pol(1,3) - pol(tpol,3))^2);

% calculo do peso W

W=1;
for i=1:tpol
    W=W*pol(i,4);
end

dimensoes =[rg2 e_to_e2 W];

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% EXCHANGESOL esta rotina gera duas posições aleatórias para o
% soluto na rede. Se uma destas posições esta vazia e outra ocupada,
% a rotina apaga o soluto ocupado e o transfere para a nova posição
% vazia. Caso contrario não faz nada.

socupado=[]; svazio=[];

srandon=ceil(rand(2,3)*N); %gera uma posição para o soluto

for exc=1:2
    xs=srandon(exc,1); ys=srandon(exc,2);zs=srandon(exc,3);
    out=[];

```



```

[k]=find(box(:,1)>=xs-dssmin & box(:,1)<=xs+dssmin);
[l]=find(box(k,2)>=ys-dssmin & box(k,2)<=ys+dssmin);
[m]=find(box(k(l),3)>=zs-dssmin & box(k(l),3)<=zs+dssmin);
klm=k(l(m));

if isempty(klm)
    svazio=[xs ys zs]; % esta posição encontra-se vazia
else
    dt=[];
    for is=1:length(klm)
        dt(is,1)=norm([xs ys zs]-box(klm(is),:));
    end
    out=find(dt<dspmin);
end

if isempty(out)==0
    socupado=ceil(klm(out(1,1))/27); % guarda a linha na qual o soluto escolhido se
% encontra
    end % ceil(klm(out(1,1))/27) fornece a coordenada
    end % do soluto na matriz sol

if isempty(svazio)==0 & isempty(socupado)==0
    % e checa se as coordenadas em svazio não se chocam com alguma coordenada do pol

    xs=svazio(1,1); ys=svazio(1,2); zs=svazio(1,3);
    % e checa se está próximo a alguma coordenada de pol
    [k]=find(pol(:,1)>=xs-dspmin & pol(:,1)<=xs+dspmin);
    [l]=find(pol(k,2)>=ys-dspmin & pol(k,2)<=ys+dspmin);
    [m]=find(pol(k(l),3)>=zs-dspmin & pol(k(l),3)<=zs+dspmin);

    if isempty(m) % srandom não esta perto de ninguém. Transfere soluto.
        socupadobox=[((socupado-1)*27+1:socupado*27)];
        sol(socupado,:)=[]; box(socupadobox,:)=[]; % apaga posição antiga
        sol=[sol; xs ys zs]; % aloca nova posição na matriz sol
        fillbox_v2
        forca_troca=1; % aloca nova posição na matriz box
    else
        klm=k(l(m));
        dt=[];
        for i=1:length(klm)
            dt(i,1)=norm([xs ys zs]-pol(klm(i),1:3));
        end
        out=1;
        out=find(dt<dspmin);
    end

    if isempty(m)==0 & isempty(out);
        socupadobox=[((socupado-1)*27+1:socupado*27)];
        sol(socupado,:)=[]; box(socupadobox,:)=[];
        sol=[sol; xs ys zs];
        fillbox_v2
        forca_troca=1;
    end
end
end

```



