



Universidade do Minho
Escola de Ciências

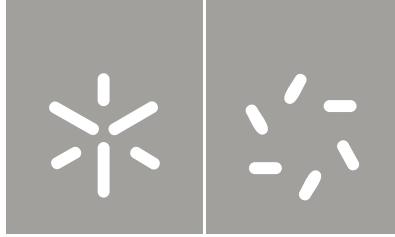
João Pedro Sousa Pinto Rego Martins

Modelação Molecular de Agentes
Intercalantes do ADN em Líquidos Iónicos

João Pedro Sousa Pinto Rego Martins Modelação Molecular de Agentes Intercalantes do ADN em Líquidos Iónicos

UMinho | 2012

Outubro de 2012



Universidade do Minho
Escola de Ciências

João Pedro Sousa Pinto Rego Martins

Modelação Molecular de Agentes
Intercalantes do ADN em Líquidos Iónicos

Tese de Mestrado
Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho efectuado sob a orientação do
Professor Doutor Nuno M. Micaêlo

e co-orientação da
Professora Doutora Marta Ramos

Outubro de 2012

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado sob a orientação do Professor Nuno Miguel da Silva Micaêlo, a quem me cabe exprimir sincero reconhecimento por tudo que me ensinou e por toda a amizade, orientação e disponibilidade que tornaram este estudo mais aliciante.

Agradeço à professora Marta Ramos, coorientadora desta tese de mestrado, pela amizade e por tudo que me ensinou sobre investigação científica e como fazer investigação.

Ao professor Michael Belsley que, apesar de não ter estado envolvido neste trabalho, o conhecimento que me passou foi da maior importância para que eu fosse capaz de me debruçar sobre os problemas de uma forma mais eficaz e diligente.

A todos os meus colegas e amigos que, com a sua multidisciplinaridade, me ensinaram muito sobre os mundos para além da física e da matemática. A eles agradeço toda a amizade e apoio durante estes anos e, principalmente, durante o período de dissertação.

Àqueles que estão mais perto, a minha família, eu dirijo uma palavra de apreço, pois sem eles este período seria ainda mais difícil. Eles sentiram a evolução deste trabalho e, sobretudo, a minha evolução. Obrigado por todo o apoio e amor durante todos estes anos.

Modelação Molecular de Agentes Intercalantes do ADN em Líquidos Iónicos

Resumo

As Moléculas intercalantes são usadas como agentes de deteção e quantificação de ADN. Estas moléculas intercalam entre as cadeias duplas de ADN, em solução aquosa, devido às interações hidrofóbicas existentes entre as moléculas. Estas moléculas intercalantes são fluorescentes mas, quando intercaladas, exibem um aumento significativo da sua intensidade de fluorescência.

Este efeito não é observado quando a solução deixa de ser a solução aquosa habitual, como por exemplo, uma solução composta por um líquido iónico à temperatura ambiente (RTILs). O decréscimo da fluorescência dos intercalantes poderá estar relacionada com o facto de estes não intercalarem com o ADN, devido às fortes interações iónicas entre o solvente e a cadeia de ADN, ou através de outros fenómenos envolvidos na interação entre as moléculas estudadas.

Com este projeto pretendemos verificar se estamos perante um fenómeno de exclusão por parte do Líquido Iónico, ou se a intercalação é espontânea, estudando os mecanismos moleculares envolvidos intercalação na cadeia de ADN e em que condição a interação entre ADN e intercaladores poderá ser restabelecida em líquidos iónicos.

Foram estudados 5 intercaladores (Brometo de Etídio, Berberine, Proflavine, Proflavine Reduzida e DAPI), com afinidades pelas bases de ADN e cargas diferentes, em 10 líquidos iónicos distintos. Fomos capazes de mostrar os mecanismos envolvidos nas interações entre os intercaladores e a cadeia de ADN e, a partir destas observações, foi possível mostrar qual dos agentes intercalantes estudados apresentou as condições mais favoráveis para uma intercalação em meio de líquido iónico. Constatamos que não há exclusão dos intercaladores e que eles se associam espontaneamente ao ADN em líquidos iónicos, contradizendo as interpretações de algumas evidências experimentais anteriores. Com base nos estudos de PMF complementado com a análise das interações energéticas, foi possível concluir que o DAPI é o intercalador que apresenta a intercalação mais forte e estável e, com base nos resultados de PMF, o Líquido Iónico que promove uma intercalação mais forte e espontânea, é o [BPYRR⁺] [PF6⁻].

Molecular Modeling of ADN Intercalating Agents in Ionic Liquids.

Abstract

Intercalating molecules are used as agents of detection and quantification of DNA. These molecules intercalate between DNA double chains in aqueous solution due to hydrophobic interactions between these molecules. These intercalating molecules are fluorescent but, when intercalated, they exhibit a significant increase in their fluorescence intensity.

This effect is not observed when the solution ceases to be the usual aqueous solution but, a solution composed of an ionic liquid at room temperature (RTILs). The decrease of fluorescence of the intercalating agents, might be related to the fact that they do not intercalate within DNA helix, due to the strong ionic interactions between the solvent and DNA chain, or by other phenomena involved in the interaction between these molecules.

With this project we intend to verify if this is a phenomenon of exclusion by the Ionic Liquid, or if the intercalation is spontaneous by studying the molecular mechanisms involved in the intercalation and in what condition the interaction between DNA and the intercalator may be restored in ionic liquids.

Five intercalators were studied (ethidium bromide, Berberine, Proflavine, reduced Proflavine and DAPI) with different DNA base-pair affinity and different loads, in ten different ionic liquids. We were able to show the mechanisms involved in the interactions between intercalators and DNA chain and, from these observations, it was possible to show which of the intercalating agents studied showed the most favorable conditions for an intercalation in ionic liquid medium. We observed that there is no exclusion of the intercalators and they spontaneously associate with DNA in ionic liquids, contradicting the interpretation of some previous experimental evidences. Based on studies of PMF, complemented with the analysis of energetic interactions, we concluded that the DAPI is the intercalator with the stronger and more stable and, based on PMF results, the ionic liquid which promotes a stronger and spontaneous intercalation is the [BPYRR⁺] [PF₆⁻].

INDICE

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
INDICE	ix
Abreviaturas.....	xi
Lista de figuras	xiii
Lista de Tabelas	xv
Capitulo 1 - Introdução.....	1
1.1 – Agentes Intercalantes	2
1.1.1 - Berberine	5
1.1.2 – DAPI.....	5
1.2.3 – Etidio	6
1.1.4 – Proflavine e Proflavine Reduzida	7
1.2 – Líquidos Iônicos à temperatura ambiente	8
Capitulo 2 – Teoria	13
2.1 – Dinâmica Molecular.....	14
2.2 – Algoritmos de simulação e cálculo.....	16
2.2.1 – Condições periódicas de fronteira.....	17
2.2.2 – Algoritmos de Dinâmica Molecular.....	19
2.2.2.1 – Condições iniciais.....	19
2.2.2.2 – Cálculo do Potencial e Forças	21
2.2.2.4 – Método de integração <i>leap-frog</i>	25
2.2.2.5 – Controlo da Temperatura – Algoritmo Berendsen	26
2.2.3 – Condições – algoritmo LINCS	26
2.2.4 – Minimização de Energia	27
2.2.4.1 – Steepest descent.....	28
2.2.4.2 – Gradiente conjugado	28
2.2.5 – Potencial de Força Média	29
Capitulo 3 – Metodologia	33
3.1 – Desenho e Desenvolvimento da Topologia dos Intercaladores.	34
3.2 – As simulações de Minimização de Energia dos intercaladores em vácuo	34
3.4 – Simulação dos intercaladores em meio de Líquido Iônico	35

3.5 – Criação das Estruturas dos complexos ADN + Intercalador.....	35
3.6 – Simulação de Minimização de Energia e Dinâmica molecular, dos complexos, em água.....	36
3.7 – Simulações de Minimização de Energia e Dinâmica Molecular dos complexos em meio de Líquido Iónico.....	37
Capítulo 4 – Apresentação e Discussão dos Resultados.....	41
4.1 Potenciais de Força Média.....	42
4.1.1 – Proflavine.....	42
4.2.3 – Comparação entre os Intercaladores Proflavine, Proflavine Reduzida e DAPI.....	46
4.2 Apresentação/Análise dos resultados baseados nas interações electroestáticas, Van der Waals e na formação de pontes de Hidrogénio.....	50
4.2.1 – Estudo dos Resultados para cada Intercalador.....	50
4.2.1.1 – Berberine.....	50
4.2.1.2 – DAPI.....	55
4.2.1.3 – Etídio.....	60
4.2.1.4 – Proflavine.....	65
4.2.1.5 – Proflavine Reduzida.....	70
4.1.3 – Comparação entre os RTILs com os melhores resultados quanto às interações de Coulomb, VdW e formação de pontes de Hidrogénio.....	75
Conclusão.....	81
Bibliografia.....	85
ANEXO 1 – Estruturas e Topologias.....	89
4.1 – Informação geral das topologias.....	89
4.1.1 – Informação relativa aos tipos de átomos usados.....	89
4.1.2 – Informação relativa às ligações interatómicas.....	90
4.1.3 – Informação relativa aos ângulos formados entre os átomos.....	91
4.1.4 – Informação relativa aos diedros, próprios e impróprios, formados entre os átomos.....	91
4.2 – Estrutura dos intercaladores e dos complexos.....	93
4.2.1 – Berberine e complexo Berberine + ADN.....	93
4.2.2 - DAPI e complexo DAPI + ADN.....	94
4.2.3 - Etídio e complexo Etídio + ADN.....	97
4.2.4 – Proflavine, Proflavine Reduzida e os complexos, por elas formados, com o ADN99	
ANEXO 2 – Gráficos relativos às interações intermoleculares.....	101

Abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

(A – T) – Adenina e Timina

cg – gradiente conjugado – do inglês *conjugated gradient*

(C – G) – Citosina e Guanina

DM – Dinâmica Molecular

md – *molecular dynamics*

ns – nano segundo

PMF – Potencial de Força Média – do inglês *Potential Mean Force*

ps – pico segundo

RTS – *Resonance Light Scattering*

RTIL – Líquido Iônico à Temperatura Ambiente – do inglês *Room Temperature Ionic Liquid*

Steep – *Steepest Descent*

[BDHYDOZA+] – 1-butyl-oxazolium

[BIM+] – 1-butyl-imidazolium

[BPYR+] – 1-butyl-pyridinium

[BPYRR+] – 1-butyl-pyrrolidinium

[HYDETMAZ+] – (2-hydroxyethyl)trimethylammonium

[PF₆+] – hexafluorophosphate

[BF₄-] – tetrafluorobromide

Lista de figuras

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA INTERCALAÇÃO DA BERBERINE NUMA CADEIA DE ADN D(ATGCAT) ₂ . O ALONGAMENTO DA CADEIA, EM A ₂ , CAUSADO PELA INTERCALAÇÃO DA BERBERINE, É MAIOR DO QUE NO SEU ESTADO RELAXADO – A ₁	3
FIGURA 2 - INTERCALAÇÃO DO DAPI EM UMA CADEIA DE ADN – D(CGCGAATTCGCG) ₂ . O DAPI ENCONTRA-SE INTERCALADO NA MINOR GROVE DOS PARES DE BASE (AATT).	4
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA BERBERINE.	5
FIGURA 4 - ESTRUTURA DO DAPI.	6
FIGURA 5 - ESTRUTURA DO ETIDIO.	7
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DA PROFLAVINE (ESQUERDA) E A PROFLAVINE REDUZIDA (DIREITA).	8
FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DOS CATIONES E ANIÕES UTILIZADOS NA CRIAÇÃO DOS RTILS USADOS NESTE TRABALHO, COMBINANDO OS CINCO CATIONES COM OS DOIS ANIÕES.	11
FIGURA 8 - DIAGRAMA REPRESENTATIVO DAS ESCOLHAS A FAZER QUANDO SE DESENHA UM MODELO MOLECULAR.	14
FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE FRONTEIRA APLICADA A UM DOS SISTEMAS ESTUDADOS NESTE TRABALHO. À ESQUERDA TEMOS O SISTEMA COMPLETO – COMPLEXO E LIQUIDO IÔNICO. À DIREITA TEMOS APENAS REPRESENTADO O COMPLEXO.	18
FIGURA 10 - DIAGRAMA DE UM ALGORITMO TIPO DAS SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR.	19
FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO DE UMA LIGAÇÃO ATÔMICA E DO POTENCIAL HARMÔNICO USADO PARA DESCREVER A VARIAÇÃO DA ENERGIA COM A DISTÂNCIA ENTRE OS ÁTOMOS LIGADOS.	21
FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO DO ÂNGULO FORMADO POR TRÊS ÁTOMOS ADJACENTES E POTENCIAL HARMÔNICO USADO PARA DESCREVER A VARIAÇÃO DA ENERGIA COM O ÂNGULO.	22
FIGURA 13 - TORÇÃO ENTRE QUATRO ÁTOMOS ADJACENTES E REPRESENTAÇÃO DO POTENCIAL PERIÓDICO USADO PARA DESCREVER A VARIAÇÃO DA ENERGIA EM FUNÇÃO DO ÂNGULO DE TORÇÃO.	22
FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO DE UM DIEDRO IMPRÓPRIO FORMADO POR QUATRO ÁTOMOS. O POTENCIAL HARMÔNICO DESCREVE A VARIAÇÃO DA ENERGIA EM FUNÇÃO DO ÂNGULO DO DIEDRO.	23
FIGURA 15 - REPRESENTAÇÃO DE DUAS CARGAS A DISTÂNCIA R E DO POTENCIAL DE COULOMB, QUE DESCREVE A VARIAÇÃO DA ENERGIA EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA ENTRE AS CARGAS.	24
FIGURA 16 - REPRESENTAÇÃO DO POTENCIAL DE LEONARD-JONES ENTRE DUAS PARTÍCULAS A UMA DISTÂNCIA R.	24
FIGURA 17 - REPRESENTAÇÃO DO MÉTODO DE INTEGRAÇÃO LEAP-FROG. É POSSÍVEL OBSERVAR COMO O CÁLCULO DAS POSIÇÕES, E VELOCIDADES, É FEITO ALTERNADAMENTE, AO LONGO DO TEMPO.	25
FIGURA 18 – REPRESENTAÇÃO DE UM POTENCIAL DE UM SISTEMA, COMEÇA COM UMA CONFIGURAÇÃO DE MAIOR ENERGIA (START) E A PROCURA DE UM MÍNIMO LOCAL DE ENERGIA (PONTO END).	27
FIGURA 19 - REPRESENTAÇÃO DE GRADIENTES $x^2 + 2y^2$. DO LADO ESQUERDO É USADO O ALGORITMO STEEPEST DESCENT PARA PROCURAR O MÍNIMO. DO LADO DIREITO É USADO O ALGORITMO DO GRADIENTE CONJUGADO (33).	29

FIGURA 20 - ESQUEMA QUE DESCREVE A FORMA COMO O ESTUDO SE DESENVOLVEU.....	33
FIGURA 21- REPRESENTAÇÃO DA INTERCALAÇÃO DA BERBERINE EM ADN, EM RTIL [BPYRR+] [PF6-] DESDE O PONTO DE INTERCALAÇÃO ATÉ A SAÍDA COMPLETA DA CADEIA DE ADN.	54
FIGURA 22 - REPRESENTAÇÃO DA INTERCALAÇÃO DO DAPI EM ADN, EM RTIL [BIM ⁺] [BF ₄ ⁻] DESDE O PONTO DE INTERCALAÇÃO ATÉ A SAÍDA COMPLETA DA CADEIA DE ADN.	59
FIGURA 23- REPRESENTAÇÃO DA INTERCALAÇÃO DO ETIDIO EM ADN, EM RTIL [BPYRR ⁺] [PF ₆ ⁻] DESDE O PONTO DE INTERCALAÇÃO ATÉ A SAÍDA COMPLETA DA CADEIA DE ADN.	64
FIGURA 24 - REPRESENTAÇÃO DA INTERCALAÇÃO DA PROFLAVINE EM ADN, EM RTIL [BPYR ⁺] BF ₄ ⁻] DESDE O PONTO DE INTERCALAÇÃO ATÉ A SAÍDA COMPLETA DA CADEIA DE ADN.....	69
FIGURA 25 - REPRESENTAÇÃO DA INTERCALAÇÃO DA PROFLAVINE REDUZIDA EM ADN, EM RTIL [BPYRR ⁺] [PF ₆ ⁻] DESDE O PONTO DE INTERCALAÇÃO ATÉ A SAÍDA COMPLETA DA CADEIA DE ADN.....	74
FIGURA 26 - ESTRUTURA DO INTERCALADOR BERBERINE APÓS A PRIMEIRA MINIMIZAÇÃO DE ENERGIA	93
FIGURA 27 - COMPLEXO FORMADO ENTRE A BERBERINE E A CADEIA DE ADN.....	94
FIGURA 28 - ESTRUTURA DO DAPI APÓS A PRIMEIRA MINIMIZAÇÃO DE ENERGIA	94
FIGURA 29 - COMPLEXO FORMADO ENTRE O DAPI E A CADEIA DE ADN	96
FIGURA 30 - ESTRUTURA DO ETIDIO APÓS A PRIMEIRA MINIMIZAÇÃO DE ENERGIA	97
FIGURA 31 - COMPLEXO FORMADO ENTRE O ETIDIO E A CADEIA DE ADN	98
FIGURA 32 – ESTRUTURA DA PROFLAVINE (ESQUERDA) E DA PROFLAVINE REDUZIDA (DIREITA) APÓS A PRIMEIRA MINIMIZAÇÃO DE ENERGIA.....	99
FIGURA 33 - COMPLEXOS FORMADOS ENTRE A CADEIA DE ADN E AS MOLÉCULAS PROFLAVINE (A) E PROFLAVINE REDUZIDA (B).....	100

Lista de Tabelas

TABELA 1 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE ALGUNS SOLVENTES A 20°C (21). DEC. = DECOMPÕEM-SE, COND. = CONDUÇÃO DE CORRENTE ELÉTRICA.....	10
TABELA 2 - TABELA DESCRITIVA DOS TIPOS DE ÁTOMOS UTILIZADOS NA CRIAÇÃO DAS TOPOLOGIAS	90
TABELA 3 - TABELA DESCRITIVA DAS LIGAÇÕES INTERATÓMICAS UTILIZADAS NA CRIAÇÃO DAS TOPOLOGIAS DOS INTERCALADORES. R_{B_0} É O COMPRIMENTO DA LIGAÇÃO ENTRE OS ÁTOMOS; K_B É A ENERGIA ASSOCIADA À LIGAÇÃO ESTABELECIDA.	90
TABELA 4 - DESCRIÇÃO DOS ÂNGULOS USADOS NA CRIAÇÃO DAS TOPOLOGIAS DOS INTERCALADORES. Θ_0 É O ÂNGULO FORMADA; K_Θ ENERGIA ASSOCIADA AO ÂNGULO	91
TABELA 5 - DESCRIÇÃO DOS DIEDROS UTILIZADOS NA CRIAÇÃO DAS TOPOLOGIAS DOS INTERCALADORES ESTUDADOS. Ξ_0 É O ANGULO FORMADO. K_Ξ ENERGIA ASSOCIADA AO ÂNGULO.....	92
TABELA 6 – INFORMAÇÃO DE CADA ÁTOMO QUE CONSTITUI A MOLÉCULA BERBERINE	93
TABELA 7 – INFORMAÇÃO DE CADA ÁTOMO QUE CONSTITUI O DAPI.....	95
TABELA 8 - INFORMAÇÃO DE CADA ÁTOMO QUE CONSTITUI A MOLÉCULA DE ETIDIO ..	97
TABELA 9 - INFORMAÇÃO DOS ÁTOMOS QUE CONSTITUEM A PROFLAVINE E A PROFLAVINE REDUZIDA.....	99

Lista de gráficos

GRÁFICO 1 - COMPARAÇÃO ENTRE OS LÍQUIDOS IÓNICOS [BDHYDOZA+] [BF4-] E [BDHYDOZA+] [PF6-] .42	42
GRÁFICO 2 - COMPARAÇÃO ENTRE OS LÍQUIDOS IÓNICOS [BIM+] [BF4] E [BIM+] [PF6]	43
GRÁFICO 3 - COMPARAÇÃO ENTRE OS LÍQUIDOS IÓNICOS [BPYR+] [BF4] E [BPYR+] [PF6]	43
GRÁFICO 4 - COMPARAÇÃO ENTRE OS LÍQUIDOS IÓNICOS [BPYRR+] [BF4] E [BPYRR+] [PF6].....	44
GRÁFICO 5 - COMPARAÇÃO ENTRE OS LÍQUIDOS IÓNICOS [HYDETMAZ+] [BF4] E [HYDETMAZ+] [PF6] ...	44
GRÁFICO 6 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS PMF PARA O MESMO ANIÃO, FAZENDO VARIAR OS CATIÕES.....	45
GRÁFICO 7 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS PMF PARA O MESMO ANIÃO, FAZENDO VARIAR OS CATIÕES.....	45
GRÁFICO 8 - COMPARAÇÃO PMF ENTRE OS INTERCALADORES PROFLAVINE, PROFLAVINE REDUZIDA E O DAPI, PARA O RTIL [BDHYDOZA+] [BF4] (ESQUERDA) E PARA [BDHYDOZA+] [PF6] (DIREITA)	46
GRÁFICO 9 - COMPARAÇÃO ENTRE A PROFLAVINE E A SUA VERSÃO REDUZIDA E O DAPI. À ESQUERDA COM O RTIL [BIM+] [BF4] E À DIREITA [BIM+] [PF6]	47
GRÁFICO 10 - COMPARAÇÃO ENTRE OS INTERCALADORES PROFLAVINE, PROFLAVINE REDUZIDA QUANDO O RTIL SOLVENTE É O [HYDETMAZ+] [BF4] – ESQUERDA E O PARA A PROFLAVINE E DAPI QUANDO O RTIL É [HYDETMAZ+] [PF6] – DIREITA.	48
HISTOGRAMA 1 – RESULTADOS ENERGÉTICOS DAS INTERAÇÕES DE COULOMB E VAN DER WAALS ENTRE O INTERCALADOR E O ADN, OS CATIÕES E OS ANIÕES. OS HISTOGRAMAS A SÃO RELATIVOS ÀS INTERAÇÕES DE COULOMB (INTERCALAÇÃO E LIVRE EM SOLUÇÃO). OS HISTOGRAMAS B SÃO RELATIVOS ÀS INTERAÇÕES DE VDW (INTERCALAÇÃO E LIVRE EM SOLUÇÃO).....	50
HISTOGRAMA 2 – DESCRIÇÃO DO COMPORTAMENTO MÉDIO DA FORMAÇÃO DE PONTES DE HIDROGÉNIO, NO PONTO DE INTERCALAÇÃO, CRIADAS ENTRE O INTERCALADOR BERBERINE E A CADEIA DE ADN E OS CATIÕES	51
HISTOGRAMA 3 - RESULTADOS ENERGÉTICOS DAS INTERAÇÕES DE COULOMB E VAN DER WAALS ENTRE O INTERCALADOR E O ADN, OS CATIÕES E OS ANIÕES. OS HISTOGRAMAS A SÃO RELATIVOS ÀS INTERAÇÕES DE COULOMB (INTERCALAÇÃO E LIVRE EM SOLUÇÃO). OS HISTOGRAMAS B SÃO RELATIVOS ÀS INTERAÇÕES DE VDW (INTERCALAÇÃO E LIVRE EM SOLUÇÃO).....	52
HISTOGRAMA 4 – DESCRIÇÃO DO COMPORTAMENTO MÉDIO DA FORMAÇÃO DE PONTES DE HIDROGÉNIO, NO PONTO DE INTERCALAÇÃO, CRIADAS ENTRE O INTERCALADOR BERBERINE E A CADEIA DE ADN E OS CATIÕES	52
HISTOGRAMA 5 - HISTOGRAMAS DE COMPARAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE O INTERCALADOR E A CADEIA DE ADN E OS LÍQUIDOS IÓNICOS (NO PONTO DE INTERCALAÇÃO E EM SOLUÇÃO), ONDE SE MANTEVE O MESMO CATIÃO E FEZ-SE VARIAR O ANIÃO. A E C - OS VALORES PARA OS POTENCIAIS DE COULOMB E L-J, COM O CATIÃO [BPYR+] ; B E D - OS MESMOS POTENCIAIS MEDIDOS COM O CATIÃO [BPYRR+].....	53
HISTOGRAMA 6 – RESULTADOS ENERGÉTICOS DAS INTERAÇÕES DE COULOMB E VAN DER WAALS ENTRE O INTERCALADOR E O ADN, OS CATIÕES E OS ANIÕES. OS HISTOGRAMAS A SÃO RELATIVOS ÀS INTERAÇÕES DE COULOMB (INTERCALAÇÃO E LIVRE EM SOLUÇÃO). OS HISTOGRAMAS B SÃO RELATIVOS ÀS INTERAÇÕES DE VDW (INTERCALAÇÃO E LIVRE EM SOLUÇÃO).....	55
HISTOGRAMA 7 – DESCRIÇÃO DO COMPORTAMENTO MÉDIO DA FORMAÇÃO DE PONTES DE HIDROGÉNIO, NO PONTO DE INTERCALAÇÃO, CRIADAS ENTRE O INTERCALADOR DAPI E A CADEIA DE ADN E OS CATIÕES	56
HISTOGRAMA 8 - RESULTADOS ENERGÉTICOS DAS INTERAÇÕES DE COULOMB E VAN DER WAALS ENTRE O INTERCALADOR E O ADN, OS CATIÕES E OS ANIÕES. OS HISTOGRAMAS A SÃO RELATIVOS ÀS INTERAÇÕES DE COULOMB (INTERCALAÇÃO E LIVRE EM SOLUÇÃO). OS HISTOGRAMAS B SÃO RELATIVOS ÀS INTERAÇÕES DE VDW (INTERCALAÇÃO E LIVRE EM SOLUÇÃO).....	57

