

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
Campus de São José do Rio Preto

**Estudo dos Aspectos
Eletrostáticos da Interação entre
Polieletrólitos e Macroíons**

Sidney Jurado de Carvalho

Orientador: Prof. Dr. Fernando Luís Barroso da Silva

São José do Rio Preto - SP

2008

SIDNEY JURADO DE CARVALHO

Estudo dos Aspectos Eletrostáticos da Interação entre Polieletrólitos e Macroíons

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, área de Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fernando Luís Barroso da Silva
Professor Doutor
USP – Ribeirão Preto
Orientador

Dr. Laurent Emmanuel Dardenne
Tecnologista Pleno 2
LNCC

Prof. Dr. Marco Antonio Alves da Silva
Professor Associado
USP – Ribeirão Preto

Prof. Dr. José Roberto Ruggiero
Professor Adjunto
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Marcio José Tiera
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 25 de junho de 2008.

Dedicado a Emílio e Aparecida.

A compreensão humana não é um exame desinteressado, mas recebe influências da vontade e dos afetos; disso se originam ciências que podem ser chamadas “ciências conforme a nossa vontade”. Pois um homem acredita mais facilmente no que gostaria que fosse verdade. Assim, ele rejeita coisas difíceis pela impaciência de pesquisar; coisas sensatas, porque diminuem a esperança; as coisas mais profundas da natureza, por superstição; à luz da experiência, por arrogância e orgulho; coisas que não são comumente aceitas, por deferência à opinião do vulgo. Em suma, inúmeras são as maneiras, e às vezes imperceptíveis, pelas quais os afetos colorem e contaminam o entendimento.

Francis Bacon, *Novum organom* (1620)

Agradecimentos

Muitas pessoas foram de extrema importância para o desenvolvimento deste trabalho. Seja pela amizade e apoio em momentos em que minhas forças pareciam ter se esgotado, ou contribuindo de maneira direta na discussão de idéias, estas pessoas me deram o privilégio de conviver com elas durante este grande momento de minha vida. Vocês estarão sempre em meu coração.

Gostaria de iniciar agradecendo aos órgãos de fomento FAPESP e CNPq que forneceram o auxílio financeiro necessário à minha dedicação ao doutoramento. Em particular, agradeço aos assessores que avaliaram o projeto e confiaram em sua execução.

Agradeço também ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Luís Barroso da Silva, quem me iniciou na área de simulação computacional e forneceu todo o conhecimento necessário para o desenvolvimento deste trabalho. Reconheço e agradeço a oportunidade, apoio, dedicação, paciência e confiança.

Aos meus amigos do departamento de física do IBILCE Márcia, Márcio, Priscila, Sabrina, André, Ana Helena, Magno, Diego, Diogo e Luciana que participaram comigo deste trajeto. Muito obrigado pela amizade e companheirismo.

Aos amigos da República TranQra Thiago e Ricardo. MUITÍSSIMO obrigado pela excelente convivência nos anos que estivemos juntos em Rio Preto. Sinto muitas

saudades deste período e espero que possamos por muitas e muitas vezes lembrá-los juntos (“TranQra na Balada”).

Ao meu grande amigo José Esio. Muitíssimo obrigado pelas palavras de apoio nos momentos difíceis, pela leitura e discussão da Tese e pela amizade sincera que sempre demonstrou. Foi um privilégio para mim nossa agradável convivência nestes últimos 6 anos.

Ao meu grande amigo Leandro Cristante pela amizade e apoio. Nossas idas ao Chalé, partidas de sinuca e xadrez, saltos do carro em movimento (lembra da cara do Paul), idas à república da medicina com troca de pneu no final da noite, Vila Dionísio finalizando com Habibb’s, resgate do Esio perdido na Baddit Bassit, entre outras aventuras, são lembranças que não sairão da minha memória.

Aos grandes amigos Ronaldo e Isadora pelos almoços agradáveis, conversas, comida japonesa, baladas e pela amizade que voeis sempre demonstraram. Gostaria de fazer um agradecimento especial ao Ronaldo por me esclarecer que o Martin McFly foi para o futuro e comprou o manual da Telesena.

A todo Departamento de Física pela confiança e muita paciência. Gostaria de agradecer principalmente aos professores Jorge Chahine, João Ruggiero, Elso, Augusto e Marcelo pela ajuda e apoio. Aos funcionários Ilva, Paulinho, Barbosa e Marcelino por toda ajuda que sempre me prestaram. Me sinto honrado por ter sido durante alguns anos professor substituto deste departamento. Independente de onde eu estiver, meu coração estará com voeis.

Ao professor Vitor Barbanti Pereira Leite pela disponibilização de seus recursos computacionais.

A todos os funcionários da seção de pós-graduação. Em particular agradeço a Rosemar que sempre foi extremamente prestativa e paciente.

Aos membros da banca do exame geral de qualificação Prof. Dr. Jorge Chahine e Prof. Dr. João Ruggiero Neto e da banca de defesa Prof. Dr. Pedro Pascutti, Dr. Laurent Emmanuel Dardenne, Prof. Dr. Marco Antonio Alves da Silva, Prof. Dr. José Roberto Ruggiero, Prof. Dr. Marcio José Tiera, Profa. Dra. Rosângela Itri e Prof. Dr. Luis Gustavo Dias pela disponibilidade em ler, criticar e fazer valiosas sugestões para melhoria deste trabalho.

Finalizando, gostaria de agradecer a toda minha família pelo amor, carinho e compreensão durante todo o tempo de realização da minha pós-graduação. Durante muito tempo meu interesse pela área de exatas foi atribuído a uma influência hereditária do interesse de meu pai nesta mesma área. Entretanto, quanto mais observo as idéias geniais de meu avô Emílio me convenço do quão fui privilegiado em ser seu neto.

Sumário

| | |
|---|-----------|
| Lista de Símbolos | 1 |
| Lista de Figuras | 8 |
| Lista de Tabelas | 12 |
| Resumo | 13 |
| Abstract | 14 |
| Introdução | 15 |
| 1 Modelo do Sistema | 20 |
| 1.1 Modelo da Célula | 21 |
| 1.2 Macroión | 23 |
| 1.3 Polieletrólito | 24 |
| 1.4 Solução Eletrolítica | 25 |
| 2 Ferramentas Computacionais | 28 |
| 2.1 Mecânica Estatística Clássica | 29 |
| 2.2 Método Monte Carlo | 32 |
| 2.3 Desenvolvimentos Computacionais | 34 |
| 2.3.1 Código Básico | 35 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 2.3.2 | Propriedades Médias Calculadas | 38 |
| 2.4 | A Fase de Equilibração | 47 |
| 3 | Propriedades da Cadeia Isolada | 50 |
| 3.1 | Cadeia Ideal | 51 |
| 3.2 | Interações de Volume | 53 |
| 3.3 | Cadeia Semiflexível | 55 |
| 3.4 | Polieletrólitos | 57 |
| 4 | Conformação do Polímero Complexado | 60 |
| 4.1 | Resultados | 62 |
| 5 | Transição Conformacional | 70 |
| 5.1 | Desenvolvimentos Teóricos | 72 |
| 5.2 | Resultados | 75 |
| 6 | Regulação de Carga | 83 |
| 6.1 | Aproximação Perturbativa | 86 |
| 6.2 | Condição Ideal | 88 |
| 6.3 | Detalhes da Simulação | 90 |
| 6.4 | Resultados | 93 |
| 7 | Conclusões | 99 |
| | Referências Bibliográficas | 101 |

Lista de Símbolos

| | |
|---------------|--|
| T | Temperatura do sistema. |
| ϵ_s | Constante dielétrica do solvente. |
| N_c | Número de moléculas do polímero. |
| R_c | Raio da célula. |
| $u_{conf}(r)$ | Energia de confinamento dos monômeros no interior da célula. |
| R_m | Raio do macroíon. |
| Q_m | Carga do macroíon. |
| Z_m | Valência do macroíon. |
| e | Carga elementar. |
| ϵ_m | Constante dielétrica do interior do macroíon. |
| N_p | Número de monômeros. |
| R_p | Raio dos monômeros. |
| Q_p | Carga dos monômeros. |
| Z_p | Valência dos monômeros. |
| $u_p(r)$ | Energia de conexão entre dois monômeros consecutivos. |
| k | Constante de força do potencial harmônico $u_p(r)$. |
| r_o | Distância média entre dois monômeros consecutivos na ausência de qualquer perturbação. |
| ϵ_o | Permissividade elétrica do vácuo. |
| β | Inverso da energia térmica $k_B T$. |

| | |
|--------------------------|---|
| $u_{el}^p(r)$ | Energia eletrostática entre dois monômeros. |
| l_B | Comprimento de <i>Bjerrum</i> . |
| κ | Inverso do comprimento de <i>Debye</i> . |
| k_B | Constante de <i>Boltzmann</i> . |
| n_i | Densidade numérica da espécie <i>i</i> . |
| Z_i | Valência da espécie <i>i</i> . |
| $u_{el}^m(r)$ | Energia eletrostática entre um monômero e o macroión. |
| N | Número total de monômeros no interior da célula. |
| U | Energia potencial total de uma determinada configuração do sistema. |
| q_i | Coordenadas generalizadas da partícula <i>i</i> . |
| p_i | Momentos canonicamente conjugados da partícula <i>i</i> . |
| q | Conjunto das coordenadas generalizadas das partículas do sistema. |
| p | Conjunto dos momentos canonicamente conjugados das partículas do sistema. |
| $\rho(q, p)$ | Densidade de probabilidade do sistema assumir a configuração caracterizada pelo conjunto de coordenadas <i>q</i> e <i>p</i> . |
| $\Gamma(p, q)$ | Grandeza física qualquer. |
| $\langle \Gamma \rangle$ | Valor médio de $\Gamma(p, q)$. |
| $H(q, p)$ | Hamiltoniana do sistema. |
| Q | Função de partição. |
| h | Constante de <i>Plank</i> . |
| N_i | Número de partículas da espécie <i>i</i> . |
| E | Energia total do sistema. |
| $\Omega(E)$ | Densidade de estados em função de <i>E</i> . |
| A | Energia Livre de <i>Helmholtz</i> . |
| \mathbf{r}_i | Vetor posição da <i>i</i> -ésima partícula. |
| \mathbf{r} | Conjunto dos vetores posição de todas as partículas do sistema. |
| Λ_i | Comprimento de onda térmico de uma partícula da espécie <i>i</i> . |

| | |
|-------------------|---|
| m_i | Massa de uma partícula da espécie i . |
| Z | Integral de configuração. |
| M | Número de configurações geradas em uma dada simulação. |
| $P(r_i r_j)$ | Probabilidade de transição da configuração r_j para a configuração r_i . |
| $P(r_i)$ | Probabilidade do sistema assumir a configuração r_i . |
| ΔU | Diferença da energia potencial entre duas configurações. |
| ΔX | Deslocamento aleatório realizado por uma partícula na direção X. |
| ΔY | Deslocamento aleatório realizado por uma partícula na direção Y. |
| ΔZ | Deslocamento aleatório realizado por uma partícula na direção Z. |
| $g_i(r)$ | Função distribuição radial das partículas da espécie i . |
| $P_i(\mathbf{r})$ | Probabilidade de uma partícula da espécie i se localizar na posição \mathbf{r} . |
| ρ_i | Densidade numérica das partículas da espécie i . |
| V | Volume total da célula. |
| n_i^k | Número de partículas da espécie i localizadas na k -ésima “fatia”. |
| V_k | Volume da k -ésima “fatia”. |
| δ | Largura das fatias. |
| $C_p(r)$ | Concentração média de monômeros à distância r do macroíon. |
| $g_p(r)$ | Função distribuição radial dos monômeros. |
| $n_p(r)$ | Número médio de monômeros à distância r do macroíon. |
| $\rho_p(r)$ | Densidade de monômeros à distância r do macroíon. |
| $w_i(r)$ | Potencial da força média agindo em uma partícula da espécie i . |
| $w_{cm}(r)$ | Potencial da força média agindo no centro de massa do polieletrólito. |
| $U^*(r)$ | Função penalização. |
| $P_{cm}(r)$ | Probabilidade do centro de massa do polímero se localizar à distância r do macroíon. |
| $P_{cm}^*(r)$ | Probabilidade do centro de massa do polímero se localizar à distância r do macroíon sendo introduzida a função penalização. |

| | |
|-------------------------------------|---|
| ξ | Parâmetro de ordem arbitrário. |
| M_i | Número de configurações da i -ésima simulação. |
| T_i | Temperatura adotada na i -ésima simulação. |
| β_i | Inverso da energia térmica $k_B T_i$ da i -ésima simulação. |
| $\Omega_i(\xi)$ | Densidade de estados da i -ésima simulação. |
| $H_i(\xi)$ | Histograma de ξ na i -ésima simulação. |
| A_i | Energia Livre da i -ésima simulação. |
| f_i | Energia Livre adimensional $\beta_i A_i$ da i -ésima simulação. |
| $P_\beta(\xi)$ | Probabilidade do sistema assumir uma configuração com valor ξ para o parâmetro de ordem na temperatura β . |
| l | Comprimento do segmento efetivo de uma cadeia ideal. |
| \mathbf{R} | Vetor <i>end-to-end</i> . |
| $P(\mathbf{R})$ | Probabilidade de uma cadeia assumir uma conformação com dimensões caracterizadas pelo vetor <i>end-to-end</i> \mathbf{R} . |
| $\langle \mathbf{R} \rangle$ | Valor médio de \mathbf{R} . |
| $\langle \mathbf{R}^2 \rangle$ | Valor quadrático médio de \mathbf{R} . |
| \mathbf{R}_{ij} | Vetor unindo o i -ésimo e o j -ésimo segmento de uma cadeia. |
| $\langle \mathbf{R}_{ij}^2 \rangle$ | Valor quadrático médio de \mathbf{R}_{ij} . |
| $\langle R_g^2 \rangle$ | Valor quadrático médio do raio de giração. |
| r | Parâmetro de extensão da cadeia $r = \langle \mathbf{R}^2 \rangle / \langle R_g^2 \rangle$. |
| $p(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j)$ | Probabilidade condicional do j -ésimo segmento assumir a posição \mathbf{r}_j , estando o i -ésimo segmento na posição \mathbf{r}_i . |
| $Q_N(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}_N)$ | Função de partição de uma cadeia contendo N segmentos com extremos fixos nas posições \mathbf{r}_0 e \mathbf{r}_N . |
| $\phi_m(\mathbf{r})$ | Autofunções do operador $\Upsilon = -(l^2/6)\nabla^2 + \beta V$. |
| E_m | Autovalores do operador $\Upsilon = -(l^2/6)\nabla^2 + \beta V$. |
| $n(\mathbf{r})$ | Concentração média de monômeros na posição \mathbf{r} . |

| | |
|--------------------------|--|
| $V_{ef}(\mathbf{r})$ | Potencial efetivo agindo nos segmentos de uma cadeia. |
| B | Segundo coeficiente do virial. |
| $\mathbf{r}(s)$ | Vetor que determina a posição de um elemento da cadeia em relação à distância s ao longo do seu contorno. |
| $\mathbf{u}(s)$ | Vetor unitário tangente à curva que determina a conformação de uma cadeia, em relação à distância s ao longo do seu contorno. |
| l_{ij} | Comprimento de uma seção da cadeia limitada pelos i -ésimo e j -ésimo segmentos. |
| θ_{ij} | Ângulo formado entre os versores $\mathbf{u}(s_i)$ e $\mathbf{u}(s_j)$. |
| L | Comprimento total de uma cadeia. |
| L_p | Comprimento de persistência. |
| L_p^o | Comprimento de persistência “intrínscico”. |
| L_p^{el} | Contribuição eletrostática do comprimento de persistência. |
| λ | Densidade numérica de carga do polímero. |
| Z_t | Carga crítica responsável em induzir a transição conformacional em que o polímero deixa de tocar o macroión em apenas um ponto e passa a tocá-lo com comprimento finito. |
| Z_w | Carga crítica responsável em induzir a transição conformacional em que o polímero passa a envolver o macroión. |
| $\langle r_{mm} \rangle$ | Comprimento médio de um segmento da cadeia. |
| N_p^* | Número mínimo de monômeros necessários para existência de cauda(s). |
| Z_{cpx} | Carga líquida do complexo. |
| $N_T(r)$ | Número total de monômeros localizados aquém da distância r do centro do macroión. |
| σ_c | Densidade superficial de carga crítica do macroión. |
| ξ_c | Densidade linear de carga crítica do polieletrólito. |
| q | Carga de um segmento da cadeia. |

| | |
|--|---|
| σ | Densidade superficial de carga de uma superfície plana. |
| $V(x)$ | Energia potencial de interação entre a superfície plana e um segmento da cadeia. |
| J_ν | Funções de Bessel do primeiro tipo. |
| κ^* | Valor de κ no qual ocorre o surgimento do estado dissociado. |
| $\langle E_L \rangle$ | Valor médio da energia de interação entre o polieletrólito e o macroión. |
| $p(i)$ | Número de resíduos que compõe o patch centralizado do i -ésimo resíduo. |
| $U([\mathbf{r}_i], \mathbf{r}_\alpha)$ | Energia de interação entre uma macromolécula descrita pelo conjunto de vetores $[\mathbf{r}_i]$ e uma outra representada por uma esfera localizada em \mathbf{r}_α . |
| $\boldsymbol{\mu}$ | Vetor momento de dipolo. |
| $\langle \mu \rangle$ | Valor médio do módulo do momento de dipolo. |
| C | Capacitância da proteína. |
| K_a | Constante de equilíbrio da reação $GH + H_2O \rightleftharpoons G + H_3O^+$. |
| pK_a | Forma logarítmica de K_a . |
| α | Grau de dissociação. |
| N_R | Número de resíduos ionizáveis de uma proteína. |
| N_R^+ | Número de grupos básicos de uma proteína. |
| N_R^- | Número de grupos ácidos de uma proteína. |
| pK_o^i | Constante de equilíbrio intrínseca do i -ésimo grupo. |
| α_o^i | Grau de dissociação do i -ésimo grupo desconsiderando o efeito dos outros resíduos. |
| $\langle Z_m \rangle_{id}$ | Valor médio da carga líquida da proteína desconsiderando a correlação entre os resíduos. |
| $\langle Z^i \rangle$ | Valor médio da carga do i -ésimo resíduo. |
| $\langle (Z^i)^2 \rangle$ | Valor quadrático médio da carga do i -ésimo resíduo. |
| C_{id} | Capacitância da proteína desconsiderando a correlação entre os resíduos. |
| η_i | Valência do i -ésimo resíduo. |

- U^{el} Componente eletrostática das interações resíduo–resíduo, proteína–monômeros e proteína–íons da solução.
- ΔU^{el} Variação de U^{el} devida a mudança do estado de protonação de um resíduo.
- R_{pc} Metade da distância *end-to-end* de um polímero neutro.

Lista de Figuras

| | | |
|-----|--|----|
| 1.1 | Representação do modelo da célula. | 16 |
| 2.1 | Fluxograma do programa. | 31 |
| 2.2 | Função distribuição radial para o sistema composto apenas por esferas rígidas. | 33 |
| 2.3 | Concentração média de monômeros em função da distância ao centro do macroión. | 34 |
| 2.4 | Número médio de monômeros em função da distância ao centro do macroión. | 35 |
| 2.5 | Potencial da força média agindo no centro de massa do polímero para cada uma das etapas da simulação: pré-equilibração, equilíbrio e produção. | 37 |
| 2.6 | Representação esquemática das três configurações iniciais utilizadas no processo de equilíbrio. | 41 |
| 2.7 | Evolução da energia total do sistema com o decorrer da fase de equilíbrio. | 42 |

| | | |
|-----|--|----|
| 3.1 | Representação esquemática de uma cadeia ideal composta por cinco segmentos efetivos de comprimento l | 44 |
| 3.2 | Representação esquemática do modelo persistente. | 48 |
| 3.3 | Efeito da força iônica nas propriedades conformacionais do polímero isolado. | 52 |
| 4.1 | Raio de giração em função do grau de polimerização do polieletrólito e número médio de monômeros em função da distância ao centro do macroíon. | 56 |
| 4.2 | Número médio de monômeros em função da distância ao centro do macroíon para cadeias com diferentes números de monômeros. | 57 |
| 4.3 | Número médio de monômeros em função da distância ao centro do macroíon com diferentes valências. | 59 |
| 4.4 | N_p^* em função da valência do macroíon. | 60 |
| 4.5 | Número total de monômeros localizados aquém da distância r do centro do macroíon. | 61 |
| 4.6 | Diagrama de fases conformacional. | 62 |
| 5.1 | Energia média da interação macroíon–polieletrólito. | 69 |
| 5.2 | Evolução da energia da interação polieletrólito–macroíon e da energia total do sistema com o decorrer da simulação e histograma da energia total do sistema. | 70 |

| | | |
|-----|--|----|
| 5.3 | Número médio de monômeros e número total de monômeros localizados à distância r do centro do macroíon em condições correspondentes à κ^* | 71 |
| 5.4 | Raio de giração de uma cadeia na presença de um macroíon com diferentes valências e número médio de monômeros em função da distância ao centro de um macroíon. | 72 |
| 5.5 | Parâmetro de extensão do polieletrólito na presença do macroíon e concentração média de monômeros em função da distância ao centro do macroíon. | 73 |
| 5.6 | Energia Livre do sistema em função do raio de giração do polieletrólito. | 74 |
| 5.7 | Diagrama de fases para dissociação do complexo. | 75 |
| 6.1 | Número de resíduos $p(i)$ compondo o patch centralizado no resíduo i para α -lactalbumina e β -lactoglobulina. | 78 |
| 6.2 | Representação pictórica do maior patch de carga existente na β -lactoglobulina e dos dois maiores patches existente na α -lactalbumina. | 79 |
| 6.3 | Valência média e capacitância da α -lactalbumina e β -lactoglobulina. | 87 |
| 6.4 | Potencial da força média agindo no centro de massa do polieletrólito devido à interação com a α -lactalbumina e β -lactoglobulina em seus respectivos pontos isoelétrico. | 88 |
| 6.5 | Valor mínimo do potencial da força média agindo no centro de massa do polieletrólito devido a sua interação com a α -lactalbumina e β -lactoglobulina. | 89 |

6.6 Resultados da interação do polieletrólito com a α -lactalbumina na
sua forma selvagem e mutante. 91

Lista de Tabelas

| | | |
|-----|---|----|
| 3.1 | Relação dos dados solicitados pelo programa no início de sua execução. | 29 |
| 5.1 | Especificações dos modelos simulados por diferentes grupos. | 54 |
| 7.1 | Raio médio e número de resíduos ionizáveis da α -lactalbumina e β - lactoglobulina com os correspondentes valores de pK_o | 84 |
| 7.2 | Informações referentes à α -lactalbumina nas formas selvagem e mu- tante. | 91 |

Resumo

O entendimento da formação de complexos compostos por polieletrólitos e macroíons é fundamental para o estudo de vários processos biológicos e tecnológicos. Neste trabalho foram investigados os aspectos eletrostáticos da complexação, verificando os efeitos da força iônica, da carga macromolecular e do grau de polimerização do polímero na estabilidade do complexo e nas características conformacionais da cadeia. Com o objetivo de obter conclusões gerais para este tipo de sistema, um modelo simplificado foi utilizado. O polímero foi representado por um conjunto de esferas rígidas carregadas conectadas por um potencial harmônico, enquanto o macroíon seguiu um modelo esférico com distribuição de carga homogênea. A interação entre as espécies carregadas foi tratada de acordo com a aproximação de Debye-Hückel. Utilizando simulações Monte Carlo no ensemble canônico, verificou-se que a dissociação do complexo possui características de transição de fase. Condições críticas foram obtidas em concordância com o comportamento observado empiricamente. Resultados da interação de polieletrólitos com proteínas no seu ponto isoelétrico mostraram que a contribuição devido apenas à regulação de carga é suficiente para estabilizar o complexo e pode ser aumentada através de mutações que diminuam a heterogeneidade de carga da proteína.

Abstract

The understanding of macroion–polyelectrolyte complex formation is fundamental for the biological and technological process studies. In this work the electrostatic issues on the complexation were investigated, verifying the effects of ionic strength, macromolecular charge, and degree of polymerization on the complex stability and the chain conformational features. With the purpose of obtain general conclusions for this system, a simplified model was adopted. The polymer was represented by a set of rigid charged spheres connected by a harmonic potential, and the macroion was represented by a rigid sphere with homogeneous charge distribution. The interaction among macromolecules was described by the Debye-Hückel theory. Using Monte Carlo simulations within the canonical ensemble, it was verified that complex dissociation has phase-like transition behaviour. Numerical values for critical conditions were obtained in agreement with the ones experimentally observed. Results of interaction among polyelectrolyte and proteins on their isoelectric point showed that the charge regulation contribution only is sufficient to make the complex stable. It is also shown that charge regulation contribution is increased by mutations which promote a lower protein charge density heterogeneity.

Introdução

Polieletrólitos são macromoléculas que possuem grupos ionizáveis [1, 2]. Em determinadas condições da solução, a distribuição de carga que estas moléculas adquirem é suficiente para que a energia de interação eletrostática entre elas supere a energia térmica, formando complexos estáveis [3]. Um dos exemplos são as proteínas [4, 5], cujos aminoácidos contém grupos COO^- ou NH^+ em suas cadeias laterais. Para essa classe de biomoléculas, assim como para outras partículas coloidais, a formação do complexo promove apenas pequenas modificações em sua estrutura, de forma que a contribuição à energia livre de ligação causada pela variação de sua entropia conformacional pode ser desprezada. Neste trabalho, polieletrólitos com essa característica serão denominados *macroíons*. Em outro extremo estão polímeros lineares com alto grau de flexibilidade, como os ácidos nucleicos [1, 6] e algumas macromoléculas sintéticas [7], cujo grande número de graus de liberdade leva a existência de uma contribuição repulsiva de natureza entrópica causada pela perda de entropia conformacional da cadeia quando de sua proximidade à superfície do macroíon (interação de depleção) [8–10], além de vários estados conformacionais para o complexo [11, 12].

A interação entre cadeias poliméricas e macroíons opostamente carregados é um assunto que vem sendo amplamente abordado atualmente [3, 11, 13, 14]. Sua importância biológica está, por exemplo, na compactação do DNA através de sua interação com proteínas histonas [6, 15–17], e na interação de glicosaminoglicanos com

a proteína antitrombina para o controle da coagulação sanguínea [18,19]. Dentre as aplicações tecnológicas, o controle da reologia de suspensões na área alimentícia [20], a promoção da taxa de coagulação/floculação para o tratamento de água [21–23], a construção de dispositivos de multicamadas de carga oscilante [24,25], e a complexação de polímeros catiônicos com DNA para terapia gênica [26] tem também motivado o estudo de tal tema. A principal questão que se coloca é como as condições físico-químicas da solução (concentração das espécies, força iônica e pH) afetam a tendência de polímeros carregados aderirem na superfície de macroíons, e como a conformação do complexo influencia na estabilidade da solução e na capacidade das moléculas executarem sua função.

Observa-se empiricamente [27–29] que em condições nas quais o complexo adquire carga líquida suficientemente baixa, ou seja, quando a carga do polímero compensa, quase que totalmente, a carga do macroíon, contribuições de segunda ordem passam a dominar a interação entre os complexos, ocasionando agregação. A solução então se separa em uma fase, denominada *coacervado*, com alta concentração destas duas espécies, e outra fase altamente diluída [27]. Entretanto, floculação e coagulação podem também ser observadas em condições em que a carga do macroíon não é balanceada pela carga do polímero, quando uma única cadeia pode interagir com mais de uma partícula coloidal formando algo semelhante a uma “ponte” entre elas [13,30]. A conectividade entre os segmentos é responsável pela interação atrativa entre os macroíons (*polyelectrolyte bridging interactions*) que pode também promover a formação de agregados. A descrição teórica destes dois fenômenos envolve a resolução de um complexo problema de muitos corpos. Neste trabalho tratamos uma versão simplificada do problema com o objetivo de descrever a formação de complexos solúveis compostos por apenas um macroíon e uma molécula do polímero, reduzindo consideravelmente o número de corpos envolvidos no sistema.

A conformação de polieletrólitos adsorvidos é fortemente dependente de vários parâ-

metros do sistema [11]. Sua influência é direta na interação entre dois complexos e, conseqüentemente, na estabilidade da solução [31]. Resultados obtidos por modelos analiticamente solúveis [32] e através de tratamentos numéricos [15, 16] mostraram que o aumento da carga do macroión faz com que a cadeia deixe de simplesmente tocá-lo e passe a envolvê-lo. Quando isto ocorre, polímeros flexíveis assumem estruturas macromoleculares tipo “bola de tênis”. Com o aumento da sua rigidez, estruturas tipo “solenóide” e “rosette” podem também ser obtidas [11, 12, 33]. Em alto grau de polimerização apenas parte do polieletrólito se mantém em contato com a partícula coloidal, com o restante formando conformações semelhantes à “caudas” [8, 12]. Entretanto, estudos por simulação computacional apontam discordâncias em relação ao número de caudas. Resultados obtidos por A. Akinchina e P. Linse [12, 34] demonstram duas caudas se estendendo em direções opostas, ao contrário dos trabalhos de P. Chodanowski e S. Stoll [8, 11, 33, 35, 36], nos quais apenas uma cauda é observada.

Estudos experimentais [11, 37, 38] e teóricos [2, 15, 16] mostraram que complexos solúveis são estáveis apenas em concentrações intermediárias de sal. Em baixa força iônica, a energia livre de ligação contém uma componente altamente desfavorável devido ao trabalho necessário para curvar o polieletrólito sobre a superfície do macroión. Nestas condições, a adição de sal pode contribuir para a complexação blindando a interação repulsiva entre os grupos carregados do polímero. No limite de alta concentração salina, observa-se variações abruptas nas grandezas experimentais relacionadas à conformação da cadeia [39–44], caracterizando a dissociação do complexo. Segundo F. W. Wiegand [45], este comportamento característico de transição de fase pode ter grande importância na regulação do metabolismo celular, uma vez que pequenas variações na composição química da célula podem causar mudanças significativas no comportamento de diversas biomoléculas.

Embora exista um grande número de trabalhos por simulação computacional abor-

dando este problema [8, 12, 33–36, 46, 47], a dependência da força iônica crítica com a densidade de carga das macromoléculas tem se mostrado dependente do critério adotado para caracterizar a transição, além de não apresentar concordância com resultados empíricos.