```
plot3(sol(:,1),sol(:,2),sol(:,3),'',solold(:,1),solold(:,2),solold(:,3),'o')
```

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
```

```
% Testa-se as condições periódicas de contorno para o pol
```

```
Sxy = sparse(N,N); Syz = sparse(N,N); Szx = sparse(N,N); %cria-se novamente a matriz de  
% alocação para o polímero
```

```
for lastp=1:size(pol,1)  
    Sxy(pol(lastp,1),pol(lastp,2))=1;  
    Syz(pol(lastp,2),pol(lastp,3))=1;  
    Szx(pol(lastp,3),pol(lastp,1))=1;  
end
```

```
x=pol(lastp,1);  
y=pol(lastp,2);  
z=pol(lastp,3);  
clear lastp;
```

```
while size(pol,1)< tpol % inicializa o crescimento
```

```
    alocacao_pos = alocacao_pot;
```

```
    for i=1:6
```

```
        p=[x y z] + passo(i,:);  
        contornopol % impõe condição de contorno em p  
        xn=p(1,1); yn=p(1,2); zn=p(1,3);  
        out=[];  
        if Sxy(xn,yn)*Syz(yn,zn)*Szx(zn,xn)==0  
            vizinhanca  
        else  
            alocacao_pos(i)=0;  
        end
```

```
        if isempty(out)==0  
            alocacao_pos(i)=0; % exclue passo proibido  
        end  
    end
```

```
    alocacao_pos = find(alocacao_pos>0); % contem o índice da linha de passo possível
```

```
    if isempty(alocacao_pos) % caiu em armadilha  
        pol=pol(1:2,:);  
        Sxy = sparse(N,N); Syz = sparse(N,N); Szx = sparse(N,N);  
        for lastp=1:size(pol,1)  
            Sxy(pol(lastp,1),pol(lastp,2))=1;  
            Syz(pol(lastp,2),pol(lastp,3))=1;  
            Szx(pol(lastp,3),pol(lastp,1))=1;  
        end
```



```

x=pol(lastp,1);
y=pol(lastp,2);
z=pol(lastp,3);
end

if isempty(alocacao_pos)==0
    w = length(alocacao_pos);
    per=ceil(rand*w); % escolhe uma das linhas de alocação_pos e as atualiza
    p=[x y z]+passo(alocacao_pos(per),:);
    contornopol
    x=p(1,1); y=p(1,2); z=p(1,3);

    Sxy(x,y)=1;
    Syz(y,z)=1;
    Sxz(z,x)=1;

    pol=[pol; x y z w/5];
end
end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% re-ordena pol revertendo condições de contorno para o calculo do
% Raio de Giração

temp=pol;
for i=2:length(pol)
    for j=1:3
        a=pol(i,j)-pol(i-1,j);
        if a < -1
            pol(i,j)=pol(i,j)+N;
        elseif a > 1
            pol(i,j)=pol(i,j)-N;
        end
    end
end
end

RaioGiro_cbmc
pol=temp; temp=[];

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% function out=vizinhanca(xp,yp,zp,sol,dspmin)

% esta função retorna as linhas da matriz MP(n,3) que contem pontos contidos
% na regioa em torno do ponto Po=[x y z] definida por x-dmin:x+dmin, ...
% estes pontos sao resgatados simplesmente com
% viz=MP(klm,:))

out=[1];

[k]=find(box(:,1)>=xn-dspmin & box(:,1)<=xn+dspmin);
[l]=find(box(k,2)>=yn-dspmin & box(k,2)<=yn+dspmin);

```



```

[m]=find(box(k(l),3)>=zn-dspmin & box(k(l),3)<=zn+dspmin);
klm=k(l(m));

%calcule a matriz de distancia entre o ponto do polímero e os solutos vizinhos
if isempty(klm)
    out=[];
else
    dt=[];
    for is=1:length(klm)
        dt(is,1)=norm([xn yn zn]-box(klm(is),:));
    end
    out=find(dt<dspmin);
end

% se out=[] não há soluto na vizinhança, ao contrario o soluto próximo.
% klm(is) guarda a linhas da matriz sol onde esta alocado o soluto na vizinhança do pol

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% condição de contorno para o polímero

icmin=find(p==0); icmax=find(p==N+1);

for ic=1:length(icmin)
    p(1,icmin(ic))=N;
end
for ic=1:length(icmax)
    p(1,icmax(ic))=1;
end

icmin=[]; icmax=[];

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% cálculo dos valores médios de RG, end-to-end e W a partir do bin
% RG^2

miny=min(Y(:,1)); maxy=max(Y(:,1)); x=20; %x=número de bins
binwidth = (maxy - miny) / x;
h = miny + binwidth*(0:x);
wbin=zeros(length(h)-1,3);
for i=2:length(h)
    j=find(Y(:,1)<h(i) & Y(:,1)>=h(i-1));
    wbin(i-1,:)= [mean(Y(j,1)) mean(Y(j,2)) mean(Y(j,3))];
end

plot(wbin(:,3),wbin(:,1),'o')

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% calcula os valores médios de RG e endo_to_end usando o fator de