HISTOGRAMA 9 – DESCRIÇÃO DO COMPORTAMENTO MÉDIO DA FORMAÇÃO DE PONTES DE HIDROGÉNIO, NO PONTO DE INTERCALAÇÃO, CRIADAS ENTRE O INTERCALADOR DAPI E A CADEIA DE ADN E OS CATIÕES	57
HISTOGRAMA 10 - HISTOGRAMAS DE COMPARAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE O INTERCALADOR E A CADEIA DE ADN E OS LÍQUIDOS IÓNICOS (NO PONTO DE INTERCALAÇÃO E EM SOLUÇÃO), ONDE SE MANTEVE O MESMO CATIÃO [BIM ⁺] E FEZ-SE VARIAR O ANIÃO. A - OS VALORES PARA OS POTENCIAIS DE COULOMB E B – OS VALORES PARA OS POTENCIAIS DE L-J	58
HISTOGRAMA 11 – RESULTADOS ENERGÉTICOS DAS INTERAÇÕES DE COULOMB E VAN DER WAALS ENTRE O INTERCALADOR E O ADN, OS CATIÕES E OS ANIÕES. OS HISTOGRAMAS A SÃO RELATIVOS ÀS INTERAÇÕES DE COULOMB (INTERCALAÇÃO E LIVRE EM SOLUÇÃO). OS HISTOGRAMAS B SÃO RELATIVOS ÀS INTERAÇÕES DE VDW (INTERCALAÇÃO E LIVRE EM SOLUÇÃO).....	60
HISTOGRAMA 12 – DESCRIÇÃO DO COMPORTAMENTO MÉDIO DA FORMAÇÃO DE PONTES DE HIDROGÉNIO, NO PONTO DE INTERCALAÇÃO, CRIADAS ENTRE O INTERCALADOR ETIDIO E A CADEIA DE ADN E OS CATIÕES	61
HISTOGRAMA 13 – RESULTADOS ENERGÉTICOS DAS INTERAÇÕES DE COULOMB E VAN DER WAALS ENTRE O INTERCALADOR E O ADN, OS CATIÕES E OS ANIÕES. OS HISTOGRAMAS A SÃO RELATIVOS ÀS INTERAÇÕES DE COULOMB (INTERCALAÇÃO E LIVRE EM SOLUÇÃO). OS HISTOGRAMAS B SÃO RELATIVOS ÀS INTERAÇÕES DE VDW (INTERCALAÇÃO E LIVRE EM SOLUÇÃO).....	62
HISTOGRAMA 14 – DESCRIÇÃO DO COMPORTAMENTO MÉDIO DA FORMAÇÃO DE PONTES DE HIDROGÉNIO, NO PONTO DE INTERCALAÇÃO, CRIADAS ENTRE O INTERCALADOR ETIDIO E A CADEIA DE ADN E OS CATIÕES	62
HISTOGRAMA 15 - HISTOGRAMAS DE COMPARAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE O INTERCALADOR E A CADEIA DE ADN E OS LÍQUIDOS IÓNICOS (NO PONTO DE INTERCALAÇÃO E EM SOLUÇÃO), ONDE SE MANTEVE O MESMO CATIÃO E FEZ-SE VARIAR O ANIÃO. A E C - OS VALORES PARA OS POTENCIAIS DE COULOMB E L-J, COM O CATIÃO [HYDETMAZ ⁺] ; B E D - OS MESMOS POTENCIAIS MEDIDOS COM O CATIÃO [BPYRR ⁺].....	63
HISTOGRAMA 16 – RESULTADOS ENERGÉTICOS DAS INTERAÇÕES DE COULOMB E VAN DER WAALS ENTRE O INTERCALADOR E O ADN, OS CATIÕES E OS ANIÕES. OS HISTOGRAMAS A SÃO RELATIVOS ÀS INTERAÇÕES DE COULOMB (INTERCALAÇÃO E LIVRE EM SOLUÇÃO). OS HISTOGRAMAS B SÃO RELATIVOS ÀS INTERAÇÕES DE VDW (INTERCALAÇÃO E LIVRE EM SOLUÇÃO).....	65
HISTOGRAMA 17 – DESCRIÇÃO DO COMPORTAMENTO MÉDIO DA FORMAÇÃO DE PONTES DE HIDROGÉNIO, NO PONTO DE INTERCALAÇÃO, CRIADAS ENTRE O INTERCALADOR PROFLAVINE E A CADEIA DE ADN E OS CATIÕES	66
HISTOGRAMA 18 - RESULTADOS ENERGÉTICOS DAS INTERAÇÕES DE COULOMB E VAN DER WAALS ENTRE O INTERCALADOR E O ADN, OS CATIÕES E OS ANIÕES. OS HISTOGRAMAS A SÃO RELATIVOS ÀS INTERAÇÕES DE COULOMB (INTERCALAÇÃO E LIVRE EM SOLUÇÃO). OS HISTOGRAMAS B SÃO RELATIVOS ÀS INTERAÇÕES DE VDW (INTERCALAÇÃO E LIVRE EM SOLUÇÃO).....	67
HISTOGRAMA 19 – DESCRIÇÃO DO COMPORTAMENTO MÉDIO DA FORMAÇÃO DE PONTES DE HIDROGÉNIO, NO PONTO DE INTERCALAÇÃO, CRIADAS ENTRE O INTERCALADOR PROFLAVINE E A CADEIA DE ADN E OS CATIÕES	67
HISTOGRAMA 20 – HISTOGRAMAS DE COMPARAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE O INTERCALADOR E A CADEIA DE ADN E OS LÍQUIDOS IÓNICOS (NO PONTO DE INTERCALAÇÃO E EM SOLUÇÃO), ONDE SE MANTEVE O MESMO CATIÃO E FEZ-SE VARIAR O ANIÃO. A E C - OS VALORES PARA OS POTENCIAIS DE COULOMB E L-J, COM O CATIÃO [BPYR ⁺] ; B E D - OS MESMOS POTENCIAIS MEDIDOS COM O CATIÃO [BPYRR ⁺].....	68
HISTOGRAMA 21 – RESULTADOS ENERGÉTICOS DAS INTERAÇÕES DE COULOMB E VAN DER WAALS ENTRE O INTERCALADOR E O ADN, OS CATIÕES E OS ANIÕES. OS HISTOGRAMAS A SÃO RELATIVOS ÀS INTERAÇÕES DE COULOMB (INTERCALAÇÃO E LIVRE EM SOLUÇÃO). OS HISTOGRAMAS B SÃO RELATIVOS ÀS INTERAÇÕES DE VDW (INTERCALAÇÃO E LIVRE EM SOLUÇÃO).....	70
HISTOGRAMA 22 – DESCRIÇÃO DO COMPORTAMENTO MÉDIO DA FORMAÇÃO DE PONTES DE HIDROGÉNIO, NO PONTO DE INTERCALAÇÃO, CRIADAS ENTRE O INTERCALADOR PROFLAVINE REDUZIDA E A CADEIA DE ADN E OS CATIÕES	71

HISTOGRAMA 23 – RESULTADOS ENERGÉTICOS DAS INTERAÇÕES DE COULOMB E VAN DER WAALS ENTRE O INTERCALADOR E O ADN, OS CATIÕES E OS ANIÕES. OS HISTOGRAMAS A SÃO RELATIVOS ÀS INTERAÇÕES DE COULOMB (INTERCALAÇÃO E LIVRE EM SOLUÇÃO). OS HISTOGRAMAS B SÃO RELATIVOS ÀS INTERAÇÕES DE VDW (INTERCALAÇÃO E LIVRE EM SOLUÇÃO).....	72
HISTOGRAMA 24 – DESCRIÇÃO DO COMPORTAMENTO MÉDIO DA FORMAÇÃO DE PONTES DE HIDROGÉNIO, NO PONTO DE INTERCALAÇÃO, CRIADAS ENTRE O INTERCALADOR PROFLAVINE REDUZIDA E A CADEIA DE ADN E OS CATIÕES	72
HISTOGRAMA 25 – HISTOGRAMAS DE COMPARAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE O INTERCALADOR E A CADEIA DE ADN E OS LÍQUIDOS IÓNICOS (NO PONTO DE INTERCALAÇÃO E EM SOLUÇÃO), ONDE SE MANTEVE O MESMO CATIÃO E FEZ-SE VARIAR O ANIÃO. A E C - OS VALORES PARA OS POTENCIAIS DE COULOMB E L-J, COM O CATIÃO [HYDETMAZ ⁺] ; B E D - OS MESMOS POTENCIAIS MEDIDOS COM O CATIÃO [BPYRR ⁺].....	73
HISTOGRAMA 26 - COMPARAÇÃO ENTRE OS VÁRIOS INTERCALADORES QUANTO ÀS INTERAÇÕES DE COULOMB COM A CADEIA DE ADN. VALORES EM KJ/MOL	75
HISTOGRAMA 27 – COMPARAÇÃO ENTRE OS VÁRIOS INTERCALADORES QUANTO ÀS INTERAÇÕES DE VAN DER WAALS COM A CADEIA DE ADN. VALORES EM KJ/MOL.....	76
HISTOGRAMA 28 - COMPARAÇÃO ENTRE OS INTERCALADORES QUANTO AO NÚMERO MÉDIO DE PONTES DE HIDROGÉNIO FORMADAS ENTRE ELES E A CADEIA DE ADN, NO PONTO DE INTERCALAÇÃO	77

Capítulo 1 - Introdução

Em 1868, Miescher isolou um núcleo de uma célula e observou a presença de um composto, formado por cadeias, que continha fósforo (1). Watson e Crick sugeriram que as cadeias em espiral, estudadas por Miescher (1), estavam ligadas através de pares de base, ou seja, uma base de uma cadeia estaria ligada a uma outra base, da cadeia adjacente, através de pontes de Hidrogênio, formando um par (2). O ácido Desoxirribonucleico, ou ADN, está entre as macromoléculas biológicas mais importantes do mundo das ciências da vida. Devido à sua importância é então necessária a sua quantificação e detecção. Entre as variadas técnicas de detecção, estão as baseadas na fluorescência, isto é, na utilização da luz como fonte de excitação de moléculas que irão fluorescer para um determinado comprimento de onda. A intensidade da fluorescência destas moléculas aumenta quando estas se encontram intercaladas na cadeia de ADN. Uma dessas moléculas é o Brometo de Etídio (3). O Brometo de Etídio faz parte de um grupo de moléculas a que se chama de agentes intercalantes. Estas moléculas intercalam, nas moléculas de ADN, nas zonas entre os pares de base que formam as cadeias de ADN. São utilizadas como sondas de fluorescência, para a quantificação e detecção de ADN, mas também podem ser utilizados em quimioterapia, onde irão impedir a replicação do ADN.

A quantificação e detecção do ADN é feita, além de outras técnicas, através de moléculas intercalantes que irão ver a sua intensidade de fluorescência aumentada quando intercaladas na cadeia de ADN (3). Esses métodos de detecção são realizados por espectroscopia de fluorescência, nos quais se faz incidir radiação com um comprimento de onda específico para a excitação da molécula que desejamos excitar, um fluoróforo por exemplo, que se encontra na amostra que vamos estudar. As moléculas, em condições normais, estarão num estado relaxado, ou estado fundamental. Quando incide radiação,

ela irá passar para um estado de excitação eletrónica que, quando volta ao estado fundamental, irá emitir radiação, de menor energia do que a incidente, à qual será feita uma leitura. Esta radiação é emitida pela molécula fluorescente que, quando se encontra intercalada na cadeia de ADN, é observado, então, um aumento da intensidade de fluorescência e do efeito de *Ressonance light-scattering (RLS)* (3). No entanto, este facto não é observado quando passamos de um meio biológico para um meio constituído por um Líquido Iónico (4). Num estudo onde se utilizou o Brometo de Etídio como sonda fluorescente e um meio Líquido Iónico, à temperatura ambiente, *1-Butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate* ou [BMIM⁺][PF₆⁻], observou-se uma diminuição da intensidade de fluorescência e do efeito de *RLS*. Este efeito observado levou a que questões fossem levantadas e que deram origem à hipótese de trabalho desta tese, sendo elas:

Será que existe intercalação em meio de Líquido iónico?

Será esta intercalação favorável ao nível das interações moleculares entre os elementos – intercalador, ADN e Líquido Iónico?

1.1 – Agentes Intercalantes

A Intercalação foi definida por Mainwaring (5), como uma sanduíche de uma molécula entre dois pares adjacentes de bases da dupla hélice da cadeia de ADN. Uma característica dos agentes intercalantes é a existência de um sistema de anéis aromáticos, com relativa deficiência de eletrões. Após a intercalação acontece uma extensão do esqueleto da cadeia de ADN – grupos fosfato, com uma estabilização resultante das interações π - π com as bases planares aromáticas (6).

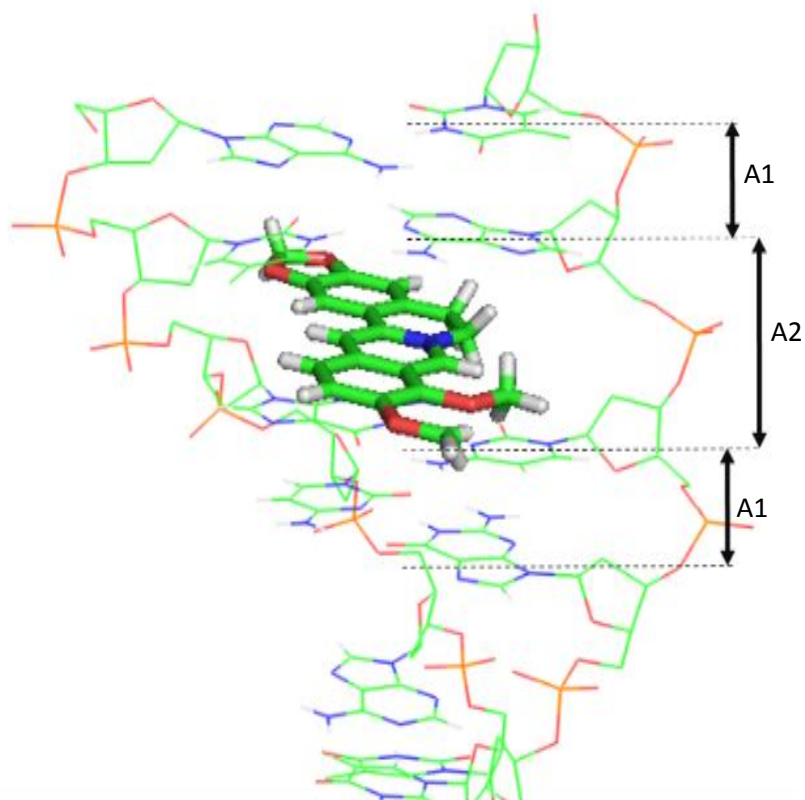


Figura 1 - Representação da intercalação da Berberine numa cadeia de ADN $D(ATGCAT)_2$. O alongamento da cadeia, em A2, causado pela intercalação da Berberine, é maior do que no seu estado relaxado – A1.

Como é possível observar na figura 1, existe um alongamento - A2, das cadeias de fosfato – ou *backbone* – da cadeia de ADN. As intercalações têm efeitos hidrodinâmicos na cadeia de ADN devido à alteração da forma da dupla hélice da cadeia e do alongamento do *backbone* (7). Estes efeitos são perfeitamente reversíveis após a remoção do intercalador. Isto só é possível caso a remoção não seja destrutiva para a cadeia. Lerman (8), também mostrou que o intercalador se situa no plano perpendicular ao eixo da dupla hélice e que a perpendicularidade entre os pares de base e a hélice não é significativamente alterada devido à intercalação. Devido a isto, os intercaladores têm de apresentar uma zona planar capaz de encaixar entre os pares de base da cadeia de ADN. Dos intercaladores estudados, os que apresentam este tipo de intercalação são a Proflavine, a Proflavine Reduzida, o Etídio e a Berberine. O DAPI, também é um agente intercalante bastante utilizado na deteção e quantificação do ADN, apresenta um tipo de intercalação

diferente. A intercalação do DAPI é feita na *minor groove* da cadeia de ADN, da parte lateral da dupla hélice. A figura 2 ilustra essa intercalação.

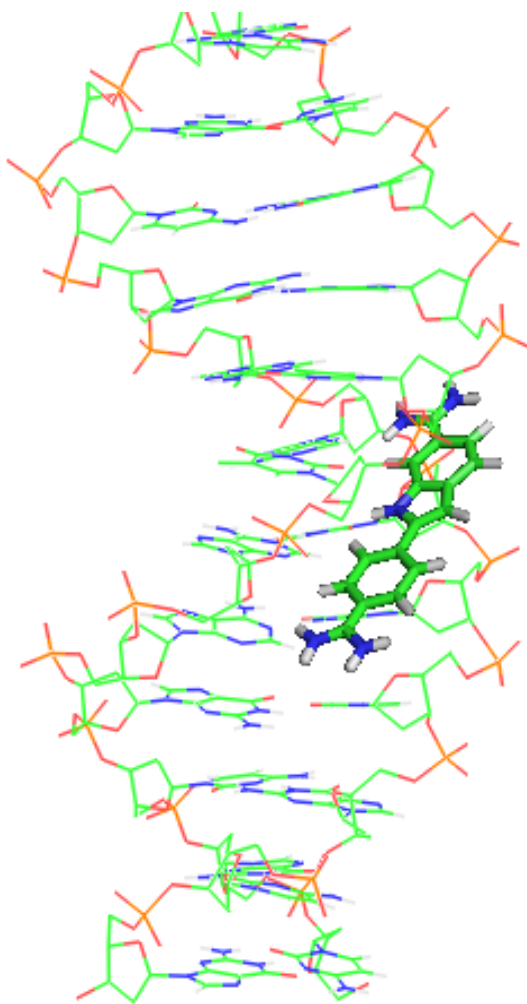


Figura 2 - Intercalação do DAPI em uma cadeia de ADN – D(CGCGAATTCGCG)2. O DAPI encontra-se intercalado na minor groove dos pares de base (AATT).

Cada um dos agentes intercalantes escolhidos apresentam características distintas, as quais pretendemos estudar e relacionar. A carga do intercalador, tamanho, forma, como intercala, onde intercala, são características tidas em consideração durante o processo de seleção de cada intercalador para este estudo.

1.1.1 - Berberine

A Berberine é uma molécula alcaloide, de carga positiva +1 (9) (10), isolada de plantas chinesas utilizadas em medicina tradicional, apresentando atividades farmacológicas e biológicas tais como o analgésico, antibacterianas, anti tubercular, anti tumoral, entre outras (9). Estudos já foram realizados no âmbito da intercalação da Berberine com ácidos nucleicos (9) (10) (11). Destes estudos foi possível concluir que a Berberine é uma molécula com afinidade para intercalar entre pares de base Adenina – Timina (A-T).

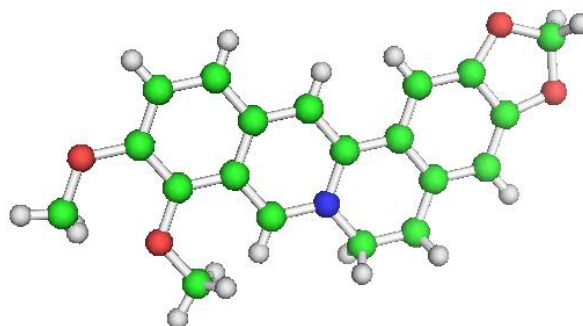


Figura 3 - Representação da estrutura da Berberine.

Todas estas características, que vão desde a sua afinidade pela intercalação entre pares de base A-T, e o amplo estudo e importância deste intercalador na medicina, foram fatores que pesaram na escolha deste intercalador para este estudo da intercalação em meio de líquido iônico à temperatura ambiente.

1.1.2 – DAPI

O DAPI é um agente intercalante, de carga positiva +2, amplamente utilizado na marcação de ADN (12). Dos intercaladores estudados no âmbito desta tese, o DAPI é o que apresenta o maior número de tipos de intercalação, seja nas *minor* ou *major grooves* ou por simples intercalação entre os pares de base (12). Estudos realizados situam a intercalação nas *minor grooves* junto a

pares de base A-T (13). Este tipo de intercalação foi o escolhido no âmbito desta tese pois achamos relevante o estudo de uma intercalação diferente quando o meio é um líquido iônico.

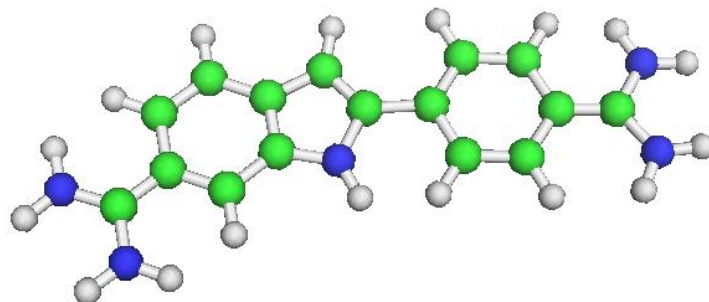


Figura 4 - Estrutura do DAPI

1.2.3 – Etidio

O Etidio é um fluoróforo referência usado em experiências de quantificação de ADN, usando espectroscopia, sob a forma de Brometo de Etidio. Também ao nível da literatura existem inúmeros estudos realizados com este intercalante (14) (15). Este foi um fator que pesou bastante na escolha do Etidio como mais um intercalador a ser estudado.

É um intercalador de carga positiva +1 e com afinidade por intercalar entre pares de base Citosina – Guanina (C-G) (15) (16).

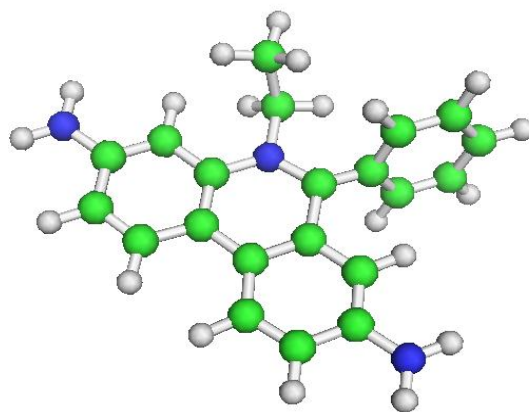


Figura 5 - Estrutura do Etídio

1.1.4 – Proflavine e Proflavine Reduzida

A Proflavine é uma amino-acridinina que apresenta uma estrutura poliaromática planar (17). Apresenta um tamanho reduzido, comparativamente aos outros intercaladores selecionados.

A Proflavine e a Proflavine Reduzida apenas diferem no estado de protonação do azoto central, como pode ser observado pela figura 6 (18). Esta redução é feita realizando uma foto-redução da Proflavine e usando um dador de protões – ácido ascórbico, pH 4.0.

Estas moléculas apresentam uma maior afinidade por uma intercalação entre pares de base C-G (18) (19). Um fator que influenciou na escolha da Proflavine foi esta apresentar carga neutra (17), o que irá permitir estudar a intercalação também ao nível das interações de Coulomb pois é possível comparar o estudo realizado para a Proflavine com o mesmo estudo realizado com a Proflavine Reduzida, que apresenta uma carga positiva +1.

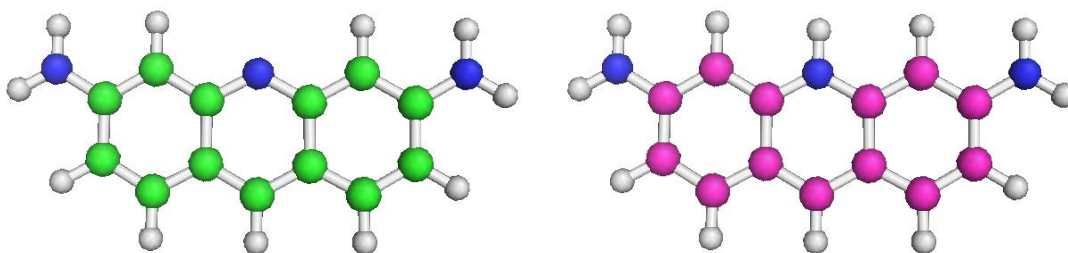


Figura 6 - Representação da Proflavine (esquerda) e a Proflavine Reduzida (direita)

Os cinco intercaladores selecionados para este estudo, sendo eles a Berberine, o Etídio, o DAPI, Proflavine e Proflavine Reduzida, permitiram estudar a intercalação, em meio de líquido iônico, observando as diferentes características apresentadas por cada agente intercalante, ou seja, o seu tamanho relativo, a carga, a sua afinidade por diferentes tipos de pares de base da cadeia e a forma como intercala na cadeia. Com este leque de intercalantes é possível realizar um estudo mais pormenorizado sobre a intercalação em geral e sobre a intercalação em meio de líquido iônico à temperatura ambiente.

1.2 – Líquidos Iônicos à temperatura ambiente

Um líquido iônico à temperatura ambiente, é um sal que se encontra em estado líquido para temperaturas inferiores a 30°C. O seu aspeto é a de um líquido clássico mas, na sua constituição, apenas existem iões. Devido à sua composição, a estrutura destes líquidos é completamente diferente de um solvente constituído por moléculas. Os iões estão presentes nestes líquidos em igual número de catiões e aniões, tornando este líquido eletricamente neutro. (20). Um RTIL típico consiste em catiões orgânicos formados por Nitrogénio ou fósforo, com aniões orgânicos de grande dimensão ou aniões inorgânicos (21).

Os RTILs apresentam características bastante atrativas, o que os tornam bastante interessantes para aplicações em química e biologia. Algumas dessas propriedades transversais a todos os líquidos iônicos são (20) (22):

- Não apresentam pressão de vapor mensurável – logo não há libertação de qualquer componente orgânico ou inorgânico volátil;
- Condução elétrica moderada ou muito baixa;
- Apresentam uma viscosidade elevada;
- Não são miscíveis com uma variedade de solventes orgânicos;
- São uma boa alternativa polar não aquosa para processos de transferência de fase.

No entanto existem algumas propriedades que podem variar com o tipo de RTIL que se esteja a usar, sendo elas:

- Combustibilidade baixa;
- Excelente estabilidade térmica até, pelo menos, os 300°C;
- Propriedades de solvatação favoráveis para uma gama de compostos polares e não polares.

Os RTILs são compostos por catiões e aniões que podem ser orgânicos ou inorgânicos. O número de combinações possíveis apenas depende das características que desejamos obter para um estudo em particular. Um RTIL bastante conhecido é o [Bmim⁺] [PF₆⁻] (23). A tabela 1 representa um estudo comparativo entre vários solventes utilizados na química e biotecnologia e o líquido iónico de referência [Bmim⁺] [PF₆⁻].

Solvent	Molecular weight	Density g/cm ³	Viscosity cP	Melting point °C	Boiling point °C	Refractive index	Dipole moment debye	Dielectric constant	Solubility %w/w		Log <i>P_{sat}</i>	Polarity Reichardt
									Solvent in water	Water in solvent		
Acetic acid	60	1.049	1.1	16.7	118	1.3719	1.74	6.15	∞	∞	-0.20	65
Acetone	58	0.790	0.33	-94.7	56.1	1.3587	2.69	20.7	∞	∞	-0.22	35.5
Acetonitrile	41	0.782	0.36	-43.8	81.6	1.3441	3.44	37.5	∞	∞	-0.34	46
Benzene	78	0.876	0.65	5.5	80.1	1.5011	0	2.28	0.18	0.063	2.15	11
1-butanol	74	0.810	2.95	-88.6	118	1.3993	1.75	17.5	7.8	20.1	0.88	60
2-butanol	74	0.807	3.78	-115	99.5	1.3970	1.64	15.8	12.5	44.1	0.78	50.5
chloroform	119	1.489	0.58	-63.5	61.2	1.4892	1.15	4.9	0.815	0.056	1.97	26
diethyl ether	74	0.713	0.23	-116	34.4	1.3524	1.15	4.34	6.9	1.3	0.83	11.5
dimethylformamide	73	0.949	2	-60.4	153	1.4305	3.86	36.7	∞	∞	-1.00	40.5
dimethyl sulfoxide	78	1.095	2.2	18.5	189	1.4793	4.30	48.7	∞	∞	-1.30	44.5
ethanol	46	0.789	1.2	-114	78.3	1.3610	1.66	26.6	∞	∞	-0.70	65.5
ethyl acetate	88	0.901	0.45	-83.5	77.1	1.3724	1.88	6.0	8.7	3.3	0.78	23
heptane	100	0.684	0.41	-90.6	98.4	1.3876	0	1.92	0.0003	0.01	4.28	1.2
hexane	86	0.659	0.32	-95.3	68.7	1.3749	0.08	1.88	0.001	0.01	3.52	0.9
methanol	32	0.791	0.55	-98	64.5	1.3284	2.87	32.7	∞	∞	-0.80	76
methyl ethyl ketone	72	0.805	0.43	-86.7	79.6	1.3788	2.76	15.2	24	10	0.30	33
methyl isobutyl ketone	100	0.801	0.60	-84	116	1.3597	2.70	13.1	1.7	1.9	1.30	27
methyl- <i>n</i> -butyl ether	88	0.741	0.27	-108	55.2	1.3689	1.32	4.5	4.8	1.5	1.38	15
octanol	130	0.827	7.2	-16.7	194.5	1.4295	1.76	10.3	0.054	4.1	3.18	34
1-propanol	60	0.804	2.3	-126	97.1	1.3856	3.10	20.3	∞	∞	0.34	62
tetrahydrofuran	72	0.888	0.55	-108	66	1.4072	1.75	7.6	∞	∞	0.54	20.5
toluene	92	0.867	0.59	-95	111	1.4969	0.31	2.38	0.074	0.03	2.70	10
water	18	0.998	1.0	0	100	1.3330	1.87	80.1	-	-	-1.48	100
BMIM-PF ₆ ionic liquid	284	1.362	300*	-8	dec.	1.4110	ions	cond.	1.8	1.4	-0.69	65

BMIM = butyl methyl imidazolium hexafluorophosphate, * dry ionic liquid, dec. = decomposes, cond. = conduct electrical current.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas de alguns solventes a 20°C. Dec. = Decompõem-se, Cond. = condução de corrente elétrica. (21).

A tabela 1 apresenta algumas propriedades físico-químicas de alguns solventes orgânicos. O [BMIM⁺] [PF₆⁻] é o único RTIL da tabela. Comparando as propriedades deste líquido iônico com os outros solventes podemos ver que a viscosidade é bastante elevada, dada a natureza dos catiões e aniões usados. Ao nível da ebulição, os líquidos iônicos não evaporam quando as temperaturas são elevadas, o que acontece é a sua decomposição. Esta característica torna os RTILs solventes bastante seguros dada a sua pressão de vapor nula e a não libertação de componentes voláteis.