Complexos solúveis tem sido também observados em condições onde as macromoléculas possuem carga de mesmo sinal [7, 27, 46, 48]. Este fenômeno, conhecido como *complexação do lado errado do ponto isoelétrico*, pode ser explicado assumindo que a heterogeneidade da densidade de carga da proteína é suficiente para gerar contribuições atrativas de segunda ordem [7, 49]. De acordo com esta abordagem, o polímero deve se ligar em regiões com alta densidade de carga oposta denominadas *patches de carga*. Outro mecanismo recentemente sugerido é o de *regulação de carga*. Segundo ele, em condições onde a macromolécula possui baixa carga líquida ($\text{pH} \approx \text{pI}$) a presença de outros corpos carregados influencia significativamente no grau de ionização dos resíduos, modificando a distribuição de carga e causando o surgimento de uma carga induzida que favorece a interação. Segundo F. L. B. da Silva e colaboradores [50], a contribuição causada pela regulação de carga é dominante e pode ser a *driving force* para a complexação.

Baseado neste cenário, o objetivo geral do trabalho é contribuir para o maior entendimento da complexação entre macroíons e polieletrólitos em condições da solução ainda não suficientemente exploradas. Do ponto de vista metodológico, novas ferramentas computacionais foram desenvolvidas, as quais serão descritas no capítulo 2. No capítulo 4 será realizada a investigação do efeito da carga do macroíon e do grau de polimerização da cadeia nas propriedades conformacionais de polieletrólitos adsorvidos. Este estudo possibilitará elucidar as divergências existentes na literatura apontadas acima. O comportamento de fase deste sistema será abordado no capítulo 5, utilizando um diferente critério para caracterização das condições críticas. O raio de giração do polímero será adotado como parâmetro de ordem e o método de mul-

tiplos histogramas [51, 52] será aplicado para o cálculo da energia livre. No capítulo 6, um modelo simplificado será proposto para estudar o efeito da força iônica na contribuição devida à regulação de carga da interação entre poliânions e proteínas do leite, além de verificar o efeito de mutações em alguns resíduos da α -lactalbumina apontados [46] como fundamentais para estabilidade do complexo.

Capítulo 1

Modelo do Sistema

O tratamento teórico de soluções polieletrólíticas não é trivial devido à considerável interação entre todos seus componentes (macromoléculas, íons de sal, contraíons e solvente). Este problema de muitos corpos impõe limitações de ordem matemática, além de inviabilizar o tratamento numérico devido ao alto custo computacional ocasionado pelo grande número de graus de liberdade. Isto sugere a utilização de modelos simplificados que possam capturar as principais características físicas destes sistemas e possibilitar uma formulação matemático-computacional tratável, em um tempo de espera razoável. Estas simplificações são realizadas substituindo o comportamento explícito de algumas espécies pelo seu comportamento médio [53, 54]. A escolha do grau de simplificação adequado a cada aplicação está relacionada com as propriedades que se deseja calcular e com os recursos matemáticos e computacionais existentes. Enquanto cálculos de propriedades espectroscópicas exigem modelos com detalhamento atômico [55, 56], trabalhos têm mostrado que a interação entre moléculas biológicas pode ser estudada utilizando modelos com precisão em escala mesoscópica [57–59].

Seguindo a sugestão de H. L. Friedman [53, 54], os modelos podem ser classifica-

dos de acordo com o seu grau de detalhamento. No nível mais fundamental, denominado *nível de Schrödinger* [53, 54], a Hamiltoniana do sistema é função das coordenadas dos elétrons e núcleos, e a interação entre as partículas é obtida de primeiros princípios. Nestas condições, a equação de Schrödinger deve ser resolvida, na maioria dos casos, por métodos aproximativos ou computacionais [60–62]. No *nível de Bohr–Oppenheimer*¹, o comportamento explícito dos elétrons é substituído pelo seu comportamento médio, e o modelo é resolvido em função das coordenadas dos átomos [53, 54]. Entretanto, nesta aproximação o potencial de interação não é conhecido, necessitando da utilização de campos de força parametrizados empiricamente ou através de cálculos quânticos [63]. Em sistemas envolvendo predominantemente interações de longo alcance, a estrutura microscópica do solvente pode ser desprezada e o comportamento molecular explícito do meio aquoso pode ser substituído por um meio contínuo com propriedades determinadas por sua constante dielétrica [54, 64–66]. Este nível de aproximação é denominado *nível de McMillan–Mayer* e foi adotado neste trabalho. A temperatura do sistema foi mantida fixa em $T = 298,15$ K e a constante dielétrica do solvente ϵ_s assumiu o valor obtido experimentalmente de 78,7.

1.1 Modelo da Célula

Em soluções suficientemente diluídas pode-se considerar que as espécies macromoleculares se comportam independentemente umas das outras. Isto permite a utilização do *modelo da célula* [67–70]. De acordo com esta aproximação, o volume total da solução pode ser dividido em regiões compostas por um macroión e N_c moléculas do polímero, além de íons de sal e contraíons. Devido à geometria da partícula coloi-

¹ Não deve-se confundir o nível de *Bohr–Oppenheimer*, classificação adotada por H. L. Friedman para o estudo de soluções coloidais, com a aproximação de *Bohr–Oppenheimer* para cálculos de estrutura eletrônica [60–62].

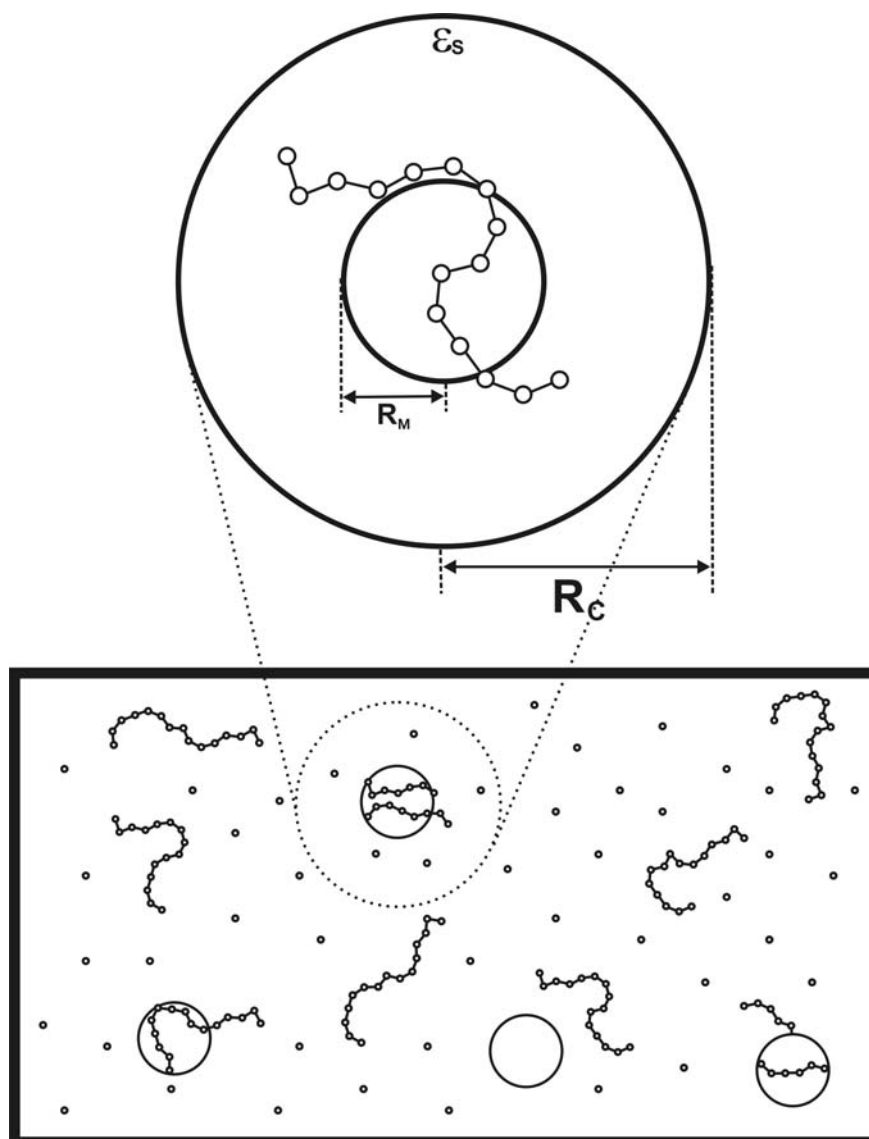


Figura 1.1: Representação do modelo da célula. Os íons de sal e contraíons não são incluídos na célula pois são tratados implicitamente como descrito na seção 1.4.

dal, é conveniente definir estas regiões como células esféricas de raio R_c , consistente com a concentração macromolecular, como mostrado na figura 1.1. Na maior parte deste trabalho, exceto nos resultados referentes à regulação de carga apresentados no capítulo 6, foi adotado $R_c = 158,26$ nm referente à concentração macromolecular de $0,1 \mu\text{M}$. No capítulo 6 foram utilizados $R_c = 340,97 \text{ \AA}$ ($0,01 \text{ mM}$) e $R_c = 199,40 \text{ \AA}$ ($0,05 \text{ mM}$).

A interação entre quaisquer espécies ocupando diferentes células é completamente

desprezada. Isto exige que cada célula seja eletricamente neutra e que não existam flutuações do número de partículas em seu interior. Por isso, qualquer partícula de raio R localizada a uma distância de r do centro da célula deve estar sujeita ao potencial confinante

$$u_{conf}(r) = \begin{cases} \infty & , \quad r > (R_c - R) \\ 0 & , \quad \text{caso contrário.} \end{cases} \quad (1.1)$$

1.2 Macroión

Recentemente, resultados empíricos mostraram a importância da distribuição de carga do macroión na sua afinidade à polieletrólitos flexíveis [7, 49, 71, 72]. Por isso, um modelo com detalhamento microscópico seria desejável e perfeitamente possível [46, 50, 73]. Entretanto, com o intuito de generalizar as análises realizadas neste trabalho, foi adotada uma representação simplificada. Apenas a contribuição de primeira ordem da expansão multipolar do potencial eletrostático gerado pelo macroión foi considerada, tratando o mesmo como uma esfera rígida de raio R_m e carga líquida $Q_m = Z_m e$, sendo e a carga elementar, localizada no centro.

Parece razoável assumir que a polarizabilidade do interior do macroión seja consideravelmente diferente da polarizabilidade do solvente [65, 74]. Isso ocasionaria a existência de cargas de polarização na superfície macromolecular e, conseqüentemente, a necessidade de definir um baixo valor para a constante dielétrica do interior do macroión (ϵ_m). Entretanto, não existe um consenso na literatura [75–79] sobre a localização da interface dielétrica e o valor correto de ϵ_m , sendo muitas vezes definidos de forma a obter resultados concordantes com dados experimentais [80].

Previsões teóricas da constante de ligação de íons metálicos à proteínas da família

da *Calmodulina*, mostraram concordância com resultados experimentais apenas para altos valores da constante dielétrica do interior proteico [77]. A utilização de baixos valores fornece resultados sem coerência física para a previsão de efeitos mutacionais [79]. Por outro lado, no caso da interação do radical superóxido (O_2^-) com a proteína *Superoxido Dismutase* [81], a utilização de baixos valores para ϵ_m é necessária para explicação dos dados empíricos. Diante destas divergências, alguns trabalhos afirmam que a escolha da constante dielétrica macromolecular depende da aplicação e das grandezas físicas que se deseja calcular [75, 82].

Seguindo então a proposta de vários trabalhos [8, 70, 83, 84] que investigaram a interação de polímeros carregados com proteínas e nanopartículas, será adotada uma atitude pragmática na qual as cargas de polarização serão desprezadas assumindo $\epsilon_m = \epsilon_s$. Esta aproximação tem o intuito principal de manter o modelo com grau de simplificação apropriado para o tratamento computacional.

1.3 Polieletrólito

O modelo adotado para o polieletrólito seguiu as especificações necessária para reproduzir o comportamento de cadeias Gaussianas [10, 85]. Além de possuir alto grau de generalidade, esta forma de tratar o polímero tem se mostrado compatível com abordagens teóricas mais detalhadas. De fato, simulações por dinâmica molecular considerando detalhamento atômico mostraram que a distância entre aminoácidos consecutivos de homopeptídeos carregados satisfaz aproximadamente a distribuição Gaussiana [86]. O polímero foi então representado simplesmente por um conjunto de N_p esferas rígidas de raio $R_p = 2 \text{ \AA}$ e carga líquida $Q_p = Z_p e = e$, conectadas pelo potencial harmônico

$$u_p(r) = \frac{1}{2}kr^2, \quad (1.2)$$

onde r é a distância entre dois monômeros consecutivos. Na ausência de qualquer perturbação externa, a distância média r_o é determinada pelo equilíbrio entre a força eletrostática repulsiva e a força harmônica atrativa. Definindo então um valor para o parâmetro r_o é possível obter a constante k através da relação [69, 86]

$$kr_o = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_o\epsilon_s r_o^2}, \quad (1.3)$$

onde ϵ_o é a permissividade elétrica do vácuo. A rigidez estrutural da cadeia foi desprezada, considerando que a componente eletrostática do comprimento de persistência é predominantemente responsável pela sua flexibilidade (a definição de comprimento de persistência será dada na seção 3.3). Em todas as simulações realizadas neste trabalho o valor do parâmetro r_o foi fixado em 4.5 Å, resultando na distância média monômero–monômero de aproximadamente 7.5 Å. Este valor é compatível com as distâncias entre aminoácidos de uma cadeia polipeptídica.

1.4 Solução Eletrolítica

Os pequenos íons móveis da solução, ou seja, íons de sal e contraíons dissociados das espécies macromoleculares, são comumente tratados de acordo com o *Modelo Primitivo* [87]. Esta forma tem se mostrado adequada para a descrição da formação de complexos moleculares [12, 50, 88–90]. Entretanto, em regimes de alta concentração salina, onde o número de partículas se torna suficientemente grande, o tempo computacional necessário para obter a convergência das propriedades médias torna o seu emprego proibitivo. Na verdade, em concentrações moderadas de sal (100

mM) este problema já está presente. Uma alternativa para reduzir o tempo computacional é considerar os pequenos íons da solução implicitamente. Em contato com o potencial elétrico gerado pelo macroíon e pelas cadeias polieletrólíticas, os íons de sal e contraíons se distribuirão atenuando a interação entre os outros constituintes do sistema. É possível então estabelecer um potencial efetivo determinado pelo comportamento médio dos íons. Este potencial pode ser obtido através da teoria de Debye-Hückel [91, 92], onde a interação entre duas partículas carregadas é dada pelo potencial de Coulomb blindado. Introduzindo uma contribuição de curto alcance dada apenas por uma barreira infinita de potencial responsável em evitar a sobreposição dos monômeros (potencial de esfera-rígida), a energia de interação entre quaisquer dois deles é então expressa por

$$\beta u_{el}^p(r) = \begin{cases} \infty & , \quad r < 2R_p \\ l_B \frac{Z_p^2}{r} \exp(-\kappa r) & , \quad \text{caso contrário,} \end{cases} \quad (1.4)$$

onde $\beta = (k_B T)^{-1}$, sendo k_B a constante de Boltzmann, e $l_B = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_o\epsilon_s k_B T}$ é chamado *comprimento de Bjerrum* [1, 92].

A constante κ^{-1} é o comprimento de Debye [91, 93]. Tradicionalmente, esta grandeza é relacionada apenas com a concentração salina. Entretanto, desde a década de 80, trabalhos mostraram que a inclusão dos contraíons responsáveis em compensar a carga macromolecular torna a teoria de Debye-Hückel adequada para descrever os efeitos da concentração macromolecular em soluções coloidais [93–96]. Recentemente, isto também se verificou no estudo da interação entre ligantes e proteínas [97]. Seguindo esta abordagem, o κ modificado é dado por

$$\kappa^{-1} = \left[\frac{\epsilon_o\epsilon_s k_B T}{e^2 \sum_{i=1}^3 n_i (Z_i)^2} \right]^{1/2}, \quad (1.5)$$

onde n_i e Z_i são a densidade numérica e valência da espécie i , respectivamente. O índice i representa os cátions e ânions do sal e os íons responsáveis pela eletroneutralidade da célula.

A energia de interação entre o macroión e um dado monômero é dada pelo potencial de Verwey-Overbeek [98]

$$\beta u_{el}^m(r) = \begin{cases} \infty & , \quad r < (R_m + R_p) \\ l_B \frac{Z_m Z_p}{(1 + \kappa R_m)} \exp[-\kappa(r - R_m)] & , \quad \text{caso contrário.} \end{cases} \quad (1.6)$$

Sendo $N = N_c N_p$ o número total de monômeros no interior da célula, a energia total de uma determinada configuração do sistema é dada por

$$U = \sum_{i=1}^N u_{conf}(r_i) + \sum_{i=1}^N u_{el}^m(r_i) + \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N u_{el}^p(r_{i,j}) + \sum_{i=1}^{N_c} \sum_{j=1}^{N_p-1} u_p(r_{j,j+1}^i), \quad (1.7)$$

onde r_i é a distância entre um determinado monômero i e o centro do macroión, $r_{i,j}$ é a distância entre quaisquer dois monômeros i e j , e $r_{j,j+1}^i$ é a distância entre os monômeros j e $j + 1$ da i -ésima cadeia. O primeiro termo refere-se a interação de confinamento dos monômeros no interior da célula (relação 1.1), os dois próximos são referentes a interação eletrostática monômero–macroión (relação 1.6) e monômero–monômero (relação 1.4), respectivamente, e o último termo refere-se ao potencial que mantém a conexão entre os monômeros (relação 1.2).

Capítulo 2

Ferramentas Computacionais

Devido a complexidade da função energia potencial definida no capítulo anterior, o tratamento matemático analítico do modelo se torna impossível. Em geral, a solução de problemas envolvendo muitos corpos interagentes exige uma abordagem numérica [91, 99–103]. Basicamente, duas técnicas de simulação computacional tem sido amplamente empregadas para o estudo de sistemas biomoleculares: uma delas, o método **Monte Carlo** (MC), [100, 102, 103] é baseado na geração de configurações aleatórias que são utilizadas, com a probabilidade adequada, para o cálculo de propriedades termodinâmicas e estruturais médias, de acordo com os fundamentos da Mecânica Estatística. Por outro lado, a técnica de **Dinâmica Molecular** (DM) [100, 102, 104, 105] realiza a integração numérica das equações da Mecânica Clássica atribuídas a cada constituinte do sistema. Como consequência, propriedades dinâmicas são obtidas naturalmente em conjunto com grandezas médias efetuadas sobre o tempo. Embora a hipótese ergódica [100, 106, 107] sugira a equivalência entre as propriedades médias obtidas com as duas metodologias, estudos [82] apontam que o método MC é mais apropriado para simulações no nível de McMillan-Mayer, ao contrário da técnica de DM que vem se mostrando mais eficiente na abordagem de problemas envolvendo processos de hidratação em escala microscópica.

2.1 Mecânica Estatística Clássica

Assumindo a validade dos limites da Mecânica Clássica, o estado de um sistema físico contendo n graus de liberdade é completamente determinado, em um dado instante, pelo valor assumido pelas coordenadas generalizadas $\{q_1, q_2, \dots, q_n\}$ e momentos canonicamente conjugados $\{p_1, p_2, \dots, p_n\}$. A evolução temporal pode ser obtida através da solução das equações de movimento (equações de *Hamilton*) [108]. Conhecendo então o estado em um instante qualquer, as condições iniciais ficam estabelecidas e o comportamento dinâmico do sistema se torna univocamente determinado.

Entretanto, algumas situações não permitem a obtenção de todo o conhecimento necessário para a aplicação do formalismo tradicional da Mecânica Clássica. Não é possível, por exemplo, conhecer o estado microscópico de um fluido em algum instante. Nestes casos, é razoável assumir que em intervalos de tempo suficientemente grandes, comparáveis ao tempo necessário para realização de medidas empíricas, o sistema assuma todos os estados acessíveis e suas propriedades se tornem independentes do tempo. Esta situação caracteriza o equilíbrio termodinâmico [106, 109].

Isto possibilita o tratamento teórico através de uma abordagem estatística, onde grandezas físicas podem ser calculadas como médias sobre todas as configurações do sistema, independente do seu comportamento dinâmico. Para isso, é conveniente introduzir um tratamento geométrico através da construção de um espaço cartesiano de dimensão $2n$, denominado *espaço de fase* [107, 109], onde cada estado seja representado por um ponto de coordenadas $(q_1, q_2, \dots, q_n, p_1, p_2, \dots, p_n)$. Em geral, a distribuição de pontos no espaço de fase não é homogênea, tornando necessária a definição de uma função densidade de probabilidade $\rho(q_1, q_2, \dots, q_n, p_1, p_2, \dots, p_n)$ que determina o número de estados no interior de um elemento de volume [106]. O conjunto das configurações representadas pelos pontos no espaço de fase é chamado

ensemble.

Denotando $q \equiv \{q_1, q_2, \dots, q_n\}$ e $p \equiv \{p_1, p_2, \dots, p_n\}$, a média de uma determinada grandeza física Γ pode ser calculada através da expressão [109]

$$\langle \Gamma \rangle = \int \Gamma(q, p) \rho(q, p) dq dp. \quad (2.1)$$

A função ρ é determinada pelos vínculos impostos a alguns parâmetros macroscópicos. De acordo com o modelo descrito no capítulo anterior, as configurações que determinam o comportamento do sistema estão restritas ao mesmo número de partículas N e ao mesmo volume V . Considera-se ainda a célula em equilíbrio térmico com o restante da solução à temperatura T . O conjunto das configurações sujeitas a N , V e T constantes é denominado *ensemble canônico*. Neste caso, a densidade de probabilidade é dependente apenas da função *Hamiltoniana* $H(q, p)$:

$$\rho(q, p) = \frac{\exp[-\beta H(q, p)]}{\int \exp[-\beta H(q, p)] dq dp}. \quad (2.2)$$

Toda a informação necessária para a caracterização termodinâmica do sistema, a partir de suas propriedades microscópicas, esta contida na *função de partição canônica* [106, 109]

$$Q = \frac{1}{h^{3N} \prod (N_i!)} \int \exp[-\beta H(q, p)] dq dp, \quad (2.3)$$

onde h é a constante de *Plank*. A produtória é realizada sobre todas as espécies de partículas distinguíveis, sendo N_i o número de partículas da espécie i . Em termos da *densidade de estados* $\Omega(E)$, ou seja, do número de estados microscópicos acessíveis ao sistema com energia E , a função de partição pode ser escrita como

$$Q = \int \Omega(E) \exp(-\beta E) dE. \quad (2.4)$$

Pode-se mostrar que a energia livre de *Helmholtz* é calculada através da expressão $A = -k_B T \ln Q$ [106, 109], de onde qualquer outra grandeza termodinâmica pode ser obtida.

Em situações onde a energia potencial depende apenas das coordenadas, como no caso do modelo apresentado no capítulo anterior, a relação 2.3 pode ser simplificada integrado-a nos momentos. Adotando o conjunto de coordenadas generalizadas como as componentes cartesianas dos vetores que indicam a posição de cada uma das N partículas ($\mathbf{r} \equiv \{\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N\}$), a função de partição pode ser reescrita como

$$Q = \frac{Z}{\prod [\Lambda_i^{3N_i} (N_i!)]}, \quad (2.5)$$

onde $Z = \int \exp[-\beta U(\mathbf{r})] d\mathbf{r}$ é a componente configuracional de Q , denominada *integral de configuração*, e $\Lambda_i = \frac{h}{\sqrt{2\pi m_i k_B T}}$ é o comprimento de onda térmico de uma partícula da espécie i com massa m_i .

Caso Γ também dependa apenas das coordenadas, a mesma integração pode ser realizada na relação 2.1, obtendo

$$\langle \Gamma \rangle = \int \Gamma(\mathbf{r}) \rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r}, \quad (2.6)$$

onde a densidade de probabilidade passa a depender apenas da posição das partículas:

$$\rho(\mathbf{r}) = \frac{\exp[-\beta U(\mathbf{r})]}{Z}. \quad (2.7)$$

Poucos são os modelos onde as integrais definidas acima podem ser resolvidas exatamente por métodos analíticos. Entretanto, além do tratamento numérico, métodos aproximativos baseados em teoria de perturbação [91] ou expansão em “cluster” [110], por exemplo, podem ser utilizados.

2.2 Método Monte Carlo

O princípio básico do cálculo numérico de integrais é estabelecer um conjunto de valores discretos para a variável, de forma que o resultado da integral possa ser obtido, dentro da precisão desejada, apenas pelos referentes valores assumidos pelo integrando. Este procedimento de discretização é inerente a métodos computacionais devido a imposição de um limite finito para a precisão de qualquer grandeza numérica [107]. Os valores da variável podem ser estabelecidos *a priori* e homogeneamente distribuídos pelo intervalo definido pelos limites da integral. Este é o caso do método de *Simpson* [111], por exemplo.

Esta metodologia se torna inviável para a solução de integrais multidimensionais, como no caso da relação 2.6. Uma formulação alternativa é tratar o conjunto das coordenadas que definem a configuração do sistema de maneira estocástica [112]. Configurações aleatórias podem ser geradas computacionalmente formando uma cadeia Markoviana [112]. Neste caso, uma determinada configuração r_i dependerá apenas da configuração anterior r_{i-1} . Se a distribuição de probabilidades destas configurações satisfizer a relação 2.7, a média de qualquer grandeza Γ pode ser calculada simplesmente por

$$\langle \Gamma \rangle = \frac{1}{M} \sum_i \Gamma_i, \quad (2.8)$$

onde Γ_i é o valor assumido por Γ quando o sistema assume a configuração r_i e M é o número total de configurações. O problema então está em se definir um critério de aceitação para as configurações criadas computacionalmente, de forma a satisfazer a distribuição de probabilidades apropriada. Isto é realizado fazendo uso da condição de *balanço detalhado* [106,112]. Denotando por $P(r_i|r_j)$ a probabilidade de transição da configuração r_j para a configuração r_i e por $P(r)$ a probabilidade do sistema assumir a configuração r , esta condição é matematicamente expressa por

$$P(r_i|r_{i-1})P(r_{i-1}) = P(r_{i-1}|r_i)P(r_i). \quad (2.9)$$

Utilizando a distribuição 2.7, a razão entre as probabilidade de transição se torna apenas dependente da diferença de energia ΔU das duas configurações em questão:

$$\frac{P(r_i|r_{i-1})}{P(r_{i-1}|r_i)} = \exp(-\beta\Delta U). \quad (2.10)$$

Resolvendo a equação acima, determina-se as probabilidades de transição e consequentemente se obtém o critério de aceitação desejado. A equação 2.10 não possui solução única. Uma delas, proposta por N. A. Metropolis e colaboradores [100,113], foi adotada para este trabalho. Esta solução é dada por

$$P(r_i|r_{i-1}) = \begin{cases} \exp(-\beta\Delta U) & , \quad \Delta U > 0 \\ 1 & , \quad \Delta U < 0. \end{cases} \quad (2.11)$$

O algoritmo computacional para implementação da proposta de Metrópolis segue o seguinte procedimento:

1. A partir de uma configuração r_i cria-se uma nova configuração r'_i realizando movimentos aleatórios nas partículas.
2. Calcula-se a diferença de energia entre as duas configurações $\Delta U = U(r'_i) - U(r_i)$.
3. Se $\Delta U \leq 0$ a nova configuração é aceita ($r_{i+1} = r'_i$).
4. Se $\Delta U > 0$ um número aleatório η homogeneamente distribuído no intervalo $[0,1]$ é criado.
5. Se $\eta \leq \exp[-\beta\Delta U]$ a configuração é aceita ($r_{i+1} = r'_i$).
6. Se $\eta > \exp[-\beta\Delta U]$ a configuração é rejeitada ($r_{i+1} = r_i$).
7. Repete-se todo processo a partir do passo 1.

2.3 Desenvolvimentos Computacionais

Os códigos computacionais foram escritos especificamente para este trabalho, adotando a linguagem de programação Fortran 77 e implementando o método Monte Carlo em conjunto com o algoritmo de Metrópolis, como descrito na seção anterior. Primeiramente, foi desenvolvido um código básico responsável em realizar a simulação do modelo descrito no capítulo 1, calculando as propriedades conformacionais médias da cadeia e a distribuição dos monômeros. Uma implementação adicional foi realizada posteriormente com o objetivo de estudar o efeito da regulação de carga [50, 59, 114]. Detalhes sobre esta segunda etapa de desenvolvimento são apresentados no capítulo 6.

2.3.1 Código Básico

Inicialmente, o programa solicita os parâmetros referentes ao modelo, juntamente com as informações relacionadas com a execução da simulação. Estes dados são apresentados na tabela 2.3.1. As configurações do sistema são geradas através de 2 tipos de movimentos. Em cada passo da simulação estes movimentos são selecionados e realizados de acordo com a descrição abaixo:

1. **Translação de um monômero:** Um monômero é escolhido aleatoriamente e as coordenadas X, Y e Z que determinam sua posição no interior da célula são acrescidas de um deslocamento ΔX , ΔY e ΔZ , respectivamente. A magnitude destes deslocamentos são obtidas randomicamente, sendo, entretanto, necessariamente menores do que o valor definido no início da execução do programa. Esta restrição determina o número de configurações aceitas no

Tabela 2.1: Relação dos dados solicitados pelo programa no início de sua execução. As grandezas entre parênteses indicam a forma como os parâmetros são denotados no capítulo 1.

| Parâmetros de entrada relacionados com o modelo | Informações de entrada relacionados com a execução da simulação |
|---|---|
| Raio do Macroion (R_m) | Número de passos para equilíbrio |
| Valência do Macroion (Z_m) | Número de passos para a produção |
| Concentração do macroion | Semente do gerador de números aleatórios |
| Número de cadeias (N_c) | Deslocamento máximo dos monômeros |
| Número de monômeros por cadeia (N_p) | Deslocamento máximo das cadeias |
| Raio dos monômeros (R_p) | Probabilidade de deslocar a cadeia |
| Valência dos monômeros (Z_p) | Número de configurações independentes |
| Separação de eq. dos monômeros (r_0) | Ler a configuração da simulação anterior ? |
| Concentração de sal | Executar produção ? |
| Temperatura (T) | |

critério de Metrópolis. O valor adotado foi de 4,5 Å, ocasionando a aceitação de aproximadamente 35% das configurações. Esta escolha se mostrou estatisticamente eficiente, ou seja, as propriedades médias relacionadas a posição dos monômeros, como o raio de giração e a distância *end-to-end*, convergiram com o menor número de passos.