```



% Rosembluth

mediaR=[sum(RG(:,1).*RG(:,3))/sum(RG(:,3)) sum(RG(:,2).*RG(:,3))

%%%

Fim do Programa

- Anfinsen, C.R. "Principles of the Folding of Protein Chains", (1973), Science, 181, 223-230
- Aratono, I., Paul, R., Tompaef, S. "Why Preferential Hydration Does Not Always Stabilize the Native Structure of Globular Proteins", (1980), Biochemistry, 29, 1924-1931
- Binder, K.; Heermann, D.W. "Monte Carlo Simulation in Statistical Physics", (1988), Lecture Series in Solid-State Science, Springer-Verlag
- Boyer, C.B. "História da Matemática", (1985), 335-336, Editora Edgard Blücher
- Bruns, W.; Metz, J. O'Driscoll, K.F. "Monte Carlo Applications in Polymer Science"; (27), Lecture Notes in Chemistry; (1981) Springer-Verlag
- Bulkov, E. "Física-Matemática", (1988), 303-308, Editora Guanabara-Koogan
- Chou, H.J.; Dill, J.A. "The Protein Folding Problem", (1993), Physics Today, 24-32



Referências Bibliográficas

- *Anfisen, C.B*; **“Principles that Govern the Folding of Protein Chain”**, (1973), Science, **181**, 223-230
- *Arakawa, T; Bhat, R; Timasheff, S.N*; **“Why Preferential Hydration Does Not Always Stabilize the Native Structure of Globular Proteins”**, (1990), Biochemistry, **29**, 1924-1931
- *Binder, K; Heermann, D.W*; **“Monte Carlo Simulation in Statistical Physics”**, (1988), Springer Series in Solid-State Sciences, Springer-Verlag
- *Boyer, C.B*; **“História da Matemática”**, (1985), 335-336, Editora Edgard Blücher
- *Bruns, W; Motoc, I; O'Driscoll, K.F*; **“Monte Carlo Applications in Polymer Science”**; (27), Lecture Notes in Chemistry; (1981); Springer-Verlag
- *Butkov, E*; **“Física-Matemática”**, (1988), 303-308, Editora Guanabara-Koogan
- *Chan, H.S; Dill, K.A*; **“The Protein Folding Problem”**, (1993), Physics Today, 24-32



- *Colombo, M.F;* **“O Papel da Água na Regulação de Macromoléculas Biológicas: Do Controle Alostérico à Especificidade no Reconhecimento Molecular”**, (1996), Tese de Livre Docência
- *Colombo, M.F; Bonnilla-Rodrigues, G.O;* **“ The Water Effect on Allosteric Regulation of Hemoglobin Probed in Water/Glucose and Water/Glycine Solutions”**, (1996), The Journal Biological Chemistry, **271**, 4895-4899
- *Colombo, M.F; Rau, D.C; Parsegian, V.A;* **“Protein Solvation in Allosteric Regulation: A Water Effect on Hemoglobin”**, (1992), Science, **256**, 655-659
- *De Gennes, P.G;* **“Scaling Concepts in Polymer Physics”**, (1991), Cornell University Press
- *Dijkstra, M; Frenkel,D;* **“Evidence for Entropy-Driven Demixing in Hard-Core Fluids”**, (1994), Physical Review Letters, **72**, 02, 298-300
- *Dijkstra, M; Frenkel,D; Hansen,P;* **“Phase Separation in Binary Hard-Core Mixtures”**, (1994), Journal Chemical Physics, **101**, 04, 3179-3189