As propriedades físico-químicas dos RTILs dependem diretamente dos catiões e aniões utilizados. Realizando variadas combinações Anião-Catião, podemos moldar o nosso solvente às nossas necessidades específicas. Esta característica dá aos RTILs o título de solvente à medida ou - *designer solvent* (24).

Os Líquidos Iônicos à temperatura ambiente escolhidos para este estudo foram selecionados a partir de trabalhos já realizados (25) (26), onde foram

parametrizados para o uso em simulações de dinâmica molecular, utilizando o campo de forças GROMOS. Os dez RTILs utilizados são formados pela combinação dos seguintes cátions e aniões:

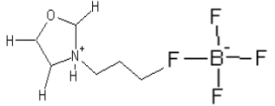
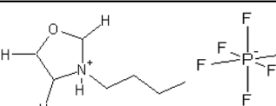
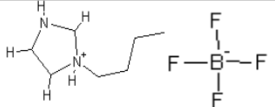
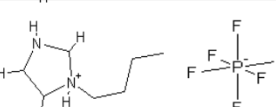
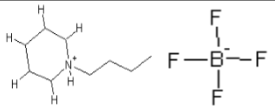
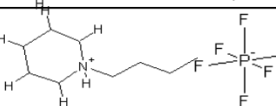
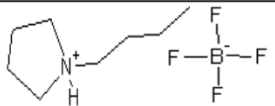
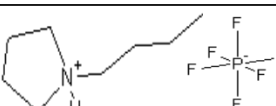
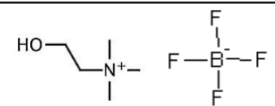
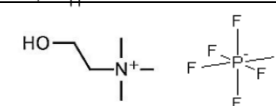
[BDHYDOZA⁺][BF₄⁻] 1-butyl-oxazolium tetrafluorobromide		[BDHYDOZA⁺][PF₆⁻] 1-butyl-oxazolium hexafluorophosphate	
[BIM⁺][BF₄⁻] 1-butyl-imidazolium tetrafluorobromide		[BIM⁺][PF₆⁻] 1-butyl-imidazolium hexafluorophosphate	
[BPYR⁺][BF₄⁻] 1-butyl-pyridinium tetrafluorobromide		[BPYR⁺][PF₆⁻] 1-butyl-pyridinium hexafluorophosphate	
[BPYRR⁺][BF₄⁻] 1-butyl-pyrrolidinium tetrafluorobromide		[BPYRR⁺][PF₆⁻] 1-butyl-pyrrolidinium hexafluorophosphate	
[HYDETMAZ⁺][BF₄⁻] (2-hydroxyethyl) trimethylamonium tetrafluorobromide		[HYDETMAZ⁺][PF₆⁻] (2-hydroxyethyl) trimethylamonium hexafluorophosphate	

Figura 7 – Representação dos cátions e aniões utilizados na criação dos RTILs usados neste trabalho, combinando os cinco cátions com os dois aniões.

Com a combinação dos cinco cátions (1-butyl-oxazolium [BDHYDOZA⁺]; 1-butyl-imidazolium [BIM⁺]; 1-butyl-pyridinium [BPYR⁺]; 1-butyl-pyrrolidinium [BPYRR⁺]; (2-hydroxyethyl)trimethylamonium [HYDETMAZ⁺]) com os dois aniões (hexafluorophosphate [PF₆⁻]; tetrafluorobromide [BF₄⁻]), obtemos dez RTILs distintos que utilizamos no estudo da intercalação dos cinco intercaladores escolhidos. Desta forma obtemos 50 combinações diferentes de complexo ADN + Intercalador e RTIL.

Os líquidos iônicos começam a substituir solventes orgânicos em aplicações como a separação de ADN usando eletroforese capilar revestida com RTIL, extração de ADN de soluções aquosas mais eficiente pois, o uso de um RTIL permite a estabilização da cadeia de ADN, devido às interações dos cátions com os grupos fosfato, o que não acontece com uso de solventes orgânicos, que causam desnaturação da cadeia de ADN (27).

O uso de sondas fluorescentes para deteção e quantificação de ADN já é um conceito bastante estudado mas, como verificamos na literatura estudada (4), o efeito de fluorescência não é observado em soluções de complexo ADN + intercalador em meio de líquido iónico. Segundo De-Hong Cheng et.al (4), esse efeito de redução da intensidade de fluorescência e da redução do efeito de *RLS*, acontece porque o intercalador não consegue intercalar na cadeia de ADN devido à estabilidade causada pelo ambiente iónico envolvente, isto é, os catiões intercalam na estrutura de ADN onde irão interagir com os grupos fosfato, o que irá resultar numa redução do intervalo entre os pares de base da cadeia, resultando numa não abertura da cadeia de ADN para criar espaço para que o agente intercalante entre.

Pretendemos, então, estudar a intercalação do ponto de vista inverso, ou seja, estudamos a diferença de energia livre entre dois estados, onde no primeiro o intercalador se encontra complexado com o ADN e no segundo o intercalador encontra-se livre em solução. Para tal vamos calcular um potencial de força média entre estes dois estados para estudar a diferença de energia livre entre eles. O estudo das interações electroestáticas, Van der Waals e a formação de pontes de hidrogénio, entre o intercalador e a cadeia de ADN e também entre este e o solvente, fornecerão informação útil sobre o processo de intercalação.

No final de todo o estudo realizado, poderemos concluir se a intercalação é favorável em líquido iónico e em que condições essa intercalação é possível, analisando quais as características dos agentes intercalantes estudados que favorecem uma intercalação, tal como a afinidade por pares de base específicos, a sua carga e forma como se intercala na cadeia de ADN.

Capítulo 2 – Teoria

A teoria necessária para o estudo de um problema baseado nas interações entre elementos de um sistema molecular, usando técnicas de simulação molecular, será explicada neste capítulo. As simulações moleculares permitem a obtenção de informação, relativa aos estados moleculares de um sistema, resolvendo numericamente as equações de movimento

$$\frac{d^2 r_j}{dt^2} = \frac{F_j}{m_j} \quad (1)$$

onde, F_j é a força medida para o elemento j de massa m_j e aceleração $\frac{d^2 r_j}{dt^2}$, do sistema simulado. A integração das equações de movimento deve ser dividida em pequenos intervalos de tempo, diminuindo o erro derivado das aproximações realizadas, como a escolha de equações clássicas e o facto de se colocar de lado efeitos quânticos para átomos leves, e o estado de energia dos eletrões ser considerado sempre como sendo o estado fundamental. Outros fatores a ter em conta é o facto de, na aproximação clássica das equações, tem de existir conservação da energia e do momento; também é necessário que todo o sistema seja reversível no tempo.

No modelo de mecânica molecular descrevemos um sistema molecular complexo de uma forma clássica. O uso deste modelo e, usando de dinâmica molecular, é possível observar os sistemas moleculares utilizando ferramentas de cálculo de energia livre e através do cálculo das interações intermoleculares que, usando de técnicas experimentais, não seria possível analisar de uma forma tão controlada e eficiente, pois, o investigador tem total controlo sobre a estrutura do sistema e sobre os campos de forças usados nos cálculos numéricos (28).

2.1 – Dinâmica Molecular

Quando desejamos criar um modelo de um sistema biológico, como é o caso do nosso estudo, existem quatro escolhas que devemos fazer, essas escolhas estão ilustradas na figura 8. Essas escolhas são (29):

- Quais são os graus de liberdade, atômicos ou moleculares, que deverão ser considerados explicitamente no sistema biológico a estudar;
- Que campos de forças serão usados para melhor descrever a energia do sistema em função dos graus de liberdade escolhidos;
- De que forma serão estes graus de liberdade apresentados;
- De que forma as fronteiras do sistema, e as forças externas, serão modeladas.

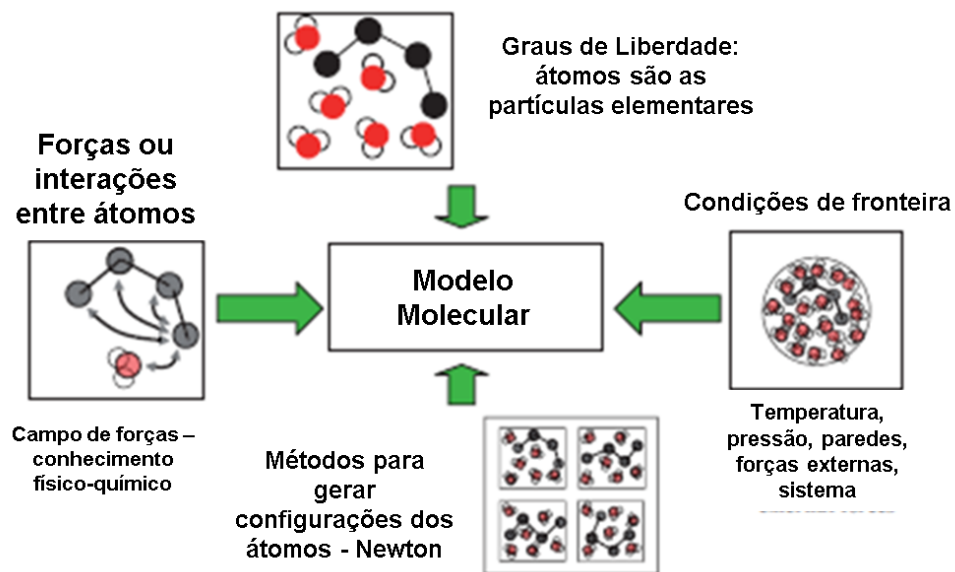


Figura 8 - diagrama representativo das escolhas a fazer quando se desenha um modelo molecular

Apesar de a mecânica quântica governar as interações entre os átomos e moléculas, quando estudamos um sistema mais complexo, essas interações, nomeadamente as não ligantes, podem ser descritas através da mecânica molecular que, fazem uso de potenciais clássicos, ou campos de forças, como parte de um Hamiltoniano clássico do sistema em estudo. Apesar da utilidade destas ferramentas para o estudo do mundo ao nível molecular, existem algumas limitações, sendo elas (30):

- Os eletrões ocupam o nível mais baixo de energia

Os campos de forças utilizados nas simulações são conservativos, ou seja, o movimento dos eletrões, como partícula individual, não é considerado. Eles irão movimentar-se com o átomo e continuarão no seu nível mais baixo de energia – Aproximação de Born-Oppenheimer.

- As simulações são clássicas.

O uso das equações de Newton vai implicar o uso de mecânica clássica para descrever o movimento dos átomos. O movimento pode ser descrito desta forma para a maior parte dos sistemas mas para átomos leves (como o Hidrogénio) ou para temperaturas muito baixas, efeitos quânticos já têm de ser considerados. Existem formas de contornar estes problemas, fazendo uso de potenciais harmónicos com as correções necessárias, à energia interna total e ao calor específico (C_v), para descrever as ligações interatómicas. Ou podemos tratar as ligações interatómicas como restrições nas equações de movimento.

- Campos de forças são aproximações

Os campos de forças são algo externo ao método de simulação e os seus parâmetros podem ser modificados pelo utilizador. Existem variados campos de forças criados, entre eles o CHARMM, AMBER e GROMOS. Este último é o campo de forças

utilizado neste estudo. No final capítulo será descrito o campo de forças utilizado e explicadas as suas vantagens e desvantagens.

- As interações de longo alcance são limitadas – *cut-off*

Um dos parâmetros utilizados quando preparamos uma simulação é o *cut-off* para as interações de longo alcance. Uma delas é o limite para as interações de Leonard-Jones ou e Coulomb. Este facto é também importante quando consideramos condições de fronteira periódicas, pois não desejamos que artefactos ocorram como o caso de um átomo interagir com a sua própria imagem.

- Condições de fronteira são não-naturais

Como o sistema a simular é pequeno, é necessário criar periodicidade no sistema. Caso não exista periodicidade, um sistema pequeno poderá apresentar grande influência do ambiente envolvente – vácuo – devido aos efeitos de superfície criados. Ao criar periodicidade eliminamos este efeito mas devemos ter em consideração o tamanho das caixas que contém o sistema e a distância de *cut-off*.

Apesar de todo o conjunto de limitações que as simulações de dinâmica molecular apresentam, o uso destas ferramentas permite analisar como se comporta cada elemento de um sistema biológico, ao nível das interações interatómicas.

2.2 – Algoritmos de simulação e cálculo

Neste ponto vamos focar nos algoritmos a ter em consideração durante o desenho de uma simulação molecular, sendo eles:

- Condições periódicas de fronteira

- Conceito de grupos
- Algoritmos de dinâmica molecular
 - Condições de iniciais
 - Topologias
 - Campos de forças
 - Posições e velocidades de cada elemento do sistema
 - Forças e Cálculos
 - Energia potencial
 - Método de integração *Leap-Frog*
 - Controlo da Temperatura e da Pressão do sistema
 - Algoritmo Berendsen
- Construção às ligações interatómicas
 - Algoritmo LINCS
- Minimização de Energia
 - Algoritmo *Steepest Descent*
 - Algoritmo gradiente conjugado
- Potencial de Força Média

2.2.1 – Condições periódicas de fronteira

Para minimizar o efeito de superfície, com o meio envolvente – vácuo - em sistemas finitos, como é o nosso caso, foi necessário recorrer a condições de fronteiras periódicas. A figura 2 ilustra esse conceito. Num sistema com condições periódicas de fronteira, o sistema original é cercado por cópias de si

mesmo criando, assim, a ilusão de que o meio envolvente já não é vácuo, mas, sim cópias do sistema original.

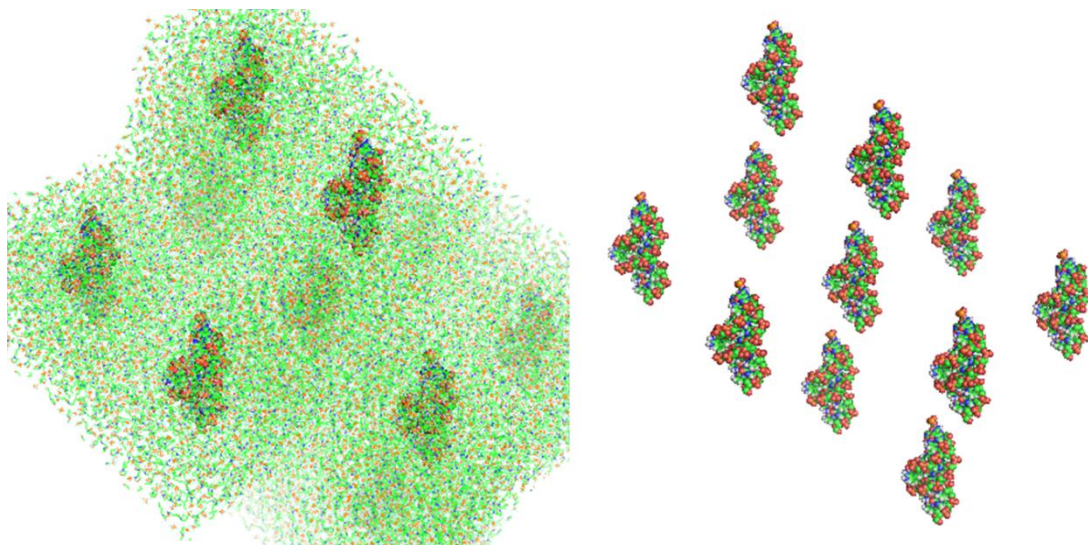


Figura 9 - representação das condições de fronteira aplicada a um dos sistemas estudados neste trabalho. À esquerda temos o sistema completo – complexo e Líquido Iônico. À direita temos apenas representado o complexo.

Um fator a ter em conta quando se criam condições de fronteira é verificar se o sistema que desejamos estudar, que no nosso caso é o complexo ADN + intercalador e as interações entre o intercalador e o meio envolvente, não vê a si próprio nas cópias criadas, ou seja, o complexo original não pode interagir com as suas cópias de forma explícita. Isto é feito limitando as distâncias de *cut-off* para as interações de longo alcance mas, principalmente, escolhendo o tamanho da caixa e a forma desta. A forma da caixa usada para simular é a de um dodecaedro. Com uma caixa deste tipo é possível ter todas as imagens à mesma distancia dado esta caixa ser o mais aproximado a uma geometria esférica. Desta forma também reduzimos a quantidade de solvente a utilizar. A escolha do tipo, e tamanho, da caixa e a escolha das condições de fronteira, ajuda a minimizar erros de simulação relacionados com as fronteiras do sistema em estudo.

2.2.2 – Algoritmos de Dinâmica Molecular

Os algoritmos, e processos, envolvidos numa simulação de dinâmica molecular começam sempre pelas condições iniciais, passando para as forças e cálculo das energias, métodos de integração e controlo da temperatura e pressão do sistema.

Qualquer simulação de dinâmica molecular segue um algoritmo do género da figura 3.

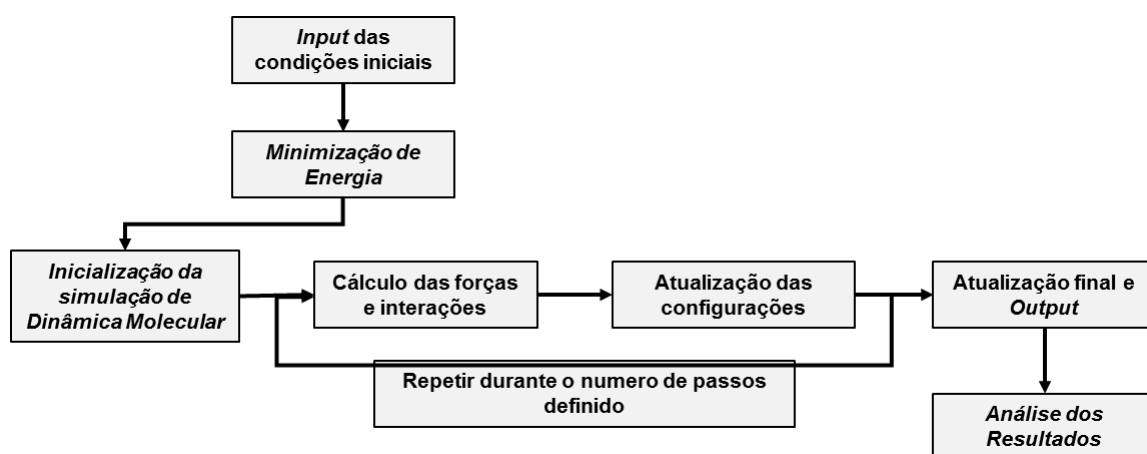


Figura 10 - diagrama de um algoritmo tipo das simulações de dinâmica molecular.

2.2.2.1 – Condições iniciais.

- **Topologias** – Cada estrutura molecular é descrita sobre a forma de uma topologia. Uma topologia descreve:
 - O tipo de cada átomo que constitui a estrutura molecular em questão;
 - A carga parcial de cada átomo;
 - Os comprimentos e as energias associadas às ligações interatómicas;

- Os ângulos, e respectivas energias associadas, formados entre os átomos da estrutura, fornecendo informação sobre a posição relativa entre os átomos num plano bidimensional.
- Os diedros, e respectivas energias, que fornece a informação sobre a posição tridimensional entre os átomos da molécula. Estes parâmetros criam a estrutura tridimensional das moléculas.
- Os pares de átomos para os quais as interações entre eles foram excluídas dos cálculos.

A criação de uma topologia é um passo extremamente importante de todo o processo de um estudo de mecânica molecular/dinâmica molecular. Qualquer parâmetro errado pode comprometer a estrutura molecular em estudo ou tornar essa estrutura irreal do ponto de vista químico.

- **Campos de forças** – A escolha do campo de forças a usar é um passo também importante. Apesar de os campos de forças de hoje serem mais robustos e eficientes, ainda há escolhas a fazer baseados nos parâmetros incorporados, nas aproximações realizadas no que toca às forças e potenciais utilizados, entre outros fatores. O GROMOS foi o campo de forças escolhido (25) (26) (31).
- **Coordenadas e velocidades iniciais** – Associado a topologias está a estrutura da molécula, ou a estrutura total do sistema, que vamos simular. As coordenadas de todos os átomos do sistema têm de ser definidas antes de qualquer simulação de dinâmica molecular. As velocidades iniciais são, geralmente, geradas pelo *software* de simulação, que as irá gerar de uma forma aleatória usando uma distribuição de Maxwell-Boltzmann

2.2.2.2 – Cálculo do Potencial e Forças

Um campo de forças descreve as energias de todas as interações covalentes e não covalentes, entre os átomos de uma molécula ou de moléculas diferentes. Ou seja,

$$V = V_{lig.covalentes} + V_{lig.não\ covalentes} \quad (2)$$

onde, a energia das ligações covalentes é dada por,

$$V_{lig.covalentes} = V_{ligações} + V_{ângulos} + V_{torções} + V_{diedros\ impróprios} \quad (3)$$

onde $V_{ligações}$ descreve as ligações entre átomos adjacentes, i e j . O potencial relativo a estas interações é, normalmente, considerado harmónico, com uma constante de força K_{ij} , ponto de equilíbrio b_{ij} e r_{ij} a distância entre os átomos.

$$V_{ligação}(r_{ij}) = \frac{1}{2}K_{ij}^b(r_{ij} - b_{ij})^2 \quad (4)$$

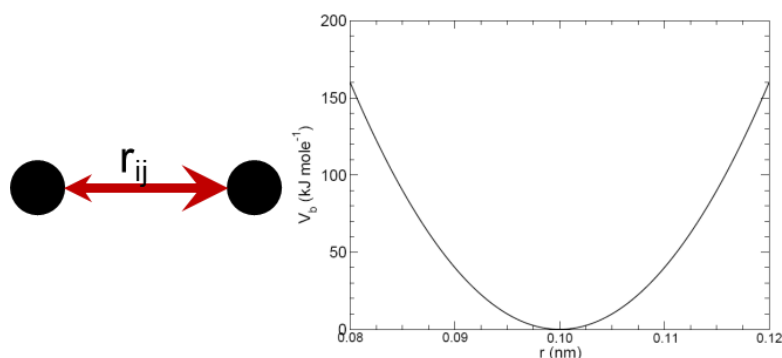


Figura 11 - Representação de uma ligação atômica e do potencial harmónico usado para descrever a variação da energia com a distância entre os átomos ligados.

$V_{ângulos}$ é a energia dos ângulos formados por três átomos adjacentes, i , j e k . O potencial pode também ser descrito como harmónico similar ao potencial das ligações. θ é o ângulo formado entre os átomos e θ^0 o ângulo de equilíbrio.

$$V_{\text{ângulos}}(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2} K_{ijk}^{\theta} (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2 \quad (5)$$

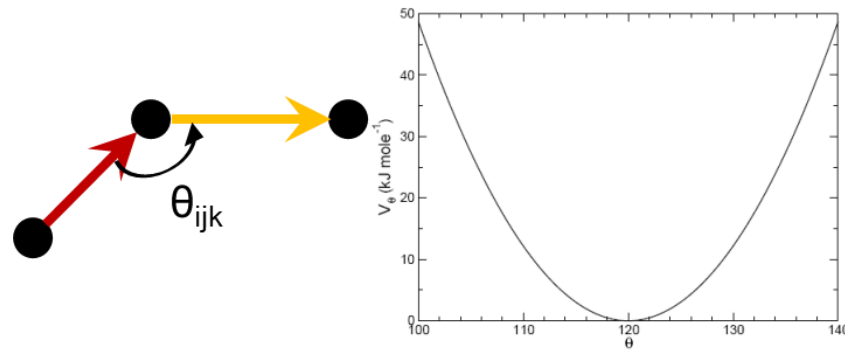


Figura 12 - Representação do ângulo formado por três átomos adjacentes e potencial harmônico usado para descrever a variação da energia com o ângulo.

$V_{\text{torções}}$ é energia relativa às torções realizadas entre quatro átomos adjacentes, **i**, **j**, **k** e **l**. É normalmente descrito como função periódica onde ϕ é o ângulo de torção, ϕ_s o ângulo de equilíbrio e K_{ϕ} constante de força.

$$V_{\text{torções}}(\phi_{ijkl}) = K_{\phi} (1 + \cos(n\phi - \phi_s)) \quad (6)$$

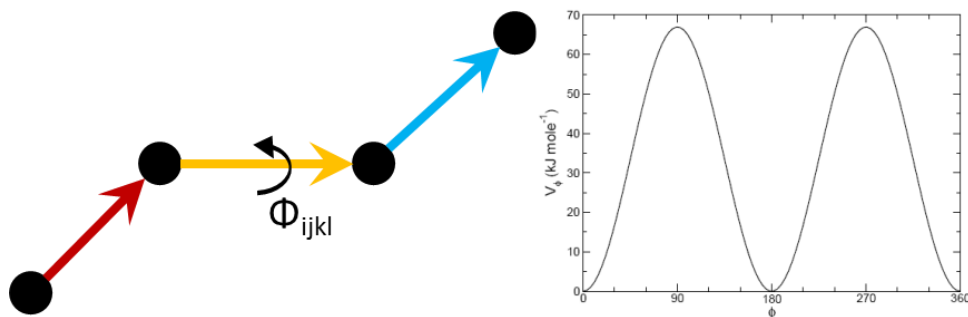


Figura 13 - torção entre quatro átomos adjacentes e representação do potencial periódico usado para descrever a variação da energia em função do ângulo de torção.

$V_{diédros\ impróprios}$ descreve uma energia de interação entre quatro átomos, que podem não ser adjacentes, **i**, **j**, **k** e **l**, usada manter grupos de átomos no plano e a sua posição espacial em relação à molécula. Pode ser descrito de forma harmónica em que ϕ é o ângulo que o grupo faz com o plano da molécula.

$$V_{diédros\ impróprios}(\phi_{ijkl}) = \frac{1}{2}K_{ijkl}^{\phi}(\phi_{ijkl} - \phi_{ijkl}^0)^2 \quad (7)$$

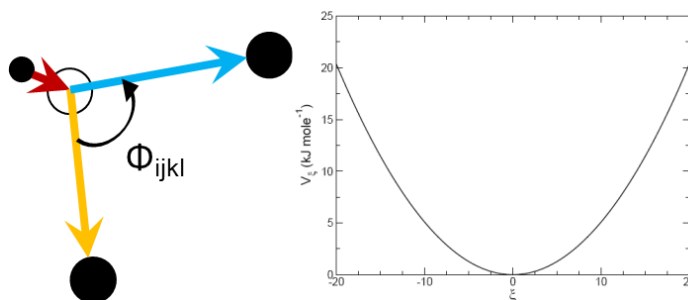


Figura 14 - Representação de um diedro impróprio formado por quatro átomos. O potencial harmónico descreve a variação da energia em função do ângulo do diedro.

A energia das ligações não covalentes é dada por

$$V_{lig.\ não\ covalentes} = V_{electroestatico} + V_{Van\ der\ Waals} \quad (8)$$

$V_{electroestatico}$ é um potencial de Coulomb que descreve a interação electroestática entre duas cargas q_i e q_j , da forma

$$V_v(r_{ij}) = f \frac{q_i q_j}{\epsilon_r r_{ij}} \quad (9)$$

onde $f = 1/4\pi\epsilon_0$, a constante dielétrica ϵ_r e r_{ij} é a distância entre as duas cargas.

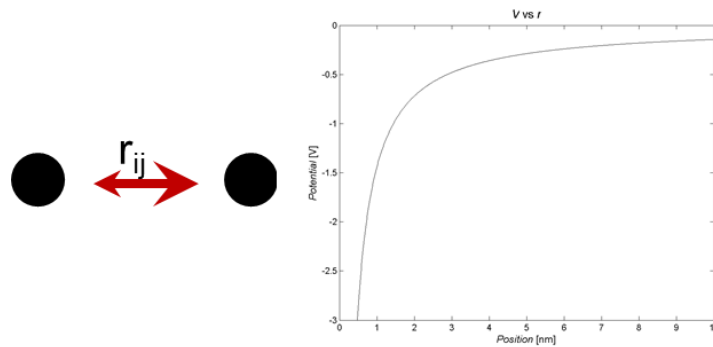


Figura 15 - Representação de duas cargas a distância r e do Potencial de Coulomb, que descreve a variação da energia em função da distância entre as cargas.

$V_{Van\ der\ Waals}$ é a energia das interações de Van der Waals entre os átomos de uma molécula ou entre átomos de moléculas diferentes. Normalmente pode ser descrito fazendo uso do potencial de Leonard-Jones

$$V_{vdW}(r) = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (10)$$

Este potencial tem uma parte atrativa $1/r^6$ e uma parte repulsiva $1/r^{12}$. O parâmetro σ é a distância entre o ponto para o qual os átomos estão perto da colisão (i.e. onde a energia toma valores infinitos) e o ponto onde a energia do potencial é zero. ϵ é o valor do mínimo de energia do potencial.