2. **Translação de uma cadeia:** Uma cadeia é escolhida aleatoriamente e todos os monômeros são deslocados conforme descrito no item acima. O valor adotado para o deslocamento máximo, e conseqüentemente a aceitação deste movimento, é fortemente dependente da magnitude da interação entre o polímero e o macroión. Em baixas concentrações de sal, o deslocamento máximo deve ser de poucos Angströms para obter aceitação em torno de 5%. Com valores tão baixos corre-se o risco do sistema se manter em estados correspondentes à mínimos de energia locais. Este problema é evitado através do procedimento descrito na seção 2.4. Em regimes de alta blindagem eletrostática, aproximadamente metade das configurações são aceitas adotando o deslocamento máximo igual à metade do raio da célula.

A execução do movimento de um monômero ou de toda a cadeia é determinada no início de cada passo através da criação de um número aleatório η . Se η for menor do que a probabilidade de deslocar a cadeia, informada no início da execução do programa, a translação da cadeia é efetuada. Caso contrário, o movimento de um monômero é realizado. O valor da probabilidade depende do grau de polimerização da cadeia e foi definida de forma a resultar em boa eficiência estatística.

As posições iniciais dos monômeros são determinadas de duas formas. Se não for indicado ao programa para ler a configuração da simulação anterior, as posições são definidas aleatoriamente. No final da fase de equilibração um arquivo é gerado com as últimas coordenadas obtidas. Os dados contidos neste arquivo podem determinar

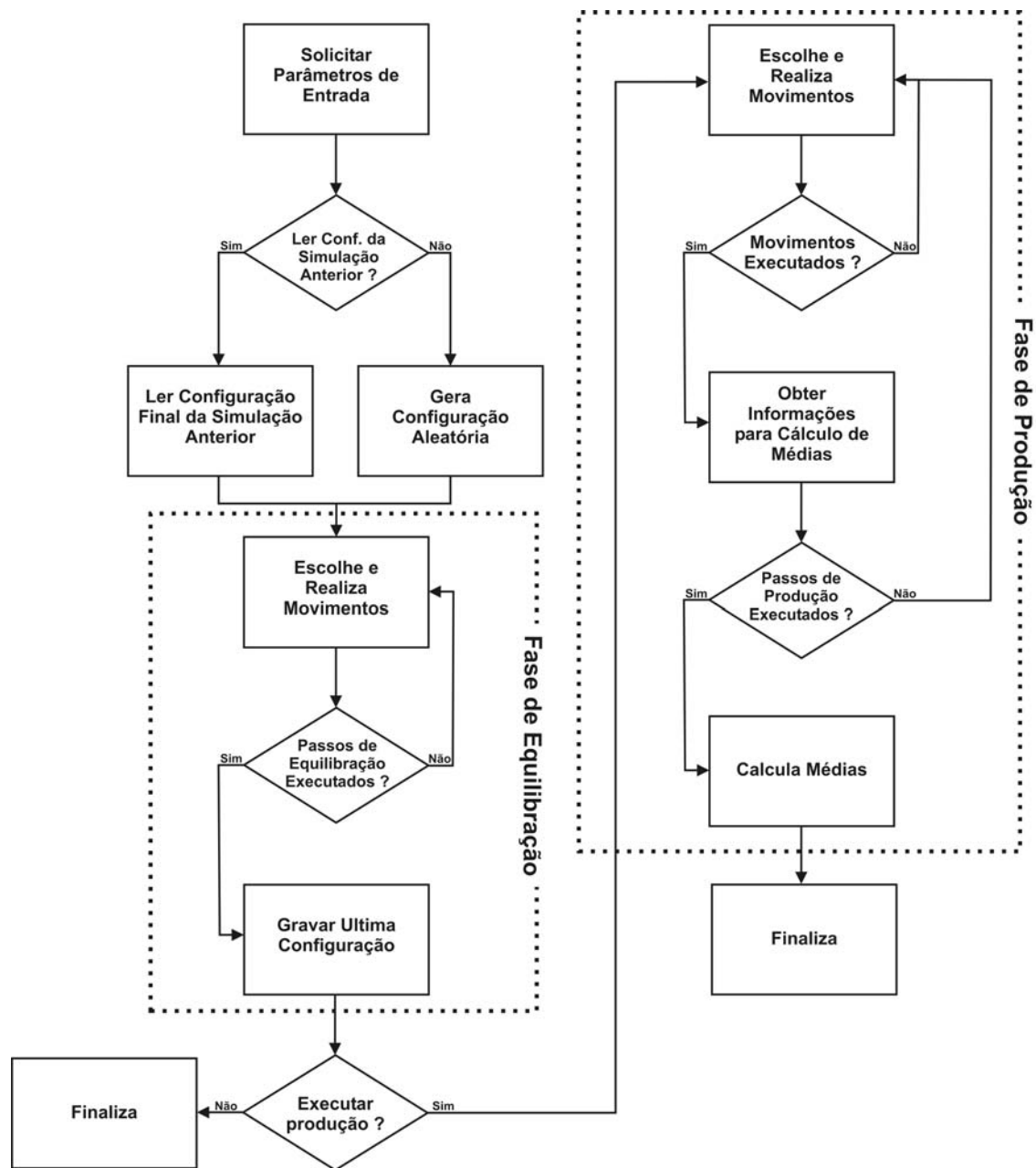


Figura 2.1: Fluxograma do programa.

a configuração inicial de uma nova simulação, caso esta opção seja selecionada.

A simulação contém duas fases principais. A fase de equilíbrio tem como objetivo levar o sistema ao estado de equilíbrio, de acordo com os critérios especificados na seção 2.4. Quando estes critérios são satisfeitos, é indicado ao programa que se execute a fase de produção, na qual as propriedades médias são calculadas. Tendo

adquirido uma determinada configuração, depois de um número suficiente de movimentos tem-se outra estatisticamente independente, a qual fornecerá informações para o cálculo das médias. A cada passo da fase de produção o programa realiza esse número de movimentos e armazena essas informações. Em geral foram utilizados 1×10^7 passos na fase de produção, número suficiente para a convergência de todas as propriedades médias calculadas. Para simulações com cadeias contendo 100 monômeros, este número de passos consome aproximadamente 96 horas de simulação em um microcomputador com processador *Dualcore* AMD64 com 2.2 GHz. Este tempo cai para aproximadamente 38 e 22 horas quando o grau de polimerização da cadeia é 60 e 40, respectivamente. O fluxograma completo do código é mostrado na figura 2.1.

2.3.2 Propriedades Médias Calculadas

Como já afirmado na seção anterior, durante a execução da fase de produção várias grandezas físicas são acumuladas pelo programa, para que no término da simulação as médias possam ser calculadas através da expressão 2.8. Entretanto, o cálculo de algumas propriedades exigem procedimentos mais elaborados, os quais são descritos a seguir.

Função Distribuição Radial

O desvio da idealidade causado pela interação entre os constituintes de um sistema físico pode ser quantitativamente avaliado pela *função distribuição radial* (fdr) [91, 99]. Esta grandeza é uma propriedade estrutural relacionada com a localização média relativa entre as partículas, passível de ser medida experimentalmente por difração de raio-X [115] e espalhamento de neutrons [116]. Aplicando ao problema específico deste trabalho, pode-se verificar o efeito do campo eletrostático criado

pelo macroíon sobre as outras espécies carregadas da solução, como o polieletrólito ou seus monômeros. Neste caso, a fdr pode ser definida como

$$g_i(r) = \frac{P_i(\mathbf{r})}{\rho_i}, \quad (2.12)$$

onde $P_i(\mathbf{r})$ é a probabilidade de uma partícula qualquer da espécie i se localizar na posição \mathbf{r} , independente da posição das outras $N - 1$ partículas, e $\rho_i = \frac{N_i}{V}$ é a densidade numérica das partículas da espécie i . Devido à isotropia do sistema em relação à esfera central, a função distribuição radial é dependente apenas de $|\mathbf{r}| \equiv r$.

A função $P_i(\mathbf{r})$ pode ser expressa como $N_i P_i^j(\mathbf{r})$, onde $P_i^j(\mathbf{r})$ é a probabilidade de uma determinada partícula j da espécie i se localizar na posição especificada acima:

$$P_i^j(\mathbf{r}) = \frac{1}{Z} \int \exp[-\beta U(\mathbf{r})] \delta(\mathbf{r}_j - \mathbf{r}) d\mathbf{r}. \quad (2.13)$$

Para calcular a fdr computacionalmente, a célula foi dividida em “fatias” concêntricas ao macroíon de largura $\delta = 1 \text{ \AA}$. No final da simulação, o número médio n_i^k de partículas da espécie i localizadas no interior da k -ésima fatia é calculado. Sendo V_k o volume da fatia, a probabilidade $P_i(r)$ é dada por

$$P_i(r) = \frac{n_i^k}{V_k}, \quad (2.14)$$

onde $r = k\delta + \frac{\delta}{2} - 1$. O valor de δ não deve ser muito alto em relação às dimensões das partículas, uma vez que isto pode comprometer a precisão da fdr. Ao mesmo tempo, um valor muito baixo pode acarretar problemas de natureza estatística pois se torna necessário um número muito grande de configurações para garantir a convergência em cada fatia. Algumas simulações com $\delta = 0,5$ e $1,5 \text{ \AA}$ foram realizadas e verificou-

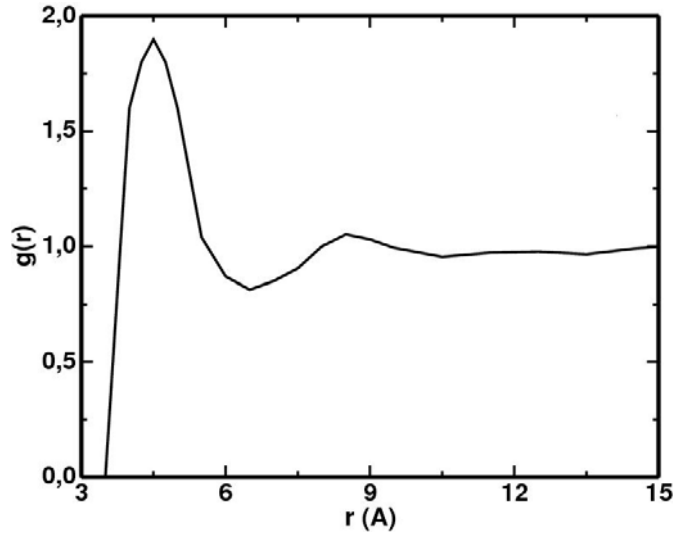


Figura 2.2: Função distribuição radial $g(r)$ para o sistema composto apenas por esferas rígidas em concentração de aproximadamente 7,2 M.

se a eficiência do valor adotado.

A figura 2.2A apresenta a função distribuição radial $g(r)$ típica de um fluido como argônio líquido [99]. Estes resultados foram obtidos com o modelo descrito no capítulo anterior, na ausência de interações eletrostáticas e de conexão entre os monômeros. O raio do macroión foi reduzido para 2 Å de forma a representar uma partícula qualquer do fluido. Devido à alta concentração (7,2 M aproximadamente), os efeitos causados pelas dimensões dos constituintes do sistema se manifestam através de um certo ordenamento estrutural de curto alcance. Pode-se identificar uma região com alta probabilidade das partículas serem encontradas, onde o valor máximo de $g(r)$ se localiza em r aproximadamente igual à distância de mínima aproximação ($\sigma = 4$ Å). Essa região é conhecida como *primeira camada de coordenação*. Em decorrência disto, a repulsão causada pelo potencial de esfera-rígida diminui a tendência das partículas se localizarem imediatamente após esta região. A *segunda camada de coordenação* pode ser observada em $r \approx 2\sigma$. Em distâncias suficientemente grandes, os desvios do comportamento ideal se tornam desprezíveis ocasionando $g(r \rightarrow \infty) \rightarrow 1$.

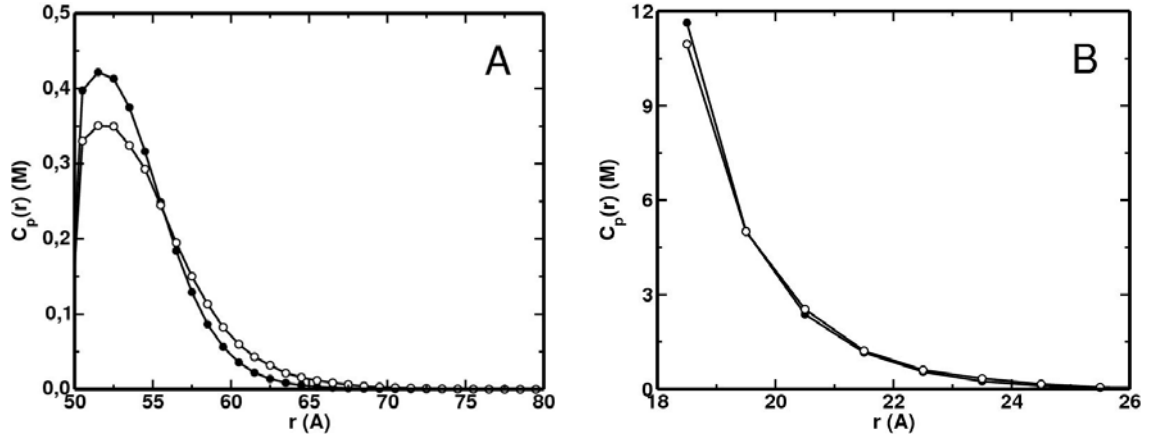


Figura 2.3: Concentração média de monômeros $C_p(r)$ na presença de um macroíon de valência $Z_m = -60$ em concentração salina nula. **(A)** O raio do macroíon é $R_m = 50$ Å e o raio da célula é $R_c = 100$ Å. **(B)** $R_m = 18$ Å e $R_c = 30$ Å. Os círculos pretos mostram resultados para uma cadeia com grau de polimerização $N_p = 60$, enquanto os brancos se referem ao sistema composto por 5 cadeias com $N_p = 12$.

Seja C_p a concentração total de monômeros. A concentração média $C_p(r)$ à distância r do macroíon pode ser obtida através da relação

$$C_p(r) = C_p g_p(r), \quad (2.15)$$

onde o índice “p” se refere aos monômeros. Esta função é mostrada na figura 2.3, seguindo as especificações da referência 58. Primeiramente, pode-se afirmar excelente concordância com os resultados exibidos em tal trabalho. Uma das curvas apresenta resultados para uma cadeia com grau de polimerização $N_p = 60$, enquanto a outra é referente a 5 cadeias com $N_p = 12$. O macroíon possui valência $Z_m = -60$ em força iônica nula. Observa-se através da figura 2.3A que no sistema composto por apenas uma cadeia, a conexão entre todos os monômeros causa um aumento da concentração destes na vizinhança do macroíon, além de um estreitamento da camada de coordenação. O alto confinamento causado pela diminuição do raio da célula (gráfico 2.3B) faz com que todos os monômeros se mantenham, praticamente, em contato com o macroíon, independente do número de cadeias. Neste caso, a largura da camada de coordenação é aproximadamente igual ao diâmetro dos monômeros.

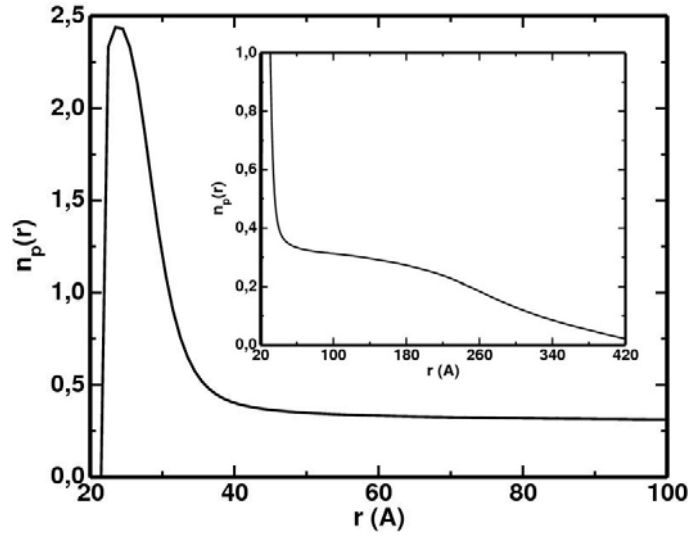


Figura 2.4: Número de coordenação $n_p(r)$ em função da distância r ao centro do macroíon com valência $Z_m = -15$. O polímero contém $N_p = 100$ monômeros. Os resultados foram obtidos em concentração salina nula e concentração macromolecular de $0,1 \mu\text{M}$ ($R_c = 158,26 \text{ nm}$).

O número médio de monômeros $n_p(r)$ à distância r do macroíon pode ser calculado através da expressão

$$n_p(r) = 4\pi r^2 \rho_p g_p(r). \quad (2.16)$$

Na figura 2.4 esta grandeza é exibida para o sistema formado por um macroíon com valência $Z_m = -15$ e um polímero possuindo 100 monômeros, em concentração salina nula. Além da camada de coordenação, observa-se a existência de monômeros em regiões afastadas da vizinhança do macroíon ($r > 40 \text{ \AA}$), caracterizando conformações tipo cauda.

Potencial da Força Média

O *potencial da força média* $w_i(r)$ de uma partícula da espécie i pode ser definido como o trabalho isotérmico reversível em trazer esta partícula de uma separação infinita até à distância r do macroíon. Quando isto é realizado nas condições que

caracterizam o ensemble canônico, esta grandeza é a variação da energia livre de *Helmholtz* neste processo. Pode-se mostrar que [99]

$$\beta w_i(r) = -\ln g_i(r) = -\ln P_i(r) + C, \quad (2.17)$$

onde C é uma constante arbitrária que pode ser definida considerando que o potencial de força média se anula em regiões suficientemente afastadas da partícula coloidal. Neste trabalho, o interesse está em verificar o efeito do macroíon sobre toda a cadeia. É conveniente então calcular o potencial da força média agindo sobre seu o centro de massa (indicado pelo índice “ cm ”). A probabilidade do centro de massa da cadeia se localizar à distância r do macroíon é dada por

$$P_{cm}(r) = \frac{1}{Z} \int \exp[-\beta U(\mathbf{r})] \delta\left(\frac{1}{N_p} \sum_{i=1}^{N_p} \mathbf{r}_i - r\right) d\mathbf{r}. \quad (2.18)$$

Entretanto, devido ao grande potencial atrativo que o macroíon exerce sobre o polímero, a probabilidade deste se localizar em regiões afastadas da partícula coloidal é muito pequena. Por isso, o tempo computacional necessário para obter a convergência de $P_{cm}(r)$ torna o cálculo de $w_{cm}(r)$ impraticável. Uma alternativa é utilizar o **método da função penalização** [50, 117, 118]. Este método se baseia em adicionar uma função $U^*(r)$ à energia potencial $U(\mathbf{r})$, fazendo com que a probabilidade do polieletrólito se localizar em qualquer ponto no interior da célula seja igualmente provável. Introduzindo a função “penalização” $U^*(r)$ a probabilidade se torna

$$P_{cm}^*(r) = \frac{1}{Z^*} \int \exp\{-\beta[U(\mathbf{r}) + U^*(r)]\} \delta\left(\frac{1}{N_p} \sum_{i=1}^{N_p} \mathbf{r}_i - r\right) d\mathbf{r}. \quad (2.19)$$

É possível mostrar que $P_{cm}(r) \propto P_{cm}^*(r) \exp[\beta U^*(r)]$. Então, se for encontrada uma função $U^*(r)$ que resulte em $P_{cm}^*(r)$ constante, a função penalização coincide com o potencial da força média:

$$w_{cm}(r) = -U^*(r). \quad (2.20)$$

O procedimento computacional para obtenção de $w_{cm}(r)$ é dividido em três etapas:

1. **Pré-equilibração:** Nesta etapa o potencial da força média é calculado através da expressão 2.17 com $U^*(r) = 0$. A figura 2.5A mostra $w_{cm}(r)$ obtida em uma situação exemplo. O polímero contém 20 monômeros e o macroíon possui

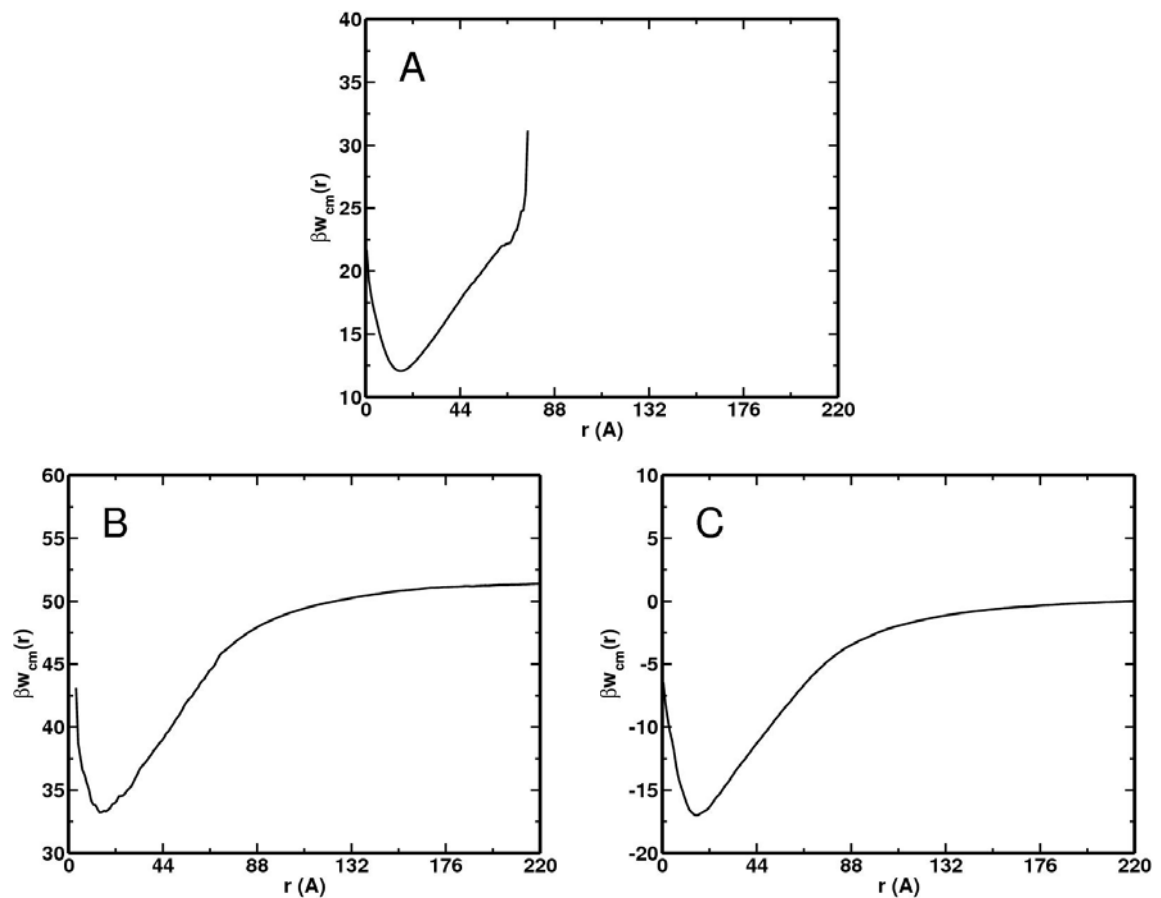


Figura 2.5: Potencial da força média $w_{cm}(r)$ agindo no centro de massa do polímero. Os resultados foram obtidos em cada uma das etapas da simulação: (A) pré-equilibração, (B) equilíbrio e (C) produção.

valência $Z_m = -6$ em concentração salina nula e concentração macromolecular de $20 \mu\text{M}$. Pode-se verificar que o centro de massa da cadeia possui probabilidade nula de se encontrar além de, aproximadamente, 90 \AA do macroíon.

2. **Equilíbrio:** A probabilidade $P_{cm}(r)$ obtida na etapa anterior é utilizada como a função penalização $U^*(r)$. Assim, regiões onde o polímero teve alta probabilidade de se encontrar na simulação anterior serão “penalizadas” e as regiões afastadas do macroíon se tornam estatisticamente privilegiadas, tornando a função $P_{cm}(r)$ aproximadamente constante em todo o volume da célula. O potencial de força média obtido nesta etapa é mostrado na figura 2.5B.
3. **Produção:** Da mesma forma que na etapa anterior, a probabilidade $P_{cm}(r)$ obtida na etapa anterior é utilizada como $U^*(r)$ e o potencial de força média atinge a convergência desejada conforme mostrado na figura 2.5C. Neste caso a curva foi transladada impondo que $w_{cm}(R_c) = 0$.

Energia Livre

A relativa estabilidade dos estados conformacionais assumidos por uma macromolécula pode ser investigada analisando a variação da energia livre com respeito a grandezas físicas relacionadas às suas propriedades estruturais. Entretanto, o cálculo da energia livre por simulação computacional envolve muitas dificuldades, uma vez que a entropia não pode ser obtida simplesmente através da média sobre o ensemble. Realizando uma simulação em temperatura fixa T , a distribuição de probabilidades de um dado parâmetro de ordem conformacional ξ pode não apresentar boa convergência para regiões de alta energia, uma vez que a energia térmica pode ser insuficiente para superar as barreiras energéticas que levam a tais estados.

Um dos métodos desenvolvidos para calcular a energia livre é o **método de múlti-**

plos histogramas [51, 52]. Este se baseia em aumentar as informações referente ao sistema de interesse combinando resultados de diferentes simulações. Seja então R simulações, sendo a i -ésima delas contendo M_i configurações obtidas em temperatura $T_i = \frac{1}{k_B \beta_i}$. Segundo S. Kumar e colaboradores [52], a densidade de estados $\Omega_i(\xi)$ obtida de cada simulação é dada por

$$\Omega_i(\xi) = H_i(\xi) \exp(\beta_i U - f_i), \quad (2.21)$$

onde $H_i(\xi)$ é o histograma de ξ e $f_i = \beta_i A_i$ é a energia livre adimensional. A densidade de estados real $\Omega(\xi)$ pode ser expressa pela média ponderada de Ω_i :

$$\Omega(\xi) = \sum_{i=1}^R c_i \Omega_i(\xi), \quad (2.22)$$

onde os pesos estatísticos c_i podem ser obtidos minimizando o erro de cada histograma. De acordo com C. H. Bennett [119]

$$c_i = \frac{M_i \exp(f_i - \beta_i U)}{\sum_{j=1}^R M_j \exp(f_j - \beta_j U)}. \quad (2.23)$$

Substituindo 2.23 em 2.22 é possível mostrar que a probabilidade do sistema na temperatura T assumir o valor ξ para parâmetro de ordem é dada por

$$P_\beta(\xi) = \frac{\sum_{i=1}^R H_i(\xi) \exp(\beta_i U)}{\sum_{i=1}^R M_i \exp(f_i - \beta_i U)} \quad \text{onde} \quad \exp(-f_j) = \sum P_\beta(\xi). \quad (2.24)$$

As equações 2.24 são resolvidas atribuindo valores iniciais arbitrários para f_i e realizando um processo iterativo até se obter a convergência desejada. Esta metodologia

foi implementada através da utilização do programa WHAM desenvolvido por A. Grossfield (<http://dasher.wustl.edu/alan/>).

2.4 A Fase de Equilibração

A função da fase de equilibração é fazer com que o sistema alcance o estado de equilíbrio, perdendo a memória da configuração inicial. Para isso, três execuções foram realizadas com diferentes valores para a semente do gerador de números

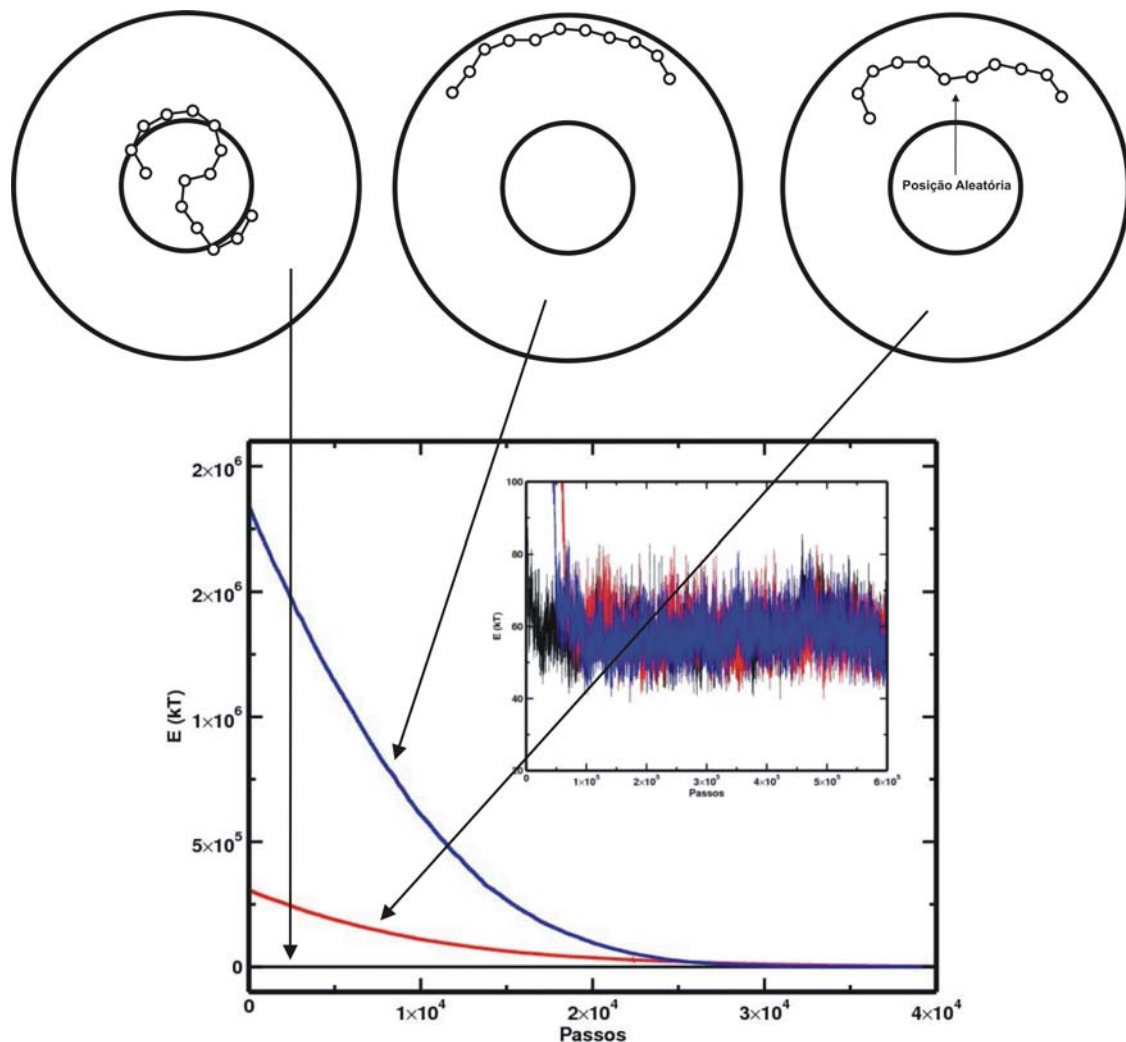


Figura 2.6: Representação esquemática das três configurações iniciais utilizadas no processo de equilibração. Resultados para o sistema composto por um macroión com valência $Z_m = -10$ e uma cadeia com 20 monômeros. A concentração de sal é nula.

aleatórios e diferentes configurações iniciais: uma delas com o polímero completamente em contato com o macroíon, uma outra com o polímero próximo da borda da célula, e a terceira com os monômeros posicionados aleatoriamente. O sistema é considerado em equilíbrio quando a energia das três simulações convergirem para um valor médio comum. A figura 2.6 mostra a evolução da energia total de um sistema composto por uma cadeia de 20 monômeros e um macroíon de valência $Z_m = -10$, em concentração salina nula. Em todas elas foram utilizados 1×10^6 passos. Caso este número não seja suficiente para alcançar o equilíbrio, novas simulações foram realizadas utilizando como configuração inicial a última configuração da execução anterior.