- *Dill, K*; **“Dominat Forces in Protein Folding”**, (1990), *Biochemistry*, **29**, 7133-7155
- *Dill, K; Bromberg, S; Yue, K; Fiebig, K.M; Yee, D.P; Thomas, P.D; Chan, H.S*; **“Principles of Protein Folding – A Perspective from Simple Exact Models”**, (1995), *Protein Science*, **4**, 561-602
- *Doi, M*; **“Introduction to Polymer Physics”**, (1996), Claredon Press.Oxford
- *Escobedo, F.A; de Pablo, J.J*; **“Chemical Potential and Dimensions of Chain Molecules in Athermal Environments”**, (1996), *Mol.Phys.*, **89**, 06, 1733-1754
- *Ferrenberg, A.M; Swedsen, R.H*; **“New Monte Carlo Technique for Studying Phase Transition”**, (1988), **61**, *Phys.Rev.Letters*, 2635-2638
- *Ferrenberg, A.M; Swedsen, R.H*; **“Optimized Monte Carlo Data Analysis”**, (1989), **63**, *Phys.Rev.Letters*, 1195-1198
- *Flory,P*; **“Principles of Polymer Chemistry”**, (1953), Cornell University Press



- *Frenkel, D; Smit, B*; “**Understanding Molecular Simulation – From Algorithms to Applications**”, (1996), Academic Press Limited
- *Gan, H.H; Tropsha, A; Schlick, T*; “**Generating Folded Protein Structures with a Lattice Chain Growth Algorithm**”, (2000), J.Chem.Phys.; **113**, nº13, 5511-5524
- *Gast, K; Damaschun, H; Misselwitz, R; Muller-Frohne, M; Zirwer, D; Damaschun, G*; “**Compactness of Protein Molten Globule: Temperature-Induced Structure Changes of the Apomyoglobin Folding Intermediate**”, (1994), **23**, European Biophysical Journal, 297-305
- *Gekko, K; Nogusa, Y; Sadahide, Y; Kamiyama, T*; “**Polyol-Induced Molten Globule of Cytochrome c: An Evidence for Stabilization by Hydrophobic Interaction**”, (1999), Biochimica et Biophysica Acta, **1434**, 44-57.
- *Gridgeman, N.T*; “**Geometric Probability and the Number π** ”, (1960), Scripta Mathematica, **25**, 183-195.
- *Hill, T*; “**An Introduction to Statistical Thermodynamics**”, (1964), Addison-Wesley Publishing Co



- *Kalos, M.H; Whitlock, P.A; "Monte Carlo Methods", (1986), Vol.01, John Wiley & Sons, Inc.*
- *Kuroda, Y; "Residual Helical Structure in the C-Terminal Fragment of Cytochrome-c", (1993), Biochemistry, 32, 1219-1224*
- *Kuroda, Y; Kidokoro, S; Wada, A; "Thermodynamic Characterization of Cytochrome-C at Low pH", (1992), J.Mol.Bio.; 223, 1139-1153*
- *Lowry, G.G; "Markov Chains and Monte Carlo Calculations in Polymer Science", (1970), Marcel Dekker, Inc*
- *Lunas-Bárcenas, G; Bennet, G.E; Sanchez, I.C; Johnston, K.P; "Monte Carlo Simulation of Polymer Chain Collapse in an Athermal Solvent", (1996), J.Chem.Phys., 101, 9971*
- *Macedo, H; Luiz, A.M; "Termodinâmica Estatística", (1975), Editora Edgard Blücher Ltda*
- *Marão, S.R; "Sobre o Efeito de Hidratação e Volume Excluído no Enovelamento da Apo-Mioglobina na Presença de Osmólitos", (2000), Tese de Doutorado*
- *Metropolis, N; Ulan, S.M; "The Monte Carlo Method", J.Am.Statist.Assoc., (44), (1949), 335*