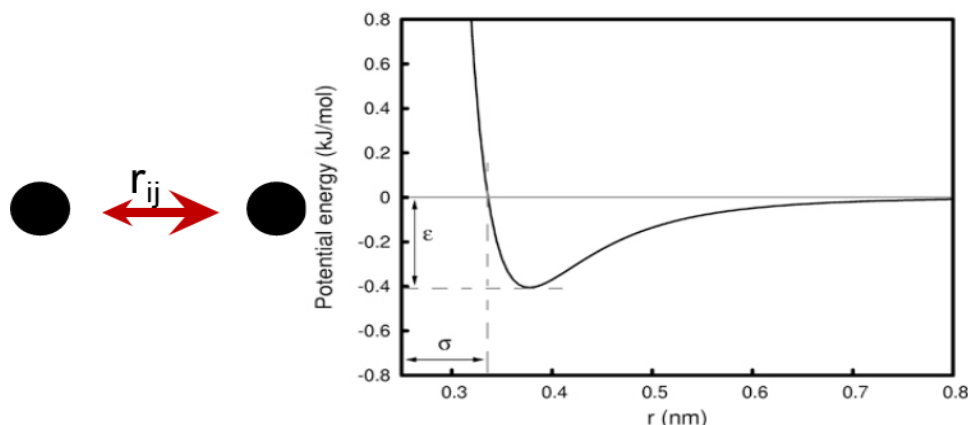


Figura 16 - Representação do potencial de Leonard-Jones entre duas partículas a uma distância r .

2.2.2.4 – Método de integração *leap-frog*

O integrador tipo de uma simulação de dinâmica molecular é o algoritmo *leap-frog* (30). Este integrador é um método numérico simples de resolução de equações diferenciais, como é o caso das equações de movimento de uma simulação molecular.

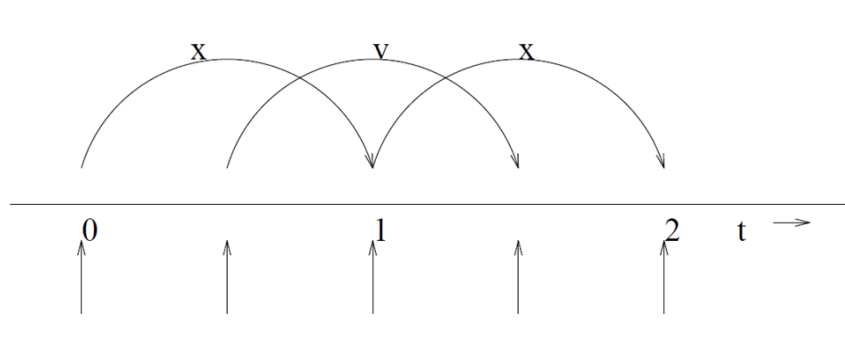


Figura 17 - representação do método de integração *leap-frog*. É possível observar como o cálculo das posições, e velocidades, é feito alternadamente, ao longo do tempo.

Este algoritmo de cálculo chama-se – *leap-frog* – pois os valores das posições \mathbf{r} e das velocidades \mathbf{v} são calculados alternadamente, isto é, um é calculado a partir do outro, à medida que o tempo avança. No *leap-frog* as posições e as velocidades são dadas, ao longo do tempo \mathbf{t} por:

$$\mathbf{v}\left(t + \frac{1}{2} \Delta t\right) = \mathbf{v}\left(t - \frac{1}{2} \Delta t\right) + \frac{\Delta t}{m} \mathbf{F}(t) \quad (11)$$

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) + \Delta t \mathbf{v}\left(t + \frac{1}{2} \Delta t\right) \quad (12)$$

$\mathbf{F}(\mathbf{t})$ é um somatório das forças aplicadas ao sistema e m a massa.

2.2.2.5 – Controlo da Temperatura – Algoritmo Berendsen

Num problema de dinâmica molecular, um facto a ter em conta é o controlo da temperatura do sistema. O controlo da temperatura, quanto se trabalha com sistemas isotérmicos e isobáricos, ou NPT, ou seja, com número constante de partículas, e com pressão e temperatura constantes, o algoritmo de Berendsen permite manter a temperatura, do sistema, constante ao longo da simulação

As mudanças de temperatura podem ocorrer devido a forças externas ou de fricção, que vão alterar o equilíbrio do sistema, ou até erros de integração, que no fundo alteram a dinâmica do sistema molecular. Um método de controlo, e correção, da temperatura do sistema é o algoritmo de Berendsen. (30). Este algoritmo permite um controlo de temperatura baseado na idealização de um banho onde a temperatura da água é constante (usando um termostato). A temperatura do sistema é então controlada de acordo com a relação:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{\tau} \quad (13)$$

Onde T_0 é a temperatura do banho, T a temperatura do sistema, τ é uma constante de tempo que faz com que o desvio da temperatura caia exponencialmente. Este método permite que o utilizador controle o tempo que desejamos para que a correção seja realizada, desde muito rápida – 0.01ps – até algo mais lento – 0.5ps (30).

2.2.3 – Condições – algoritmo LINCS

As condições são uma forma de manter as ligações e os ângulos interatómicos restringidos e, também, eliminar os modos vibracionais de maior frequência (30). O algoritmo usado para restringir o movimento dos átomos, ao nível das ligações e ângulos, é o algoritmo LINCS (32).

Este algoritmo aplica os multiplicadores de Lagrange às forças de restrição. Recorrendo a uma expansão, onde a ordem é um parâmetro fornecido pelo utilizador, resolve-se esses multiplicadores aproximando o Inverso do Jacobiano a cada iteração (30) (32). A implementação do algoritmo é feita de modo que, sempre que o sistema se tornar instável, ou seja, sempre que as vibrações das ligações, ou ângulos, se tornam muito elevadas, devido à intensidade das forças externas por exemplo, a simulação pára.

2.2.4 – Minimização de Energia

As minimizações de energia permitem otimizar as estruturas do sistema, procurando um estado de menor energia, usando algoritmos como o *steepest descent* ou o Gradiente conjugado. Numa minimização de energia, estes algoritmos procuram mínimos de energia locais, em relação ao ponto de partida. Uma minimização de energia não toma em conta efeitos como a temperatura logo, a trajetória dos átomos perde o sentido do ponto de vista físico, devido a isto, apenas obtemos a configuração final que corresponde a um mínimo local da energia potencial do sistema.

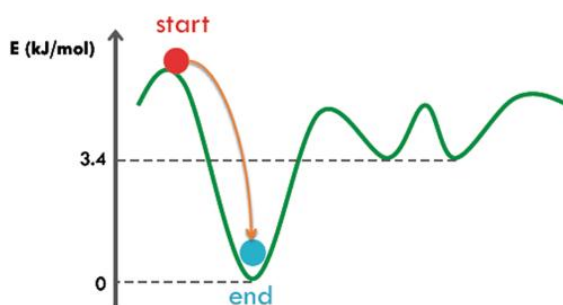


Figura 18 – Representação de um potencial de um sistema, Começa com uma configuração de maior energia (START) e a procura de um mínimo local de energia (ponto END).

2.2.4.1 – Steepest descent

Este método de minimização de energia não é o mais eficiente, ao nível do cálculo e busca do mínimo de energia, mas é o mais rápido e robusto. O seu uso deve ser limitado a sistemas pequenos/simples ou para os quais uma minimização prévia foi realizada usando de um método mais eficiente no cálculo e busca do mínimo de energia do sistema. Sendo \mathbf{r} um vetor posição de um átomo e \mathbf{F} as forças aplicadas ao átomo, as posições seguintes são dadas pela seguinte equação:

$$r_{n+1} = r_n + \frac{F_n}{\max(|F_n|)} h_n \quad (14)$$

Onde h_0 é o desvio máximo. O que deve acontecer é o seguinte:

- Caso $V_{n+1} < V_n$ então as novas posições são aceites e $h_{n+1} = 1.2h_n$
- Caso $V_{n+1} \geq V_n$ então as novas posições são rejeitadas e $h_n = 0.2h_n$

O algoritmo pára após um número determinado de passos, fornecidos pelo utilizador, ou chegamos a um mínimo de energia derivado de uma mudança mínima nos valores das Forças, ou potenciais, calculados a cada iteração.

2.2.4.2 – Gradiente conjugado

Este método não apresenta o comportamento oscilatório, do método anterior, perto de poços de energia estreitos do potencial, isto é, quando estamos longe do mínimo de energia, este método comporta-se como o anterior, apesar de menos eficiente, mas, quando se está perto do mínimo, existe uma mudança de direção, da movimentação através do gradiente, na qual encontra o mínimo de energia de uma forma mais rápida e eficiente que o método anterior. A figura seguinte compara estes dois algoritmos quando usados para procurar o mínimo num gradiente da forma $x^2 + 2y^2$ (33)

Como podemos observar pela figura 11, o método do gradiente conjugado é mais eficiente a encontrar o mínimo quando está perto deste. O método *Steepest Descent* é mais lento pois oscila, ou seja, muda de direções, quando está perto do mínimo, tornam-se menos eficiente na procura.

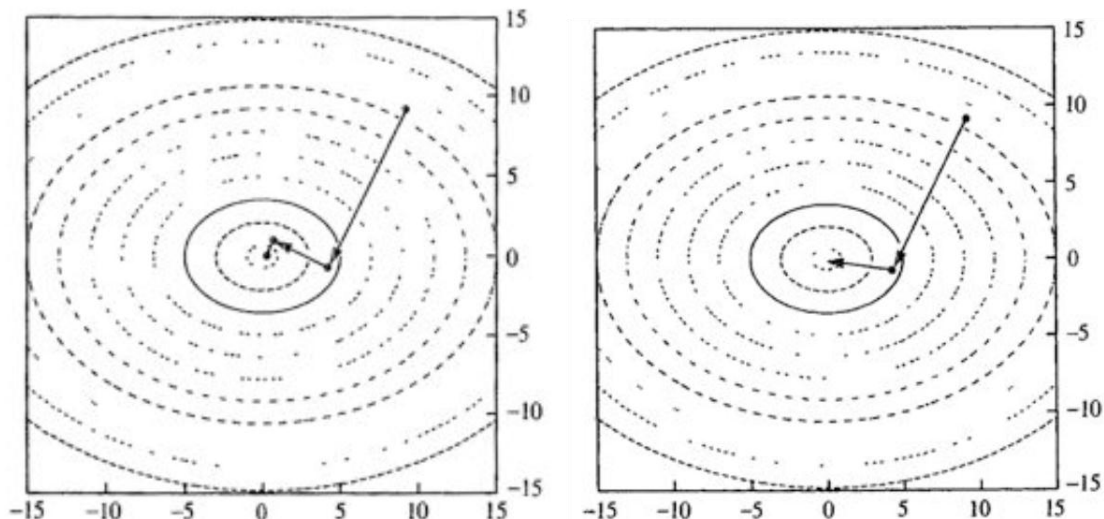


Figura 19 - Representação de gradientes $x^2 + 2y^2$. Do lado esquerdo é usado o algoritmo *Steepest Descent* para procurar o mínimo. Do lado direito é usado o algoritmo do gradiente conjugado (33).

O método do Gradiente conjugado é um pouco mais lento nas primeiras iterações mas acaba por ser mais eficiente quando nos encontrámos perto do mínimo local de energia. O método *Steepest Descent*, por ser mais rápido nas primeiras iterações, longe do mínimo local de energia, é usado na primeira minimizações e o Gradiente conjugado é usado como forma de refinar a procura do mínimo local.

2.2.5 – Potencial de Força Média

Este potencial é obtido integrando a força média de um conjunto de configurações (34). Estudos realizados (35) (36) mostraram que potenciais de força média, obtidos através de simulações computacionais, são sensíveis ao tratamento da electroestática de longo-alcance, métodos de *cut-off* e condições

de fronteira. Em alguns casos, para um dado sistema, o número, localização e energia relativa do mínimo do potencial poderia ser diferente, dependendo das condições de fronteira usadas e o *cut-off* das interações electrostáticas (36).

O potencial de força média, $\mathbf{W}(\Omega)$, pode ser definido como a energia livre de um sistema como função de um subconjunto selecionado, Ω , do conjunto de configurações do sistema. O potencial de força média pode, então, ser calculado da forma (37)

$$W(\Omega) = -KT \ln \rho(\Omega) + \alpha \quad (15)$$

onde $\rho(\Omega)$ é a distribuição de probabilidade condicional definida em Ω , α é uma constante. Na prática, o cálculo numérico de um potencial de força média requer uma avaliação, através de dinâmica molecular, de $\rho(\Omega)$. Para tornar a amostragem, e os cálculos, mais eficientes e precisos, recorre-se ao *Umbrella Sampling* (38). No *Umbrella Sampling* recorre-se a um potencial externo, $\mathbf{V}(\Omega)$, que é adicionado ao Hamiltoniano que facilita a amostragem das partes inacessíveis de Ω (35). Como o potencial $\mathbf{V}(\Omega)$ não faz parte do Hamiltoniano original do sistema, $\mathbf{H}(\Omega)$, o potencial de força média corrigido pode ser obtido usando a relação

$$W(\Omega) = -KT \ln \rho_u(\Omega) - KTV(\Omega) + KT \ln(KTV(\Omega))_u \quad (16)$$

onde o índice u indica que o PMF correspondente é calculado a partir do potencial, alterado pelo *Umbrella Sampling*, $H_u(\Omega) = H(\Omega) + V(\Omega)$ (35).

No pacote de *software* GROMACS, existem variados métodos, através dos quais é possível realizar este cálculo (30). No âmbito deste trabalho foi utilizado o método denominado de “pull code”. Este método calcula a força média entre os centros de massa das moléculas, ou grupos, selecionados. Com este método, um dos grupos, intercalador por exemplo, irá ser progressivamente puxado do seu ponto inicial, ponto de intercalação, enquanto o segundo grupo, cadeia de ADN, está fixo usando restrições. O *Umbrella Sampling* será realizado usando as configurações selecionadas, retiradas da amostragem resultante do *Pull*. O cálculo do potencial de força média será, então, realizado usando esta amostragem. O potencial de força média do

sistema – ADN + intercalador + Líquido Iônico, irá descrever a energia livre da interação do intercalador com a cadeia de ADN.

Capítulo 3 – Metodologia

Neste terceiro capítulo vamos descrever a forma como aplicamos todo o conhecimento de dinâmica e mecânica molecular para a resolução do problema do estudo da intercalação, das interações do intercalador com ADN e o solvente e os efeitos dos Líquidos Iônicos na intercalação.

O diagrama seguinte – figura 20 – é demonstrativo da forma como todo o estudo foi realizado. Cada etapa e cada estudo individual, desde o início do projeto até à análise dos resultados, estão representados no diagrama e será, depois, explicada individualmente de forma mais detalhada.

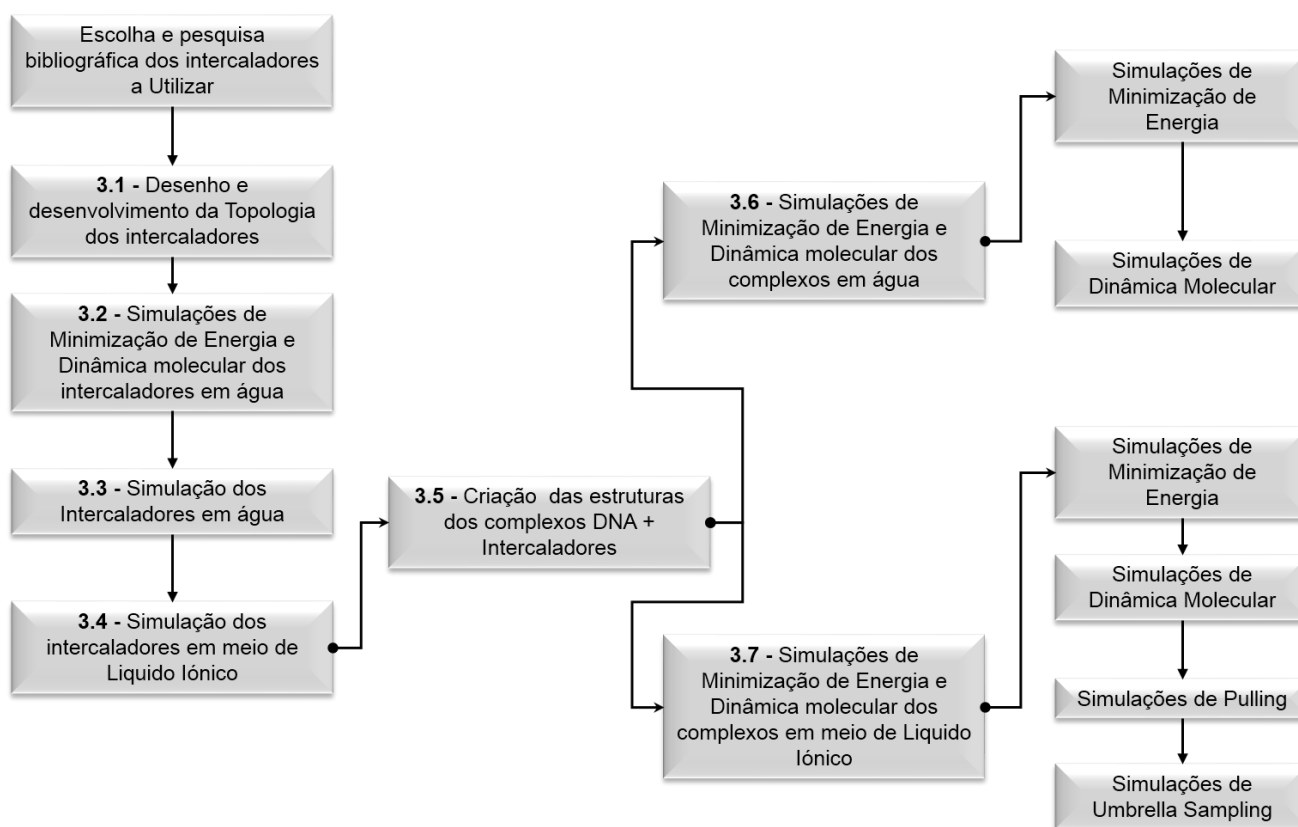


Figura 20 - Esquema que descreve a forma como o estudo se desenvolveu.

3.1 – Desenho e Desenvolvimento da Topologia dos Intercaladores.

Uma topologia descreve todas as ligações, ângulos, diedros, pares de átomos para interações VdW e cargas parciais de cada átomo. Todos estes parâmetros necessitam ser introduzidos da forma mais precisa recorrendo à literatura já publicada. No caso deste trabalho, não existem parametrizações publicadas para estes intercaladores usando o campo de forças GROMOS, devido a este facto, as topologias de cada intercalador tiveram de ser criadas por nós. As cargas parciais para cada átomo foram retiradas da literatura. O Anexo 1 – Estruturas e Topologias – contém toda informação relevante sobre as topologias dos intercaladores.

3.2 – As simulações de Minimização de Energia dos intercaladores em vácuo

As simulações de Minimização de Energia dos intercaladores em vácuo serviram para otimizar as estruturas obtidas por cristalografia. Foi usado o integrador *Steeep* com 7ps de simulação.

3.3 – Simulação dos Intercaladores em Água

Os intercaladores foram colocados em caixas com moléculas de água. Como as caixas têm de apresentar carga total nula, foi necessário compensar a carga dos intercaladores com iões de carga oposta – iões de Cloro no nosso caso. As simulações de minimização de energia foram realizadas em dois passos, onde no primeiro passo usamos o integrador *Steeep* com 100ps de simulação, um *cut-off* para as interações electroestáticas de 0.9nm e com restrições aos movimentos dos átomos do intercalador (excepto átomos de Hidrogénio). No segundo passo os parâmetros são os mesmos, apenas retiramos as restrições ao intercalador.

Após as simulações de minimização de energia procedemos a simulações de dinâmica molecular que foram realizadas em três passos. No primeiro passo os átomos do intercalador encontram-se com restrição aos seus movimentos. O tempo de Simulação foi de 100ps com integrador md e *cut-off* de 0.9nm. No segundo passo apenas levantamos as restrições aos átomos do intercalador. No terceiro passo de simulação de dinâmica molecular usamos os mesmos parâmetros do passo anterior mas com tempo de simulação de 5ns.

3.4 – Simulação dos intercaladores em meio de Líquido Iônico

Todo o processo de simulação é análogo ao processo utilizado para simular com a água, ou seja, primeiro foram realizadas simulações de Minimização de Energia e depois simulações de Dinâmica Molecular.

A minimização de energia foi realizada em dois passos. No primeiro passo foi usado um tempo de simulação de 35ps com integrador *Steep*, um *cut-off* de 0.9nm e com restrições aos átomos do intercalador (excepto aos átomos de Hidrogénio). Na segunda minimização de energia, usamos os mesmos parâmetros e levantamos as restrições.

A dinâmica molecular foi simulada em três fases. Na primeira fase foi usado o integrador md com tempo de simulação de 100ps, um *cut-off* de 0.9nm e com restrições aos átomos do intercalador (excepto átomos de Hidrogénio). No segundo passo usamos os mesmos parâmetros e retiramos as restrições ao intercalador. O último passo é análogo ao anterior mas com tempo de simulação de 5ns.

3.5 – Criação das Estruturas dos complexos ADN + Intercalador.

O processo de complexação manual para os intercaladores com afinidade por bases Citosina – Guanina, foi realizado usando a cadeia de ADN que continha a Proflavine. Para o caso da Berberine, que tem afinidade por pares de base Adenina- Timina, foi usada uma cadeia de ADN retirada da

literatura (13). As cadeias têm um tamanho entre 6 pares de base e os 12 pares de base. Para mais informações sobre os complexos ver o Anexo 1.

A complexação manual dos intercaladores é realizada procedendo ao alinhamento da estrutura, que contém o intercalador, com a estrutura da cadeia de ADN final. O alinhamento processa-se da seguinte forma:

- Em primeiro lugar devemos colocar as duas cadeias na mesma sessão do PyMOL e retirar todos os átomos/moléculas extra que estavam incluídas nos ficheiros que continham a estrutura original.
- Devemos, então, colocar as duas cadeias o mais próximo possível uma da outra e com os pares de base alinhados.
- O alinhamento final procede-se retirando o Intercalador original e sobrepondo as duas cadeias de ADN da melhor forma possível, com o mínimo de desalinhamento. Isto pode ser realizado através das funcionalidades do PyMOL também pode ser necessário realizar o alinhamento final manualmente.
- Depois do alinhamento estar feito, retiramos a cadeia de ADN que continha o intercalador e obtemos o resultado final que é o Intercalador complexado na nova cadeia de ADN.

3.6 – Simulação de Minimização de Energia e Dinâmica molecular, dos complexos, em água.

A simulação dos complexos em meio aquoso serviria como uma forma de controlo para as simulações dos complexos em meio de Líquido Iónico mas não foi possível manter a estabilidade dos complexos no último passo de Dinâmica Molecular. No processo de simulação passou por cinco passos de Minimização de Energia antes de se realizar as simulações de Dinâmica Molecular. No primeiro passo de minimização de energia foi usado o integrador *Steep* com tempo de simulação de 100ps, um *cut-off* de 0.9nm e com

restrições a todas as moléculas a simular, ou seja, à cadeia de ADN, ao intercalador e às moléculas de água (excepto aos átomos de Hidrogénio). No segundo passo alteramos apenas o integrador, usando agora o integrador Gradiente Conjugado (cg). Na terceira minimização retiramos as restrições à água e usamos um tempo de simulação de 50ps. No quarto passo a restrição ao intercalador é levantada e apenas os movimentos do *backbone* da cadeia de ADN se encontram restritos. Os parâmetros da simulação mantêm-se iguais ao anterior. No quinto passo de minimização de energia, todas as restrições são levantadas, mantendo os parâmetros da simulação iguais ao passo anterior. Através destes cinco passos de minimização de energia, foi possível minimizar a energia do sistema de uma forma gradual e controlada.

As simulações de dinâmica Molecular foram realizadas em três passos distintos. No primeiro passo, a cadeia de ADN e o intercalador encontram-se com os seus movimentos restringidos (excepto os Hidrogénios). O tempo de simulação é de 500ps, usando o integrador md e um *cut-off* de 0.9nm. No segundo passo apenas o *backbone* da cadeia de ADN se encontra com os movimentos restringidos e o tempo de simulação é agora de 100ps. No último passo não existem restrições impostas e o tempo de simulação é de 5ns.

No terceiro passo das simulações de dinâmica molecular é notada uma instabilidade da molécula de ADN. Já seria de esperar que a molécula de ADN se comporta-se de uma forma instável em meio aquoso mas, apesar da integração de iões para estabilizar a cadeia, esta não se manteve estável durante os 5ns de simulação, começando a abrir nas pontas.

3.7 – Simulações de Minimização de Energia e Dinâmica Molecular dos complexos em meio de Líquido Iónico.

O processo de Minimização de Energia acontece em cinco passos e a Dinâmica Molecular é realizada em três passos. Após as simulações de DM, são realizadas simulações de *Pulling* e as simulações *Umbrella*.

Os cinco passos de minimização de energia são semelhantes aos usados para a água – ver ponto 3.6. As restrições aos movimentos dos átomos

são as mesmas mas onde se restringe água restringe-se agora os aniões e catiões que constituem o RTIL. O mesmo se passa para as simulações de Dinâmica Molecular, onde os parâmetros serão os mesmos mas, no último passo, o tempo de simulação será agora de 50ns.

Nas simulações de *Pulling*, vamos ter restrições ao *backbone* da cadeia de ADN, pois queremos puxar o intercalador mas não queremos que a cadeia de ADN seja também puxada, devido às interações entre esta e o intercalador. As simulações de *Pulling* foram realizadas usando o integrador md com um tempo de simulação de 500ps, um *cut-off* de 0.9nm e com restrição apenas ao *backbone* da cadeia de ADN. A taxa de variação da posição de referência foi de 0.01 nm/ps e a direção do *Pull* foi realizada no sentido positivo do eixo do x.

Este tipo de Simulação é delicado pois uma força muito elevada ou uma Taxa de variação alta pode fazer com que o *Pulling* seja algo violento para o complexo ou até para o próprio sistema em geral. Os parâmetros utilizados nas simulações, após testes realizados, foram os que se provaram os mais eficazes para uma simulação de *Pulling* eficaz e com os melhores resultados finais.

Foi possível retirar um *frame* para cada posição do intercalador, em relação á cadeia de ADN, em cada instante medido. Seleccionamos, então, um conjunto de posições, ou *frames*, para realizar as simulações de medição do Potencial de Força Média através do método de *Umbrella Sampling*.

Para cada combinação complexo + RTIL, foram seleccionados entre 20 e 30 *frames* para se realizar as simulações de *Umbrella Sampling*. Quanto maior o numero de configurações melhor será a amostragem para um resultado de medição de Potencial de Força Média.

3.8 – Como foi realizada a Análise e Tratamento dos Resultados obtidos

Para complementar a informação fornecida pelo estudo dos potenciais de força média, analisámos as interações energéticas, isto é, interações electroestáticas, Van der Waals e a formação de pontes de Hidrogénio, entre os intercaladores e a cadeia de ADN e, também, entre os intercaladores e os iões

constituintes do Líquido Iónico. As configurações alvo foram os *frames* utilizados nas simulações de *Umbrella Sampling* dado fornecerem informação energética em pontos distintos do espaço e a mesma informação que seria utilizada no cálculo do PMF. No anexo 2 encontram-se os resultados das medições dos potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e a contabilização da formação de pontes de Hidrogénio, para as cinquenta combinações Intercalador / ADN / RTIL

Capítulo 4 – Apresentação e Discussão dos Resultados

Para estudar o comportamento dos complexos Intercalador + ADN em Líquidos Iónicos à Temperatura Ambiente (RTILs) foram realizadas algumas medições e observações para se verificar de que forma o Intercalador interage com o ADN e com o Líquido Iónico envolvente.