Na figura 2.7A é apresentado os primeiros 1×10^6 passos da equilibração do mesmo sistema abordado na figura 2.6, mas em concentração salina de 10 mM, próximo das condições que levam à transição. Na primeira simulação, onde a cadeia inicia em contato com o macroíon, o sistema assume configurações com baixa energia, caracterizando o estado complexado. As duas outras se mantêm com energia média compatíveis com o estado dissociado. As três simulações foram realizadas com deslocamento máximo da cadeia de 100 Å. Nos próximos 1×10^6 passos este valor foi

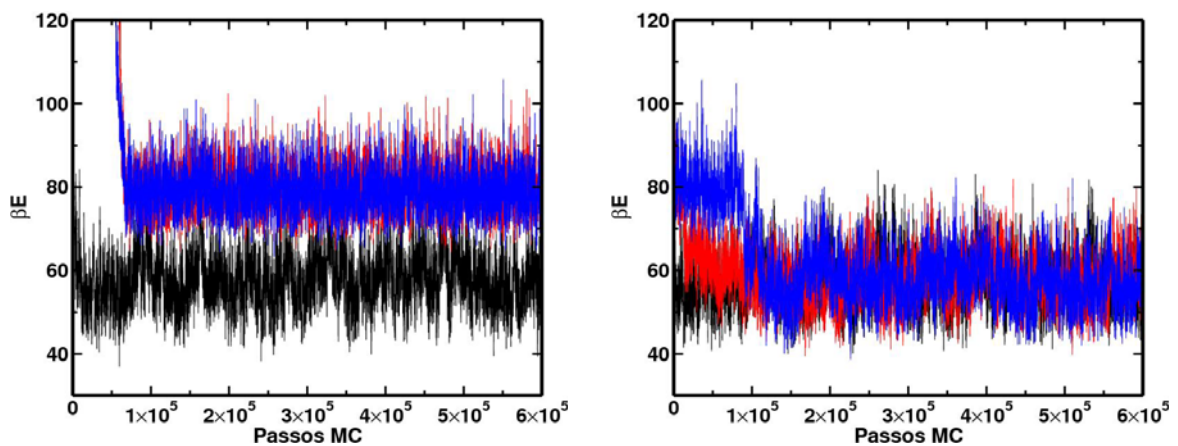


Figura 2.7: (A) Primeiros 1×10^6 passos de equilibração do sistema composto por um macroíon com valência $Z_m = -10$ e uma cadeia com 20 monômeros em concentração salina de 10 mM. (B) Fase final do processo de equilibração. As cores se referem às mesmas situações apresentadas na figura 2.6.

aumentado para 500 Å, possibilitando ao sistema vencer a barreira de potencial e assumir configurações de mais baixa energia, conforme mostrado na figura 2.7B.

Capítulo 3

Propriedades da Cadeia Isolada

Observa-se experimentalmente que as propriedades de soluções compostas por polímeros são fortemente dependentes de sua concentração [10, 120, 121]. Quando a fração de volume ocupada pelas macromoléculas é suficientemente baixa para que as mesmas se mantenham distantes umas das outras (solução diluída), as propriedades da solução são diretamente relacionadas com o comportamento individual do seus constituintes [10]. Embora nestas condições o tratamento teórico se torne simplificado, uma vez que as interações intercadeias podem ser desprezadas, detalhes químicos e estruturais em pequena escala, específicos de cada grupo molecular presente no polímero, tornam sua descrição ainda complicada. Apesar desta complexidade, algumas características conformacionais universais podem ser obtidas através de modelos simplificados que exploram apenas as consequências estatísticas da conectividade entre os monômeros [9, 10, 85].

3.1 Cadeia Ideal

A mais simples forma de tratar teóricamente um polímero é considerá-lo uma *cadeia ideal*, ou seja, um conjunto de segmentos livremente articulados, cujo comprimento l , denominado comprimento efetivo [122], é definido pela porção da macromolécula que se comporta orientacionalmente descorrelacionada das demais [9, 10, 85]. Esta grandeza é o único parâmetro do modelo e depende da estrutura atômica detalhada dos monômeros, da natureza do solvente, da concentração do eletrólito, e de quaisquer outras características que determinem a flexibilidade da molécula.

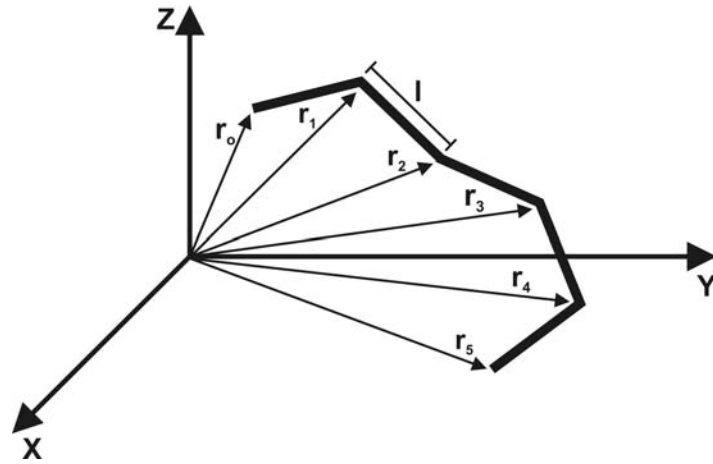


Figura 3.1: Representação esquemática de uma cadeia ideal composta por cinco segmentos efetivos de comprimento l .

Seja então uma cadeia composta por N segmentos cujas posições, em relação a um sistema de coordenadas arbitrário, são indicadas pelo conjunto de vetores $\{\mathbf{r}_0 \dots \mathbf{r}_N\}$, conforme mostrado na figura 3.1. De acordo com o teorema do limite central, é possível mostrar que para $N \gg 1$ a distribuição de probabilidades do vetor *end-to-end* $\mathbf{R} = \mathbf{r}_N - \mathbf{r}_0$ satisfaz a distribuição Gaussiana

$$P(\mathbf{R}) = \left(\frac{3}{2\pi Nl^2} \right)^{3/2} \exp \left(-\frac{3R^2}{2Nl^2} \right). \quad (3.1)$$

Sua simplicidade matemática permite o cálculo exato de todos os seus momentos, bem como de algumas propriedades estruturais passíveis de serem medidas experimentalmente, como o raio de giração e o raio hidrodinâmico [10], fornecendo um formalismo geral para a descrição do comportamento de cadeias poliméricas, independente do seu detalhamento em pequena escala. Devido à isotropia espacial é possível verificar que $\langle \mathbf{R} \rangle = 0$. A mais simples propriedade estrutural que caracteriza as dimensões da cadeia é então o valor quadrático médio da distância *end-to-end*

$$\langle \mathbf{R}^2 \rangle = \int \mathbf{R}^2 P(\mathbf{R}) d\mathbf{R} = Nl^2. \quad (3.2)$$

A distância média entre os dois segmentos extremos do polímero $\langle \mathbf{R}^2 \rangle^{1/2} = N^{1/2}l$ é muito menor do que o comprimento da cadeia Nl . Isto ocorre porque, como não há interação entre os monômeros, as propriedades de equilíbrio da macromolécula são dadas pelas conformações mais compactas que contem maior entropia conformacional. O expoente $1/2$ é universal e característico de cadeias ideais.

Uma importante propriedade da distribuição Gaussiana é a invariância de escala. Segundo ela a distância entre dois pontos quaisquer da cadeia, não apenas o módulo do vetor \mathbf{R} , obedecem a mesma distribuição de probabilidades. Então, uma parte da macromolécula definida pelo vetor $\mathbf{R}_{ij} = \mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j$ também satisfaz a relação 3.2, ou seja, $\langle \mathbf{R}_{ij}^2 \rangle = |i - j|l^2$. Com isso é possível calcular o valor quadrático médio do raio de giração

$$\langle R_g^2 \rangle = \frac{1}{2N^2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \langle (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j)^2 \rangle = \frac{1}{6} Nl^2. \quad (3.3)$$

O grau de extensão do polímero pode ser determinado pela grandeza $r = \langle \mathbf{R}^2 \rangle / \langle R_g^2 \rangle$. Utilizando os resultados 3.2 e 3.3 é possível verificar que cadeias ideais são caracte-

rizadas por $r = 6$. Valores distintos refletem o efeito da ação de campos externos ou de interações entre os segmentos.

3.2 Interações de Volume

Do ponto de vista energético, o comportamento de cadeias ideais são determinados apenas pelas ligações covalentes existente entre monômeros vizinhos. Quaisquer outras interações entre os segmentos são denominadas *interações de volume* [10]. A repulsão elétrica entre monômeros carregados suficientemente afastados ao longo da cadeia representam um exemplo de tais interações.

Seguindo o mesmo modelo simplificado descrito na seção anterior, a probabilidade condicional $p(\mathbf{r}_{i-1}, \mathbf{r}_i)$ de um determinado segmento i , sujeito ao potencial $V(\mathbf{r}_i)$, assumir a posição \mathbf{r}_i , estando o segmento $i - 1$ na posição \mathbf{r}_{i-1} é dada por

$$p(\mathbf{r}_{i-1}, \mathbf{r}_i) = \frac{1}{4\pi l^2} \delta(|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_{i-1}| - l) \exp[-\beta V(\mathbf{r}_i)]. \quad (3.4)$$

A função de partição $Q_N(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}_N)$ é dada pela soma de todas as conformações possíveis contendo N segmentos com os extremos fixos nas posições \mathbf{r}_0 e \mathbf{r}_N :

$$Q_N(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}_N) = \int \left[\prod_{i=1}^N p(\mathbf{r}_{i-1}, \mathbf{r}_i) \right] d\mathbf{r}_1 \dots d\mathbf{r}_{N-1}. \quad (3.5)$$

Para sistemas fracamente interagentes ($\beta V \ll 1$) é possível mostrar que $Q_N(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}_N)$ satisfaz a equação de difusão

$$\left[\frac{\partial}{\partial N} - \frac{l^2}{6} \nabla^2 + \beta V \right] Q_N(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}_N) = 0, \quad (3.6)$$

com condição de contorno $\lim_{N \rightarrow 0} Q_N(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}_N) = \delta(\mathbf{r}_N - \mathbf{r}_0)$.

Em geral, a solução de 3.6 pode ser expressa em termos dos autovalores E_m e das respectivas autofunções ϕ_m do correspondente operador $\Upsilon = -\frac{l^2}{6}\nabla^2 + \beta V$, na forma da série bilinear [9, 10]

$$Q_N(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}_N) = \sum_m \phi_m(\mathbf{r}_N) \phi_m^*(\mathbf{r}_0) \exp(-E_m N). \quad (3.7)$$

No limite de longas cadeias ($N \gg 1$) é possível verificar que o estado fundamental, caracterizado pelo menor autovalor E_0 , domina a soma 3.7 [9]. Neste caso

$$Q_N(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}_N) \approx \phi_0(\mathbf{r}_N) \phi_0^*(\mathbf{r}_0) \exp(-E_0 N). \quad (3.8)$$

A concentração média de monômeros $n(\mathbf{r})$ pode ser expressa por

$$n(\mathbf{r}) = C \sum_{m=1}^N \int \int Q_m(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}) Q_{N-m}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_N) d\mathbf{r}_0 d\mathbf{r}_N, \quad (3.9)$$

onde a constante C é obtida através da condição de normalização $\int n(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = N$. Substituindo 3.8 em 3.9 pode-se verificar que

$$n(\mathbf{r}) = |\phi_0(\mathbf{r})|^2. \quad (3.10)$$

Em 1965 S. F. Edwards [123] abordou o problema de uma cadeia sujeita à interações responsáveis em evitar a sobreposição dos segmentos. Para isso, foi considerado que qualquer um deles, localizado na posição \mathbf{r} , está sujeito à ação de todos os outros através de um potencial efetivo $V_{ef}(\mathbf{r}) = Bn(\mathbf{r})$ proporcional à concentração $n(\mathbf{r})$.

A constante B é determinada pelo segundo coeficiente do virial [91]

$$B = \frac{1}{2} \int \left\{ 1 - \exp[-\beta U(\mathbf{r})] \right\} d\mathbf{r}, \quad (3.11)$$

onde $U(\mathbf{r})$ é a energia potencial de interação entre dois segmentos. No caso apenas de repulsões estéricas, onde U pode ser dado por uma barreira de potencial, B resulta no volume excluído a um segmento devido a presença de outro (no trabalho original de S. F. Edwards foi utilizado um potencial escrito em termos da função delta). Configurações compactas que não satisfazem esta restrição possuirão probabilidade nula. Isto exige uma correção na relação 3.2 que leva a $\langle \mathbf{R}^2 \rangle \sim N^{6/5}$ e $r = 6,3$.

3.3 Cadeia Semiflexível

Segundo a seção 3.1, pode-se definir um segmento efetivo para o polímero de forma que seu comportamento seja compatível com o de uma cadeia ideal. Para isso, é necessário que o comprimento dos segmentos seja grande o suficiente para garantir orientações completamente descorrelacionadas, e que a macromolécula seja suficientemente longa para possuir um grande número de tais segmentos e não haver desvios significativos do comportamento Gaussiano. Entretanto, em alguns casos estas restrições não podem ser satisfeitas pois a cadeia se comporta de maneira *semi-flexível*. Um exemplo seria um polímero cuja conformação de equilíbrio seja rígida, e efeitos

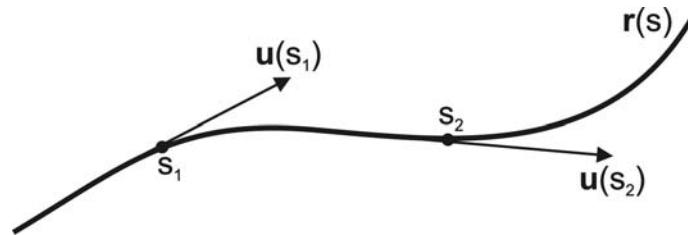


Figura 3.2: Representação esquemática do modelo persistente.

térmicos produzem apenas pequenas deformações em sua estrutura. Neste caso, é matematicamente conveniente tratar a molécula como uma curva contínua, de comprimento L , determinada pelo vetor $\mathbf{r}(s)$, onde s é dado pela distância ao longo do seu contorno. Este modelo é conhecido como *modelo de cadeia persistente* ou *continuamente curva* [109]. Para cada ponto s pode ser definido um vetor unitário $\mathbf{u}(s) = \frac{\partial \mathbf{r}(s)}{\partial s}$, tangente à curva, conforme ilustrado na figura 3.2.

A curvatura no interior de uma dada seção de comprimento $l_{ij} = s_i - s_j$ é caracterizada por $\langle \cos \theta_{ij} \rangle$, onde θ_{ij} é o ângulo entre $\mathbf{u}(s_i)$ e $\mathbf{u}(s_j)$. Se este segmento possuir alta rigidez, as direções dos dois vetores serão altamente correlacionadas e $\langle \cos \theta_{ij} \rangle \approx 1$. No limite oposto de alta flexibilidade $\langle \cos \theta_{ij} \rangle \approx 0$. É possível mostrar que [10, 109]

$$\langle \cos \theta_{ij} \rangle = \exp \left(-\frac{|s_j - s_i|}{L_p} \right), \quad (3.12)$$

onde L_p , denominado comprimento de persistência, é o parâmetro que caracteriza a flexibilidade da macrolécula na aproximação contínua. Esta expressão mostra que a correlação orientacional entre os vetores tangente à cadeia decai exponencialmente com a distância ao longo do seu contorno, tornando-se aproximadamente nula em comprimentos maiores que L_p .

Nesta aproximação, o valor quadrático médio da distância *end-to-end* pode ser escrito como

$$\langle \mathbf{R}^2 \rangle = \int_0^L ds_i \int_0^L ds_j \langle \mathbf{u}(s_i) \cdot \mathbf{u}(s_j) \rangle \quad (3.13)$$

$$= \int_0^L ds_i \int_0^L ds_j \exp \left(-\frac{|s_j - s_i|}{L_p} \right) \quad (3.14)$$

$$= 2LL_p - 2L_p^2 \left[1 - \exp\left(-\frac{L}{L_p}\right) \right]. \quad (3.15)$$

No limite de $L \ll L_p$, a molécula se comporta como um segmento rígido fazendo com que a distância *end-to-end* se torne aproximadamente igual ao seu comprimento de contorno ($\langle \mathbf{R}^2 \rangle^{1/2} \approx L$). Cadeias suficientemente longas ($L \gg L_p$) devem recuperar o comportamento de cadeia ideal, onde $\langle \mathbf{R}^2 \rangle = Nl^2 = Ll$. Realizando o limite na relação 3.15 verifica-se que $\langle \mathbf{R}^2 \rangle \rightarrow 2LL_p$, mostrando que o comprimento do segmento efetivo de polímeros tratados de acordo com o modelo persistente é dado por $l = 2L_p$. No caso da molécula de DNA, por exemplo, $L_p \approx 50$ nm (150 pares de base aproximadamente) em condições fisiológicas, demonstrando forte dependência com a força iônica [124, 125].

3.4 Polieletrólitos

Seguindo a definição apresentada no capítulo introdutório, polieletrólitos são macromoléculas que possuem grupos ionizáveis. Em decorrência da interação eletrostática entre os segmentos, o polímero assume um comportamento semiflexível com sua conformação dependendo fortemente da fração de grupos carregados e da força iônica da solução [1]. O comprimento de persistência pode ser particionado em duas contribuições [10]:

$$L_p = L_p^o + L_p^{el}, \quad (3.16)$$

onde L_p^o é o comprimento de persistência “intrínseco” da macromolécula, considerando apenas a contribuição conformacional, e L_p^{el} é a componente devido às

interações eletrostáticas. T. Odijk [126] e, independentemente, J. Skolnick e M. Fixman [127] desenvolveram a teoria acerca do comprimento de persistência eletrostático, normalmente conhecida como teoria OSF (Odijk–Skolnick–Fixman), tratando a solução eletrolítica de acordo com a teoria de Debye–Hückel. A seguinte expressão foi obtida:

$$L_p^{el} = \frac{l_B \lambda^2}{4\kappa^2}, \quad (3.17)$$

onde λ é a densidade numérica de carga do polímero em unidade do inverso de comprimento.

Interações entre segmentos separados por distâncias maiores que L_p podem ser classificada como interações de volume, conforme apontado na seção 3.2. A repulsão entre grupos carregados mais próximos determina a rigidez eletrostática da cadeia e, conseqüentemente, o comprimento de persistência. No limite de força iônica nula, $L_p^{el} \rightarrow \infty$ e o polímero se comporta como um segmento rígido. Este comportamento foi confirmado empregando o procedimento descrito no capítulo 3.7, na ausência do macroíon. O gráfico 3.3A mostra o raio de giração em relação ao número de monômeros, em dois regimes extremos de força iônica: concentração salina nula e 1 M de sal. No primeiro caso pode-se verificar a dependência linear entre estas duas grandezas. Como o modelo não inclui nenhum tipo de mecanismo de persistência além do eletrostático, na situação oposta onde as interações eletrostáticas são totalmente blindadas, $L_p^{el} \rightarrow 0$ e as dimensões da cadeia são determinadas apenas pelo efeito de volume excluído. Neste caso, assim como a distância *end-to-end*, $\langle R_g^2 \rangle^{1/2} \sim N^{6/5}$.

O gráfico 3.3B mostra a variação do grau de extensão r com a concentração salina para um polímero contendo 60 monômeros. É possível mostrar que cadeias

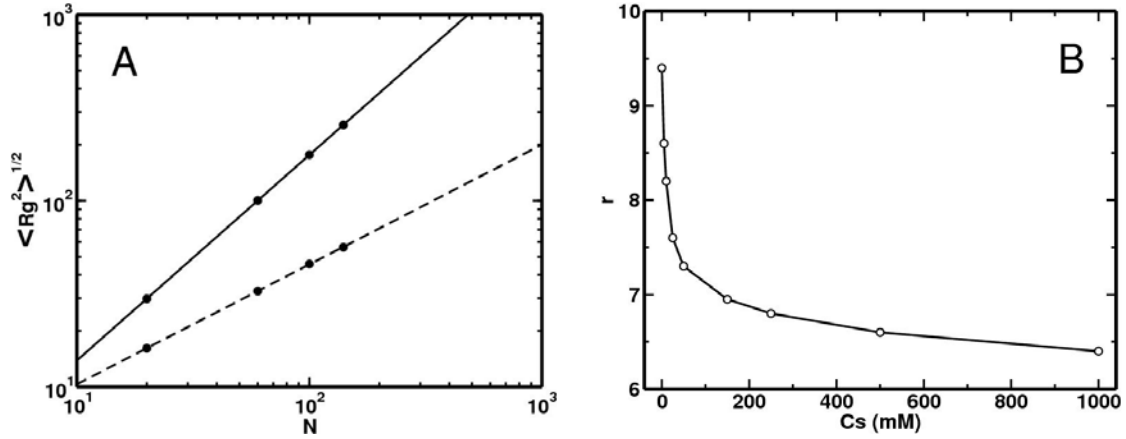


Figura 3.3: (A) Raio de giração $\langle R_g^2 \rangle^{1/2}$ em relação ao número de monômeros N . A linha contínua (coeficiente angular aproximadamente igual a 1) e tracejada (coeficiente angular aproximadamente igual a 0,6) se refere a concentração salina nula e 1 M, respectivamente. (B) Variação de r em relação à concentração de sal C_s para uma cadeia de 60 monômeros.

rígidas possuem $r = 12$ no limite de $N \gg 1$. Entretanto, isto não é observado em concentração de sal nula devido ao comprimento finito da mesma. Com o aumento da força iônica, as dimensões da macromolécula diminuem até assumir um comportamento próximo do ideal ($r = 6,3$) em 1 M de sal. Estes resultados demonstram a consistência do código desenvolvido e sua eficiência em explorar o espaço de conformações do polímero, mesmo realizando apenas movimentos locais para gerar novas configurações.

Capítulo 4

Conformação do Polímero

Complexado

Estudos teóricos da conformação de polieletrólitos adsorvidos em superfícies vem sendo realizados desde 1984, quando H. A. Van der Schee e J. Lyklema [128] desenvolveram o primeiro trabalho baseado em primeiros princípios. Neste modelo, as configurações da cadeia são restritas a uma rede quadrada e a interação entre os segmentos e a superfície plana, opostamente carregada, é dada, em âmbito de campo médio, pela solução da equação de Poisson-Boltzmann. Embora muito simples, o modelo se mostrou eficiente na previsão do comportamento da adsorção em relação a variação da concentração salina e do grau de polimerização da cadeia.

Características conformacionais de complexos formados por polímeros carregados e partículas coloidais esféricas foram estudadas por diversas metodologias teóricas. R. Netz e J. F. Joanny [32] abordaram o problema da interação de uma cadeia infinita semiflexível com uma esfera rígida de carga oposta. O funcional da energia livre foi minimizado através de uma aproximação perturbativa e as fases conformacionais foram obtidas em função de um amplo conjunto de variáveis do sistema. Utilizando

Tabela 4.1: Especificações dos modelos simulados por diferentes grupos.

| | Mateescu e colaboradores [129] | Nguyen e Shklovskii [130] | Chodanowski e Stoll [8] | Akinchina e Linse [12] | Este trabalho |
|-----------|--------------------------------|---------------------------|-------------------------|------------------------|---------------|
| R_m (Å) | 9,2 – 10,7 | 28,4 | 35,7 | 20 | 20 |
| Z_m (e) | -50 | -100 | -100 | -40 | -5 – -40 |
| R_p (Å) | 0,71 | 1,42 | 3,57 | 2 | 2 |
| Z_p (e) | 1 | 1 | 1 | 0,25 – 1 | 1 |
| N_p | 100 | 130 – 180 | 25 – 200 | 40 – 160 | 20 – 100 |

uma abordagem numérica, R. R. Netz e colaboradores [15, 16, 31] resolveram este mesmo modelo exatamente (considerando as limitações computacionais), aplicando-o ao estudo de partículas nucleossomais. Em geral, três estados possíveis foram identificados para o complexo: (1) polímero em contato com a esfera em apenas um ponto, (2) porção da cadeia tocando a esfera com comprimento finito e (3) polímero envolvendo a esfera. As valências da partícula coloidal Z_t e Z_w necessárias para induzir a transição (1) \rightarrow (2) e (2) \rightarrow (3), respectivamente, podem ser calculadas através das expressões

$$Z_t = \left[\frac{L_p^o}{l_B} \ln \left(\frac{l_B \lambda^2}{L_p^o \kappa^2} \right) \right]^{1/2} \quad \text{e} \quad Z_w = \lambda R_m \ln \left(\frac{1}{R_m \kappa} \right). \quad (4.1)$$

Simulações computacionais utilizando o método de Monte Carlo foram extensivamente realizadas por diversos grupos, seguindo as especificações mostradas na tabela 4. Os modelos são semelhantes ao descrito no capítulo 1, com algumas variações nas contribuições do potencial que determinam a flexibilidade da cadeia e no tratamento do eletrólito. E. M. Mateescu e colaboradores [129] estudaram este problema na ausência de sal e verificaram que o número de monômeros complexados cresce com o aumento do raio do macroíon, podendo superar o necessário para neutralizar o com-

plexo. Este fenômeno, conhecido como *inversão de carga* [131], tem sido verificado experimentalmente [132] e através de várias abordagens teóricas [8, 35, 70, 129, 130].

Resultados semelhantes foram obtidos por T. T. Nguyen e B. I. Shklovskii [130] e por P. Chodanowski e S. Stoll [8, 33, 35, 36], os quais também estudaram o efeito da concentração de sal, incorporada no modelo através da teoria de Debye–Hückel, e do grau de polimerização do polieletrólito. Verificou-se que a carga líquida do complexo, de sinal oposto à do macroión, cresce com o aumento do número de monômeros até atingir um valor máximo. Neste ponto, o sistema sofre uma transição de primeira ordem caracterizada pelo surgimento de uma cauda.

Um rico comportamento estrutural foi também observado por A. Akinchina e P. Linse [12, 34], considerando contraíons explicitamente de acordo com o modelo primitivo. Em certas condições observou-se a existência de duas caudas, em discordância com os trabalhos citados no parágrafo acima. Como pode ser verificado na tabela 4, as simulações foram realizadas em diferentes condições, fato que pode explicar tais divergências. Portanto, com o objetivo de fornecer resultados que possam contribuir para o melhor entendimento da conformação de polímeros carregados adsorvidos, este problema foi revisitado com ênfase no efeito da variação da carga da partícula coloidal e do grau de polimerização da cadeia.

4.1 Resultados

O raio de giração do polieletrólito é apresentado na figura 4.1A, em função do número de monômeros, para quatro valores de Z_m . Os resultados são referentes ao sistema em concentração salina nula e concentração macromolecular suficientemente baixa para não haver influência da localização da borda da célula nas configurações do polímero. Observa-se que a presença de macroíons pouco carregados não introduzem

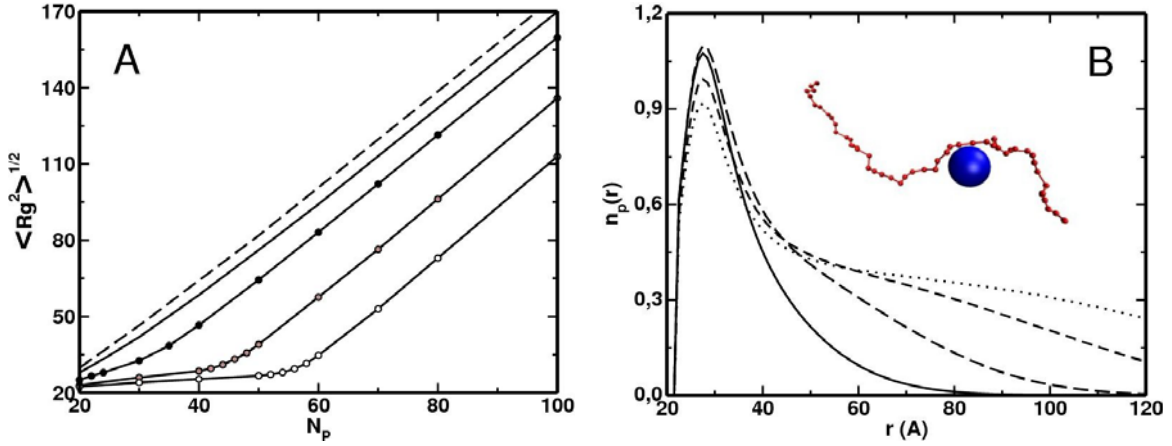


Figura 4.1: **(A)** Raio de giração $\langle R_g^2 \rangle$ em função do grau de polimerização do polieletrólito N_p . A valência do macroíon é $Z_m = -5$ (linha sem símbolos), -10 (símbolos pretos), -20 (símbolos cinzas) e -30 (símbolos brancos). A linha tracejada mostra o comportamento da cadeia isolada. **(B)** Número médio de monômeros $n_p(r)$ em função da distância r ao centro do macroíon com valência $Z_m = -5$. O polímero contém $N_p = 20$ (linha contínua), 30 (tracejado longo), 40 (tracejado curto) ou 50 (linha pontilhada) monômeros. Os resultados foram obtidos em concentração salina nula e concentração macromolecular de $0,1 \mu\text{M}$ ($R_c = 158,26 \text{ nm}$).

variações significativas nas dimensões do polieletrólito. No caso de $Z_m = -5$, o maior desvio relativo é de aproximadamente 0,04 para $N_p = 100$. Entretanto, verifica-se através da figura 4.1B a existência de uma camada de coordenação, independente do grau de polimerização da cadeia, indicando a formação do complexo. Isto permite inferir que apenas uma pequena porção do polímero se mantém em contato com a partícula coloidal, conforme mostrado na ilustração da figura. É importante salientar que não há garantia que uma dada configuração obtida aleatoriamente da simulação seja estatisticamente representativa. Por isso, as propriedades conformacionais de várias delas foram comparadas com os respectivos valores médios, constatando que esta ilustração exibe o comportamento mais provável da cadeia.