- *Nairn, J.A*; **"LATTICE™ 8.0 – A Computer Experiment Investigating the Conformations of Polymer Molecules"**, (2003), University of Utah
- *Neves, A.C.D*; **"Efeito de Água no Estado Conformacional Compacto de Citocromo-c"**, (1996), Dissertação de Mestrado
- *Ohgushi, M; Wada, A*; **"Liquid Like State of Side Chains at the Intermediate Stage of Protein Denaturation"**, (1984), *Advan.Biophys.*, **18**, 75-90
- *Ohgushi, M; Wada, A*; **"Molten Globule State: A Compact Form of Globular Proteins with Móbile Side Chains"**, (1983), *Febs Letters*, **164**, 21-24
- *Onuchic, J.N; Wolynes, P.G; Luthey-Schulten, Z; Socci, N.D*; **"Toward an Outline of the Topography of a Realistic Protein-Folding Funnel"**, (1995), *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **92**, 3626-3630
- *Pacitti, T; Atkinson, C.P*; **"Programação e Métodos Computacionais"**, (1983), Vol-02, LTC Editora
- *Pain, R.H*; **"Mechanisms of Protein Folding"**, (1996), Oxford University Press



- *Pielak, G.J; Erie, D.A; Saunders, A.J; Morar, A.S; Davi-Searles, P.R;* **“Sugar-Induced Molten-Globule Model”**, (1998), *Biochemistry*, **37**,17048-17053.
- *Ptitsyn, O.B;* **“Molten Globule and Protein Folding”**, (1993), *Advac.Pro.Chem*, **47**, 83-229.
- *Rosenbluth,M.M; Rosenbluth, A.W;* **“Monte Carlo Calculation of the Average Extension of Molecular Chains”**, (1955), *J.Chem.Phys.*,**23**, nº 2, 356-359
- *Sanches-Ruiz, J.M; Del Pino, I.M.P;* **“An Osmolyte on the Heat Capacity Change for Protein Folding”**, (1995), *Biochemistry*, **34**, 8621-8630
- *Santoro, M.M; Liu,Y; Khan, M.A; Hou, L.X; Bolen, D.W;* **“Increased Thermal Stability of Proteins in the Presence of Naturally Occurring Osmolytes”**, (1992), *Biochemistry*, **31**, 5278-5283
- *Shearwin, K.E; Winzor, D.J;* *Arch.Biochem.Biophys.*;**282**, 297-301.
- *Silva, R; Felício, J.R.D;* **“Simulação de Monte Carlo com Repesagem Aplicada ao Calor Específico de Sólidos”**, (2002), *Revista Brasileira de Ensino de Física*, (**24**), 2, 103-109



- *Socci, N.D; Onuchic, J.N;* **“Folding of Proteinlike Heteropolymers”**, (1994), *J.Chem.Phys.*; **101**, nº02, 1519-1528
- *Socci, N.D; Onuchic, J.N; Wolynes, P.G;* **“Diffusive Dynamics of Reaction Coordinate for Protein Folding Funnels”**, (1996), *J.Chem.Phys.*; **104**, nº15, 5860-5868
- *Sun, S.T; Nishio, I; Swislow, G; Tanaka, T;* **“The Coil-Globule Transition: Radius of Gyration of Polystyrene in Cyclohexane”**, (1980), *J.Chem.Phys.*, **73**, 5971-5975
- *Timasheff, S.N; Lee, J.C;* **“The Stabilization of Proteins by Sucrose”**, (1981), *J.Biol.Chemistry*, **256**, 7193-7201
- *Timasheff, S.N; Xie, G;* **“Mechanism of the Stabilization of Ribonuclease A by Sorbitol: Preferential Hydration is Greater for the Denatured than for the Native Protein”**, (1996), *Protein Science*, **6**, 211-221.
- *Yancey,P.H; Clark,M.E; Hand, S.C; Bowlus, R.D; Somero, G.M;* **“Living With Water Stress: Evolution on Osmolyte Systems”**, (1982), *Science*, **217**, 1214-1222.