Como descrito no capítulo 3 – Metodologia – realizaram-se simulações de *Pulling* a cada combinação ADN + Intercalador + RTIL e, para zonas seleccionadas retiradas dos resultados das trajetórias de *Pulling*, foi calculado o Potencial de Força Média (PMF), usando *Umbrella Sampling* e medidos os Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e número de pontes de Hidrogénio, para cada par Intercalador + ADN, Intercalador + catião e Intercalador + anião. Com os resultados apurados somos capazes de concluir:

- Se a intercalação é favorável em meio de Líquidos Iónicos;
- Em qual dos líquidos iónicos a intercalação é mais favorável;
- Qual o intercalador com a intercalação mais forte;
- Os efeitos dos catiões e aniões para as diferentes combinações estudadas.

O estudo dos conjuntos foi realizado em duas frentes. Numa das frentes temos um estudo baseado nos Potenciais de energia (Coulomb, Leonard-Jones e pontes de Hidrogénio). Desta forma podemos observar como interagem as diferentes partes de cada combinação ADN + Intercalador + RTIL e observar de que forma a intercalação é facilitada ou não. Na outra frente, o estudo é baseado nos Potenciais de força Média ou na energia de *Binding* entre ADN e o Intercalador.

4.1 Potenciais de Força Média.

Neste ponto estudamos a intercalação usando um método que tira partido do Potencial de Força Média (PMF). Como explicado no capítulo 3 – Metodologia – foi utilizada a técnica de *umbrella Sampling* que cria um gráfico que descreve a diferença de energia livre entre dois estados, onde no primeiro o intercalador se encontra complexado com o ADN e no segundo o intercalador encontra-se livre em solução. Desta forma é possível analisar se a intercalação em meio de Líquido Iónico é espontânea.

Foi possível realizar um estudo completo para a Proflavine. No caso da Proflavine Reduzida foi possível estudar 8 combinações. Para o DAPI foi possível estudar 6 combinações. Apenas no caso do Etídio e da Berberine não foi possível obter resultados de PMF completos.

Os potenciais são apresentados sobre a forma da Energia Livre (em KJ/mol), ao longo distância x (em nm) do intercalador ao centro de massa do complexo.

4.1.1 – Proflavine

Começamos por comparar os Líquidos Iónicos formados pelos iões [BDHYDOZA⁺] [BF₄⁻] e [BDHYDOZA⁺] [PF₆⁻].

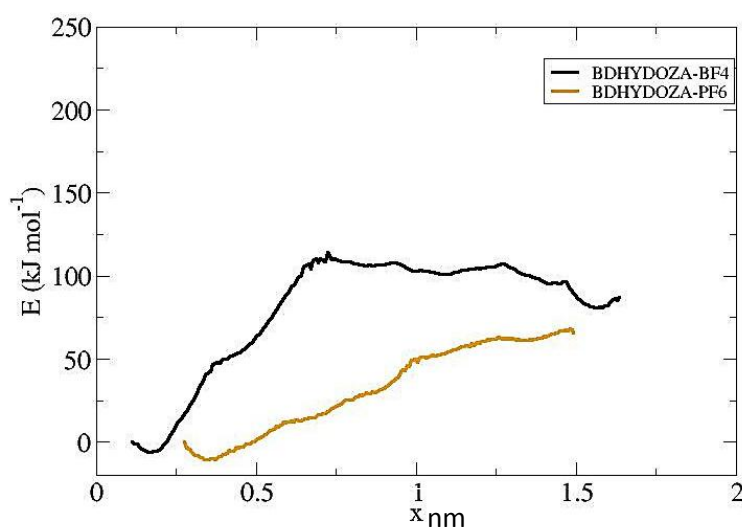


Gráfico 1 - comparação entre os Líquidos Iónicos [BDHYDOZA⁺] [BF₄⁻] e [BDHYDOZA⁺] [PF₆⁻]

Como podemos observar pelo gráfico 1, o Líquido Iônico [BDHYDOZA⁺] [BF₄⁻] apresenta o valor mais elevado para a diferença de energia livre entre os dois estados.

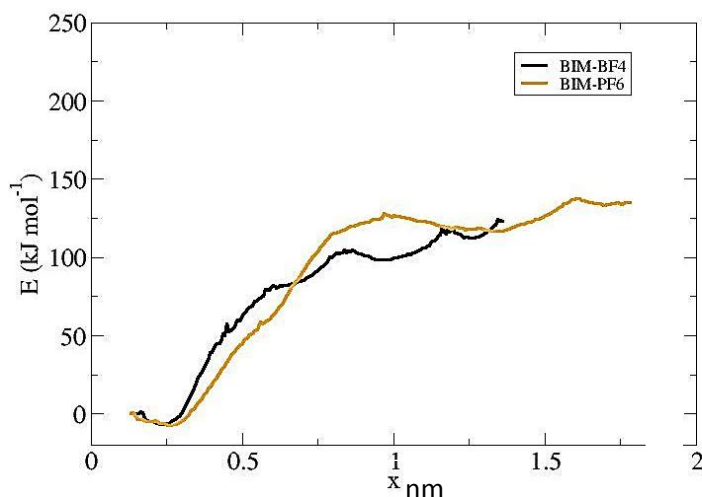


Gráfico 2 - comparação entre os Líquidos Iônicos [BIM⁺] [BF₄⁻] e [BIM⁺] [PF₆⁻]

Podemos observar, através do gráfico 2, que o [BIM⁺] [PF₆⁻] observa um valor de energia livre ligeiramente superior ao [BIM⁺] [BF₄⁻].

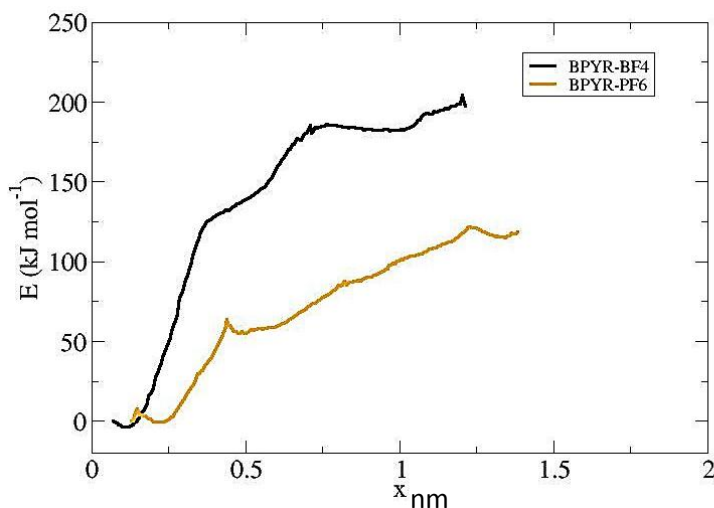


Gráfico 3 - comparação entre os Líquidos Iônicos [BPYR⁺] [BF₄⁻] e [BPYR⁺] [PF₆⁻]

Através do gráfico 3 comparamos os Líquidos Iônicos [BPYR⁺] [BF₄⁻] e [BPYR⁺] [PF₆⁻]. Neste caso é notória a diferença de energia entre os dois. O [BPYR⁺] [BF₄⁻] apresenta o valor mais elevado, ultrapassando os 200KJ/mol.

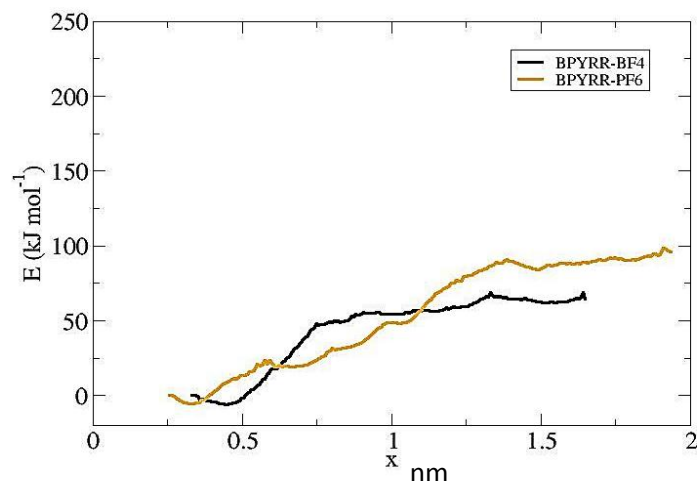


Gráfico 4 - comparação entre os Líquidos Iônicos [BPYRR⁺] [BF₄⁻] e [BPYRR⁺] [PF₆⁻]

Quanto ao estudo dos Líquidos Iônicos [BPYRR⁺] [BF₄⁻] e [BPYRR⁺] [PF₆⁻], o gráfico 4 ilustra os resultados comparativos entre estes dois Líquidos Iônicos. É possível observar que o [BPYRR⁺] [PF₆⁻] observa um nível de energia superior ao [BF₄⁻]. No entanto os valores da energia não passam os 100KJ/mol.

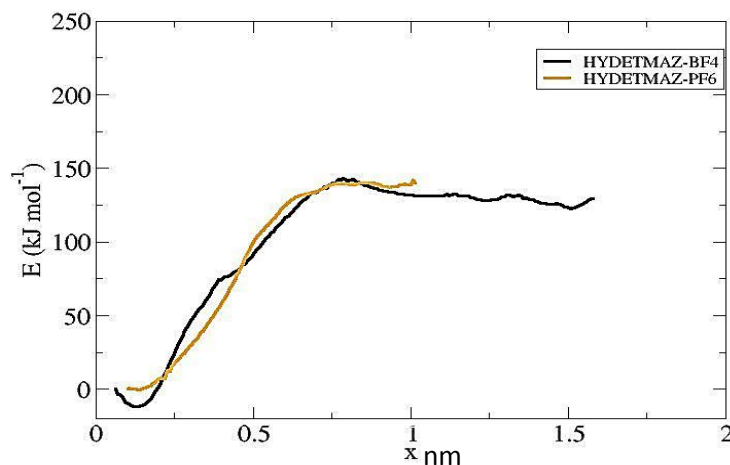


Gráfico 5 - comparação entre os Líquidos Iônicos [HYDETMAS⁺] [BF₄⁻] e [HYDETMAS⁺] [PF₆⁻]

Comparando os Líquidos Iônicos [HYDETMAS⁺] [BF₄⁻] e o [HYDETMAS⁺] [PF₆⁻], através do gráfico 5, verificamos que a diferença de

energia livre entre os estados nestes Líquidos Iônicos é quase inexistente. Os valores da energia chegam perto dos 150KJ/mol para ambos os casos.

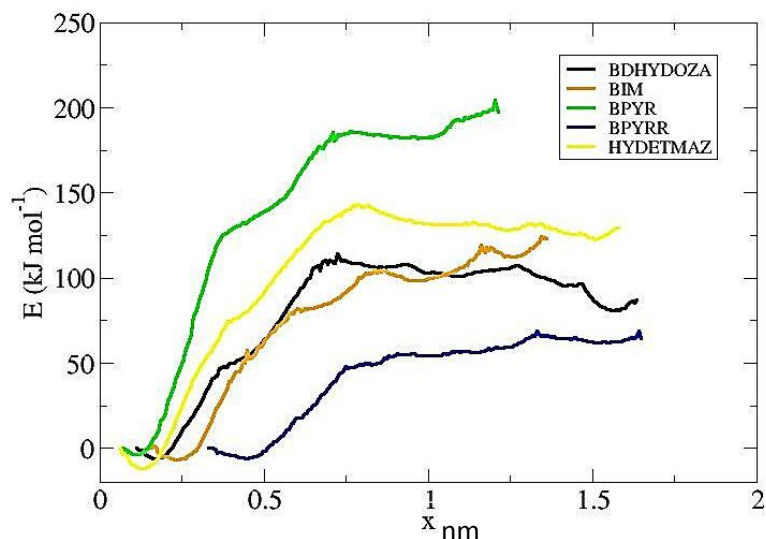


Gráfico 6 - comparação dos resultados PMF para o mesmo anião, fazendo variar os catiões.

Passamos agora a um estudo onde mantemos o anião e comparamos o efeito dos vários catiões. O gráfico 6 representa a comparação entre todos os catiões onde o anião é o $[BF_4^-]$. Podemos observar que o $[BPYR^+][BF_4^-]$ é o melhor resultado desta série comparada no gráfico 6m ou seja, este RTIL apresenta a diferença de energia livre, entre os dois estados, mais elevada.

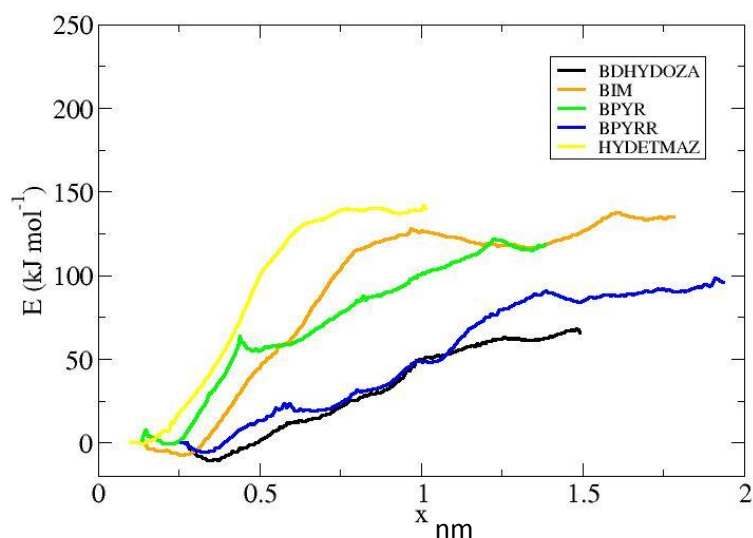


Gráfico 7 - comparação dos resultados PMF para o mesmo anião, fazendo variar os catiões.

Procedemos à mesma comparação mas alterando o anião para o $[PF_6^-]$. Através da análise do gráfico 7, podemos retirar que o $[HYDETMAZ^+][PF_6^-]$ é o que apresenta o melhor resultado de PMF para esta série

Depois da análise realizada ao nível dos Potenciais de Força Média, para o intercalador Proflavine, podemos concluir que o Líquido Iónico que promove a intercalação mais forte da Proflavine é o $[BPYR^+][BF_4^-]$. Este intercalador apresenta a diferença de energia livre mais elevada entre os dez RTILs estudados para a intercalação da Proflavine.

4.2.3 – Comparação entre os Intercaladores Proflavine, Proflavine Reduzida e DAPI

Os gráficos seguintes comparam os diversos intercaladores para os quais foi possível completar um estudo sobre o Potencial de Força Média. As comparações serão feitas por catião.

O primeiro gráfico, gráfico 8, compara a Proflavine, Proflavine Reduzida e o DAPI, quando o RTIL solvente é composto pelos iões $[BDHYDOZA^+]$ e alterando o aniões $[BF_4^-]$ e $[PF_6^-]$.

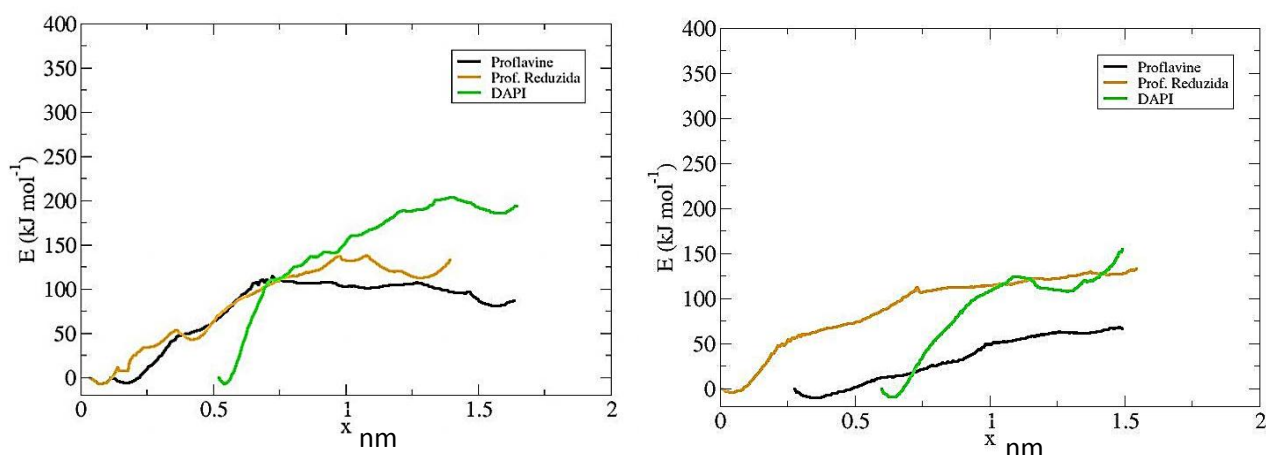


Gráfico 8 - comparação PMF entre os intercaladores Proflavine, Proflavine Reduzida e o DAPI, para o RTIL $[BDHYDOZA^+][BF_4^-]$ (esquerda) e para $[BDHYDOZA^+][PF_6^-]$ (direita).

Nos dois casos, o DAPI apresenta os valores mais elevados quanto à energia necessária para retirar o intercalador. É possível também reparar que a Proflavine Reduzida apresenta uma diferença de energia livre maior do que a Proflavine. Dos dois aniões, o $[BF_4^-]$ permite uma melhor intercalação dos três intercaladores estudados quando o catião é o $[BDHYDOZA^+]$.

Passamos agora para análise mudando o catião para o $[BIM^+]$. Neste caso apenas para o anião $[BF_4^-]$ foi possível estudar o DAPI junto com a Proflavine e a sua versão Reduzida.

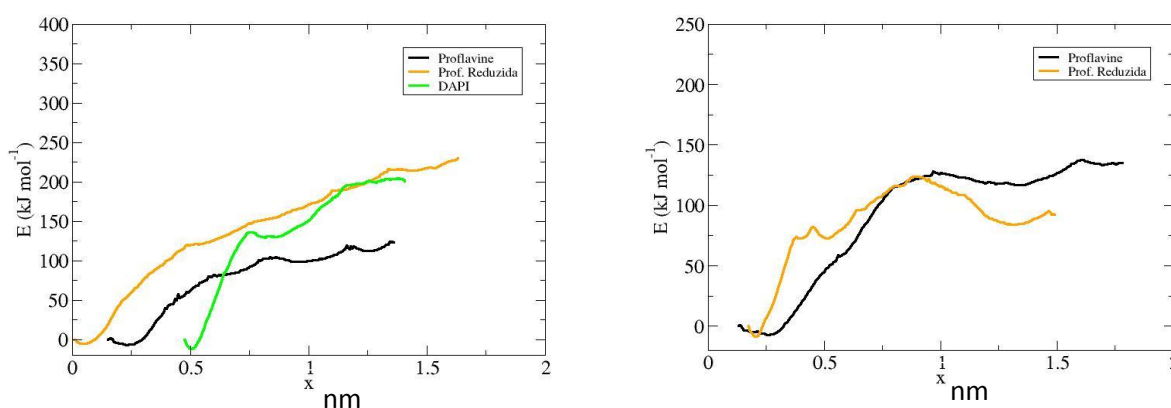


Gráfico 9 - Comparação entre a Proflavine e a sua versão Reduzida e o DAPI. À esquerda com o RTIL $[BIM^+][BF_4^-]$ e à direita $[BIM^+][PF_6^-]$

Podemos observar que, como no caso anterior, a mudança do anião fez com que o nível da energia livre também descesse. No caso do anião $[BF_4^-]$, a Proflavine Reduzida apresenta a interação com o valor mais elevado de energia entre o estado complexado e livre, estando o DAPI muito próximo pois, apesar de o valor máximo de energia livre ser inferior ao medido para a Proflavine Reduzida, o DAPI apresenta um valor mais negativo para o estado complexado, ou seja, a intercalação é mais forte para o DAPI do que no caso da Proflavine Reduzida.

Para finalizar o estudo comparativo, estudamos as intercalações para o $[HYDETMAZ^+]$. Neste caso também apenas comparamos a Proflavine com o DAPI, quando o anião é o $[PF_6^-]$, e a comparação entre a Proflavine e a Proflavine Reduzida quando o anião é o $[BF_4^-]$.

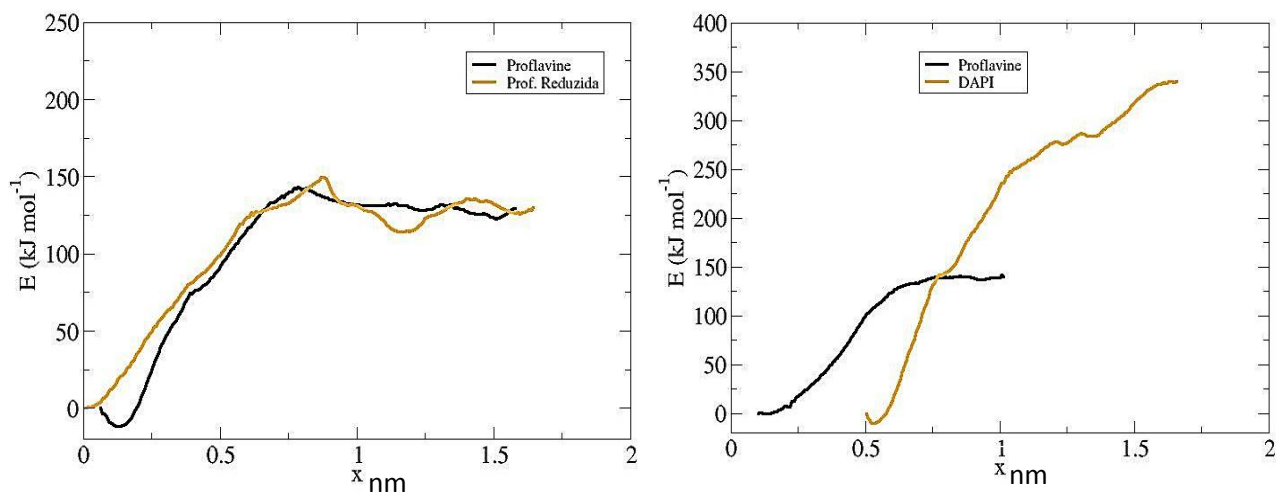


Gráfico 10 - comparação entre os intercaladores Proflavine, Proflavine Reduzida quando o RTIL solvente é o [HYDETMAZ⁺] [BF₄⁻] – esquerda e o para a Proflavine e DAPI quando o RTIL é [HYDETMAZ⁺] [PF₆⁻] – direita.

Neste último caso, quando o anião é o [BF₄⁻], a Proflavine apresenta uma intercalação mais forte do que a Proflavine Reduzida. Isto deve-se ao facto de a Energia livre, no estado complexado, é mais negativa para a Proflavine, ou seja, apesar de o valor máximo de Energia Livre medido ser semelhante entre os dois intercaladores, a diferença de energia livre entre os dois estados é maior para a Proflavine.

Quando comparamos a Proflavine com o DAPI, usando o anião [PF₆⁻], podemos observar que a diferença de energia livre entre os dois estados é significativamente maior para o DAPI.

O estudo do Potencial de Força Média da intercalação da Proflavine permitiu-nos concluir que esta intercalação é espontânea para todos os Líquidos Iónicos estudados. O [BPYR⁺] [BF₄⁻] apresentou a diferença de energia livre mais elevada entre o estado da Proflavine complexada e o estado livre. Este resultado será complementado com a análise das interações de Coulomb, Van der Waals e com a formação de pontes de Hidrogénio.

A comparação entre intercaladores usando o mesmo catião e fazendo variar o anião, permitiu verificar que, entre os intercaladores comparados, o DAPI apresenta a intercalação mais forte e espontânea em todos os RTILs

estudados usando PMF. Estes resultados serão complementados com a análise das interações energéticas entre o DAPI e a cadeia de ADN e o RTIL.

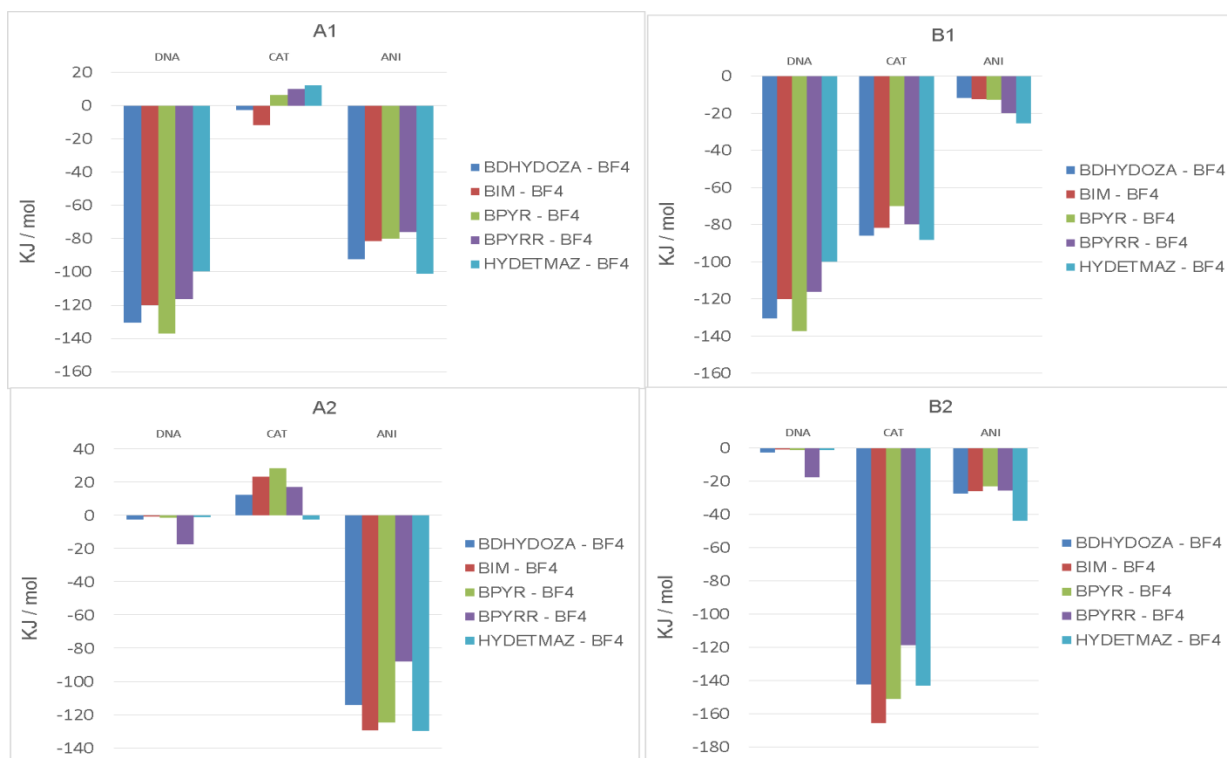
Apesar destas diferenças, é possível concluir que para todos os estudos de PMF realizados, os intercaladores associam-se de uma forma espontânea ao ADN, independentemente do RTIL utilizado.

4.2 Apresentação/Análise dos resultados baseados nas interações electrostáticas, Van der Waals e na formação de pontes de Hidrogénio.

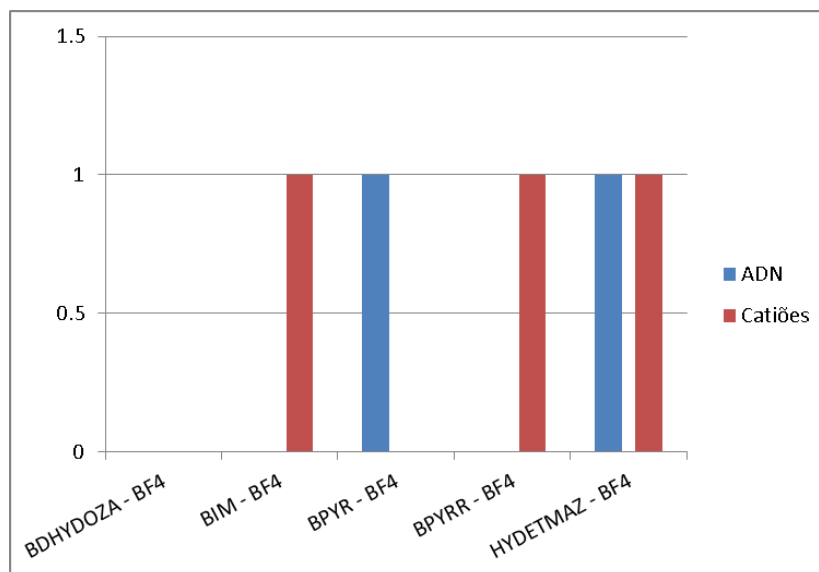
4.2.1 – Estudo dos Resultados para cada Intercalador

Nos seguintes histogramas são apresentados os resultados relativos às interações electrostáticas, VdW entre os intercaladores e a cadeia de ADN, os catiões e os aniões, e a formação de pontes de Hidrogénio entre os intercaladores e a cadeia de ADN e os catiões.