Comportamento semelhante foi obtido no caso de macroíons com valência $Z_m = -10$ e -15 , conforme observa-se nas figuras 4.2A e 4.2B, respectivamente. Devido ao aumento da interação entre o polieletrólito e a partícula coloidal, o número de monômeros em sua vizinhança cresce. Isto indica que uma porção cada vez maior do polímero toca a esfera acompanhando sua curvatura. Mesmo em baixos valores de Z_m , a energia de interação é suficiente para superar a diminuição da entropia trans-

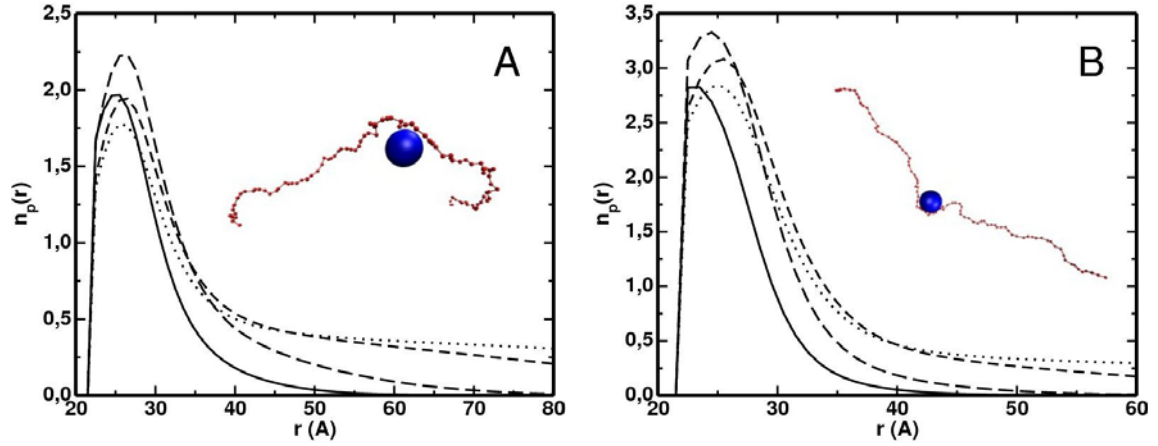


Figura 4.2: Número médio de monômeros $n_p(r)$ em função da distância r ao centro do macroíon com valência (A) $Z_m = -10$ e (B) -15 . O polímero contém $N_p = 20$ (linha contínua), 30 (tracejado longo), 40 (tracejado curto) ou 50 (linha pontilhada) monômeros.

lacional da cadeia, mas compensa apenas parcialmente sua rigidez eletrostática, não possibilitando ao polímero se envolver sobre a superfície macromolecular. Exceto pelo reduzido número de monômeros complexados, os demais mantêm a mesma liberdade que teriam caso o polieletrólito estivesse isolado.

Dois regimes distintos para o raio de giração podem ser identificados (figura 4.1A) para maiores valores da carga do macroíon ($|Z_m| \geq 20$). Cadeias com grau de polimerização suficientemente baixos possuem raio de giração com valores próximos da distância de máxima aproximação dos monômeros ($R_m + R_p = 22 \text{ \AA}$). Nestas condições, o macroíon determina as dimensões do polieletrólito, uma vez que a interação é suficiente para manter todos os monômeros próximos à sua superfície, envolvendo-o.

Adaptando os parâmetros do modelo às equações 4.1, pode-se verificar a concordância entre o tratamento computacional e a abordagem analítica citada acima [32]. Entretanto, de acordo com o modelo apresentado na seção 1.3, não existe, além daquele causado pelas interações eletrostáticas entre os monômeros, nenhum outro mecanismo de persistência associado ao polieletrólito. Uma vez que as expressões citadas foram obtidas considerando uma cadeia semiflexível, é necessário encontrar uma

grandeza equivalente a L_p^o . Como na ausência de repulsão entre os monômeros dois segmentos consecutivos são orientacionalmente descorrelacionados, a metade do valor médio de seu comprimento $\langle r_{mm} \rangle$ se torna apropriada. A densidade de carga do polímero é dada por $\lambda = \frac{N_p e}{(N_p - 1)\langle r_{mm} \rangle}$. Com isso, é possível obter $Z_t \approx -2,7$ e $Z_w \approx -14,9$ em concordância com as previsões obtidas pelas simulações.

Nos casos analisados acima, verifica-se que a altura da camada de coordenação varia não monotonicamente com a carga do macroión. No caso de $Z_m = -5$, observa-se que esta grandeza assume o valor aproximado de 1,1 para $N_p = 20$, apresentando pequeno aumento para $N_p = 30$, e decrescendo para cadeias mais extensas. Isto pode ser atribuído à competição entre dois efeitos. Com o aumento de N_p a entropia conformacional do polímero cresce, contribuindo para a diminuição do número de monômeros complexados. Em contrapartida, a interação entre a esfera e o polieletrólito aumenta, favorecendo a complexação. Quando a cadeia é pequena, os monômeros adicionados localizam-se próximos da partícula coloidal e o segundo efeito é dominante, ao contrário do que acontece para polímeros maiores. Este fato sugere a existência de um grau de polimerização ideal que otimiza o contato dos monômeros com a esfera.

Prolongando as retas referentes aos dois regimes observados na figura 4.1A, o ponto de intersecção determina o número de monômeros N_p^* no qual o comportamento do raio de giração se altera. Quando $N_p > N_p^*$ obtem-se o comportamento equivalente ao de cadeias isoladas. Isso ocorre porque parte do polímero sofre o efeito do volume excluído eletrostático, formando uma ou duas caudas [8, 130] que passam a dominar a estatística da cadeia. As figuras 4.3A a 4.3F apresentam o número médio de monômeros $n_p(r)$ para $Z_m = -20, -30$ e -40 e quatro distintos valores do grau de polimerização. O aumento da carga do macroión ocasiona a diminuição da largura da camada de coordenação devido a maior interação eletrostática com os monômeros. As figuras da direita demonstram claramente o surgimento da(s)

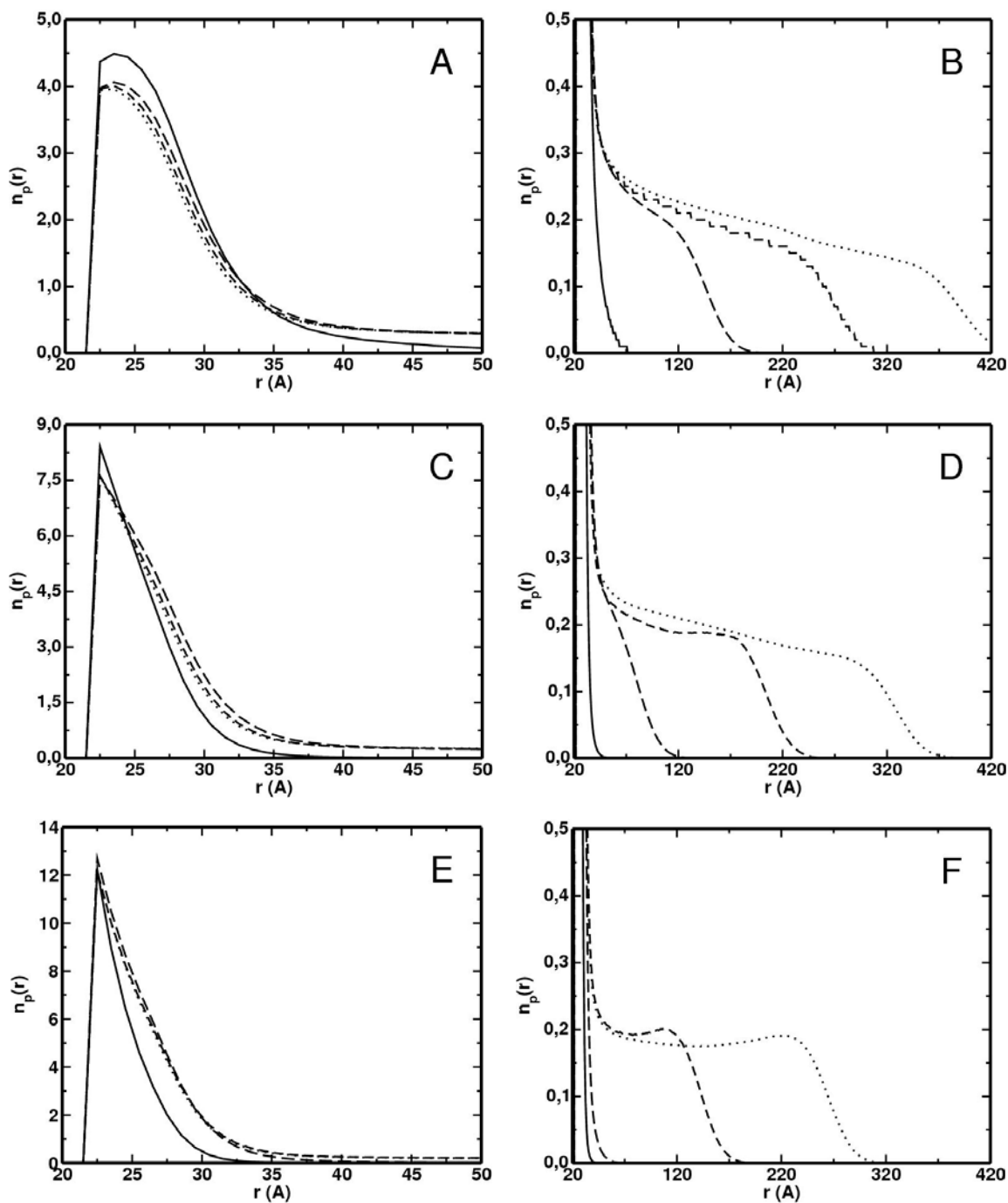


Figura 4.3: Número médio de monômeros $n_p(r)$ em função da distância r ao centro do macroíon com valência $Z_m = -20$ (A) e (B), -30 (C) e (D) e -40 (E) e (F). O polímero contém $N_p = 40$ (linha contínua), 60 (tracejado longo), 80 (tracejado curto) e 100 (linha pontilhada).

cauda(s). Observa-se que este fato está associado com o decréscimo do número de monômeros na camada de coordenação. Quando a carga líquida do complexo (macroíon + monômeros na camada de coordenação) atinge um determinado valor, a adição de um novo monômero não é mais energeticamente favorável. Por isso, esta

porção da extremidade se mantém com mobilidade comparável a de uma cadeia isolada, trazendo parte do polímero, antes complexado, para a solução. Este fato está em plena concordância com o modelo fenomenológico proposto por T. T. Nguyen e B. I. Shklovskii [130].

O valor de N_p^* é mostrado na figura 4.4 em função da carga do macroíon. Pode-se verificar que $N_p^* > |Z_m|$, confirmando a inversão de carga. É interessante notar que a valência do complexo $Z_{cpx} = Z_m + N_p^*$ independe da carga do macroíon, em consistência com os resultados observados em outros trabalhos [129,133]. Para todos os casos verificados neste trabalho $Z_{cpx} = 27$ em concentração salina nula.

A figura 4.5 mostra o número total de monômeros vizinhos ao macroíon $N_T(r)$, em função da distância r , conforme a seguinte definição (ver relação 2.16):

$$N_T(r) = \int_0^r n_p(r') dr' \quad (4.2)$$

Em geral, observa-se alta taxa de variação desta grandeza na região correspondente

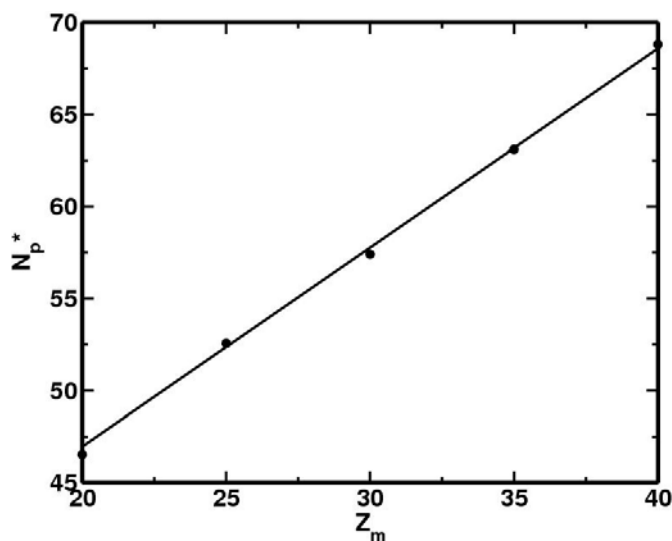


Figura 4.4: N_p^* em função da valência do macroíon Z_m . A linha contínua é a função linear ajustada aos pontos.

à camada de coordenação, diminuindo significativamente para maiores valores de r . Como pode ser observado nos gráficos 4.5A e 4.5B, para $Z_m = -40$ e $N_p = 40$ e 60 o coeficiente angular da reta correspondente a esta segunda região é nulo. Isso ocorre pois todos os monômeros da cadeia se mantêm complexados. Nos outros casos, a inclinação fornece informações sobre o número de caudas. Como já verificado, quando $Z_m = -15$ apenas um segmento da cadeia toca o macroíon. Então, este pode ser utilizado como referência para o estado com duas caudas. No gráfico 4.3B, referente a $N_p = 60$, o coeficiente angular é aproximadamente o mesmo para todos os valores de Z_m , exceto para $Z_m = -40$ pelas razões já citadas acima. Aumentando o grau de polimerização, a inclinação para $Z_m = -20, -30$ e -40 diminui, indicando que o

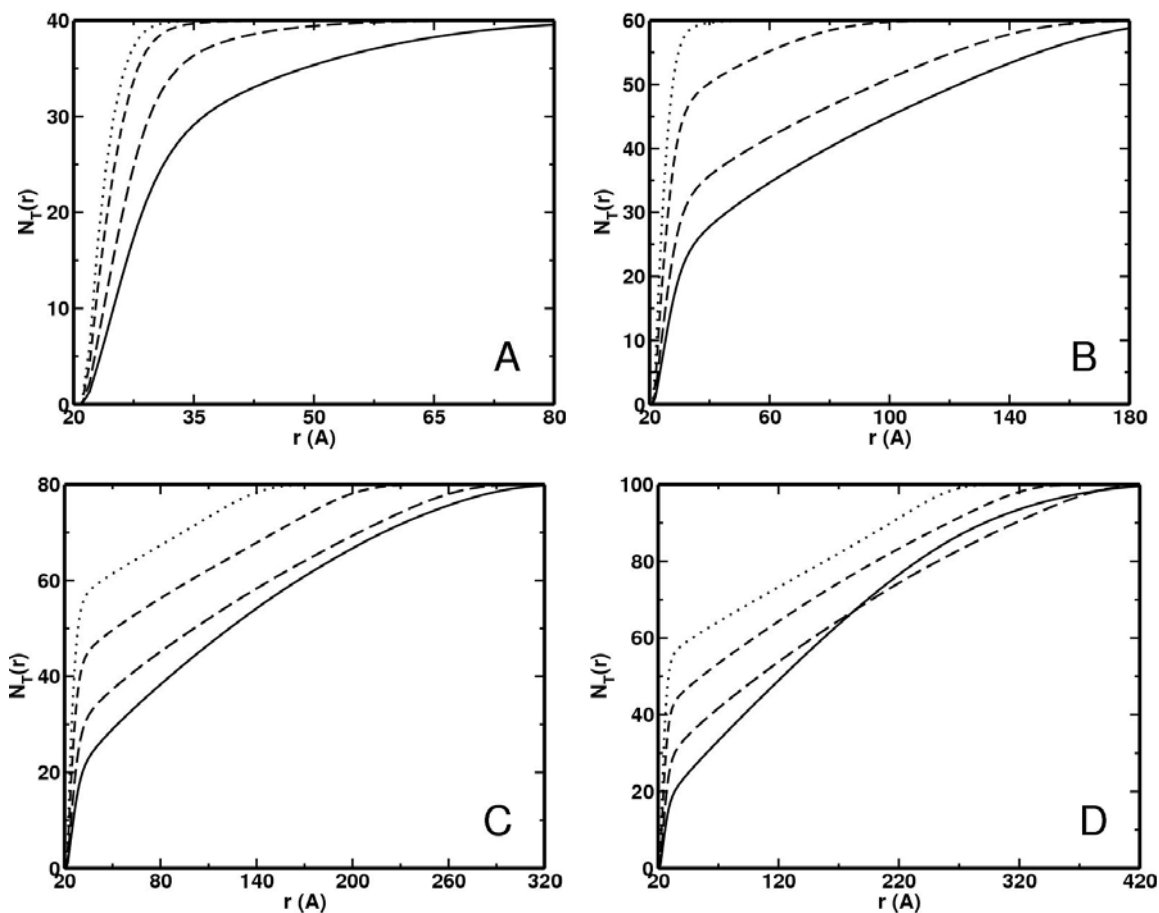


Figura 4.5: Número total de monômeros $N_T(r)$ localizados aquém da distância r do centro do macroíon com valência $Z_m = -15$ (linha contínua), -20 (tracejado longo), -30 (tracejado curto) e -40 (linha pontilhada). O grau de polimerização da cadeia é (A) $N_p = 40$, (B) 60 , (C) 80 e (D) 100 .

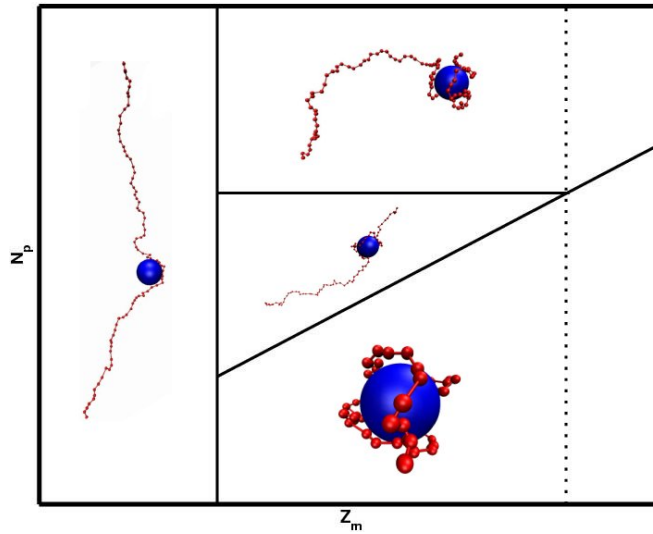


Figura 4.6: Diagrama de estados conformacionais para o sistema composto por um macroíon com valência Z_m e grau de polimerização N_p em concentração salina nula e concentração macromolecular de $0,1 \mu\text{M}$ ($R_c = 158,26 \text{ nm}$).

estado com apenas uma cauda passa a predominar. Esta dependência do número de caudas com o grau de polimerização da cadeia pode explicar as divergências entre os resultados obtidos por P. Chodanowski e S. Stoll [8] e por A. Akinchina e P. Linse [12]. O primeiro deles não demonstra a existência de conformações com duas caudas pois se limitou ao estudo de macroíons com alta carga líquida ($|Z_m| = 100$), que necessitam de polímeros com alto grau de polimerização para formação destas, enquanto nas simulações realizadas no segundo foi considerado $|Z_m| = 40$.

Baseando-se nos resultados apresentados acima é possível sugerir o diagrama de estados conformacionais esquemático mostrado na figura 4.6. Para valores de Z_m além da linha pontilhada não verifica-se conformações com duas caudas, devido ao número de monômeros necessários para saturar o complexo.

Capítulo 5

Transição Conformacional

De acordo com os resultados apresentados no capítulo anterior, as propriedades conformacionais de polieletrólitos adsorvidos são distintas daquelas que estes teriam quando livres em solução. Isto sugere que a dissociação do complexo pode se manifestar através de modificações na conformação do polímero. De fato, resultados obtidos por modelos analiticamente solúveis [134–137] mostraram que esta variação conformacional ocorre abruptamente e possui características de transição de fase. Em temperatura constante, as condições críticas que levam à dissociação seguem a relação

$$\sigma_c \xi_c \sim \kappa^a, \quad (5.1)$$

onde σ_c é a densidade superficial de carga crítica do macroión e ξ_c é a densidade linear de carga crítica do polieletrólito. O expoente a é dependente das aproximações utilizadas [134, 135] e de algumas características do sistema, como a geometria do macroión [136] e o regime de força iônica [135–137]. Comportamento semelhante foi observado em estudos experimentais envolvendo a interação de polieletrólitos

sintéticos com proteínas [41, 42, 44] ou micelas [39, 40, 43] opostamente carregadas. Utilizando um amplo conjunto de técnicas, tais como medidas de turbidez [40, 42, 43], espalhamento dinâmico de luz [40, 41] e titulação potenciométrica [39, 44], a validade da expressão 5.1 foi verificada para $a = 1$.

Simulações Monte Carlo realizadas por P. Chodanowski e S. Stoll [8, 33, 35, 36] permitiram avaliar o efeito de vários parâmetros do sistema na dissociação do complexo formado por uma esfera e uma cadeia polimérica de carga oposta. A variação do número de monômeros carregados do polieletrólito resultou em mudanças drásticas na probabilidade de contato destes com a esfera [36]. Entretanto, a dependência da densidade linear de carga crítica com a força iônica se mostrou concordante com a relação 5.1 para $a = 2$, em desacordo com a previsão experimental.

Em 2004 R. de Vries [46] verificou o efeito da densidade de carga de pequenos poliânions na sua complexação com as proteínas do leite α -lactalbumina e β -lactoglobulina. Atribuindo cargas fracionárias aos monômeros da cadeia, não foram observadas variações abruptas na energia de interação entre as duas macromoléculas. Segundo a argumentação do autor, este fato está relacionado com o pequeno número de ligações eletrostáticas (da ordem de 10) que estabilizam o complexo, sugerindo que polímeros com maior densidade de carga levariam a tal comportamento. Valores críticos para a força iônica foram então obtidos em condições onde a energia de interação é igual a energia térmica $k_B T$. Com este critério o comportamento experimental ($a = 1$) foi recuperado.

Estudos por simulação computacional abordando o efeito da carga da partícula coloidal foram desenvolvidos por P. Linse e colaboradores [83, 138], embora a ênfase dos trabalhos não tenha sido na transição conformacional do polímero.

Este assunto será então revisitado com o objetivo principal de explorar o comportamento do sistema em condições próximas às condições críticas dadas pela expressão

5.1. Os dois exemplos citados nos parágrafos acima mostram como peculiaridades do modelo e mudanças no critério para caracterização dos estados que o polieletrólito pode assumir, podem levar a conclusões conflitantes. Entretanto, parece razoável tratar o problema através da definição de um parâmetro de ordem relacionado diretamente com a conformação do polímero, e verificar o comportamento da energia livre em relação a esta grandeza. O método de múltiplos histogramas, descrito na seção 2.3.2, será utilizado para realização de tal procedimento.

5.1 Desenvolvimentos Teóricos

Em 1977 F. W. Wiegel [45, 134] estudou a adsorção de um polieletrólito em uma superfície plana opostamente carregada com densidade superficial de carga σ . O polímero foi considerado uma cadeia ideal composta por N segmentos de comprimento l e carga q . Tratando o eletrólito de acordo com a teoria de Debye-Huckel, a energia de interação entre a superfície e um segmento da cadeia é dada por

$$V(x) = \frac{q\sigma}{2\epsilon_o\epsilon_s\kappa} \exp(-\kappa x), \quad (5.2)$$

onde x é a distância do segmento à superfície.

A função de partição para este problema pode ser expressa pela expansão bilinear 3.8. Cada autofunção é o produto de três funções de apenas uma coordenada. Como $V(x)$ depende apenas da coordenada normal à superfície, as componentes nas coordenadas paralelas y e z possuirão comportamento Gaussiano de cadeia isolada, enquanto a componente na coordenada normal é dada em termos das autofunções $\phi_m(x)$ e dos autovalores E_m da equação

$$\left[-\frac{l^2}{6} \frac{d^2}{dx^2} - \beta \frac{|q\sigma|}{2\epsilon_o\epsilon_s\kappa} \exp(-\kappa x) \right] \phi_m(x) = E_m \phi_m(x), \quad (5.3)$$

com condições de contorno $\phi_m(x=0) = \lim_{x \rightarrow \infty} \phi_m(x) = 0$.

A equação 5.3 é equivalente à equação de *Schrödinger* independente do tempo para uma partícula em um poço unidimensional com energia potencial $\beta V(x) = -\beta \frac{|q\sigma|}{2\epsilon_o\epsilon_s\kappa} \exp(-\kappa x)$. Através da analogia com o problema quântico, dois comportamentos distintos podem ser obtidos:

1. Se βV for maior que um determinado valor crítico $(\beta V)_c$ não será observado nenhum estado ligado. A solução de 5.3 será caracterizada por um espectro contínuo de autovalores $E_m \geq 0$ e autofunções $\phi_m(x)$ possuindo comportamento periódico. Neste caso a energia de interação entre o polímero e a superfície não é suficiente para superar a entropia da cadeia, mantendo-a dissociada.
2. Se $\beta V < (\beta V)_c$ será obtido um espectro discreto com, ao menos, um autovalor $E_m < 0$ caracterizando o estado adsorvido. Nestas condições, é conveniente realizar as substituições

$$\varphi_\nu(\eta) = \phi_m(x) \quad , \quad \eta = \left(\frac{24\beta|q\sigma|}{2\epsilon_o\epsilon_s\kappa^3 l^2} \right)^{1/2} \exp\left(-\frac{1}{2}\kappa x\right) \quad \text{e} \quad -\nu^2 = \frac{24E_m}{\kappa^2 l^2}, \quad (5.4)$$

formulando o problema em termos da equação de Bessel

$$\left[\frac{d^2}{d\eta^2} + \frac{1}{\eta} \frac{d}{d\eta} + \left(1 - \frac{\nu^2}{\eta^2} \right) \right] \varphi_\nu(\eta) = 0, \quad (5.5)$$

com condições de contorno

$$\varphi_\nu \left[\eta = \left(\frac{24\beta|q\sigma|}{2\epsilon_o\epsilon_s\kappa^3l^2} \right)^{1/2} \right] = \varphi_\nu(\eta = 0) = 0. \quad (5.6)$$

As autofunções são dadas por $\varphi_\nu(\eta) = AJ_\nu(\eta)$, onde $J_\nu(\eta)$ são as funções de Bessel do primeiro tipo, e os autovalores são determinados pelas raízes da equação

$$J_\nu \left(\frac{24\beta|q\sigma|}{2\epsilon_o\epsilon_s\kappa^3l^2} \right) = 0. \quad (5.7)$$

Existem tanto estados ligados quanto soluções possíveis para 5.7 com $\nu > 0$. A transição para o estado dissociado ocorre quando $\nu = 0$. Neste caso $\left(\frac{24\beta|q\sigma|}{2\epsilon_o\epsilon_s\kappa^3l^2} \right)^{1/2} \approx 2,4048$. Então, a dependência do comprimento de Debye κ com a densidade de carga superficial crítica σ_c segue a relação

$$\sigma_c \sim \kappa^3. \quad (5.8)$$

M. Muthukumar e colaboradores abordaram o problema da adsorção de polieletrólitos à superfícies opostamente carregadas planas [135] e curvas [136] tratando o polí-mero de maneira mais realista. Utilizando um procedimento variacional, o segmento efetivo da cadeia isolada foi calculado incorporando efeitos da interação eletrostática entre os segmentos. As condições críticas foram obtidas de maneira semelhante ao apresentado acima, considerando uma cadeia Gaussiana composta por N segmentos efetivos. Segundo estes trabalhos, além de enfraquecer a interação entre a superfície e o polieletrólito, a adição de sal também contribui para a dissociação do complexo aumentando a entropia conformacional da cadeia. No limite de baixa blindagem eletrostática ($\kappa \rightarrow 0$) o polímero é mais rígido e, conseqüentemente, possui menor entropia conformacional que no caso flexível onde $\kappa \rightarrow \infty$. Isto leva a leis de escala distintas neste dois limites:

$$\sigma_c \sim \begin{cases} \kappa^3, & \kappa \rightarrow 0 \\ \kappa^{11/5}, & \kappa \rightarrow \infty. \end{cases} \quad (5.9)$$

O mesmo procedimento foi aplicado à interação do polímero com uma esfera de raio R e densidade superficial de carga σ . Neste caso, a cadeia deve se “dobrar” para haver o contato dos monômeros com a superfície do macroíon. A interação macroíon-polieletrólito, além de superar a entropia da cadeia, deve também compensar a rigidez da mesma. No limite de alta curvatura ($\kappa R \ll 1$)

$$\sigma_c \sim \begin{cases} \kappa^2, & \kappa \rightarrow 0 \\ \kappa^{6/5}, & \kappa \rightarrow \infty. \end{cases} \quad (5.10)$$

Em 2006, R. G. Winkler e A. G. Cherstvy [137] apontaram para a limitação do procedimento variacional utilizado por M. Muthukumar e revisitaram o problema da adsorção em partículas coloidais esféricas. A solução exata foi obtida aproximando o potencial de Coulomb blindado pelo potencial de Hulthén, e o comportamento empírico foi reproduzido em baixos valores de força iônica:

$$\sigma_c \sim \begin{cases} \kappa, & \kappa \rightarrow 0 \\ \kappa^3, & \kappa \rightarrow \infty. \end{cases} \quad (5.11)$$

5.2 Resultados

Os resultados apresentados na figura 5.1A se referem ao sistema composto por uma cadeia polimérica carregada e um macroíon com valência $Z_m = -10$, em baixa concentração, como no capítulo anterior. A energia média da interação entre estes dois corpos $\langle E_L \rangle$ é mostrada em função do inverso do comprimento de Debye. Em

força iônica suficientemente baixa para que o polímero se mantenha complexado, a interação entre os monômeros e a esfera é enfraquecida devido ao aumento da blindagem eletrostática. Como consequência, em baixo grau de polimerização ($N_p = 20$), $\langle E_L \rangle$ assume o comportamento dado pela função $\langle E_L \rangle = A \exp(\kappa B)$, indicada pela linha tracejada no gráfico, onde $A \approx -50,71 k_B T$ e $B \approx -23,95 \text{ \AA}$ são parâmetros ajustáveis relacionados ao número de monômeros complexados e à distância média destes ao centro da partícula coloidal, respectivamente. Cadeias maiores não seguem esta mesma concordância quantitativa devido à dependência não trivial do número de monômeros complexados com a concentração salina.

Quando o inverso do comprimento de Debye atinge um determinado valor crítico κ^* , a variação de $\langle E_L \rangle$ em relação a κ cresce significativamente. Além de ser geral, não apresentando dependência com o número de monômeros do polieletrólito (figura 5.1A) nem com a carga do macroíon (figura 5.1B), esta mudança de comportamento esta associada com o surgimento de um pico nas flutuações na energia de interação entre as duas macromoléculas. Este fato pode ser observado no gráfico interno da figura 5.1B, sugere que o aumento de $\frac{\partial \langle E_L \rangle}{\partial \kappa}$ é decorrente de uma transição de fase

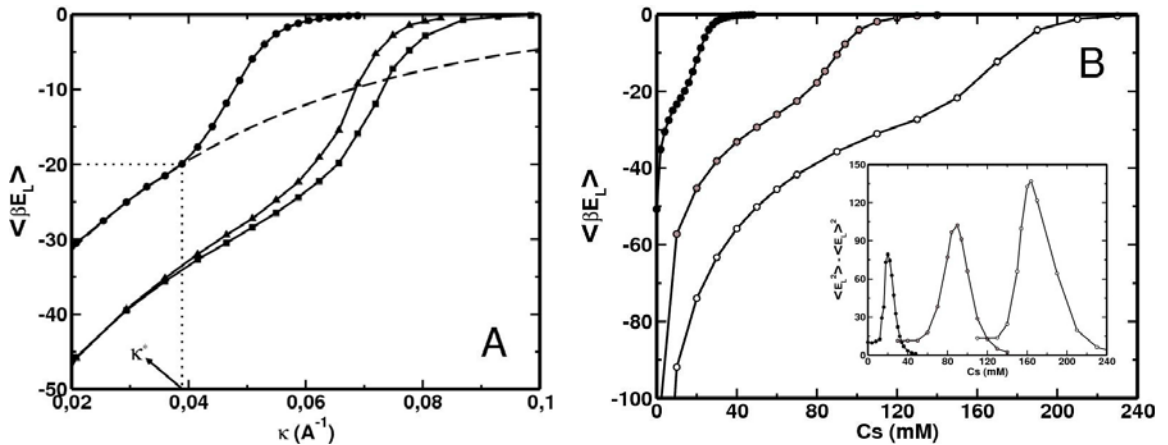


Figura 5.1: Energia média da interação E_L entre um macroíon com valência Z_m e um polieletrólito com grau de polimerização N_p . **(A)** $Z_m = -10$ e $N_p = 20$ (círculos), 40 (triângulos) e 60 (quadrados). A linha tracejada mostra a curva $\langle E_L \rangle = A \exp(\kappa B)$ com $A \approx -50,71 k_B T$ e $B \approx -23,95 \text{ \AA}$. **(B)** $N_p = 20$ e $Z_m = -10$ (símbolos pretos), -20 (símbolos cinzas) e -30 (símbolos brancos). O gráfico interno à figura (B) mostra o valor quadrático da flutuação da energia de interação.

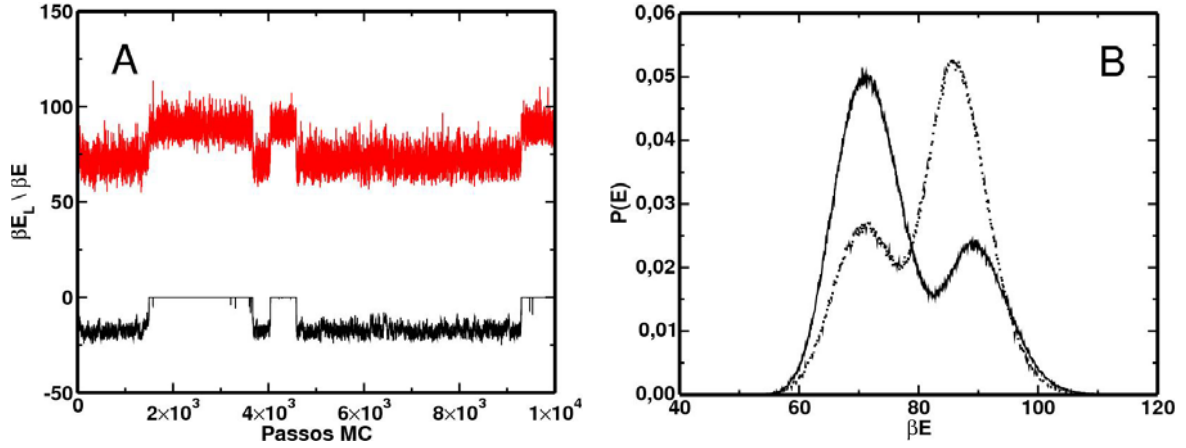


Figura 5.2: (A) Evolução da energia da interação polieletrólito–macroíon E_L e da energia total E com o decorrer da simulação para $Z_m = -10$, $N_p = 20$ e concentração salina de 22 mM. (B) Histograma da energia total para $Z_m = -10$ e $N_p = 20$. As linhas contínua e pontilhada mostram resultados para concentração salina de 22 e 28 mM, respectivamente.

promovida pela adição de sal.

A figura 5.2A apresenta a evolução de E_L com o decorrer da simulação em condições onde $\kappa > \kappa^*$. O sistema é composto por um macroíon de valência $Z_m = -10$ e uma cadeia contendo 20 monômeros em concentração salina de 22 mM ($\kappa \approx 0,048 \text{ \AA}^{-1}$). Podem ser identificadas transições reversíveis entre dois estados distintos: o **estado complexado**, onde a energia média da interação entre o polímero e a esfera segue a função $\langle E_L \rangle = A \exp(\kappa B)$, e o **estado dissociado** com $\langle E_L \rangle \approx 0$. As mesmas transições existentes em E_L podem também ser observadas na energia total do sistema E . Este fato indica que não existe nenhum tipo de transição conformacional induzida exclusivamente por interações intracadeia.

Os histogramas de E apresentados na figura 5.2B para dois valores distintos de concentração salina (22 e 28 mM) seguem uma distribuição bimodal. O pico em menor energia corresponde ao estado complexado, enquanto o segundo é referente ao estado dissociado. Com o enfraquecimento da interação entre as macromoléculas causada pela adição de sal, a população de configurações no estado dissociado aumenta ocasionando a inversão da altura dos picos. O surgimento do estado dissociado e sua contribuição para a média de E_L está associado à mudança de comportamento ob-

servadas nas figuras 5.1A e 5.1B. O mesmo comportamento pode ser verificado para maiores valores de Z_m .

No caso de cadeias contendo 20 monômeros, κ^* é aproximadamente $0,039 \text{ \AA}^{-1}$, correspondendo a $\langle E_L \rangle \approx -20 k_B T$, conforme pode ser observado pela linha pontilhada da figura 5.1A. Isto indica que o estado dissociado surge quando a energia média da interação de cada monômero com o macroíon é aproximadamente igual à energia térmica. Resultado semelhante foi obtido por P. Chodanowski e S. Stoll [8] utilizando diferente critério para determinação de κ^* . Entretanto, para cadeias com maior grau de polimerização é possível verificar o surgimento do estado dissociado quando $\langle E_L \rangle > -N_p k_B T$. Isto ocorre pois alguns monômeros se localizam na parte da cadeia que forma(m) cauda(s) (ver capítulo anterior), contribuindo pouco para E_L . A figura 5.3A apresenta o número de coordenação em função da distância ao centro do macroíon, nas mesmas condições mostradas na figura 5.1A, em concentração salina referente a κ^* . A camada de coordenação se estende até aproximadamente 40 \AA (indicado pela linha tracejada vertical dos gráficos). Embora este valor não seja rigoroso, sua variação dentro de um intervalo razoável não impõe modificações no comportamento qualitativo do sistema. De acordo com a figura 5.3B o número de

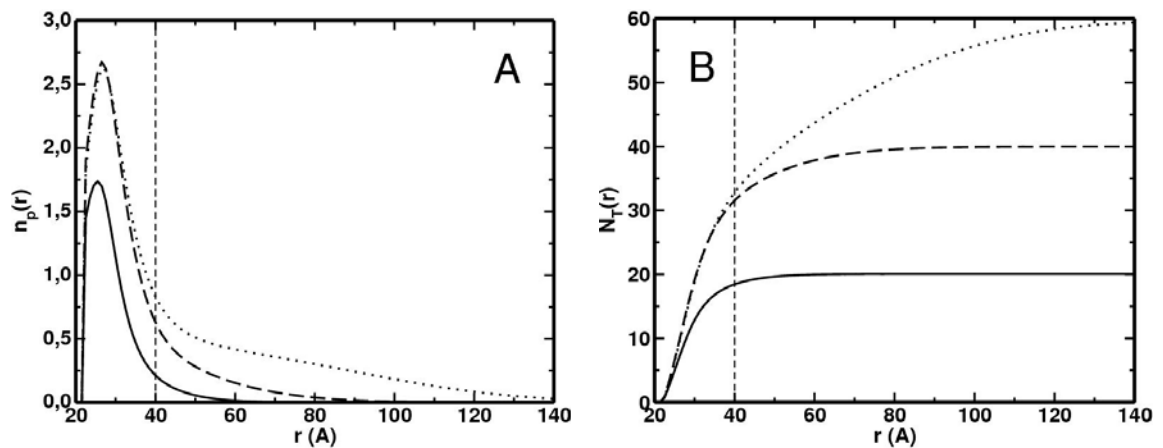


Figura 5.3: (A) Número médio de monômeros $n_p(r)$ e (B) número total de monômeros $N_T(r)$ localizados à distância r do centro do macroíon com valência $Z_m = -10$ em concentração salina correspondente a κ^* . As linhas contínuas, tracejada e pontilhada apresentam resultados para $N_p = 20$ ($C_s = 14 \text{ mM}$), $N_p = 40$ ($C_s = 24 \text{ mM}$) e $N_p = 60$ ($C_s = 26 \text{ mM}$), respectivamente.

monômeros existente no interior desta região, efetivamente ligados ao macroíon, é aproximadamente 30, valor consistente com a energia na qual ocorre a mudança no comportamento de $\langle E_L \rangle$. Então, o estado dissociado surge quando a energia média da interação correspondente a cada monômero **complexado** é aproximadamente igual a $k_B T$.

Os resultados apresentados acima indicam que os estados complexado e dissociado podem também ser caracterizados pela distância do centro de massa do polímero ao macroíon. No estado complexado, o polímero se mantém próximo do macroíon com alguns monômeros em contato real com a esfera, enquanto no estado dissociado a distância polieletrólito–macroíon é suficientemente grande para que a energia de interação seja nula. Distâncias intermediárias são observadas com probabilidade muito baixa. Neste caso, a energia eletrostática não é suficiente para superar a interação de depleção que tende a manter a cadeia afastada da superfície da esfera. Flutuações térmicas podem fazer com que o polímero se aproxime suficientemente do macroíon para que o complexo seja estabilizado, ou se afaste para regiões onde a interação de depleção domine.

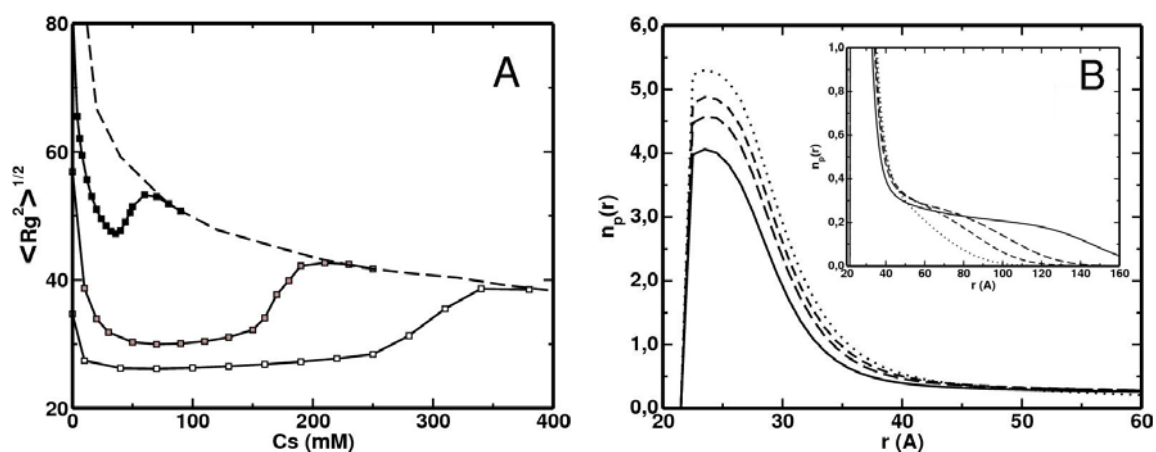


Figura 5.4: **(A)** Raio de giração $\langle R_g^2 \rangle^{1/2}$ de uma cadeia com 60 monômeros na presença de um macroíon com valência $Z_m = -10$ (símbolos pretos), -20 (símbolos cinzas) e -30 (símbolos brancos). A linha tracejada mostra o comportamento da cadeia isolada. **(B)** Número médio de monômeros $n_p(r)$ em função da distância r ao centro de um macroíon de valência $Z_m = -20$. As linhas contínuas, com tracejado longo, curto e pontilhada mostram resultados para concentração salina de 0, 5, 10 e 20 mM, respectivamente.

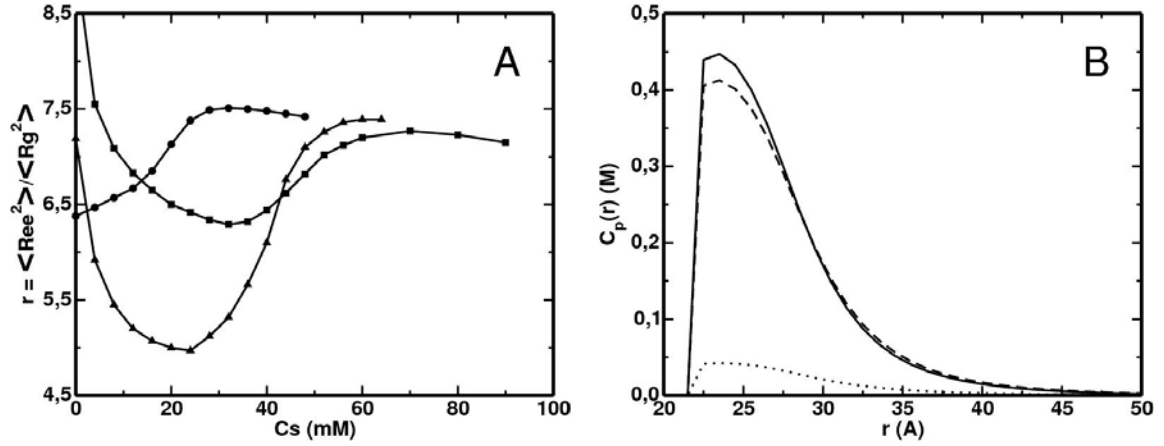


Figura 5.5: (A) Parâmetro de extensão r para cadeias com 20 (círculos), 40 (triângulos) e 60 (quadrados) monômeros na presença de um macroíon com valência $Z_m = -10$. (B) Concentração de monômeros para $Z_m = -10$ e $N_p = 20$. Linha sólida, com tracejado longo e pontilhada mostram resultados para concentração de sal de 0, 10 e 30 mM, respectivamente.

A transição para o estado dissociado se manifesta nas propriedades conformacionais do polímero. A figura 5.4A mostra o raio de giração de uma cadeia com 60 monômeros, em função da concentração salina, para três valores de Z_m . Em todos os casos podem ser identificados três regimes distintos: em baixa força iônica, as dimensões do polieletrólito decrescem com a adição de sal assumindo valores menores do que o mesmo teria isolado em solução. Isto ocorre porque a rigidez eletrostática da cadeia diminui devido à blindagem da interação entre os monômeros, permitindo com que ela se “dobre” sobre a superfície do macroíon. O aumento do número de monômeros nas vizinhanças da partícula coloidal pode ser observado na figura 5.4B para $Z_m = -20$. Quando a concentração salina atinge um valor suficientemente alto, dependente da carga do macroíon, esta tendência se inverte e a adição de sal passa a contribuir para o aumento das dimensões da cadeia. Nestas condições, ocorre o surgimento do estado dissociado e o sistema se encontra em coexistência de estados. Aumentando ainda mais a concentração do eletrólito observa-se o comportamento equivalente ao de cadeias isoladas.

Modificando o grau de polimerização (figura 5.5A) observa-se que esta inversão de comportamento não ocorre para pequenas cadeias ($N_p = 20$). Neste caso, todos os

monômeros se encontram próximos à superfície da esfera, acompanhando sua curvatura, mesmo em concentração salina nula. A blindagem eletrostática da interação monômero–macroíon aumenta a liberdade de alguns monômeros, diminuindo a influência das dimensões da partícula coloidal sobre o polímero. Este comportamento pode ser confirmado na figura 5.5B, onde a concentração de monômeros $C_p(r)$ é apresentada em diferentes regimes de força iônica. Verifica-se a queda drástica de $C_p(r)$ quando a concentração de sal aumenta de 10 para 30 mM, consequência direta da transição para o estado dissociado.

Uma vez que o interesse principal deste capítulo está na transição conformacional causada pela dissociação do complexo, o raio de giração do polímero será considerado o parâmetro de ordem da transição. A figura 5.6A apresenta a energia livre do sistema em função desta grandeza. A cadeia contém 60 monômeros e o macroíon possui valência $Z_m = -20$. Em concentração salina de 160 mM, observa-se dois estados com diferenças significativas de flutuações, como obtido através de modelos analíticos [10]. O mínimo referente ao menor valor do raio de giração corresponde ao estado complexado, onde as flutuações são, de fato, pequenas pois a esfera determina as dimensões da cadeia. Com o aumento da concentração de sal para 170 mM, a

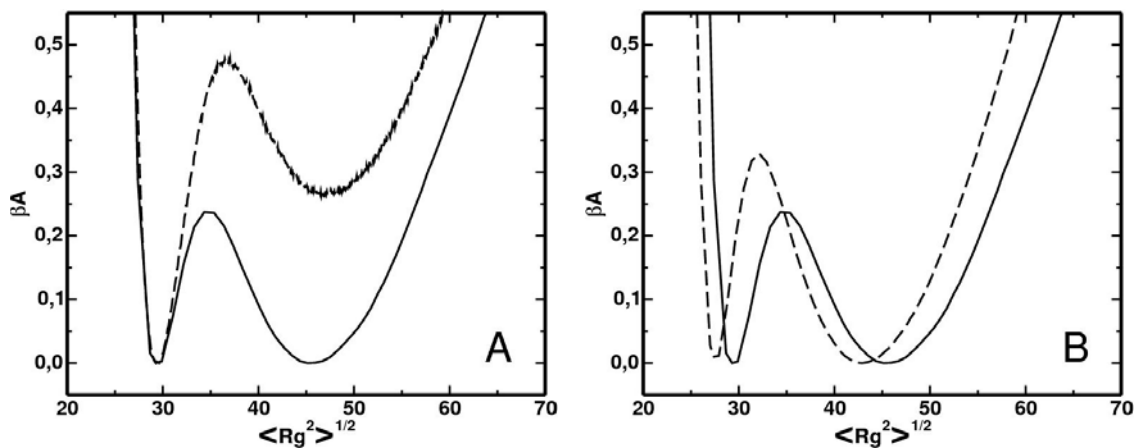


Figura 5.6: Energia Livre em função do raio de giração $\langle R_g^2 \rangle^{1/2}$ para o sistema composto por um macroíon com valência Z_m e um polieletrólito com grau de polimerização $N_p = 60$. (A) $Z_m = -20$ em concentração salina de 160 mM (linha tracejada) e 170 mM (linha contínua). (B) $Z_m = -20$ em concentração salina de 170 mM (linha contínua) e $Z_m = -30$ em concentração salina de 305 mM (linha tracejada).

barreira diminui devido à maior blindagem da interação eletrostática atrativa entre as duas macromoléculas. Com isso, a probabilidade do estado dissociado aumenta e os dois mínimos da energia livre assumem valores iguais, caracterizando a condição crítica. Este perfil da energia livre é característico de transições de primeira ordem, assim como as transições abruptas apresentadas na figura 5.2A.

O efeito do aumento da carga do macroíon na energia livre pode ser avaliado através da figura 5.6B. O primeiro valor mínimo de A , referente ao estado complexado, se desloca para menores valores do raio de giração com o aumento de Z_m , uma vez que o crescimento interação atrativa monômero–macroíon faz com que um maior número de monômeros se mantenham complexados e mais próximos da esfera. Isto também ocasiona um aumento da barreira que separa os dois estados de equilíbrio.

A figura 5.7 apresenta o diagrama de fases para os sistemas compostos por um macroíon com valência Z_m e um polímero contendo 20 ou 60 monômeros. Verifica-se a dependência linear de Z_m com o comprimento de Debye, em acordo com os resultados obtidos experimentalmente.

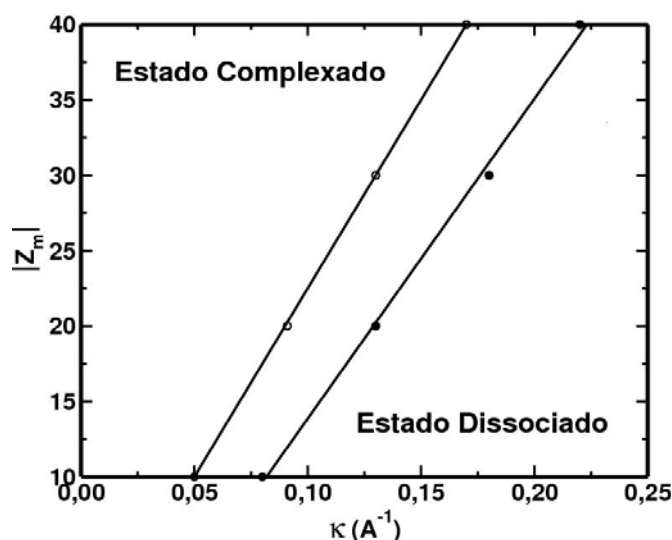


Figura 5.7: Diagrama de fases para os sistemas compostos por um macroíon com valência Z_m e um polímero contendo 20 (símbolos brancos) ou 60 (símbolos pretos) monômeros. A linha contínua é a função linear ajustada aos pontos.

Capítulo 6

Regulação de Carga

Conhecer as condições que determinam a estabilidade de complexos formados por polieletrólitos e proteínas é fundamental para o entendimento de processos intracelulares [16–18, 139]. Em várias situações de interesse, os resultados experimentais [27, 49, 140, 141] mostram forte dependência da constante de ligação com o pH e a força iônica da solução, sugerindo que as interações eletrostáticas são as principais responsáveis pela complexação.

No caso da interação entre polieletrólitos e proteínas do leite em seus pontos isoelétrico, a estabilidade do complexo é comumente atribuída à existência de patches de carga. Este fenômeno foi estudado por R. de Vries [46] utilizando simulações Monte Carlo. Ele mostrou que a causa da diferença na afinidade do polímero à α -Lactalbumina (α -lac) e β -Lactoglobulina (β -lac) pode ser atribuída a diferentes distribuições dos patches de carga. A β -lac possui vários pequenos patches distribuídos por sua superfície, enquanto que na α -lac uma grande região de densidade de carga positiva é responsável por um complexo mais estável, como demonstrado por resultados experimentais [142, 143]. Esta forma de entender o fenômeno permite identificar regiões, ou até mesmo resíduos de aminoácidos, fundamentalmente

responsáveis pela estabilidade do complexo.

Embora a identificação dos resíduos que constituem o patch de carga seja arbitrária, R. de Vries [144] desenvolveu um critério para determiná-los: o número de resíduos $p(i)$ que formam o patch centralizado no resíduo i é dado por todos os vizinhos contidos no interior de uma esfera com centro na posição de i , e raio menor que a distância do mais próximo vizinho de carga oposta. Desta forma, cinco resíduos foram indicados como principais componentes do maior patch de carga encontrado na α -lac: LYS62, HIS68, ARG70, LYS98 e LYS94. A figura 6.1 mostra $p(i)$ para as duas proteínas do leite citadas acima, considerando todos os grupos carregados. É interessante notar que os maiores patches existentes na β -lac possuem carga negativa, o que não ocorre para α -lac, onde observa-se dois grandes patches de carga oposta. A disposição estrutural dos resíduos que formam estas regiões de alta densidade de carga pode ser visualizada na figura 6.2.

O trabalho citado acima [46], bem como muitos outros que abordaram teoricamente a formação de complexos moleculares [50, 58, 89, 145, 146], assumem a distribuição de carga da proteína constante, aproximação que exclui a componente devido à regulação de carga. Este mecanismo foi estudado primeiramente em 1952 por J. G.

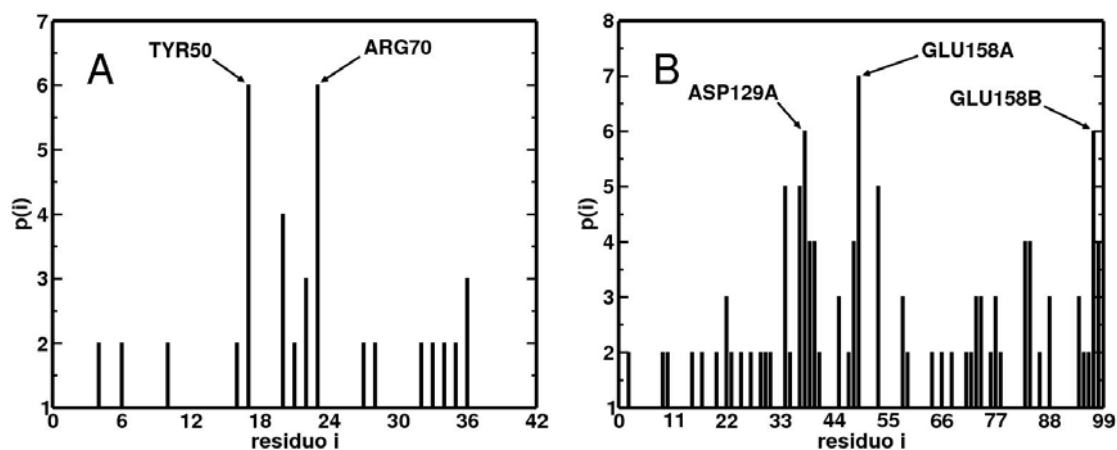


Figura 6.1: Número de resíduos $p(i)$ compondo o patch centralizado no resíduo i . Os resultados são referentes à (A) α -lactalbumina e (B) β -lactoglobulina. As setas indicam qual o resíduo central do patch.

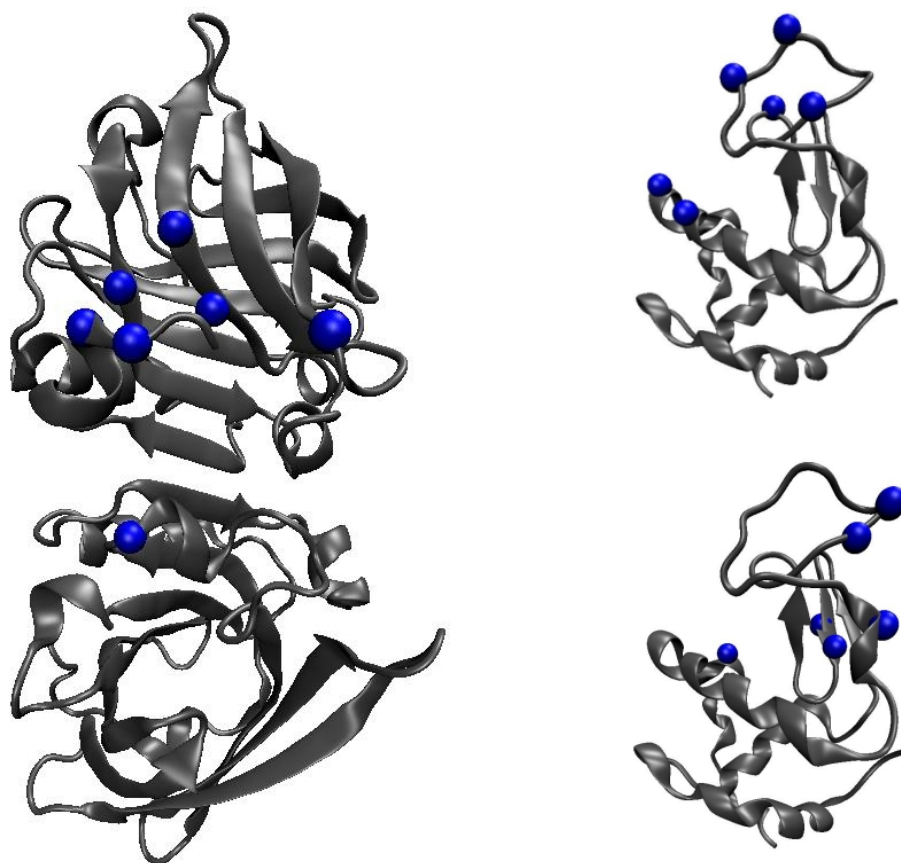


Figura 6.2: Representação pictórica do maior patch de carga existente na β -lactoglobulina, centralizado no resíduo GLU158 da cadeia A, de acordo com PDB-ID 1BEB (figura da esquerda), e dos dois maiores patches existente na α -lactalbumina, centralizados nos resíduos ARG70 (figura superior da direita) e TYR18 (figura inferior da direita), de acordo com PDB-ID 1HFY. As esferas azuis se localizam na posição do carbono- α dos resíduos que constituem o patch.