4.2.1.1 – Berberine



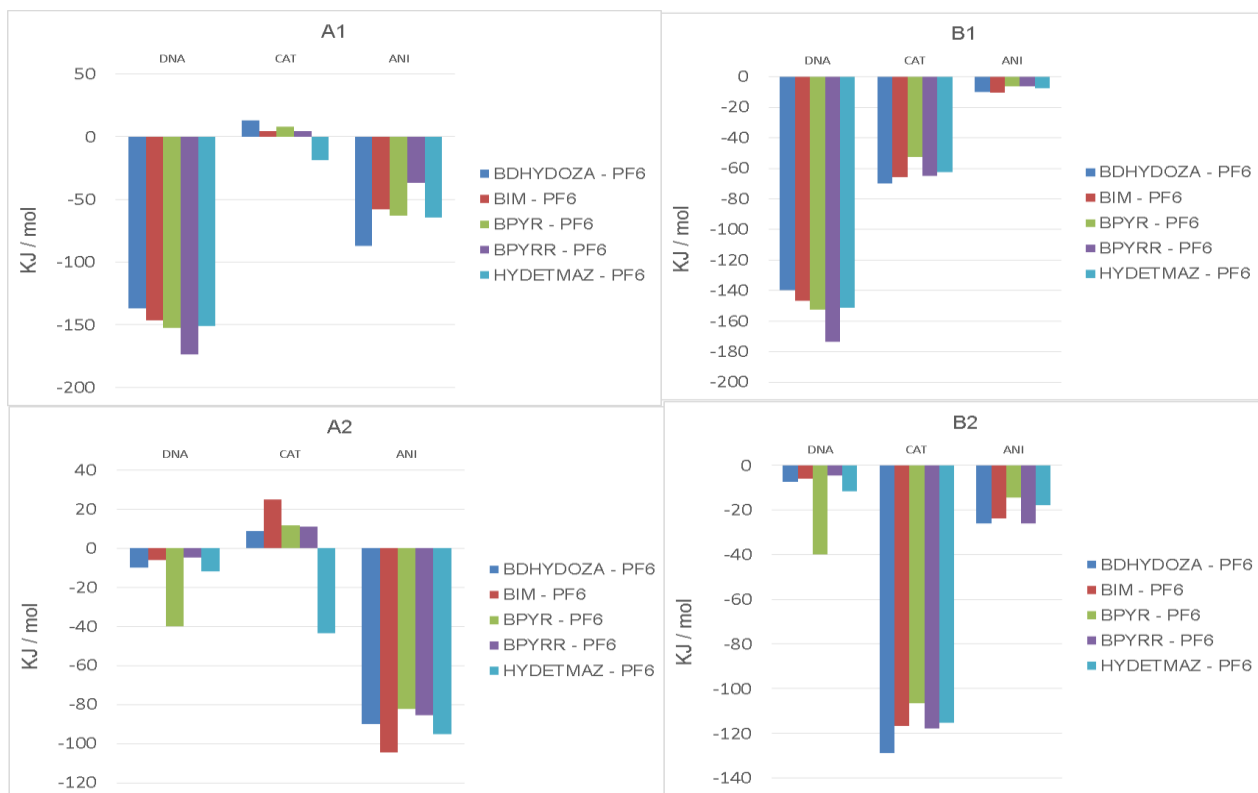
Histograma 1 – Resultados energéticos das interações de Coulomb e Van der Waals entre o intercalador e o ADN, os catiões e os aniões. Os histogramas A são relativos às interações de Coulomb (intercalação e livre em solução). Os histogramas B são relativos às interações de VdW (intercalação e livre em solução).



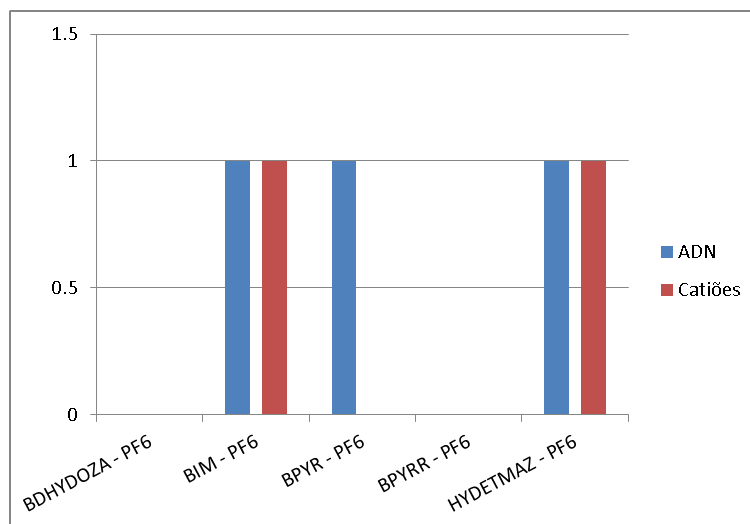
Histograma 2 – Descrição do comportamento médio da formação de pontes de Hidrogénio, no ponto de intercalação, criadas entre o intercalador Berberine e a cadeia de ADN e os catiões

A Berberine é um intercalador de carga positiva +1. Tem preferência para intercalar entre as bases A-T do ADN.

Observando o histograma 1, podemos ver o efeito dos diferentes catiões na intercalação da Berberine. o Líquido Iónico [BPYR⁺] [BF₄⁻] apresenta os valores energéticos mais elevados para as interações de Coulomb e Van der Waals, com o valor de -137.18 KJ/mol. Relativamente à existência de pontes de Hidrogénio (histograma 2) observamos que, o líquido iónico [BPYR⁺] [BF₄⁻] apresenta a formação de pontes de Hidrogénio na zona de intercalação, promovendo desta forma, uma intercalação mais forte e estável.



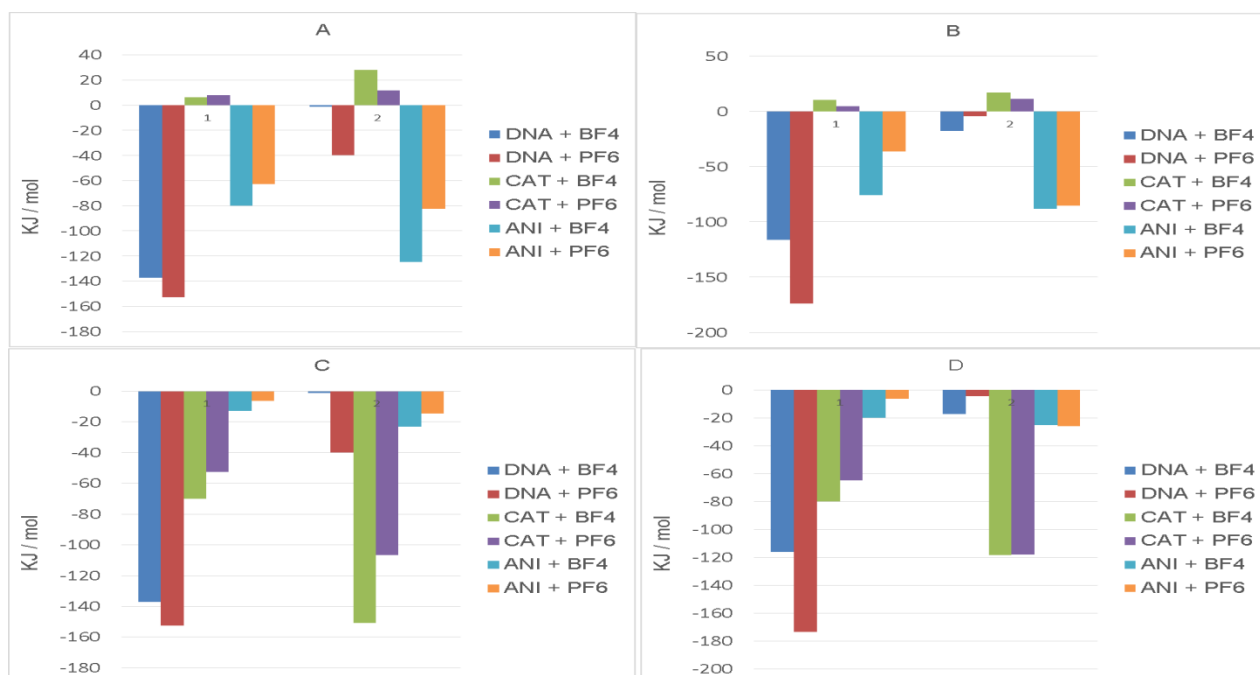
Histograma 3 - Resultados energéticos das interações de Coulomb e Van der Waals entre o intercalador e o ADN, os catiões e os aniões. Os histogramas A são relativos às interações de Coulomb (intercalação e livre em solução). Os histogramas B são relativos às interações de VdW (intercalação e livre em solução)



Histograma 4 – Descrição do comportamento médio da formação de pontes de Hidrogénio, no ponto de intercalação, criadas entre o intercalador Berberine e a cadeia de ADN e os catiões

Realizamos o mesmo estudo mas com o anião $[PF_6^-]$ e, observando o histograma 3, a combinação que apresenta as interações mais fortes, no ponto de intercalação, é a combinação Berberine em meio $[BPYRR^+][PF_6^-]$, com um valor de energia, para as interações electrostáticas de -173.63 KJ/mol e de -173.64 KJ/mol para as interações de VdW, entre o Intercalador e a cadeia de ADN. Apesar dos bons resultados energéticos, não são contabilizadas pontes de hidrogénio formadas, entre o intercalador e o ADN ou catiões, no ponto de intercalação (histograma 4).

Comparamos os dois resultados obtidos mantendo o catião e fazendo variar o anião, para observar o efeito deste. Comparamos o $[BPYR^+][BF_4^-]$ com o $[BPYR^+][PF_6^-]$ e também o líquido iónico $[BPYRR^+][BF_4^-]$ com o $[BPYRR^+][PF_6^-]$.



Histograma 5 - histogramas de comparação das interações entre o intercalador e a cadeia de ADN e os líquidos iónicos (no ponto de intercalação e em solução), onde se manteve o mesmo catião e fez-se variar o anião. A e C - os valores para os potenciais de Coulomb e L-J, com o catião $[BPYR^+]$; B e D - os mesmos potenciais medidos com o catião $[BPYRR^+]$.

Através da análise comparativa entre os histogramas, observamos que o $[BPYR^+][BF_4^-]$, que foi aquele que apresentou os melhores resultados para o

anião $[BF_4^-]$, apresentando valores mais baixos para a energia das interações de Coulomb, e VdW, entre a Berberine e o ADN, que o seu homólogo com o anião $[PF_6^-]$. No caso das interações com os íões, estes valores tornam-se mais reduzidos. A mudança do anião sugere, então, uma intercalação mais forte entre a Berberine e o ADN. O $[BPYRR^+][PF_6^-]$ apresenta melhores resultados do que o seu correspondente formado com o anião $[BF_4^-]$. Observando os dois casos estudados é possível observar que, para o intercalador Berberine, o Líquidos Iônicos que incluem na sua composição o anião $[PF_6^-]$ observarão uma intercalação mais forte entre o Intercalador e a cadeia de ADN.

As imagens seguintes ilustram a intercalação da Berberine no ADN.

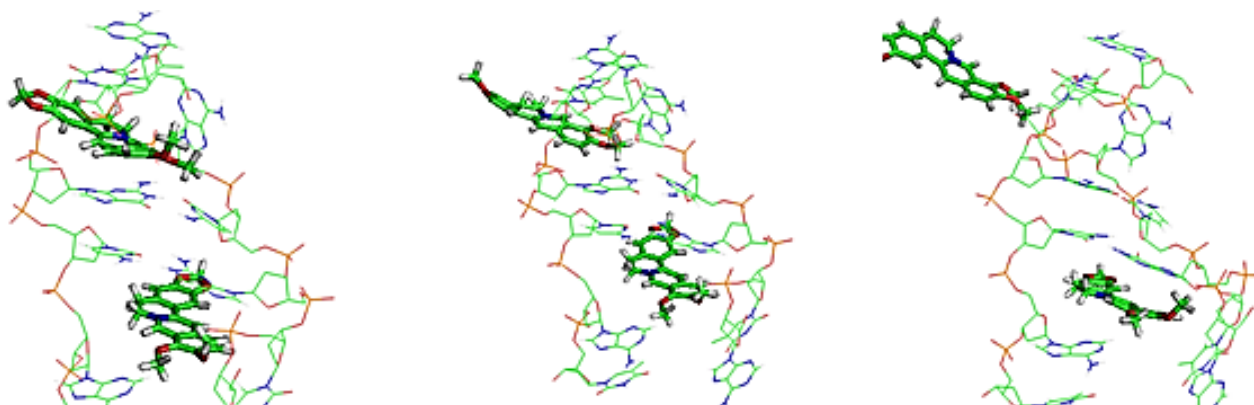
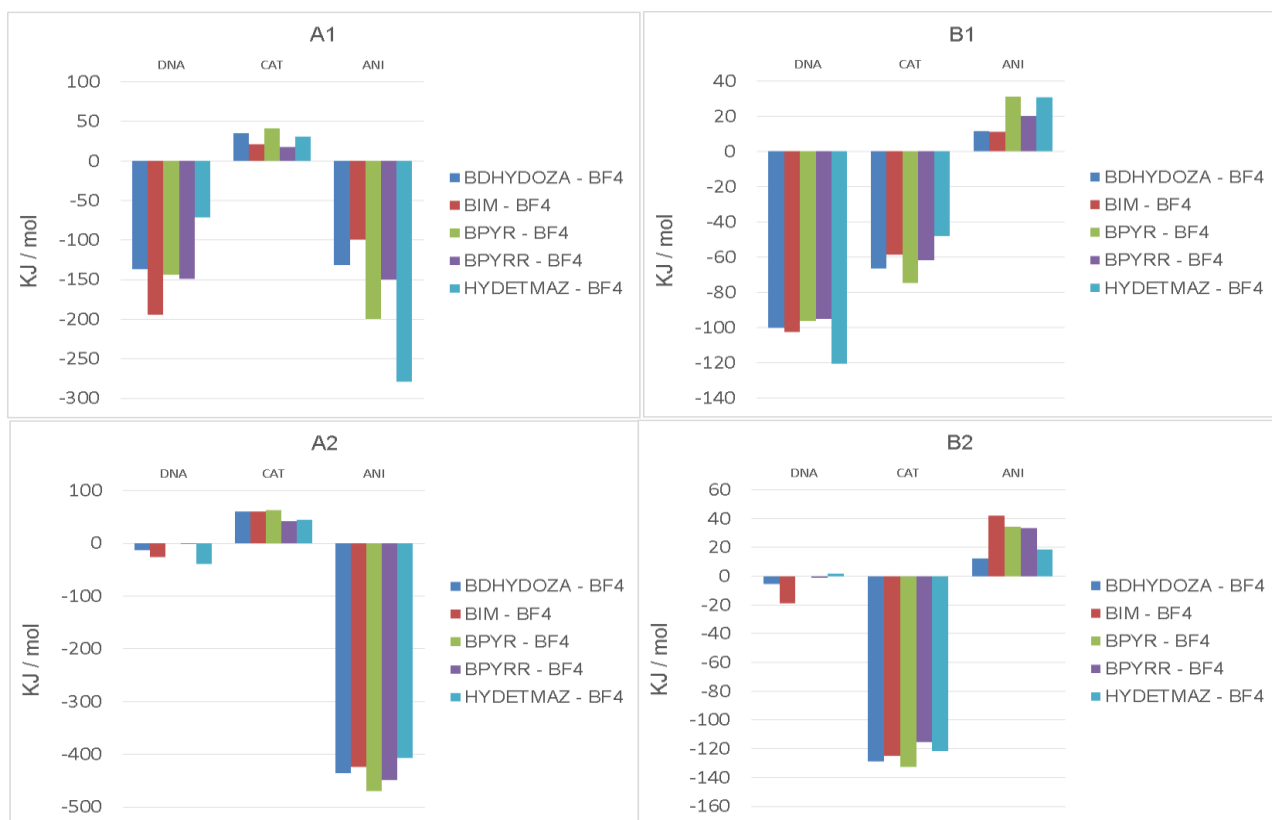


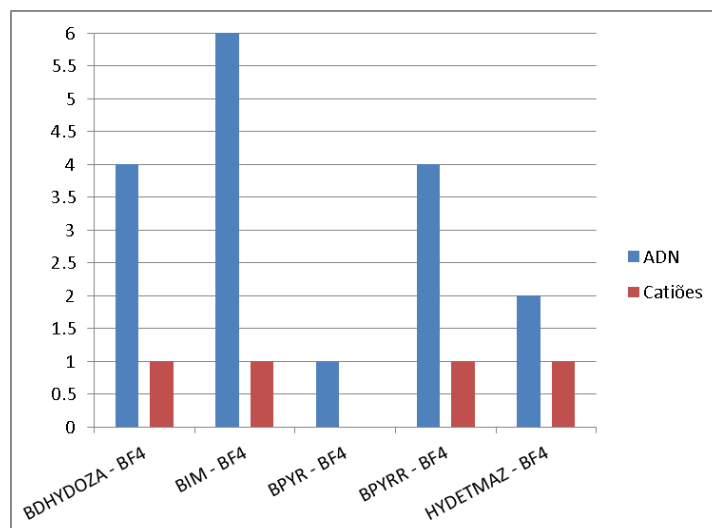
Figura 21- Representação da intercalação da Berberine em ADN, em RTIL $[BPYRR^+][PF_6^-]$ desde o ponto de intercalação até a saída completa da cadeia de ADN.

4.2.1.2 – DAPI

O DAPI é um intercalador de carga positiva +2. Devido à sua carga, a interação electrostática com os restantes intervenientes – ADN e Líquido Iónico – prevê-se mais forte.

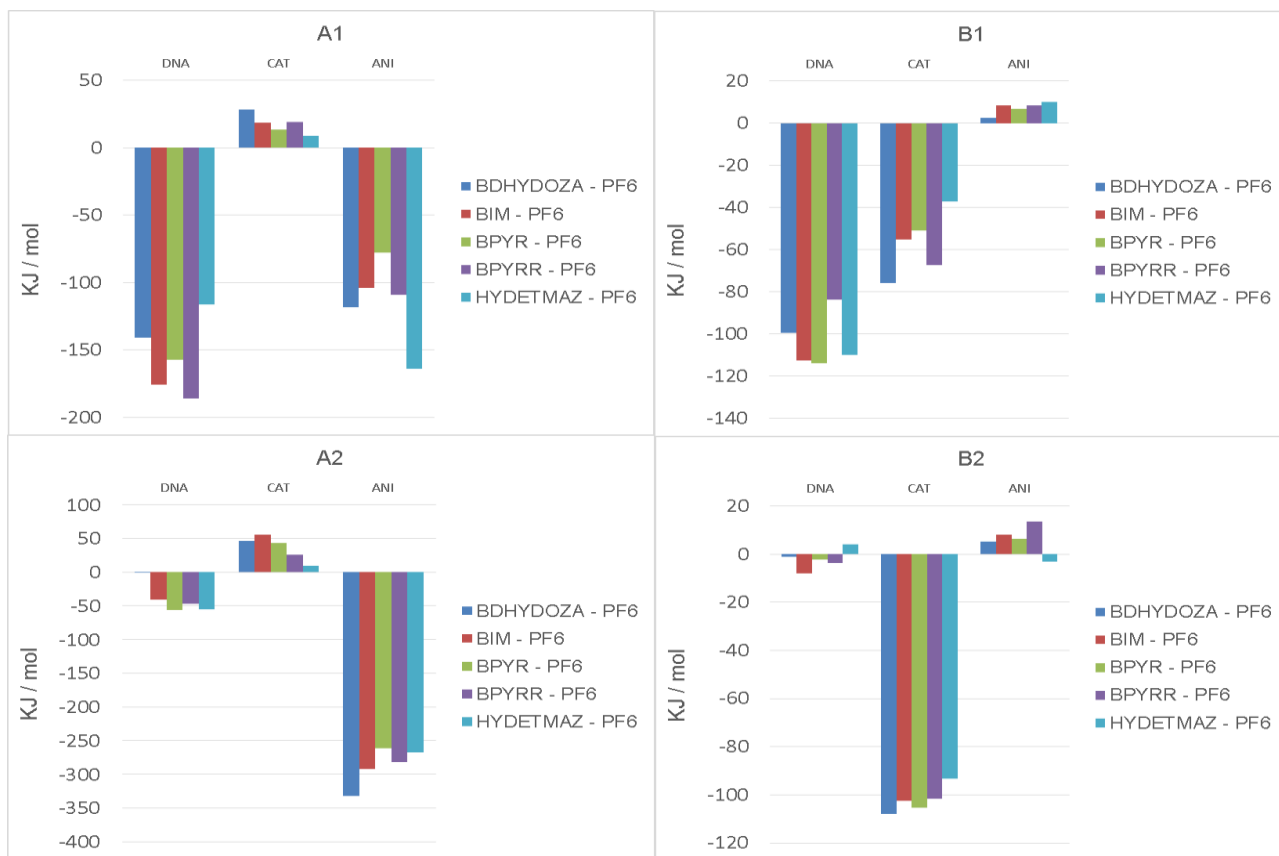


Histograma 6 – Resultados energéticos das interações de Coulomb e Van der Waals entre o intercalador e o ADN, os catiões e os aniões. Os histogramas A são relativos às interações de Coulomb (intercalação e livre em solução). Os histogramas B são relativos às interações de VdW (intercalação e livre em solução)

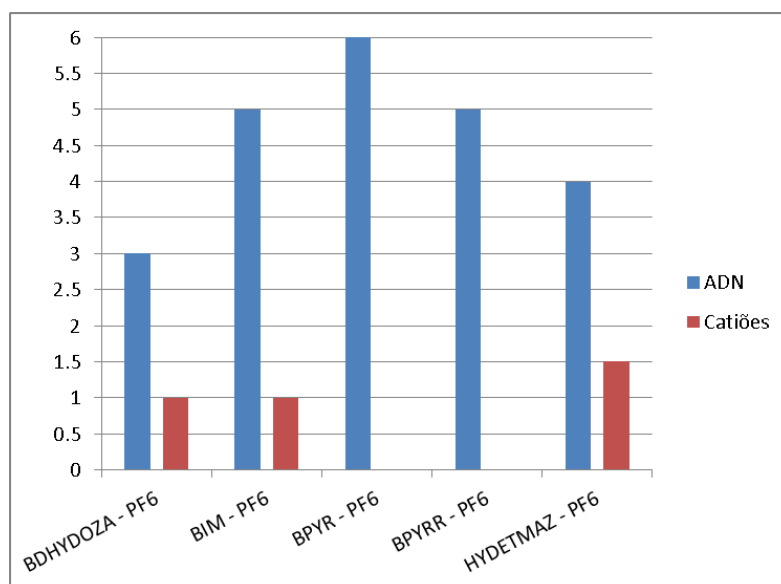


Histograma 7 – Descrição do comportamento médio da formação de pontes de Hidrogénio, no ponto de intercalação, criadas entre o intercalador DAPI e a cadeia de ADN e os catiões

Observando os histogramas 6 e 7, podemos verificar que a combinação catião-anião que apresenta os melhores resultados para uma intercalação forte é o [BIM⁺] [BF₄⁻]. Os valores para as interações electroestáticas, entre DAPI e o ADN são de -194.17KJ/mol. Para as interações de Van der Waals entre DAPI – ADN, o valor da energia medida é de -102.66KJ/mol. O [BIM⁺] também apresenta o maior número de pontes de Hidrogénio formadas no ponto de intercalação, que é de 6 pontes.



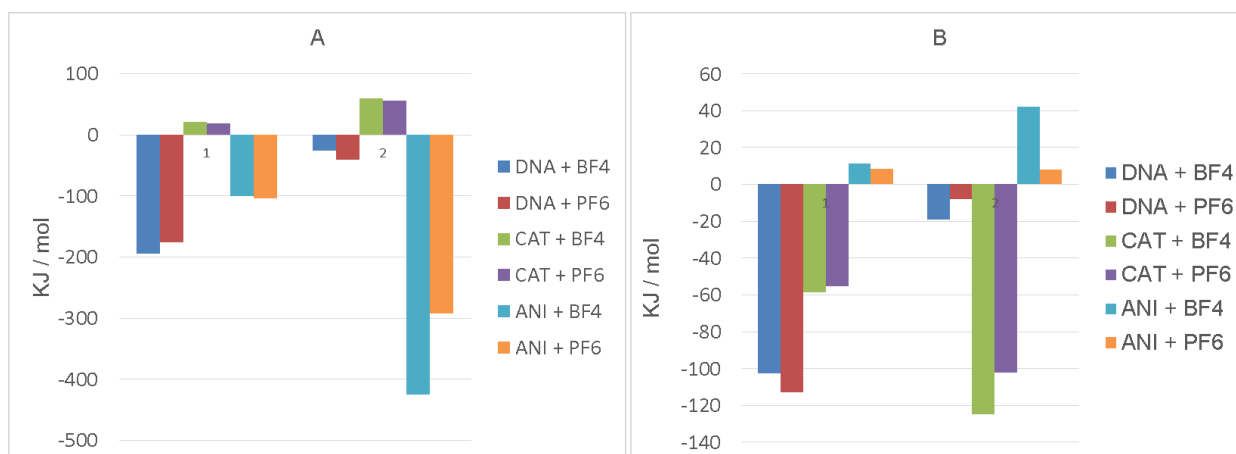
Histograma 8 - Resultados energéticos das interações de Coulomb e Van der Waals entre o intercalador e o ADN, os catiões e os aniões. Os histogramas A são relativos às interações de Coulomb (intercalação e livre em solução). Os histogramas B são relativos às interações de VdW (intercalação e livre em solução)



Histograma 9 – Descrição do comportamento médio da formação de pontes de Hidrogénio, no ponto de intercalação, criadas entre o intercalador DAPI e a cadeia de ADN e os catiões

Analisando agora as combinações com anião $[PF_6^-]$ observamos através do histograma 8, que a energia das interações de Coulomb, no ponto de intercalação, entre o DAPI e a cadeia de ADN é de -175.99KJ/mol . Para as interações de Van der Waals o valor medido é de -112.81KJ/mol . Nenhum destes valores é o mais alto, comparado com as combinações com os restantes catiões mas, adicionando a informação do histograma 9, o número de pontes de Hidrogénio no ponto de intercalação é de até 5 pontes formadas, o que sugere que esta será a melhor combinação DAPI – ADN – Líquido Iónico com o anião $[PF_6^-]$.

Depois deste estudo em que mantivemos o anião fixo, chegamos à conclusão que o catião $[BIM^+]$ apresenta os melhores resultados energéticos quando combinado com o anião $[BF_4^-]$ e com o anião $[PF_6^-]$. Os histogramas seguintes ilustram a comparação entre estes dois líquidos Iónicos.



Histograma 10 - histogramas de comparação das interações entre o intercalador e a cadeia de ADN e os líquidos iónicos (no ponto de intercalação e em solução), onde se manteve o mesmo catião $[BIM^+]$ e fez-se variar o anião. A - os valores para os potenciais de Coulomb e B – os valores para os potenciais de L-J

Comparando as energias das interações electrostáticas DAPI – ADN, o RTIL $[BIM^+][BF_4^-]$ apresenta um valor aproximadamente -21KJ/mol mais elevado do que o homólogo com o anião $[PF_6^-]$. No caso das interações de Van der Waals, o RTIL $[BIM^+][PF_6^-]$ é -10KJ/mol mais elevado. A nível da formação de pontes e Hidrogénio, o $[BIM^+][BF_4^-]$ apresenta 6 pontes de Hidrogénio

formadas no ponto de intercalação enquanto o [BIM⁺] [PF₆⁻] apenas apresenta 5 pontes.

Concluindo, ao nível de intercalação, o Líquido Iónico [BIM⁺] [BF₄⁻] possibilita a intercalação do DAPI no ADN de uma forma mais estável e forte, devido ao número de pontes de Hidrogénio e às interações de Coulomb serem elevadas e as de Van de Waals serem apenas ligeiramente mais baixas que o caso homólogo com anião [PF₆⁻].