Kirkwood e J. B. Shumaker [147], os quais calcularam a contribuição à energia livre de ligação utilizando teoria de perturbação. Recentemente, M. Lund e colaboradores [59, 114] mostraram que a susceptibilidade dos resíduos modificarem seu estado de ionização devido a alguma perturbação eletrostática externa é diretamente relacionada com a flutuação de carga da proteína, também denominada *capacitância*.

F. L. B. da Silva e colaboradores [50] revisitaram o problema estudado por R. de Vries adotando um modelo puramente eletrostático. Foi utilizado simulações Monte Carlo para investigar a interação entre um poliânion e três proteínas: α -lac, β -lac e Lisozima (lis). A comparação entre as contribuições carga-dipolo e carga-carga

induzida mostrou que nos três casos estudados a contribuição causada pela regulação de carga é dominante, principalmente no caso da lis, onde apenas a contribuição dipolar não é suficiente para formar um complexo estável.

A proposta deste capítulo é primeiramente avaliar o efeito da força iônica no mecanismo de regulação de carga. Para isso, as proteínas do leite citadas acima foram utilizadas como modelo. O segundo objetivo é mostrar que a diminuição da heterogeneidade da densidade de carga da α -lac favorece a interação com o polieletrólito devido ao mecanismo de regulação de carga. Neste caso foram realizadas mutações nos resíduos indicados por R. de Vries.

6.1 Aproximação Perturbativa

A derivação formal do potencial da força média agindo no centro de massa do polieletrólito devido ao campo elétrico criado pela proteína, pode ser realizada particionando a energia eletrostática em contribuições multipolares e aplicando métodos perturbativos [50, 147]. Seja então uma proteína com centro de massa localizado na origem de um sistema de coordenadas arbitrário, e distribuição de carga definida por $[Q_i = Z_i e, \mathbf{r}_i]$. No caso da interação com um polieletrólito, pode-se utilizar um modelo extremamente simples e tratá-lo como uma esfera rígida com carga central $Q_\alpha = Z_\alpha e$ localizada em \mathbf{r}_α . A energia eletrostática da interação entre as duas macromoléculas é dada por

$$\beta U([\mathbf{r}_i], \mathbf{r}_\alpha) = l_B Z_\alpha \sum_i \frac{Z_i}{r_{i\alpha}} \exp(-\kappa r_{i\alpha}), \quad (6.1)$$

onde $r_{i\alpha} = |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_\alpha|$. Assumindo que a distância $r = |\mathbf{r}|$ entre o centro de massa das duas macromoléculas seja muito maior que $|\mathbf{r}_i|$, a expansão multipolar de U pode

ser realizada até segunda ordem:

$$\beta U(\mathbf{r}) \approx l_B Z_\alpha \left[\frac{Z_m}{r} + \frac{\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{r}}{r^3} \right] \frac{\exp[-\kappa(r - R_m)]}{(1 + \kappa R_m)}, \quad (6.2)$$

onde $Z_m = \sum_i Z_i$ é a valência da proteína, $\boldsymbol{\mu} = \sum_i Z_i \mathbf{r}_i$ é seu momento de dipolo, em unidades de comprimento, definido em relação ao centro de massa, e R_m é seu raio médio.

Considerando que a proteína esteja em seu ponto isoelétrico, é razoável assumir que a energia de interação seja muito menor do que a auto-energia das macromoléculas isoladas. Nestas condições é possível utilizar teoria de perturbação [91] e mostrar que o potencial da força média $w_{cm}(\mathbf{r})$ pode ser escrito como

$$\beta w_{cm}(\mathbf{r}) = -\ln \langle \exp[-\beta U(\mathbf{r})] \rangle_o \approx -\ln \left[1 - \langle \beta U(\mathbf{r}) \rangle_o + \frac{1}{2} \langle (\beta U(\mathbf{r}))^2 \rangle_o \right], \quad (6.3)$$

onde $\langle \dots \rangle_o$ denota a média sobre os graus de liberdade de cada macromolécula independentemente. Expandindo a relação 6.3 até segunda ordem e combinando com a equação 6.2, obtem-se

$$\beta w_{cm}(\mathbf{r}) \approx l_B Z_\alpha \left[\frac{\langle Z_m \rangle_o}{r} + \frac{\langle \boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{r} \rangle_o}{r^3} \right] \frac{\exp[-\kappa(r - R_m)]}{(1 + \kappa R_m)} - l_B^2 Z_\alpha^2 \left[\frac{C}{2r^2} + \frac{\langle \boldsymbol{\mu} \rangle_o^2}{6r^4} \right] \frac{\exp[-2\kappa(r - R_m)]}{(1 + \kappa R_m)^2}, \quad (6.4)$$

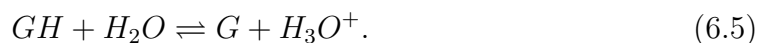
onde $C = \langle Z_m^2 \rangle_o - \langle Z_m \rangle_o^2$ é a capacitância da proteína, uma propriedade intrínseca que quantifica a susceptibilidade à regulação de carga [50, 59, 114]. Esta grandeza depende do número de grupos ionizáveis, e alcança seu valor máximo quando $pH \approx pK_o$ dos resíduos mais abundantes. Nestas condições, a probabilidade de protonação destes

resíduos é aproximadamente 0,5 (considerando pequenas interações no interior da macromolécula) e a flutuação de sua carga é máxima.

O primeiro termo da relação 6.4 contém a contribuição carga–carga e carga–dipolo. Ambos se anulam pois $\langle Z_m \rangle_o = 0$ no ponto isoeletrico e $\langle \boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{r} \rangle_o = 0$ devido à média sobre todas as configurações orientacionais da proteína. Então, $w_{cm}(\mathbf{r})$ é dado apenas por contribuições de segunda ordem. Embora o termo dominante dependa da magnitude de $\langle \boldsymbol{\mu} \rangle$ e C , é importante observar que a contribuição carga–carga induzida é sempre de maior alcance.

6.2 Condição Ideal

A distribuição de carga das proteínas tem origem na ionização dos grupos ácidos e básicos existentes nos resíduos de aminoácidos que a constituem [1, 2, 148]. Em solução aquosa, a probabilidade de um certo grupo estar ionizado é determinada pelo equilíbrio químico [149, 150] (equilíbrio ácido–base) entre a forma protonada GH e dissociada G . No caso de um grupo ácido, a forma protonada é neutra e a forma dissociada é negativamente carregada (G^-). Se o grupo é básico, a forma protonada é o ácido conjugado da base G carregado positivamente (GH^+). Em geral, o equilíbrio é descrito pela reação



A constante de equilíbrio K_a é definida de acordo com a lei de ação das massas [2, 109]. Em baixa concentração das espécies carregadas

$$K_a = \frac{[G][H_3O^+]}{[GH]}, \quad (6.6)$$

onde [...] denota a concentração molar das espécies. A probabilidade dos grupos ionizáveis estarem na forma dissociada se manifesta no grau de dissociação

$$\alpha = \frac{[G]}{[G] + [GH]}. \quad (6.7)$$

Combinando as expressões 6.6 e 6.7 a relação entre α e o pH da solução é obtida através da equação de *Henderson-Hasselbalch* [148, 149]

$$pK_a = pH - \log\left(\frac{\alpha}{1 - \alpha}\right), \quad (6.8)$$

onde $pK_a = -\log K_a$, uma forma conveniente de expressar a constante de equilíbrio devido à magnitude das concentrações envolvidas.

A constante de equilíbrio é fortemente dependente dos parâmetros do sistema que determinam o ambiente eletrostático no qual o grupo ionizável está inserido. Quando no interior de uma proteína, a interação com outros resíduos carregados afeta a probabilidade de ionização [148, 151, 152]. Uma forma de avaliar esta influência é verificar o desvio da carga média e da capacitância da proteína em relação ao seu comportamento ideal, onde nenhuma perturbação externa afeta o comportamento dos grupos ionizáveis. Neste caso, a constante de equilíbrio é normalmente denotada por K_o , e depende apenas de propriedades intrínsecas do resíduo que contém o grupo.

Seja então uma proteína composta por N_R grupos ionizáveis, sendo N_R^+ grupos básicos e N_R^- grupos ácidos. Assumindo que o i -ésimo grupo possui constante de equilíbrio intrínseca $pK_o^i = -\log K_o^i$, a valência média ideal pode ser expressa pela

relação

$$\langle Z_m \rangle_{id} = \sum_{i=1}^{N_R^+} (1 - \alpha_o^i) - \sum_{i=1}^{N_R^-} \alpha_o^i, \quad (6.9)$$

onde $\alpha_o^i = \left(1 + 10^{pK_o^i - pH}\right)^{-1}$.

A flutuação da carga do i -ésimo grupo ionizável é dada por $\langle (Z^i)^2 \rangle - \langle Z^i \rangle^2$, onde $\langle Z^i \rangle$ é sua carga média. Em condições ideais, $\langle (Z^i)^2 \rangle = \alpha_o^i$ e $\langle Z^i \rangle^2 = (\alpha_o^i)^2$ para grupos ácidos, e $\langle (Z^i)^2 \rangle = (1 - \alpha_o^i)$ e $\langle Z^i \rangle^2 = (1 - \alpha_o^i)^2$ para grupos básicos. Então, em geral $\langle (Z^i)^2 \rangle - \langle Z^i \rangle^2 = \alpha_o^i - (\alpha_o^i)^2$. Somando sobre todos os grupos ionizáveis obtem-se a capacitância ideal da proteína [59]

$$C_{id} = \sum_{i=1}^{N_R} \frac{10^{pH - pK_o^i}}{(1 + 10^{pH - pK_o^i})^2}. \quad (6.10)$$

6.3 Detalhes da Simulação

O modelo adotado para o estudo do efeito da regulação de carga na complexação de polieletrólitos com proteínas é aquele descrito no capítulo 1. A proteína é tratada como uma esfera rígida de raio R_m e carga líquida central $Z_m e$, eliminando completamente contribuições causadas pela distribuição assimétrica de carga. A solução eletrolítica é descrita através da teoria de Debye-Huckel, desprezando contribuições entrópicas causadas pela redistribuição dos íons da solução (liberação de contraíons). Tem sido apontado [3] que estas contribuições podem ser o *driving force* para complexação, e sua inclusão no modelo pode esconder o efeito da regulação de carga. Embora estas aproximações sejam mais grosseiras do que tem sido utilizado em outros trabalhos [50, 114], onde o modelo primitivo [87] é adotado e detalhes em

escala atômica são considerados para a proteína, desta forma é possível avaliar o efeito da regulação de carga exclusivamente, além de permitir o estudo em regimes de força iônica compatíveis com o ambiente fisiológico devido a redução do custo computacional.

Embora anteriormente as propriedades médias tenham sido calculadas sobre um ensemble de configurações com Z_m constante, neste capítulo a carga líquida deve ser determinada pelas condições da solução. Para isso, o pH foi um dos parâmetros de entrada da simulação, bem como as posições espaciais dos resíduos, os quais foram obtidas da estrutura cristalográfica (PDB-ID 1HFY para α -lac e PDB-ID 1BEB para β -lac em forma dimérica), e o pK_o de cada grupo ionizável, definido de acordo com Y. Nozaki e C. Tanford [153]. Algumas informações específicas de cada proteína são apresentadas na tabela 6.3.

De acordo com a seção 2.3, as configurações do sistema são criadas através de movimentos translacionais da cadeia e dos monômeros. Para levar em conta o equilíbrio ácido-base, a modificação do estado de ionização dos resíduo deve também ser realizada. A probabilidade de tal mudança ocorrer é especificada no início da simulação. Quando esta opção é escolhida, um aminoácido é selecionado aleatoriamente e sua valência é modificada ($0 \leftrightarrow -1$, caso o resíduo possua um grupo ácido, ou $0 \leftrightarrow 1$, caso o grupo seja básico). Sendo η_i a valência do resíduo i , a valência total da

Tabela 6.1: Raio médio R_m e número de resíduos ionizáveis das proteínas estudadas neste capítulo com os correspondentes valores de pK_o .

| Proteína | R_m (Å) | Número de resíduos | | | | | | |
|--------------------------------|-----------|--------------------|-----|-----|-----|------|------|------|
| | | ASP | GLU | HIS | TYR | LYS | CYS | ARG |
| α -lactalbumina (1HFY) | 27,5 | 14 | 4 | 3 | 4 | 13 | 0 | 1 |
| β -lactoglobulina (1BEB) | 42,0 | 20 | 32 | 2 | 8 | 30 | 2 | 6 |
| pK_o | – | 4,0 | 4,4 | 6,3 | 9,6 | 10,4 | 10,8 | 12,0 |

proteína em cada configuração é dada por

$$Z_m = \sum_i \eta_i. \quad (6.11)$$

Normalmente, o estudo de macromoléculas tituláveis por simulação computacional é realizado no ensemble grande canônico, onde a mudança do estado de ionização de um resíduo é acompanhada pela variação do número de protons na solução. A aceitação de novas configurações é determinada tanto pela variação da energia como também pelo potencial químico do proton no *bulk*. Como neste trabalho os contraíons e íons de sal são tratados implicitamente, a simulação é ainda realizada no ensemble canônico, de forma que a protonação/desprotonação de um resíduo é acompanhada pela correspondente variação do κ de Debye modificado (relação 1.5), mantendo a eletroneutralidade da célula. A aceitação de cada tentativa de alterar o estado de ionização de um resíduo é determinada pela variação da energia [154]

$$\beta\Delta U = \beta\Delta U^{el} \pm \ln 10 (pH - pK_o), \quad (6.12)$$

onde o sinal positivo se aplica à protonação e o sinal negativo à desprotonação. A componente eletrostática ΔU^{el} contém uma contribuição dada pela interação do resíduo cuja carga foi modificada com os outros resíduos carregados da proteína, uma outra contribuição devido à interação da proteína com os monômeros, e uma terceira ocasionada pela variação da concentração iônica ao redor da proteína. A energia eletrostática calculada antes e após a modificação de η_j é dada por

$$\beta U^{el} = \underbrace{\sum_{i=1}^{N_R} l_B \frac{\eta_i \eta_j}{r_{ij}}}_{\text{resíduo-resíduo}} + \underbrace{\sum_{i=1}^{N_p} l_B \frac{Z_m Z_p \exp[-\kappa(r_i - R_m)]}{r_i (1 + \kappa R_m)}}_{\text{proteína-monômero}} + \underbrace{l_B \frac{Z_m^2 \kappa}{(1 + \kappa R_m)}}_{\text{proteína-íons}}, \quad (6.13)$$

onde r_{ij} é a distância entre o i -ésimo e o j -ésimo resíduo, e r_i é a distância do centro da proteína ao i -ésimo monômero. A carga do aminoácido é atribuída na posição do átomo no qual o próton se liga.

6.4 Resultados

A valência média e a capacitância da α -lac e β -lac, em três valores de força iônica, são apresentadas na figura 6.3. Estes resultados se referem às proteínas isoladas, na ausência do polieletrólito. Os círculos pretos mostram resultados obtidos da referência 50, onde o modelo é mais realista (os íons móveis da solução são tratados explicitamente e a macromolécula possui detalhes atômicos). Verifica-se a concordância entre as duas aproximações, mesmo em baixa concentração de sal (1 mM) e alta concentração macromolecular (0,1 mM), onde a aproximação de campo médio linear é mais crítica devido ao alto potencial eletrostático gerado pela proteína em extremos valores de pH, e à contribuição explícita dos contraíons responsáveis em manter a eletroneutralidade do sistema. Como pode ser observado na relação 6.13, o efeito do eletrólito é introduzido considerando a densidade de carga esféricamente simétrica. Entretanto, mesmo em condições onde os efeitos dipolares se tornam dominantes (pH \approx pI) esta concordância é também observada. É razoável assumir então que o modelo proposto é eficiente em descrever o equilíbrio ácido-base com mesma acuracidade que se tem obtido com aproximações mais realísticas [50, 59, 114].

A variação da força iônica não promove mudanças significativas no pI das proteínas,

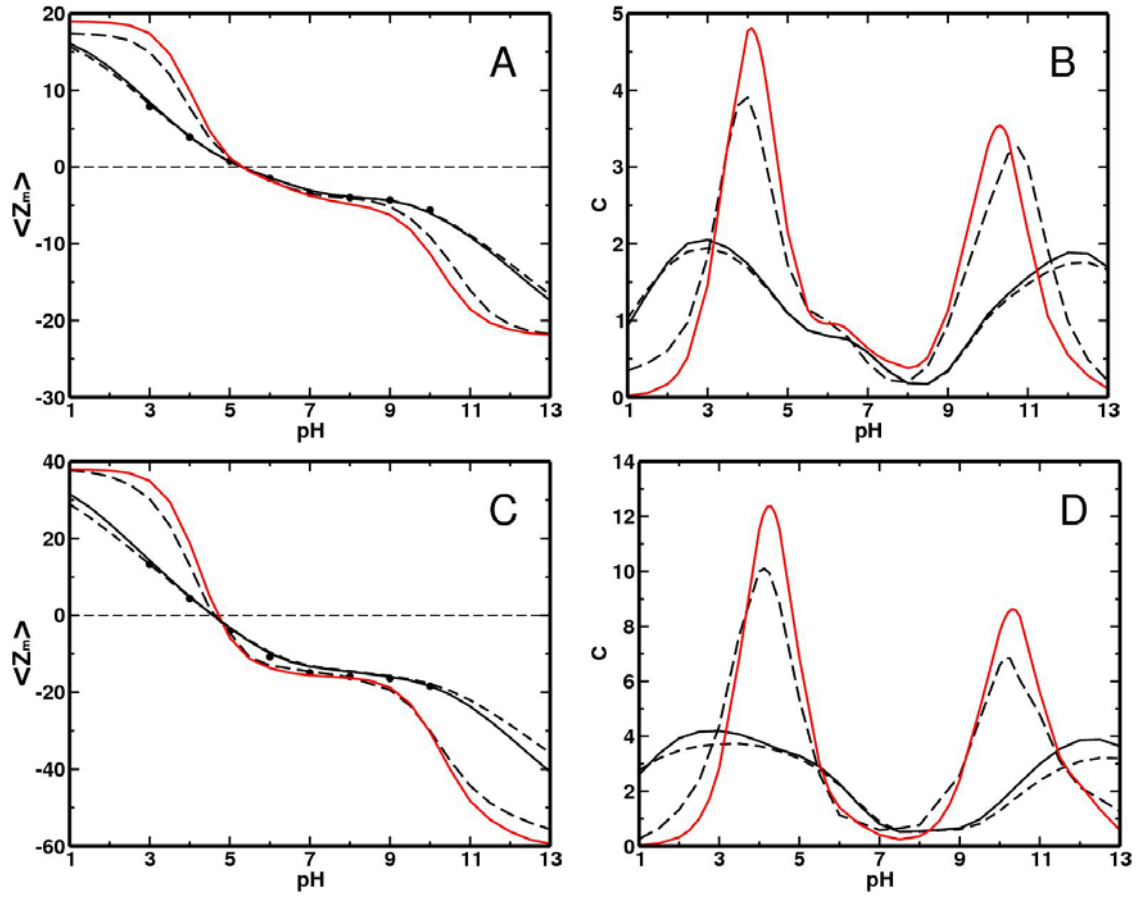


Figura 6.3: Valência média $\langle Z_m \rangle$ e capacitância C da α -lactalbumina (gráficos (A) e (B), respectivamente) e β -lactoglobulina (gráficos (C) e (D), respectivamente). O comportamento ideal é apresentado por linhas vermelhas. As linhas pretas contínuas e com tracejado longo mostram resultados em concentração macromolecular $C_p = 0,1$ mM e concentrações salinas $C_s = 1$ mM e 100 mM, respectivamente, enquanto a linha com tracejado curto apresenta resultados em baixa concentração macromolecular ($7 \mu\text{M}$) e concentração salina de 1 mM. Os círculos pretos se referem aos resultados obtidos da referência 50 em concentração macromolecular $C_p = 0,1$ mM e concentração de sal $C_s = 1$ mM.

os quais são mantidos dentro do intervalo observado empiricamente ($\text{pI} = 5,4$ e $4,6$ para α -lac e β -lac, respectivamente). A adição de sal leva o sistema ao comportamento ideal devido à blindagem eletrostática exercida sobre a interação entre os resíduos, e os efeitos causados pela variação da concentração macromolecular são observados apenas para alta carga macromolecular.

Como esperado, em condições de baixa interação intramolecular, os valores máximos da capacitância localiza-se em valores de pH aproximadamente iguais ao pK_o dos resíduos mais abundantes. Isto pode ser verificado através das informações contidas

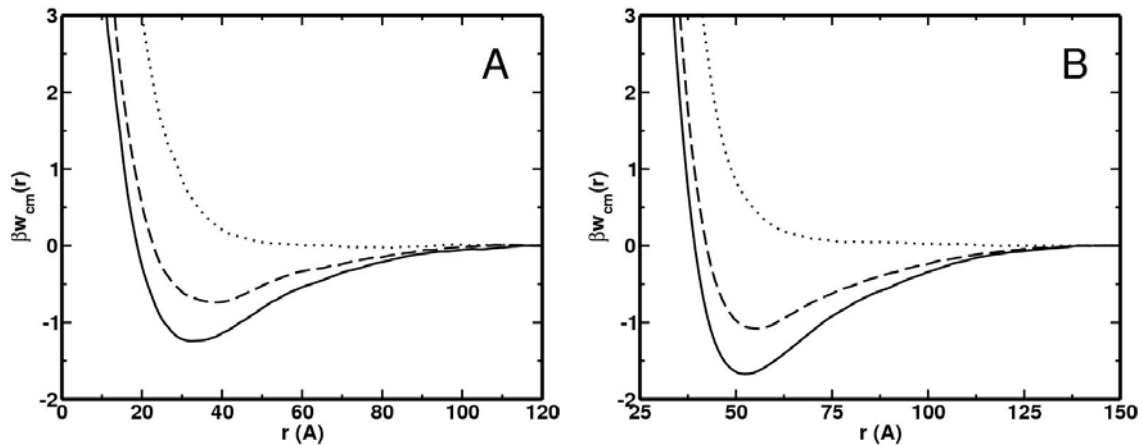


Figura 6.4: Potencial da força média $w_{cm}(r)$ agindo do centro de massa do polieletrólito devido à interação com a proteína. A concentração macromolecular é de 0,05 mM e a concentração salina é de 1 mM (linha contínua), 2 mM (linha tracejada) e 10 mM (linha pontilhada). Os resultados foram obtidos para (A) α -lactalbumina e (B) β -lactoglobulina em seus respectivos pontos isoelétrico.

na tabela 6.3. Em baixa força iônica, a interação eletrostática entre os resíduos altera a probabilidade de protonação ocasionando o deslocamento dos picos para valores mais extremos de pH.

A figura 6.4 apresenta o potencial da força média $w_{cm}(r)$ agindo no centro de massa do polieletrólito devido à interação com a α -lac (figura 6.4A) e β -lac (figura 6.4B), em seus respectivos pontos isoelétrico, para três diferentes regimes de concentração salina. Observa-se que a adição de sal promove o aumento do valor mínimo de $w_{cm}(r)$ indicando a diminuição da afinidade entre as duas macromoléculas. É interessante notar que isto ocorre mesmo quando as proteínas se encontram em seu pI e a contribuição atrativa dipolar não é considerada (veja seção 6.3). T. Hattori e colaboradores [7] verificaram o mesmo comportamento para a interação de polieletrólitos aniônicos sintéticos com a β -lac. Entretanto, a interpretação do efeito do sal é baseada na diferença de blindagem de regiões da proteína com densidade de carga negativa e positiva. Os resultados apresentados aqui sugerem um mecanismo de complexação baseado exclusivamente em interações eletrostáticas, que não depende da heterogeneidade da distribuição de carga da proteína.

A figura 6.5 mostra a variação do valor mínimo do potencial da força média em

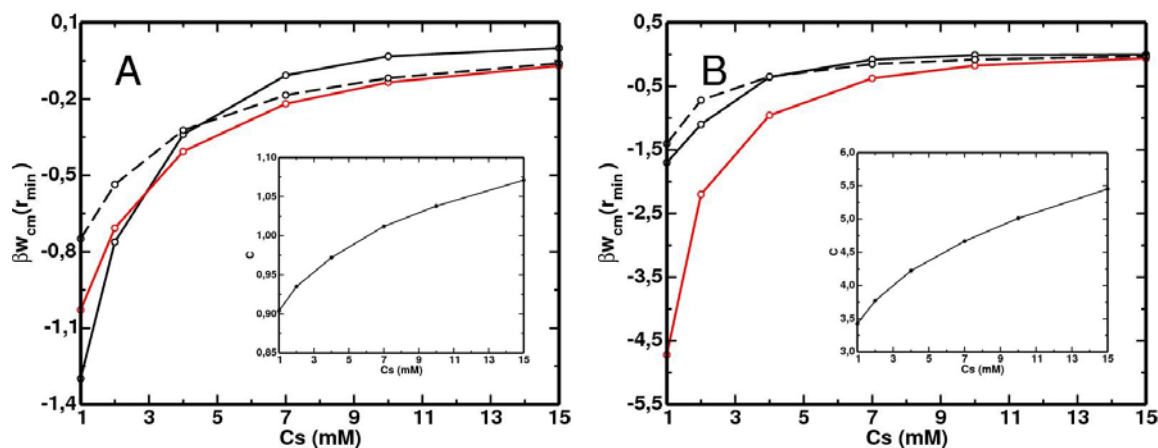


Figura 6.5: Valor mínimo do potencial da força média agindo do centro de massa do polieletrólito devido à interação com a proteína em concentração de 0,05 mM. A linha contínua preta se refere à resultados obtidos através do método Monte Carlo. A linha tracejada apresenta cálculos utilizando teoria de perturbação e adotando a capacitância obtida pelas simulações. Na linha vermelha são mostrados os mesmos cálculos utilizando teoria de perturbação mas adotando a capacitância ideal. Os resultados foram obtidos para (A) α -lactalbumina e (B) β -lactoglobulina em seus respectivos pontos isoelétrico.

relação à concentração salina. A linha contínua preta apresenta resultados obtidos por simulação Monte Carlo (MC), confirmando o efeito de blindagem eletrostática já observado na figura 6.4. Entretanto, como pode ser verificado no gráfico interno, a capacitância cresce com a concentração salina, compensando, apenas parcialmente, a blindagem causada pela adição de sal.

As outras curvas foram obtidas utilizando teoria de perturbação (relação 6.4). Seguindo as especificações da referência 50, a estimativa da distância proteína–polieletrólito é dada por $r_{min} = R_m + R_{pc}$, onde R_{pc} foi considerado metade da distância *end-to-end* do correspondente polímero neutro (30 Å), independente da concentração de sal. A linha tracejada apresenta resultados adotando as capacitâncias obtidas pelo método MC, exibidas no gráfico interno. Observa-se que, em baixa força iônica, o potencial da força média calculado por métodos perturbativos subestima as previsões obtidas pela simulação. A inversão deste comportamento é causada pelo efeito da concentração salina na distância média entre as duas macromoléculas, quando do cálculo através do método MC.

Os dados apresentados pela linha vermelha foram calculados utilizando a capacitância ideal (relação 6.10). $C_{id} = 1,27$ e $10,84$ para α -lac e β -lac, respectivamente. Comparando estes valores com as capacitâncias obtidas por simulação, constata-se que a distribuição de carga das proteínas, e a conseqüente interação entre os resíduos, inibe a troca de protons com a solução diminuindo a flutuação de carga. A diferença entre a capacitância ideal e aquelas obtidas por MC mostra que este efeito é mais significativo na β -lac, conseqüência direta dos grandes patches mostrados na figura 6.1B. Por isso, a afinidade desta proteína pelo polieletrólito é superestimada pelo cálculo perturbativo com C_{id} , o que não ocorre para α -lac. Este fato sugere que a diminuição dos patches de carga pode contribuir para a complexação devido ao aumento da capacitância das proteínas.

A figura 6.6A mostra o efeito das mutações nos resíduos da α -lac indicados na referência 46. Estes resultados foram obtidos através do modelo descrito na referência 50, tratando os íons da solução explicitamente e considerando a proteína com detalhamento atômico. A simples substituição do LYS62 e LYS98 por resíduos neutros

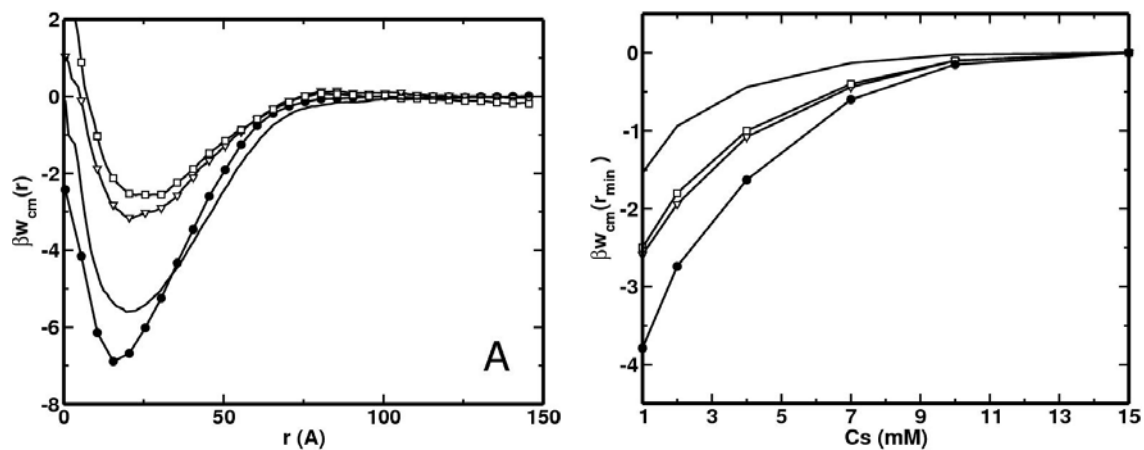


Figura 6.6: Resultados da interação entre o polieletrólito e a α -lactalbumina na sua forma selvagem (sem símbolos), neutralizando o resíduo LYS98 (quadrados brancos), neutralizando o resíduo LYS62 (triângulos brancos), e realizando mutações nos 5 resíduos indicados na referência 46 (círculos pretos). A proteína está em seu ponto isoelétrico. **(A)** Potencial da força média agindo no centro de massa do polímero em concentração salina de 1 mM e concentração macromolecular de 60 mM, obtido com o modelo atômico da referência 50. **(B)** Valor mínimo do potencial da força média agindo no centro de massa do polieletrólito em função da concentração salina. A concentração da proteína é 0,01 mM.

diminui a afinidade do polímero pela proteína, em relação à forma selvagem. Entretanto, quando os cinco resíduos (LYS62, HIS68, ARG70, LYS94 e LYS98) são alterados, a afinidade aumenta, mesmo com a proteína possuindo cinco fontes de carga a menos. Quando as mutações são realizadas, embora a densidade de carga positiva (patche de carga) em determinadas regiões da proteína diminua, a protonação dos outros resíduos se torna mais provável devido a diminuição do potencial eletrostático que estaria agindo nos sítios caso a proteína estivesse em sua forma selvagem. Isto se reflete também na flutuação da carga destes resíduos e conseqüentemente na capacitância da proteína (ver tabela 6.4).

O mesmo comportamento é observado tratando a solução eletrolítica através da teoria de Debye–Hückel. Entretanto, neste caso mutações simples em qualquer um dos resíduos leva a um aumento na afinidade entre as duas macromoléculas. Isto ocorre devido a simplicidade do modelo que desconsidera contribuições dipolares. De acordo com a tabela 6.4, mutações simples diminuem o momento de dipolo da proteína ocasionando a diminuição da afinidade verificada na figura 6.6A.

Tabela 6.2: Informações referentes à α -lactalbumina nas formas selvagem e mutante. Os dados apresentados na segunda coluna foram obtidos com o modelo descrito na referência 50. Na terceira coluna estão os resultados obtidos no modelo descrito na seção 6.3.

| Mutações | pI | Referência 50 | | Seção 6.3 |
|----------------|-----|---------------------|------|-----------|
| | | $\langle\mu\rangle$ | C | C |
| Forma Selvagem | 5,4 | 82,0 | 0,99 | 0,94 |
| LYS62 | 5,0 | 77,7 | 1,3 | 1,2 |
| LYS98 | 5,0 | 65,8 | 1,2 | 1,2 |
| 5 mutações | 4,2 | 91,0 | 1,6 | 1,4 |

Capítulo 7

Conclusões

A interação eletrostática entre um polieletrólito e um macroíon esférico foi estudada utilizando simulações Monte Carlo. Primeiramente, aspectos conformacionais relacionados com a variação da carga do macroíon e do grau de polimerização da cadeia foram investigados na ausência de sal. Em baixa carga macromolecular o polímero apenas toca a partícula coloidal, não sofrendo variações conformacionais significativas em relação ao seu comportamento isolado em solução. Com o aumento de Z_m o macroíon passa a determinar as dimensões do polieletrólito, uma vez que a interação monômero–esfera é suficiente para que a cadeia passe a envolvê-lo. Quando o número de monômeros complexados atinge um determinado valor crítico N_p^* observa-se a formação de cauda(s). O número de caudas se mostrou dependente do grau de polimerização do polieletrólito. Cadeias pequenas, até aproximadamente 80 monômeros, apresentaram estruturas com duas caudas se estendendo em direções opostas, ao contrário de polímeros maiores no qual apenas uma cauda é observada. Portanto, macroíons com carga suficientemente alta para que a formação de caudas necessite da complexação com polímeros com alto grau de polimerização apresentarão apenas uma cauda. Este fato mostra que as divergências existentes na literatura são decorrentes de diferentes especificações do modelo. Observa-se também que

o valor de N_p^* é suficiente para causar a inversão de carga do macroíon, de forma que a carga líquida do complexo seja invariante em relação à carga da esfera e ao número de monômeros da cadeia. Isto sugere que esta grandeza deve depender das propriedades geométricas do sistema.

Com a adição de sal a blindagem da interação repulsiva entre os segmentos da cadeia promove o aumento do número de monômeros complexados, até que a energia de interação de cada monômero com o macroíon atinja o valor aproximado de $k_B T$. Quando isto ocorre, configurações nas quais o complexo é dissociado passam a contribuir significativamente para as propriedades conformacionais médias do polieletrólito. Isto causa uma transição de primeira ordem caracterizada por variações abruptas nas propriedades conformacionais da cadeia. Utilizando o método de múltiplos histogramas para calcular a energia livre do sistema em relação ao raio de giração do polímero, verificou-se a dependência linear da carga macromolecular crítica com a força iônica, em concordância com resultados experimentais.

A estabilidade de complexos compostos por polieletrólitos e proteínas foi também estudada em condições nas quais a proteína se encontra em seu ponto isoelétrico. Utilizando um modelo simplificado onde as contribuições dipolares são desprezadas, verificou-se que apenas o mecanismo de regulação de carga é suficiente para formação de complexos estáveis. Este mecanismo depende da susceptibilidade das proteínas adquirirem carga líquida induzida pela presença de outras espécies carregadas. Quantitativamente, esta susceptibilidade pode ser medida através da capacitância da proteína. Esta grandeza se mostrou fortemente dependente da distribuição de carga, uma vez que interações intramoleculares podem inibir a troca de prótons com a solução. Portanto, como verificado para α -lactalbumina, mutações nos resíduos localizados em regiões de alta densidade de carga podem favorecer a complexação.

Com a adição de sal observou-se a redução da interação atrativa entre as duas macromoléculas, de acordo com o tradicional efeito de blindagem eletrostática. Entretanto, esta contribuição é parcialmente compensada pelo aumento da capacitância da proteína com a concentração salina.

Referências Bibliográficas

- [1] M. Daune. *Molecular Biophysics – Structures in motion*. Oxford University Press, Oxford, 1999.
- [2] H. Boroudjerdi et. al. Statics and dynamics of strongly charged soft matter. *Phys. Rep.*, 416:129–199, 2005.
- [3] R. de Vries and M. C. Stuart. Theory and simulations of macroion complexation. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 11:295–301, 2006.
- [4] T. E. Creighton. *Proteins – Structures and Molecular Principles*. W. E. Freeman and Company, New York, 1983.
- [5] C. L. Brooks III, M. Karplus, and B. M. Pettitt. *Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure and Thermodynamics*. John Wiley and Sons, New York, 1988.
- [6] H. Schiessel. The physics of chromatin. *J. Phys. Condens. Matter*, 15:R699–R774, 2003.
- [7] T. Hattori, R. Hallberg, and P. L. Dubin. Roles of electrostatic interaction and polymer structure in the binding of β -lactoglobulin to anionic polyelectrolytes: Measurement of binding constants by frontal analysis continuous capillary electrophoresis. *Langmuir*, 16:9738–9743, 2000.

- [8] P. Chodanowski and S. Stoll. Polyelectrolyte adsorption on charged particles in the Debye-Hückel approximation. A Monte Carlo approach. *Macromolecules*, 34:2320–2328, 2001.
- [9] P. G. de Gennes. *Scaling Concepts in Polymer Physics*. Cornell University Press, Ithaca, 1979.
- [10] A. Y. Grosberg and A. R. Khokhlov. *Statistical Physics of Macromolecules*. AIP Press, New York, 1994.
- [11] S. Ulrich, M. Seijo, and S. Stoll. The many facets of polyelectrolyte and oppositely charged macroions complex formation. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 11:268–272, 2006.
- [12] A. Akinchina and P. Linse. Monte Carlo simulations of polyion–macroion complexes. Polyion length and charge density dependence. *J. Phys. Chem. B*, 107(32):8011–8021, 2003.
- [13] R. Podgornik and M. Licer. Polyelectrolyte bridging interactions between charged macromolecules. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 11:273–279, 2006.
- [14] C. L. Cooper et. al. Polyelectrolyte–proteins complexes. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 10:52–78, 2005.
- [15] K.-K. Kunze and R. R. Netz. Salt-induced DNA-histone complexation. *Phys. Rev. Lett.*, 85(20):4389–4392, 2000.
- [16] K.-K. Kunze and R. R. Netz. Complexes of semiflexible polyelectrolytes and charged spheres as models for salt-modulated nucleosomal structures. *Phys. Rev. E*, 66:011918, 2002.
- [17] J. Feng e Z. Chun-Cheng. Thermodynamics of nucleosomal core particles. *Biochemistry*, 2006.

- [18] G. E. Stoner, S. Srinivasan, and E. Gileadi. Adsorption inhibition as a mechanism for the antithrombogenic activity of some drugs. I. Competitive adsorption of fibrinogen and heparin on mica. *J. Phys. Chem.*, 75(14):2107–2111, 1971.
- [19] B. Mulloy et. al. The interaction between Heparin and polylysine: A circular dichroism and molecular modelling study. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 29(6):721–729, 1996.
- [20] D. H. Napper. *Polymeric Stabilization of Colloidal Dispersions*. Academic Press, New York, 1983.
- [21] M. Hara. *Polyelectrolytes: Sciences and Technology*. Decker, New York, 1993.
- [22] W. L. K. Schwoyer. *Polyelectrolytes for Water and Wastewater Treatment*. CRC Press, Boca Raton, 1981.
- [23] S. Gutcho. *Waste Treatment with Polyelectrolytes and other Flocculants*. Noyes Data Corporation, New Jersey, 1977.
- [24] G. Decher. *Science*, 277:1232, 1997.
- [25] F. Caruso, R. A. Caruso, and H. Möhwald. *Science*, 282:1111, 1998.
- [26] A. Elouahabi and J. Ruyschaert. Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *Mol. Ther.*, 11(3):336–347, 2005.
- [27] C. G. de Kruif, F. Weinbreck, and R. de Vries. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 9:340–349, 2004.
- [28] F. Weinbreck et. al. Complexation of whey proteins with carrageenan. *J. Agric. Food Chem.*, 52:3550–3555, 2004.

- [29] R. de Vries and M. C. Stuart. Theory and simulations of macroion complexation. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 11:295–301, 2006.
- [30] D. F. Evans and H. Wennerström. *The Colloidal Domain*. VCH Publishers Inc., New York, 1994.
- [31] H. Boroudjerdi and R. R. Netz. Strongly coupled polyelectrolyte–macroion complexes. *J. Phys.: Condens. Matter*, 17:S1137–S1151, 2005.
- [32] R. R. Netz and J. F. Joanny. Complexation between a semiflexible polyelectrolyte and an oppositely charged sphere. *Macromolecules*, 32:9026–9040, 1999.
- [33] S. Stoll and P. Chodanowski. Polyelectrolyte adsorption on an oppositely charged spherical particles. chain rigidity effects. *Macromolecules*, 35:9556–9562, 2002.
- [34] A. Akinchina and P. Linse. *Macromolecules*, 35:5183, 2002.
- [35] P. Chodanowski and S. Stoll. Polyelectrolyte adsorption on charged particles: Ionic concentration and particle size effects – A Monte Carlo approach. *J. Chem. Phys.*, 115(10):4951–4960, 2001.
- [36] M. Brynda, P. Chodanowski, and S. Stoll. Polyelectrolyte–particle complex formation. Polyelectrolyte linear charge density and ionic concentration effects. Monte Carlo simulations. *Colloid Polym. Sci.*, 280:789–797, 2002.
- [37] T. D. Yager, C. T. McMurray, and K. E. van Holde. *Biochemistry*, 28:2271, 1989.
- [38] F. Weinbreck et. al. Complex formation of whey proteins: Exocellular polysaccharide EPS B40. *Langmuir*, 19:9404–9410, 2003.

- [39] D. W. McQuigg, J. I. Kaplan, and P. L. Dubin. Critical conditions for the binding of polyelectrolyte to small oppositely charged micelles. *J. Phys. Chem.*, 96:1973–1978, 1992.
- [40] Y. Li, J. Xia, and P. L. Dubin. Complex formation between polyelectrolyte and oppositely charged mixed micelles – Static and dynamic light-scattering study of the effect of polyelectrolyte molecular-weight and concentration. *Macromolecules*, 27:7049, 1994.
- [41] Y. J. Li, K. W. Mattison, and P. L. Dubin. Light scattering studies of the binding of bovine Serum Albumin to a cationic polyelectrolyte. *Biopolymers*, 38(4):527–533, 1996.
- [42] J. L. Xia et. al. Complexation of Trypsin and Alcohol Dehydrogenase with poly(diallyldimethylammonium chloride). *Biopolymers*, 41(4):359–365, 1997.
- [43] K. Yoshida, S. Sokhakian, and P. L. Dubin. Binding of polycarboxylic acids to cationic mixed micelles: Effects of polymer counterion binding and polyion charge distribution. *J. Colloid. Interface Sci.*, 205:257–264, 1998.
- [44] K. W. Mattison, P. L. Dubin, and I. J. Brittain. Complex formation between bovine Serum Albumin and strong polyelectrolytes: Effect of polymer charge density. *J. Phys. Chem. B*, 102(19):3830–3836, 1998.
- [45] F. W. Wiegel. *Conformational Phase Transition in a Macromolecule: Exactly Solvable Models. In Phase Transitions and Critical Phenomena*, volume 7. Academic Press London, 1983.
- [46] R. de Vries. Monte Carlo simulations of flexible polyanions complexing with whey proteins at their isoelectric point. *J. Chem. Phys.*, 120(7):3475–3481, 2004.

- [47] C. Y. Kong and M. Muthukumar. Monte carlo study of adsorption of a polyelectrolyte onto charged surfaces. *J. Chem. Phys.*, 109(4):1522–1527, 1998.
- [48] J. M. Park et. al. *Macromolecules*, 25:290–295, 1992.
- [49] E. Seyrek et. al. Ionic strength dependence of protein-polyelectrolyte interactions. *Biomacromolecules*, 4(2):273–282, 2003.
- [50] F. L. B. da Silva et. al. On the complexation of proteins and polyelectrolytes. *J. Phys. Chem. B*, 110:4459–4464, 2006.
- [51] A. M. Ferrenberg and R. H. Swendsen. Optimized Monte Carlo data analysis. *Phys. Rev. Lett.*, 63(12):1195–1198, 1989.
- [52] S. Kumar et. al. The Weighted Histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method. *J. Comp. Chem.*, 13(8):1011–1021, 1992.
- [53] H. L. Friedman. Introduction. *Faraday Discuss. of the Chem. Soc.*, 64:7–15, 1977.
- [54] H. L. Friedman. Electrolyte solutions at equilibrium. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 32:179–204, 1981.
- [55] J. C. Smith. *Dynamics of biomolecules: Simulation versus X-ray, neutron and infrared experiment. In Computer Simulation of Biomolecular Systems*, volume 3. Kluwer Academic Publishers, 1997.
- [56] K. J. Jalkanen, M. Elstner, and S. Suhai. Amino acids and small peptides as building blocks for proteins: Comparative theoretical and spectroscopic studies. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, 675:61–77, 2004.
- [57] C. E. Woodward and B. Svensson. Potentials of mean force in charged systems: Application to Superoxide Dismutase. *J. Phys. Chem.*, 95:7471–7477, 1991.

- [58] M. Lund and B. Jonsson. A mesoscopic model for protein-protein interactions in solution. *Biophys. J.*, 85(5):2940–2947, 2003.
- [59] M. Lund and B. Jonsson. On the charge regulation of proteins. *Biochemistry*, 44:5722–5727, 2005.
- [60] W. J. Hehre et. al. *Ab. Initio Molecular Orbital Theory*. Wiley, New York, 1986.
- [61] J. J. P. Stewart. *Reviews in Computational Chemistry*, volume I. VCH, New York, 1990.
- [62] M. C. Zerner. *Reviews in Computational Chemistry*, volume II. VCH, New York, 1991.
- [63] P. H. Hunenberger e W. F. van Gunsteren. *Empirical Classical Interactions Functions for Molecular Simulation. In Computer Simulation of Biomolecular Systems*, volume 3. Kluwer Academic Publishers, 1997.
- [64] M. E. Davis and J. A. McCammon. Electrostatics in biomolecular structure and dynamics. *Chem. Rev.*, 90:509–521, 1990.
- [65] B. Honig, K. Sharp, and A. Yang. Macroscopic models of aqueous solutions: Biological and chemical applications. *J. Phys. Chem.*, 97:1101, 1993.
- [66] A. Warshel and A. Papazyan. Electrostatic effects in macromolecules: fundamental concepts and practical modeling. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 8:211–217, 1998.
- [67] R. A. Marcus. *J. Chem. Phys.*, 23:1057, 1955.
- [68] H. Wennerström, B. Jönsson, and P. Linse. The cell model for polyelectrolyte systems. Exact statistical mechanics relations, Monte Carlo simulations, and the Poisson-Boltzmann approximation. *J. Chem. Phys.*, 76:4665, 1982.

- [69] M. Granfeldt, B. Jonsson, and C. E. Woodward. A mean-field Monte Carlo technique for studies of electric double layers and flexible polyelectrolytes. *J. Phys. Chem.*, 96:10080–10086, 1992.
- [70] T. Wallin and P. Linse. Monte Carlo simulations of polyelectrolyte at charged micelles. 1. Effects of chain flexibility. *Langmuir*, 12:305–314, 1996.
- [71] R. K. Hallberg and P. L. Dubin. Effect of pH on the binding of β -lactoglobulin to sodium polystyrenesulfonate. *J. Phys. Chem. B*, 102:8629–8633, 1998.
- [72] C. L. Cooper et. al. Effects of polyelectrolyte chain stiffness, charge mobility, and charge sequences on binding to proteins and micelles. *Biomacromolecules*, 7:1025–1035, 2006.
- [73] S. V. Lyulin, A. A. Darinskii, and A. V. Lyulin. Computer simulation of complexes of dendrimers with linear polyelectrolytes. *Macromolecules*, 38:3990–3998, 2005.
- [74] S. C. Harvey. Treatment of electrostatic effects in macromolecular modeling. *Proteins Struct. Funct. Genet.*, 5(1):78–92, 1989.
- [75] A. Warshel and J. Åqvist. Electrostatic energy and macromolecular function. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 20:267–298, 1991.
- [76] J. Antonsiewicz, J. A. McCammon, and M. K. Gilson. Prediction of pH-dependence properties of proteins. *J. Mol. Biol.*, 238:415–436, 1994.
- [77] R. Penfold, J. Warwicker, and B. Jönsson. Electrostatic models for calcium binding proteins. *J. Phys. Chem. B*, 108:8599–8610, 1998.
- [78] J. Warwicker. Simplified methods for pK_a and acid pH-dependent stability estimation in proteins: Removing dielectric and counterion boundaries. *Prot. Sci.*, 8:418–425, 1999.

- [79] F. L. B. da Silva, B. Jönsson, and R. Penfold. A critical investigation of the Tanford-Kirkwood scheme by means of Monte Carlo simulations. *Prot. Sci.*, 10:1415–1425, 2001.
- [80] F. L. B. da Silva et. al. Titration of fatty acids solubilized in cationic, nonionic and anionic micelles: Theory and experiment. *J. Phys. Chem. B*, 106:3515–3522, 2003.
- [81] K. A. Sharp, R. Fine, and B. Honig. Computer simulations of the diffusion of a substrate to an active site of an enzyme. *Science*, 236:1460–1463, 1987.
- [82] F. L. B. da Silva. *Statistical Mechanics Studies of Aqueous Solutions and Biomolecular Systems*. PhD thesis, Lund University, Sweden, 2000.
- [83] M. Jonsson and P. Linse. Polyelectrolyte-macroion complexation. I. Effect of linear charge density, chain length, and macroion charge. *J. Chem. Phys.*, 115(7):3406–3418, 2001.
- [84] F. Carlsson, P. Linse, and M. Malmsten. Monte Carlo simulations of polyelectrolyte-protein complexation. *J. Phys. Chem. B*, 105(38):9040–9049, 2001.
- [85] M. Doi and S. F. Edwards. *Theory of Polymer Dynamics*. Academic Press, New York, 1986.
- [86] M. K. Granfeldt, B. Jönsson, and C. E. Woodward. *Molec. Phys.*, 87:407, 1991.
- [87] T. L. Hill. *An Introduction to Statistical Thermodynamics*. Dover Publications Inc., New York, 1986.
- [88] B. Svensson et. al. Binding of Ca^{2+} to Calmodulin and its tryptic fragments: Theory and experiment. *Biochemistry*, 32:2828–2834, 1993.

- [89] I. Andre et. al. The role of electrostatic interactions in calmodulin-peptide complex formation. *Biophys. J.*, 87:1929–1938, 2004.
- [90] M. Skepo e P. Linse. Complexation, phase separation, and redissolution in polyelectrolyte–macroion solutions. *Macromolecules*, 36:508–519, 2003.
- [91] D. A. McQuarrie. *Statistical Mechanics*. Harper Collins, New York, 1976.
- [92] Y. Levin. Electrostatic correlations: from plasma to biology. *Rep. Prog. Phys.*, 65:1577–1632, 2002.
- [93] K. S. Schmitz, editor. *Macroion Characterization: From Dilute Solutions to Complex Fluids*. American Chemistry Society, Washington, 1994.
- [94] B. Beresford-Smith. *Some Aspects of Strongly Interacting colloidal dispersions*. PhD thesis, Australian National University, Canberra, 1985.
- [95] B. Beresford-Smith and D. Y. C. Chan. Electrical double-layer interactions in concentrated colloidal systems. *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 76:65–75, 1983.
- [96] S. C. Lin, W. I. Lee, and J. M. Shurr. Brownian motion of highly charged poly(L-lysine). Effects of salt and polyion concentration. *Biopolymers*, 17:1041–1064, 1978.
- [97] S. J. Carvalho, R. C. T. Ghiotto, and F. L. B. da Silva. Monte Carlo and modified Tanford-Kirkwood results for macromolecular electrostatics calculations. *J. Phys. Chem. B*, 2006.
- [98] E. J. W. Verwey and J. Th. G. Overbeek. *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*. Elsevier Publishing Company Inc., Amsterdam, 1948.
- [99] D. Chandler. *Introduction to Modern Statistical Mechanics*. Oxford University Press, Oxford, 1987.

- [100] D. Frenkel and B. Smit. *Understanding Molecular Simulation: From algorithms to Applications*. Academic Press, San Diego, 1996.
- [101] D. Levesque and J. J. Weis. Recent progress in the simulation of classical fluids. *Topics in Applied Physics*, 71:121–204, 1992.
- [102] M. P. Allen and D. J. Tildesley. *Computer Simulation of Liquids*. Oxford University Press, Oxford, 1989.
- [103] D. Levesque, J. J. Weis, and J. P. Hansen. Simulation of classical fluids. In K. Binder, editor, *Monte Carlo Methods in Statistical Physics*, volume 5, pages 47–119, Berlin, 1986. Springer-Verlag.
- [104] W. F. van Gunsteren and H. J. C. Berendsen. Computer simulation of molecular dynamics: Methodology, applications, and perspective in chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 29:992–1023, 1990.
- [105] W. F. van Gunsteren, P. K. Weiner, and A. J. Wilkinson, editors. *Computer Simulation of Biomolecular systems*, volume 2. Escom, Leiden, 1993.
- [106] R. C. Tolman. *The Principles of Statistical Mechanics*. Dover Publications, Inc., New York, 1980.
- [107] E. J. S. Lage. *Física Estatística*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1995.
- [108] H. Goldstein. *Classical Mechanics*. Addison-Wesley, Reading, 1980.
- [109] L. Landau and E. M. Lifshitz. *Statistical Physics, part 1*. Pergamon Press, Oxford, 3rd edition, 1980.
- [110] K. Huang. *Statistical Mechanics*. John Wiley & sons, New York, 2nd edition, 1987.
- [111] M. A. G. Ruggiero and V. L. R. Lopes. *Cálculo Numérico – Aspectos Teóricos e Computacionais*. Makron Books, São Paulo, 2nd edition, 1986.

- [112] T. Tomé and M. J. de Oliveira. *Dinâmica Estocástica e Irreversibilidade*. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- [113] N. A. Metropolis et. al. Equation of state calculations by fast computing machines. *J. Chem. Phys.*, 21:1087–1097, 1953.
- [114] M. Lund, T. Åkesson, and B. Jonsson. Enhanced protein adsorption due to charge regulation. *Langmuir*, 21:8385–8388, 2005.
- [115] H. Ohtaki, T. Radnai, and T. Yamaguchi. Structure of water under subcritical and supercritical conditions by solution x-ray diffraction. *Chem. Soc. Rev.*, pages 41–51, 1997.
- [116] J. E. Enderby. Neutron scattering from ionic solutions. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 34:155–185, 1993.
- [117] M. O. Khan and D. Y. C. Chan. Monte Carlo simulations of stretched charged polymers. *J. Phys. Chem. B*, 107:8131–8139, 2003.
- [118] M. O. Khan and D. Y. C. Chan. Effect of chain stiffness on polyelectrolyte condensation. *Macromolecules*, 38:3017–3025, 2005.
- [119] C. H. Bennett. *J. Comput. Chem.*, 22:245, 1976.
- [120] V. G. Rostiashvili, V. I. Irzhak, and B. A. Rosenberg. *Glass Transition in Polymers*. Khimiya Publishers, Leningrad, 1987.
- [121] A. N. Semenov and A. R. Khokhlov. Statistical physics of liquid-crystalline polymers. *Usp. Fiz. Nauk.*, 156:427, 1988.
- [122] W. Kuhn. *Kolloid Z.*, 68:2, 1934.
- [123] S. F. Edwards. The statistical mechanics of polymers with excluded volume. *Proc. Phys. Soc.*, 85:613–624, 1965.

- [124] L. D. Williams and L. J. Maher III. Electrostatic mechanisms of DNA deformation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 29:497–521, 2000.
- [125] P. J. Hagerman. Flexibility of DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 17:265–286, 1988.
- [126] T. Odijk. Polyelectrolytes near the rod limit. *J. Polym. Sci.*, 15:477–483, 1977.
- [127] J. Skolnick and M. Fixman. Electrostatic persistence length of a wormlike polyelectrolyte. *Macromolecules*, 10:944–948, 1977.
- [128] H. A. van der Schee and J. Lyklema. A lattice theory of polyelectrolyte adsorption. *J. Phys. Chem.*, 88:666, 1984.
- [129] E. M. Mattescu et. al. Overcharging of a spherical macroion by an oppositely charged polyelectrolyte. *Europhys. Lett.*, 46(4):493–498, 1999.
- [130] T. T. Nguyen and B. I. Shklovskii. Overcharging of a macroion by an oppositely charged polyelectrolyte. *Physica A*, 293:324–338, 2000.
- [131] A. Y. Grosberg, T. T. Nguyen, and B. I. Shklovskii. Colloquium: The physics of charge inversion in chemical and biological systems. *Rev. Mod. Phys.*, 74(2):329–345, 2002.
- [132] Y. Wang, K. Kimura, Q. Huang, P. L. Dubin, and W. Jaeger. *Macromolecules*, 32:7128, 1999.
- [133] S. Y. Park, R. F. Bruinsma, and W. M. Gelbart. *Europhys. Lett.*, 46:454, 1999.
- [134] F. W. Wiegand. Adsorption of a macromolecule to a charged surface. *J. Phys. A: Math. Gen.*, 10(2):299–303, 1977.

- [135] M. Muthukumar. Adsorption of a polyelectrolyte chain to a charged surface. *J. Chem. Phys.*, 86(12):7230–7235, 1987.
- [136] F. von Goeler and M. Muthukumar. Adsorption of a polyelectrolyte onto curved surfaces. *J. Chem. Phys.*, 100(10):7796–7803, 1994.
- [137] R. G. Winkler and A. G. Cherstvy. Critical adsorption of polyelectrolytes onto charged spherical colloids. *Phys. Rev. Lett.*, 96, 2006.
- [138] T. Wallin and P. Linse. Monte Carlo simulations of polyelectrolytes at charged micelles. 3. Effects of surfactant tail length. *J. Phys. Chem. B*, 101:5506–5513, 1997.
- [139] P. R. Bergethon. *The Physical Basis of Biochemistry - The Foundations of Molecular Biophysics*. Springer-Verlag New York Inc., New York, 1998.
- [140] K. R. Grymonpre et. al. *Biomacromolecules*, 2:422–429, 2001.
- [141] M. Girard, S. L. Turgeon, and S. F. Gauthier. *J. Agric. Food. Chem.*, 51:6043–6049, 2003.
- [142] F. Weinbreck et. al. *Biomacromolecules*, 4:293, 2003.
- [143] F. Weinbreck and C. G. de Kruif. *In Food Colloids. Biopolymers and Materials*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2003.
- [144] R. de Vries, F. Weinbreck, and C. G. de Kruif. Theory of polyelectrolyte adsorption on heterogeneously charged surfaces applied to soluble protein–polyelectrolyte complexes. *J. Chem. Phys.*, 118(10):4649–4659, 2003.
- [145] B. Jönsson and B. Svensson. Monte Carlo simulation of ion–protein binding. In W. F. van Gunsteren, P. K. Weiner, and A. Wilkinson, editors, *Computer Simulation of Biomolecular Systems*, volume 2, pages 464–482, Leiden, 1993. ESCOM.

- [146] F. Carlsson, M. Malmsten, and P. Linse. Monte Carlo simulations of Lysozyme self-association in aqueous solution. *J. Phys. Chem.*, 105:12189–12195, 2001.
- [147] J. G. Kirkwood and J. B. Shumaker. Forces between protein molecules in solution arising from fluctuations in proton charge and configuration. *Chemistry*, 38:863–871, 1952.
- [148] K. E. van Holde, W. C. Johnson, and P. S. Ho. *Principles of Physical Biochemistry*. Prentice-Hall, New Jersey, 1998.
- [149] P. W. Atkins. *Physical Chemistry*. Oxford University Press, London, 5th edition, 1995.
- [150] K. Denbigh, editor. *The Principles of Chemical Equilibrium*. Cambridge University Press, Cambridge, 1997.
- [151] D. Bashford and M. Karplus. pKa's of ionizable groups in proteins: Atomic detail from a continuum electrostatic model. *Biochemistry*, 29:10219–10225, 1990.
- [152] J. Antonsiewicz, J. A. McCammon, and M. K. Gilson. The determinants of pK_as in proteins. *Biochemistry*, 35:7819–7833, 1994.
- [153] Y. Nozaki and C. Tanford. Examination of titration behavior. *Methods Enzymol.*, 11:715–734, 1967.
- [154] T. Kesvatera et. al. Focusing the electrostatic potential at EF-hands of Calbindin D_{9K}. Titration of acidic residues. *Proteins Struct. Funct. Genet.*, 45:129–135, 2001.