As Imagens seguintes ilustram a intercalação do DAPI no ADN quando o Líquido Iónico é o [BIM⁺] [BF₄⁻].

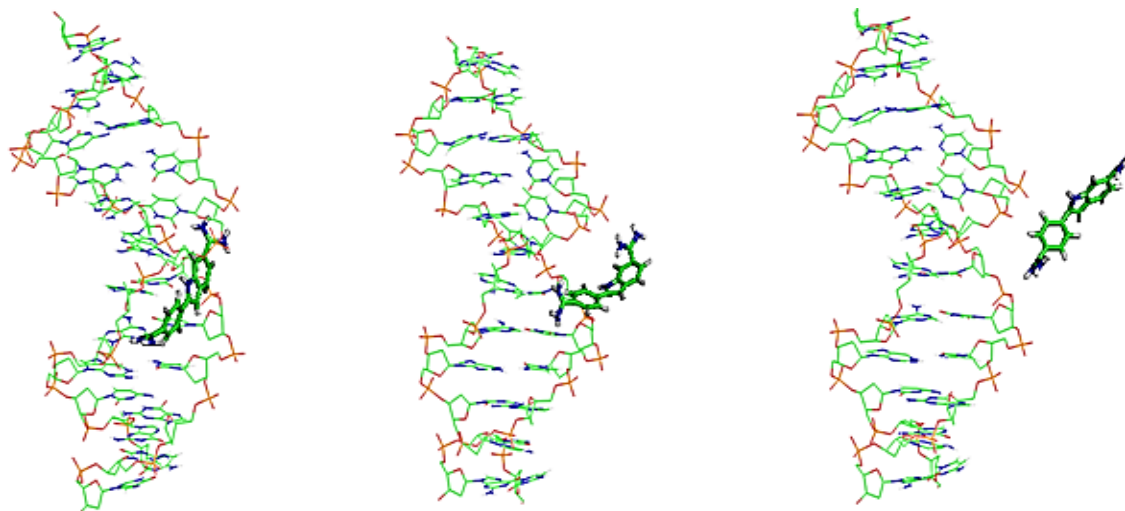
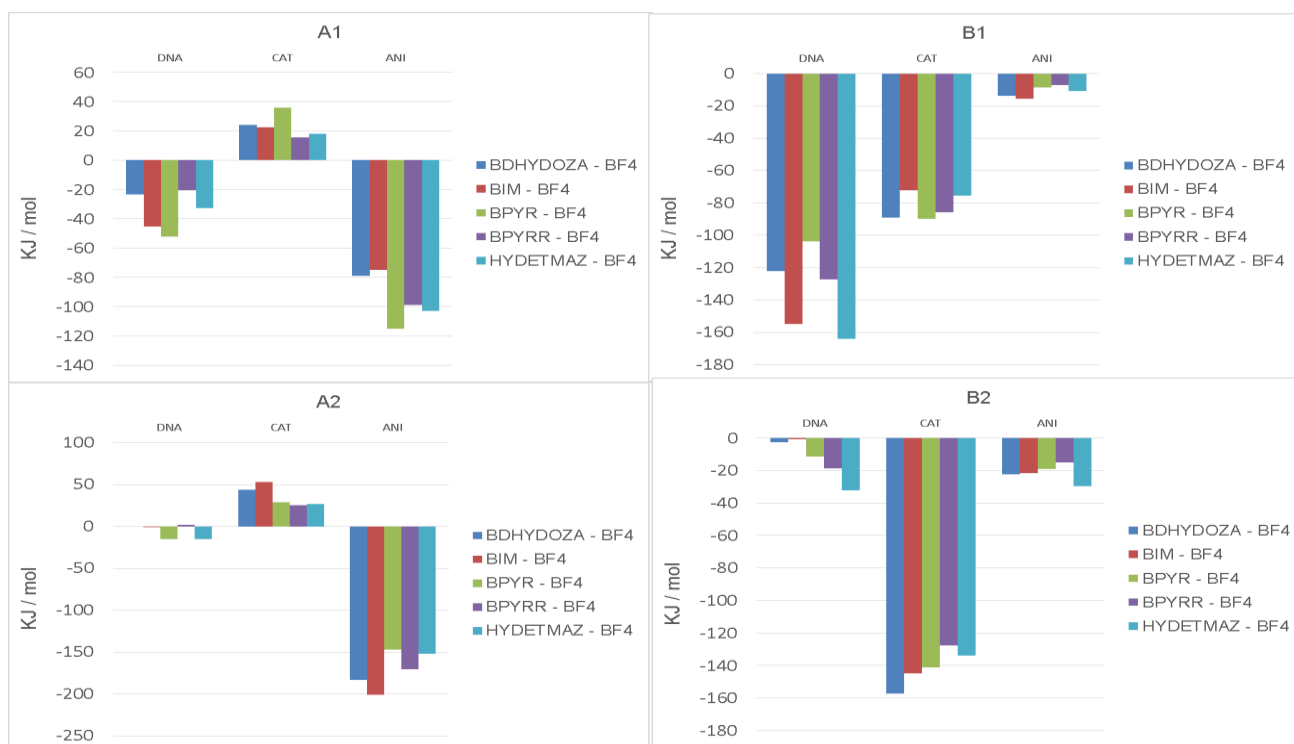


Figura 22 - Representação da intercalação do DAPI em ADN, em RTIL [BIM⁺] [BF₄⁻] desde o ponto de intercalação até a saída completa da cadeia de ADN.

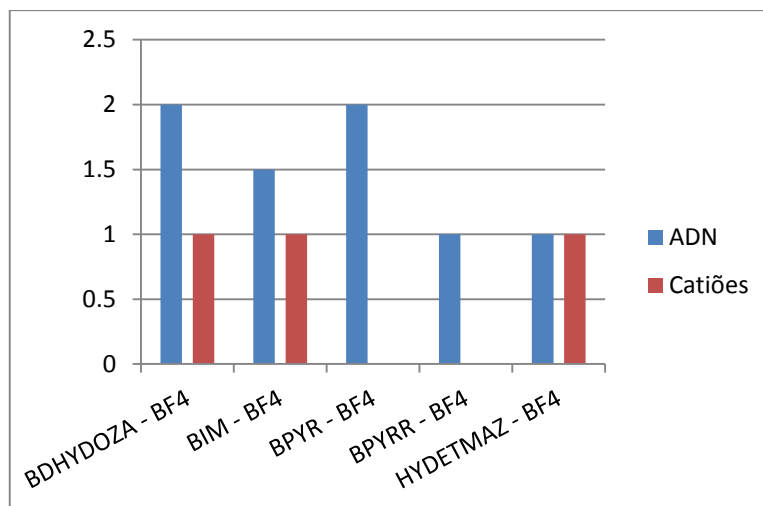
4.2.1.3 – Etídio

O Etídio é um intercalador com carga positiva +1. Tem preferência para intercalar entre os pares de base C-G. O histograma 7 reflete os resultados para o estudo das combinações onde se fez variar o catião e manteve-se o mesmo anião [BF₄].

Numa primeira observação, podemos ver que as interações electrostáticas entre o Etídio e a cadeia de ADN são as mais baixas medidas até agora. Podemos, então, confirmar que o local onde se realiza a intercalação – entre os pares de base C-G ou entre A-T – influencia a forma como o intercalador irá interagir electrostaticamente com a cadeia de ADN.

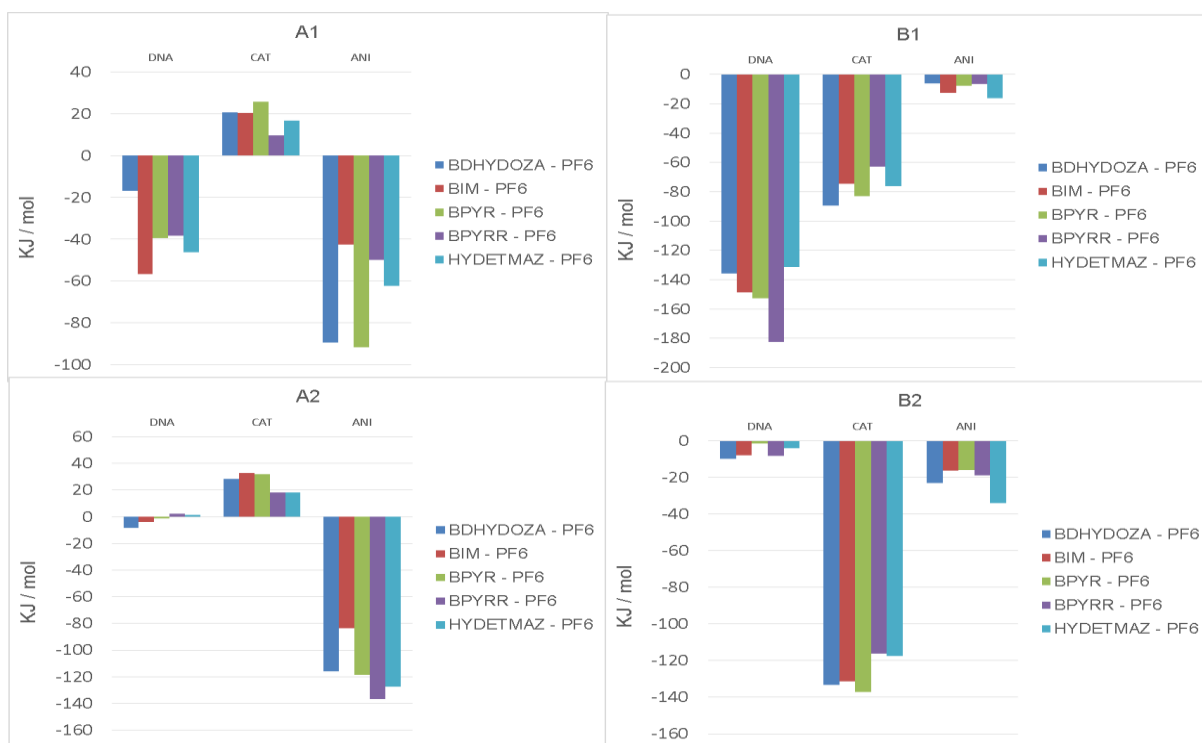


Histograma 11 – Resultados energéticos das interações de Coulomb e Van der Waals entre o intercalador e o ADN, os catiões e os aniões. Os histogramas A são relativos às interações de Coulomb (intercalação e livre em solução). Os histogramas B são relativos às interações de VdW (intercalação e livre em solução)

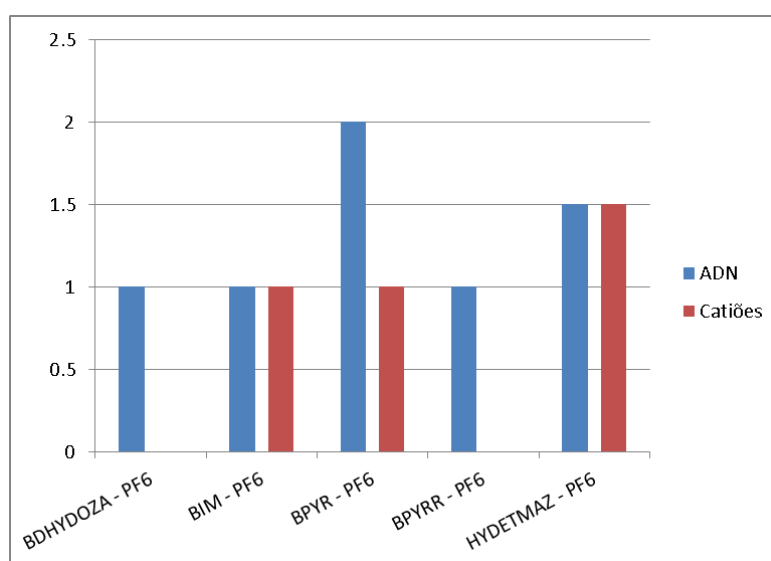


Histograma 12 – Descrição do comportamento médio da formação de pontes de Hidrogénio, no ponto de intercalação, criadas entre o intercalador Etidio e a cadeia de ADN e os catiões

Estudando os valores do histograma 11, e observando os resultados sobre a formação de pontes de Hidrogénio – histograma 12, é possível sugerir que a combinação do catião [HYDETMAZ⁺] com o anião [BF₄⁻] oferece as melhores condições para uma intercalação mais forte e estável do Etidio com a cadeia de ADN. A energia calculada para as interações de Coulomb entre Etidio e o ADN é de -32.62KJ/mol e para as interações de Van der Waals é de -163.62KJ/mol. No ponto de intercalação o número de pontes médio é de 1.5. Este comportamento mantém-se ao longo da distância medida.



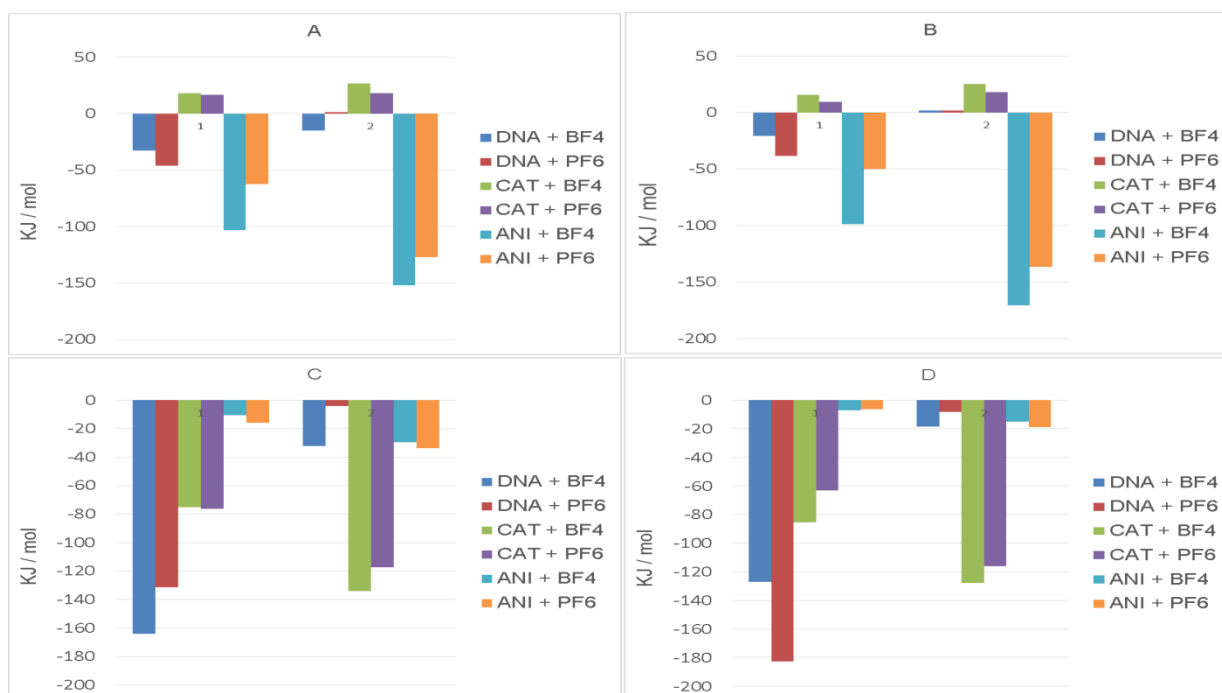
Histograma 13 – Resultado s energéticos das interações de Coulomb e Van der Waals entre o intercalador e o ADN, os catiões e os aniões. Os histogramas A são relativos às interações de Coulomb (intercalação e livre em solução). Os histogramas B são relativos às interações de VdW (intercalação e livre em solução)



Histograma 14 – Descrição do comportamento médio da formação de pontes de Hidrogénio, no ponto de intercalação, criadas entre o intercalador Etídio e a cadeia de ADN e os catiões

Passamos agora para o estudo do anião $[PF_6^-]$. Pela análise dos histogramas 13 e 14, podemos observar que o catião $[BPYRR^+]$ apresenta os valores mais elevados para as interações de Van der Waals, entre o Etídio e a cadeia de ADN, com o valor de -182.63KJ/mol . No caso das interações de Coulomb, o valor de -38.39KJ/mol já não se encontra entre os mais elevados da série. Apesar de não ser o mais elevado, no conjunto das interações electroestáticas + Van der Waals, a intercalação do Etídio é mais forte quando o Líquido Iónico contém o ião $[BPYRR^+]$. Ao nível das pontes de Hidrogénio, o $[BPYRR^+]$ apenas apresenta uma no ponto de intercalação. É relevante apontar que, a ausência de pontes formadas com o catião, no ponto de intercalação, favorece a estabilidade da intercalação do Etídio.

Feito o estudo para cada anião, comparamos agora os dois Líquidos Iónicos escolhidos – $[HYDETMAZ^+][BF_4^-]$ e $[BPYRR^+][PF_6^-]$. O histogramas seguinte – histograma 9 – representam a comparação, para o mesmo catião, entre os aniões $[BF_4^-]$ e $[PF_6^-]$



Histograma 15 - histogramas de comparação das interações entre o intercalador e a cadeia de ADN e os líquidos iónicos (no ponto de intercalação e em solução), onde se manteve o mesmo catião e fez-se variar o anião. A e C - os valores para os potenciais de Coulomb e L-J, com o catião $[HYDETMAZ^+]$; B e D - os mesmos potenciais medidos com o catião $[BPYRR^+]$.

A intercalação do Etídio solvatada com o RTIL [BPYRR⁺] [PF₆⁻] apresenta os melhores resultados energéticos, com uma diferença de aproximadamente -30KJ/mol. O comportamento das pontes de Hidrogénio, entre o Etídio e a cadeia de ADN, é semelhante nos dois casos estudados mas, no caso do [BPYRR⁺] [PF₆⁻], o número de pontes formadas ao longo da distância, com o catião, é menor, o que possibilita uma intercalação mais estável entre a molécula de Etídio e a cadeia de ADN.

Em suma, dado o conjunto de resultados analisados para estes dois Líquidos Iónicos, aquele que possibilita uma intercalação do Etídio mais estável, e forte, e que também possibilita um caminho mais facilitado para a intercalação é o Líquido Iónico [BPYRR⁺] [PF₆⁻].

Para visualizar como é a intercalação do Etídio, quando o solvente é o RTIL [BPYRR⁺] [PF₆⁻], temos as seguintes imagens.

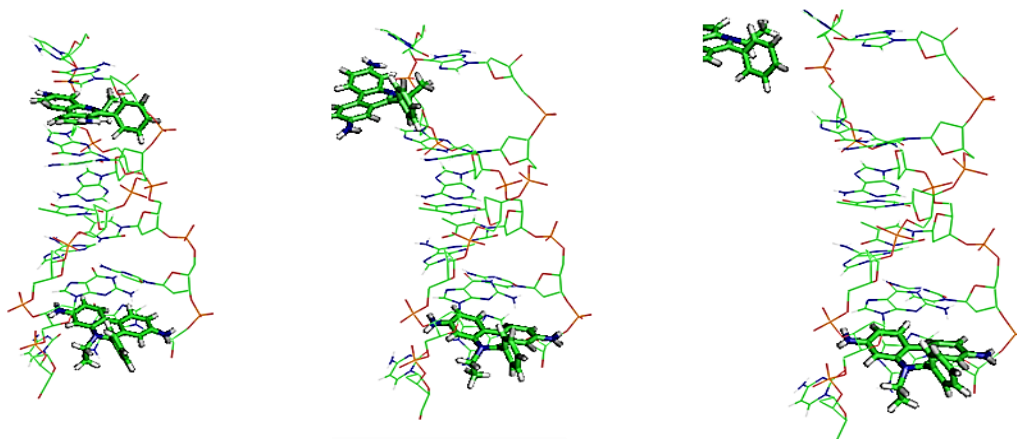
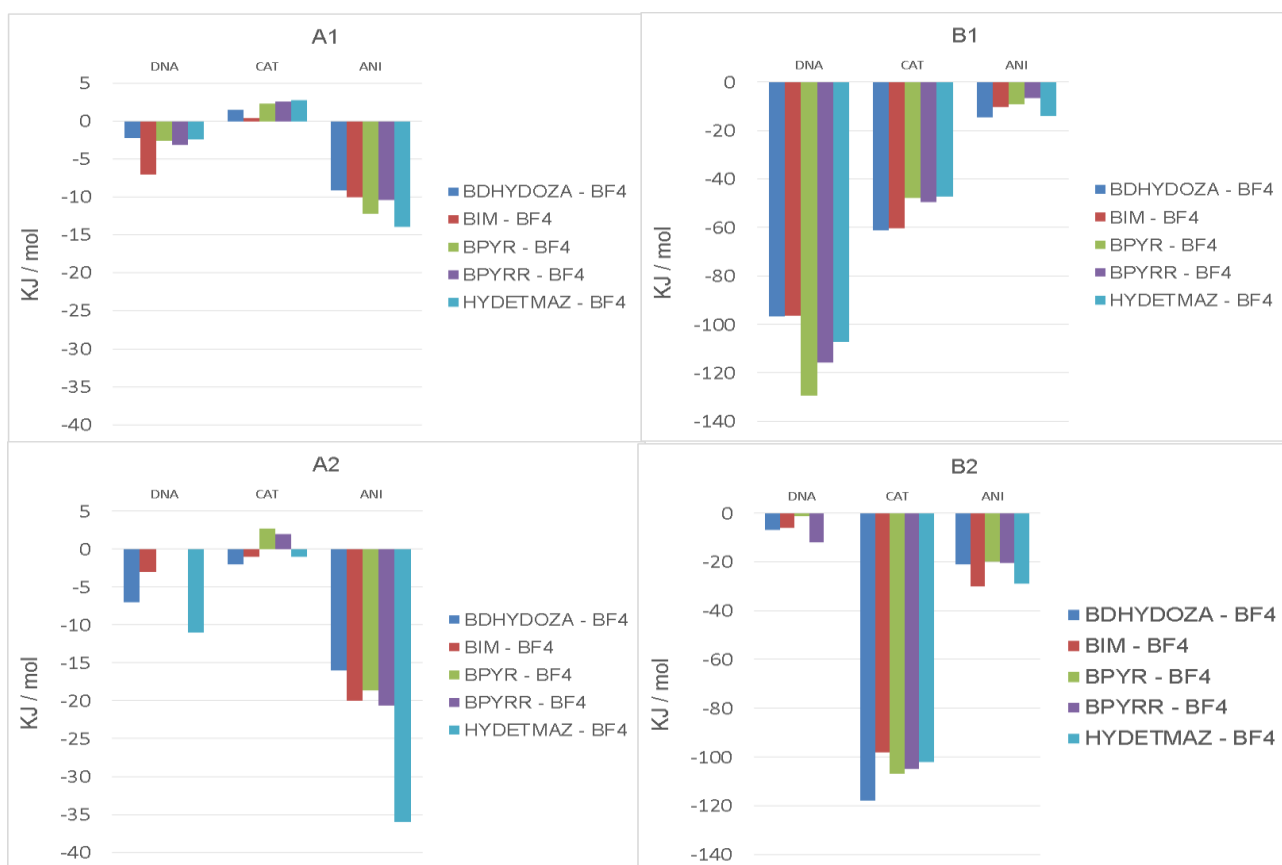


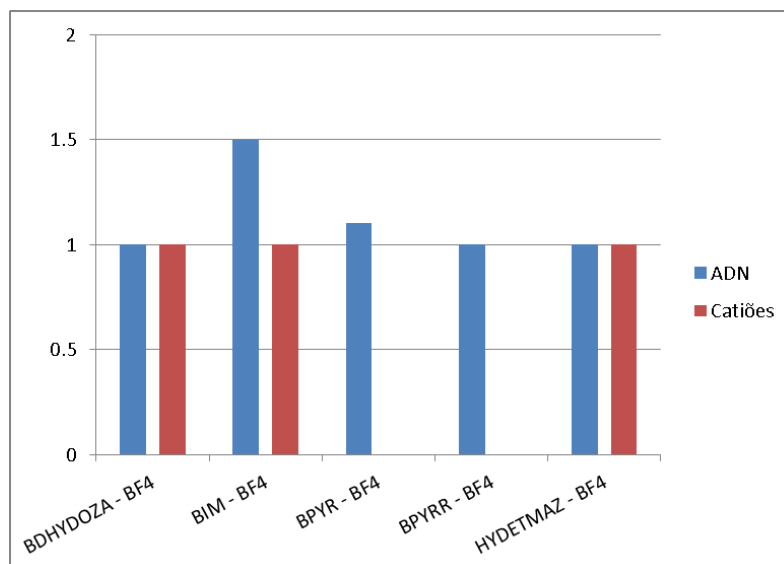
Figura 23- Representação da intercalação do Etídio em ADN, em RTIL [BPYRR⁺] [PF₆⁻] desde o ponto de intercalação até a saída completa da cadeia de ADN.

4.2.1.4 – Proflavine

A Proflavine é o único intercalado com carga neutra que estudamos. É também o intercalador mais pequeno. Tem preferência por uma intercalação entre os pares de base C-G. Podemos observar pelo histograma 10 que, o facto de a molécula apresentar carga neutra traduz-se em interações electrostáticas reduzidas. Também de notar que o facto de a Proflavine ser um intercalador pequeno, quando comparado com os outros estudados, as interações de Van der Waals serão também mais reduzidas.

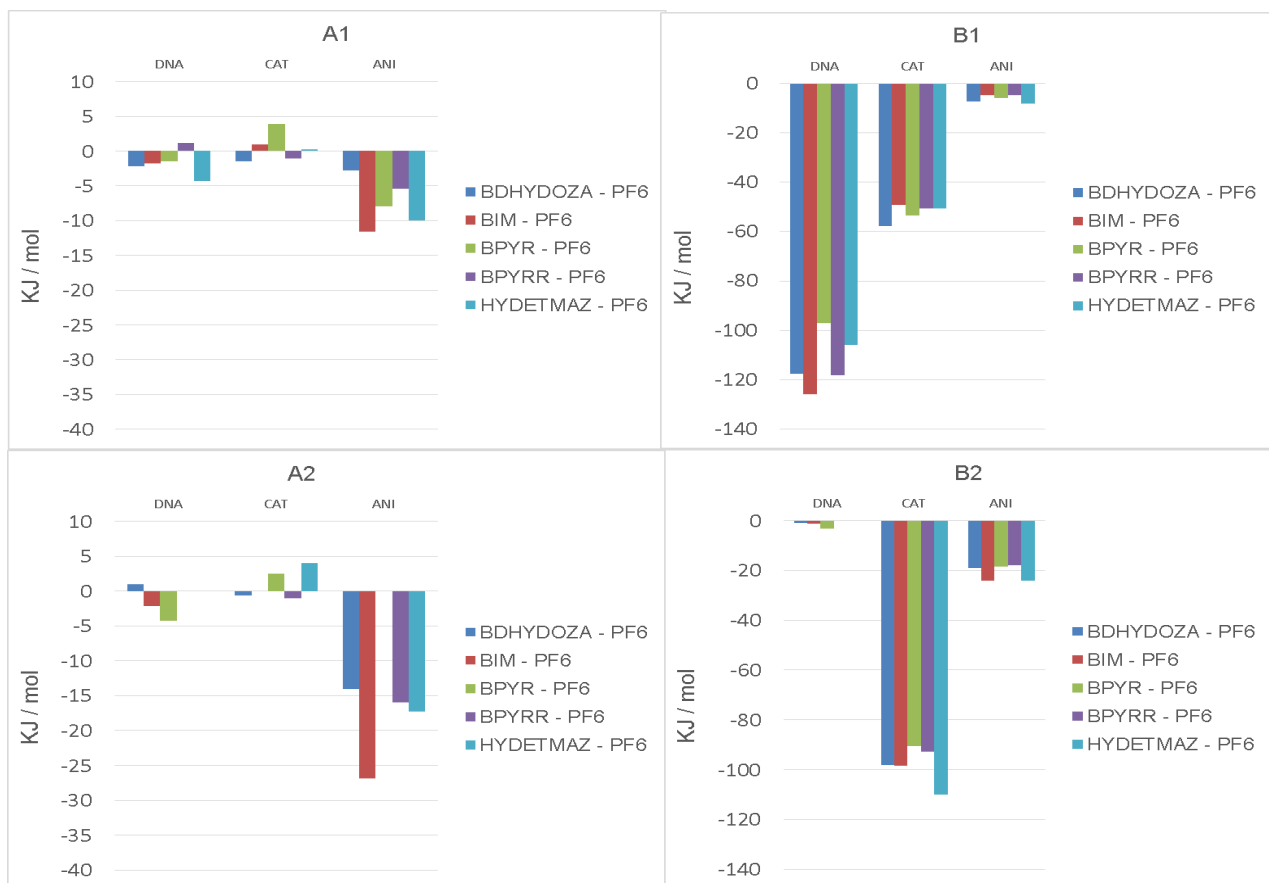


Histograma 16 – Resultados energéticos das interações de Coulomb e Van der Waals entre o intercalador e o ADN, os cátions e os aniões. Os histogramas A são relativos às interações de Coulomb (intercalação e livre em solução). Os histogramas B são relativos às interações de VdW (intercalação e livre em solução)

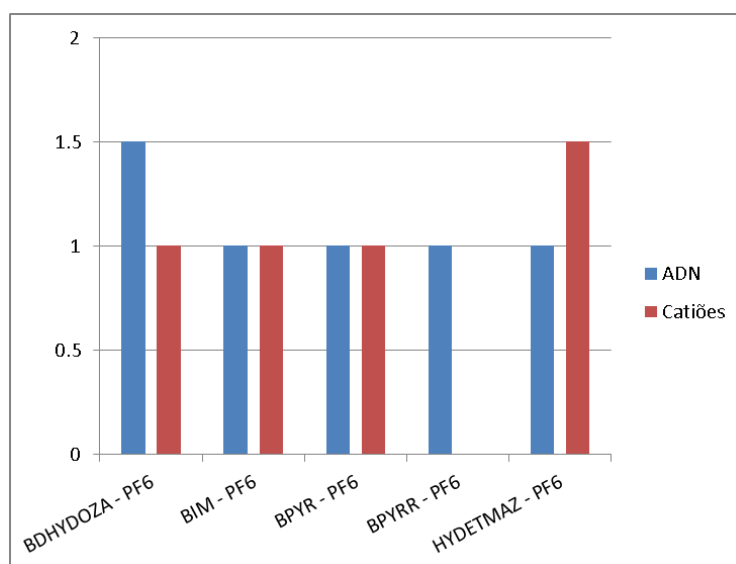


Histograma 17 – Descrição do comportamento médio da formação de pontes de Hidrogénio, no ponto de intercalação, criadas entre o intercalador Proflavine e a cadeia de ADN e os catiões

Através da análise dos histogramas 16 e 17, é possível sugerir que, no conjunto dos resultados analisados desta série, o catião [BPYR⁺] apresenta os melhores resultados para a intercalação. O valor das energias das interações electrostáticas é baixo em todos os casos, dada a neutralidade da molécula Proflavine. No caso das interações de VdW, entre a Proflavine e a Cadeia de ADN solvatada com o RTIL [BPYR⁺] [BF₄⁻], apresentam os valores mais elevados, com o valor de -129.34KJ/mol. Ao nível das pontes de Hidrogénio, não foi observada a formação de pontes com os catiões [BPYR⁺], principalmente junto ao ponto de intercalação. Este facto facilita uma intercalação mais estável entre a Proflavine e o ADN, neste RTIL.



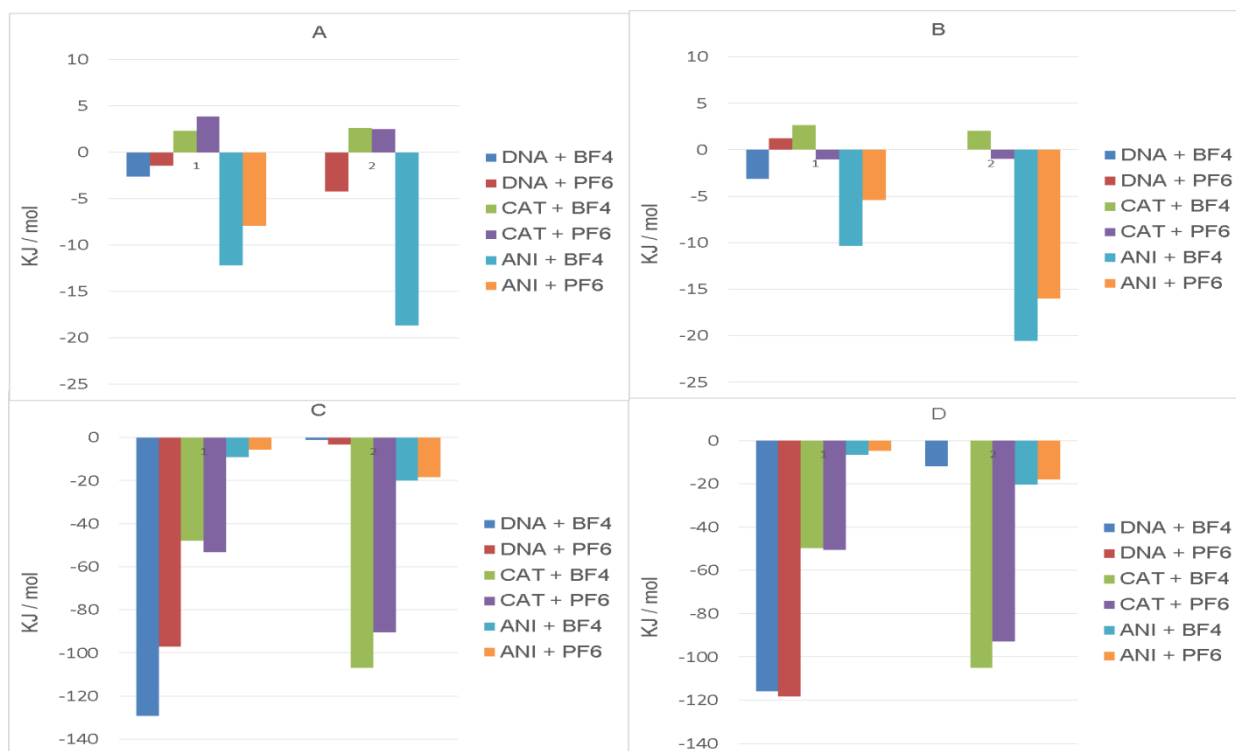
Histograma 18 - Resultados energéticos das interações de Coulomb e Van der Waals entre o intercalador e o ADN, os catiões e os aniões. Os histogramas A são relativos às interações de Coulomb (intercalação e livre em solução). Os histogramas B são relativos às interações de VdW (intercalação e livre em solução)



Histograma 19 – Descrição do comportamento médio da formação de pontes de Hidrogénio, no ponto de intercalação, criadas entre o intercalador Proflavine e a cadeia de ADN e os catiões

Analisando o histograma 18 e 19, verificamos que o [BPYRR⁺] é o catião que, no conjunto total dos resultados, apresenta as melhores condições para uma intercalação. As interações de Van der Waals apresentam uma energia de -118.23KJ/mol. No ponto de Intercalação apenas se contabiliza uma pontes formada com a cadeia de ADN, não sendo contabilizadas pontes com o catião na intercalação, o que favorece a estabilidade desta, quando o catião usado é o [BPYRR⁺].

Realizamos agora o estudo comparativo dos entre os dois Líquidos Iônicos, [BPYR⁺] [BF₄⁻] e [BPYRR⁺] [PF₆⁻], para, assim, escolher qual é o Líquido Iônico que promove uma melhor intercalação da Proflavine na cadeia de ADN.



Histograma 20 – histogramas de comparação das interações entre o intercalador e a cadeia de ADN e os líquidos iônicos (no ponto de intercalação e em solução), onde se manteve o mesmo catião e fez-se variar o anião. A e C - os valores para os potenciais de Coulomb e L-J, com o catião [BPYR⁺]; B e D - os mesmos potenciais medidos com o catião [BPYRR⁺].

Analisando o efeito dos aniões nos dois casos, verificamos que para o catião [BPYR⁺], a Intercalação da Proflavine é mais forte quando o anião usado é o [BF₄⁻]. No caso do catião [BPYRR⁺], as diferenças nas interações entre a Proflavine – Cadeia de ADN são quase inexistentes. O anião [BF₄⁻] apresenta as interações mais fortes com a Proflavine do que o anião [PF₆⁻].

Comparando, agora, os Líquidos Iônicos escolhidos, é possível sugerir que o [BPYR⁺] [BF₄⁻] apresenta o melhor conjunto de resultados que promovem uma intercalação mais forte e estável da Proflavine. As imagens seguintes ilustram a intercalação da Proflavine no ADN, usando o RTIL [BPYR⁺] [BF₄⁻].

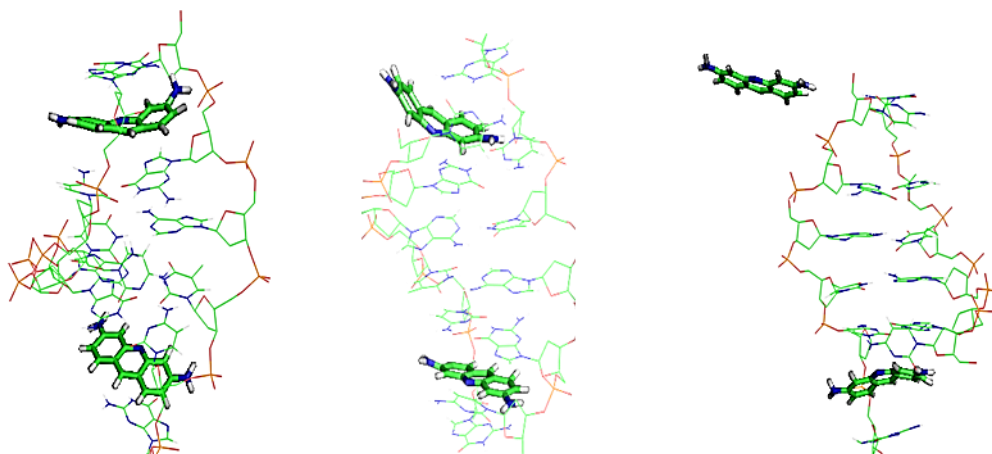
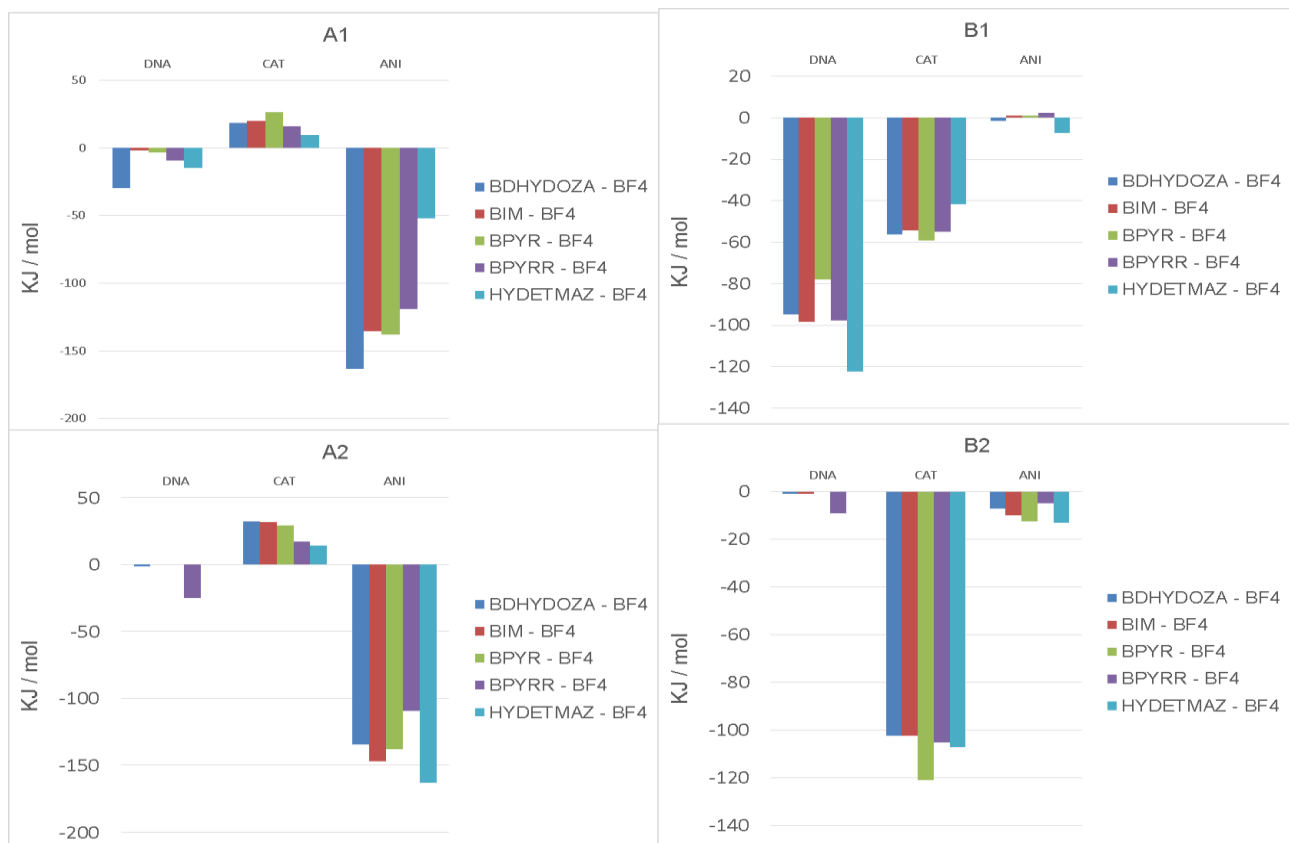


Figura 24 - Representação da intercalação da Proflavine em ADN, em RTIL [BPYR⁺] [BF₄⁻] desde o ponto de intercalação até a saída completa da cadeia de ADN.

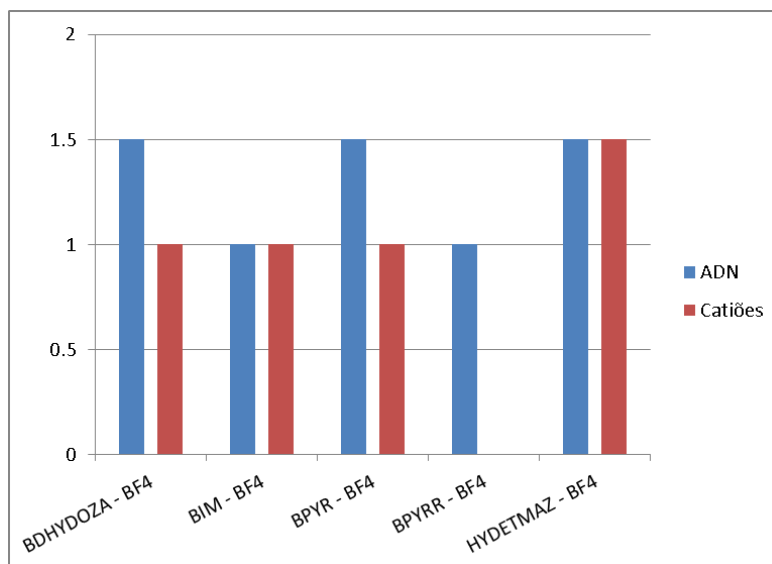
4.2.1.5 – Proflavine Reduzida

Depois de estudarmos a Proflavine, estudamos agora a molécula Proflavine na forma reduzida, ou seja, com uma carga positiva +1.

O histograma 21 ilustra os dados relativos às energias das interações de Coulomb e Van der Waals medidas entre o intercalador e a cadeia de ADN, os catiões e os aniões, quando o anião usado é o [BF₄-].



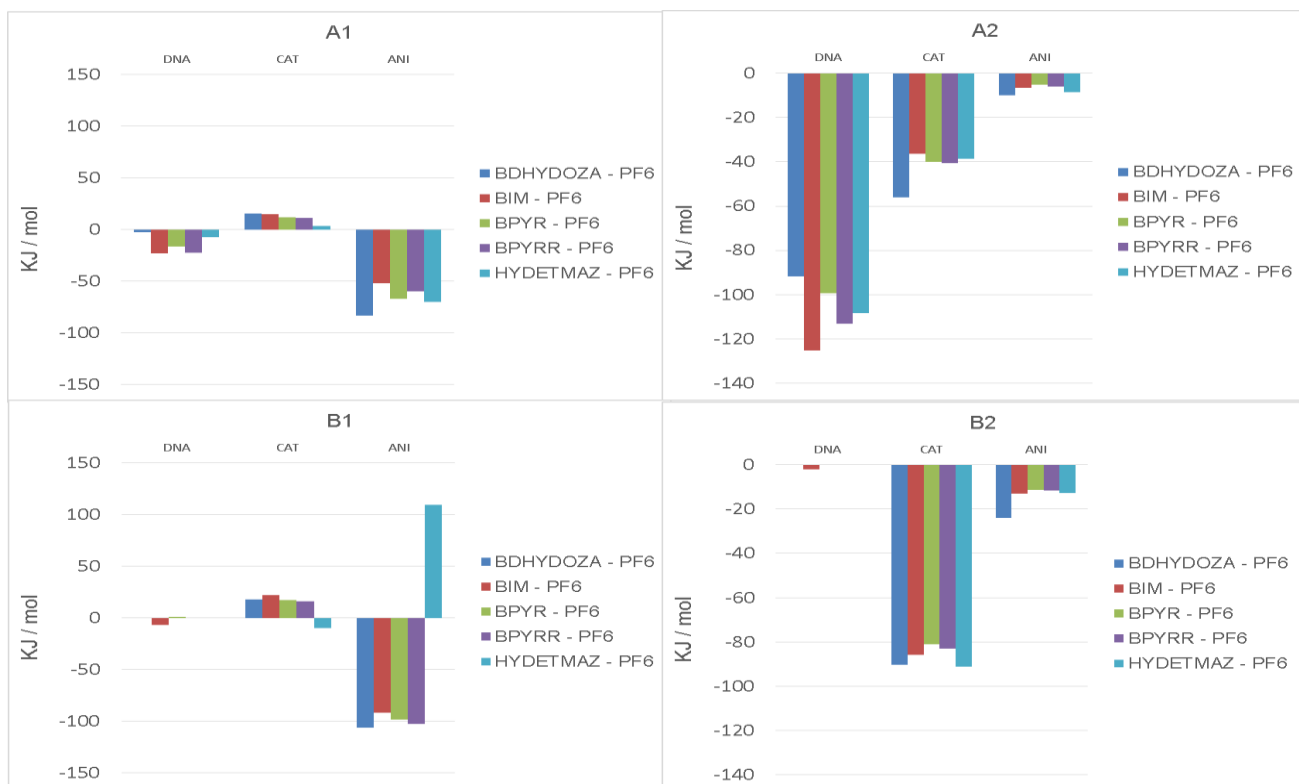
Histograma 21 – Resultados energéticos das interações de Coulomb e Van der Waals entre o intercalador e o ADN, os catiões e os aniões. Os histogramas A são relativos às interações de Coulomb (intercalação e livre em solução). Os histogramas B são relativos às interações de VdW (intercalação e livre em solução)



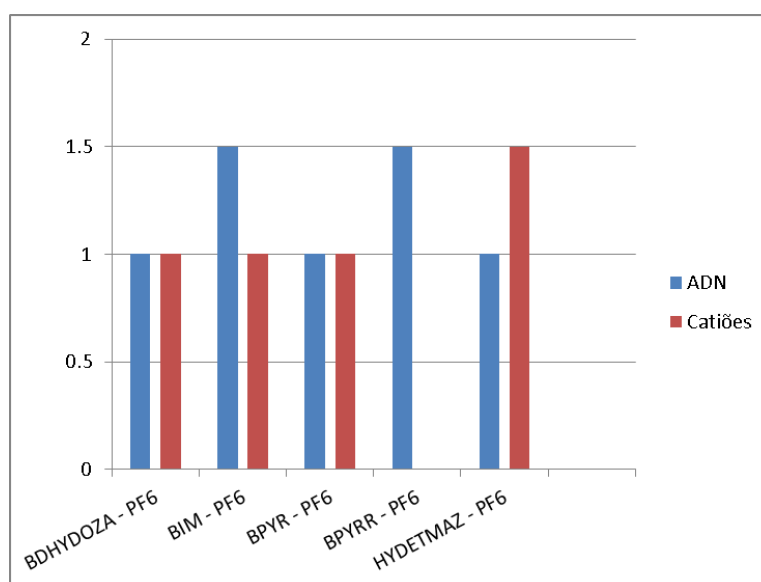
Histograma 22 – Descrição do comportamento médio da formação de pontes de Hidrogénio, no ponto de intercalação, criadas entre o intercalador Proflavine Reduzida e a cadeia de ADN e os catiões

O facto de a Proflavine estar no seu estado reduzido, aumentou o energia das interações electrostáticas, com os aniões, em 100KJ/mol, o que torna relevante o efeito do anião na intercalação.

Com o RTIL [HYDETMAZ⁺] [BF₄⁻], as interações de Coulomb com o anião, são mais fracas no ponto de intercalação e, as interações de Van der Waals entre o Intercalador e a cadeia de ADN, são as mais energéticas, apresentando um valor de -122.2KJ/mol. Analisando a formação de pontes de Hidrogénio – histograma 22 - o [HYDETMAZ⁺] [BF₄⁻] apresenta o maior número de pontes formadas, entre o intercalador e a cadeia de ADN, no ponto de intercalação. O conjunto destes resultados promove uma intercalação mais favorável neste RTIL.



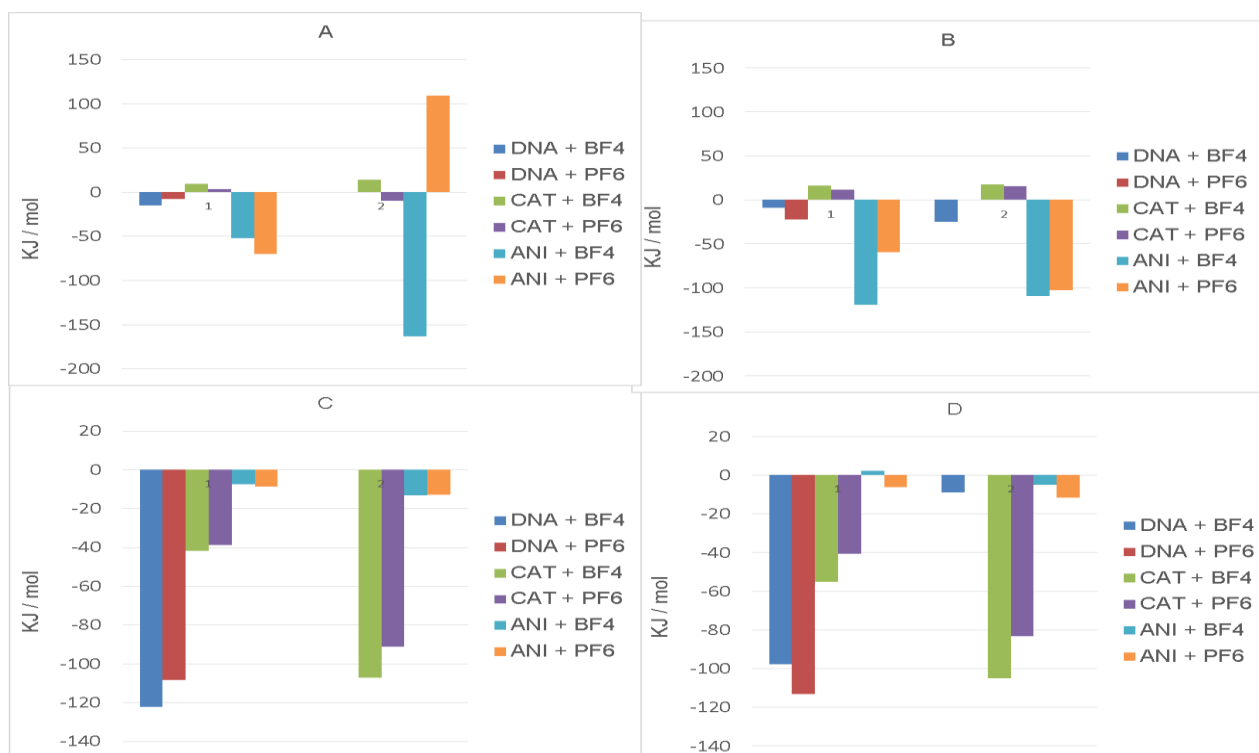
Histograma 23 – Resultados energéticos das interações de Coulomb e Van der Waals entre o intercalador e o ADN, os catiões e os aniões. Os histogramas A são relativos às interações de Coulomb (intercalação e livre em solução). Os histogramas B são relativos às interações de VdW (intercalação e livre em solução)



Histograma 24 – Descrição do comportamento médio da formação de pontes de Hidrogénio, no ponto de intercalação, criadas entre o intercalador Proflavine Reduzida e a cadeia de ADN e os catiões

O histograma 23 ilustra os resultados relativos ao estudo do anião [PF6⁻]. O catião que apresenta o conjunto de valores energéticos mais elevados para as interações de Coulomb e VdW é o [BPYRR⁺]. O valor da energia das interações de Van der Waals entre a Proflavine Reduzida e a cadeia de ADN é de -113.27KJ/mol. Ao nível da formação de pontes de Hidrogénio – histograma 24, apenas são contabilizadas pontes formas com o ADN, com o número médio de 1.5 no ponto de intercalação. De notar que não existem pontes formadas com os catiões, o que favorece a intercalação da Proflavine Reduzida.

Procedemos à comparação entre os dois Líquidos Iónicos estudados – [HYDETMAZ⁺] [BF4⁻] e [BPYRR⁺] [PF6⁻]. O histograma seguinte representa a comparação entre estes dois catiões, mudando o anião. Desta forma estudaremos a influência do anião, na Intercalação da Proflavine Reduzida.



Histograma 25 – histogramas de comparação das interações entre o intercalador e a cadeia de ADN e os líquidos iónicos (no ponto de intercalação e em solução), onde se manteve o mesmo catião e fez-se variar o anião. A e C - os valores para os potenciais de Coulomb e L-J, com o catião [HYDETMAZ⁺]; B e D - os mesmos potenciais medidos com o catião [BPYRR⁺].

O anião $[PF_6^-]$, quando combinado com o catião $[HYDETMAZ^+]$, exerce um efeito de repulsão electrostática na Proflavine Reduzida, quando esta se encontra longe do ponto de intercalação. Ao nível das interações de Van der Waals, o anião não exerce muita influência em ambos os casos. Comparando a influência dos dois aniões, quando combinados com o mesmo catião, reparamos que, no caso do $[HYDETMAZ^+]$, as interações entre o intercalador e a cadeia de ADN são ligeiramente mais fortes quando o anião usado é o $[BF_4^-]$. No caso do $[BPYRR^+]$, as interações electrostáticas entre o anião $[PF_6^-]$ e o intercalador são mais fracas, o que promove uma intercalação mais estável e forte entre a Proflavine Reduzida e a cadeia de ADN. É, então, possível concluir que a forma como o anião interage com o intercalador, vai influenciar a estabilidade e a força da ligação entre o intercalador e a cadeia de ADN.

No conjunto total dos dados analisados, o $[BPYRR^+]$ $[PF_6^-]$ apresentou o melhor conjunto de resultados, sugerindo que este Líquido Iónico promove uma intercalação mais forte e estável da Proflavine Reduzida.

As imagens seguintes ilustram a intercalação da Proflavine Reduzida no ADN, usando o RTIL $[BPYRR^+]$ $[PF_6^-]$.

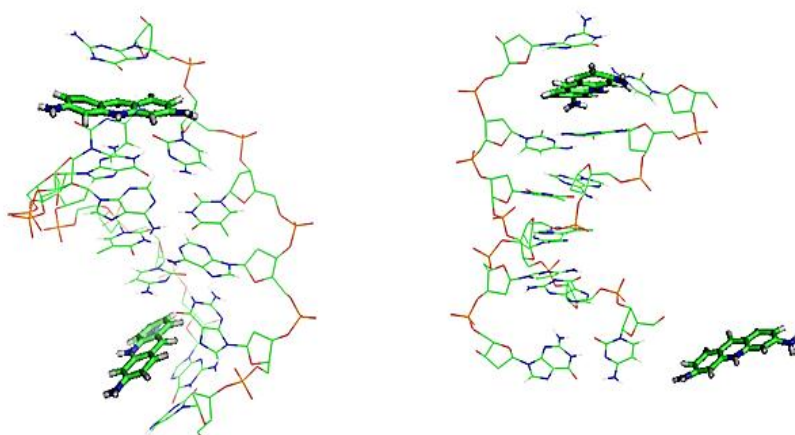
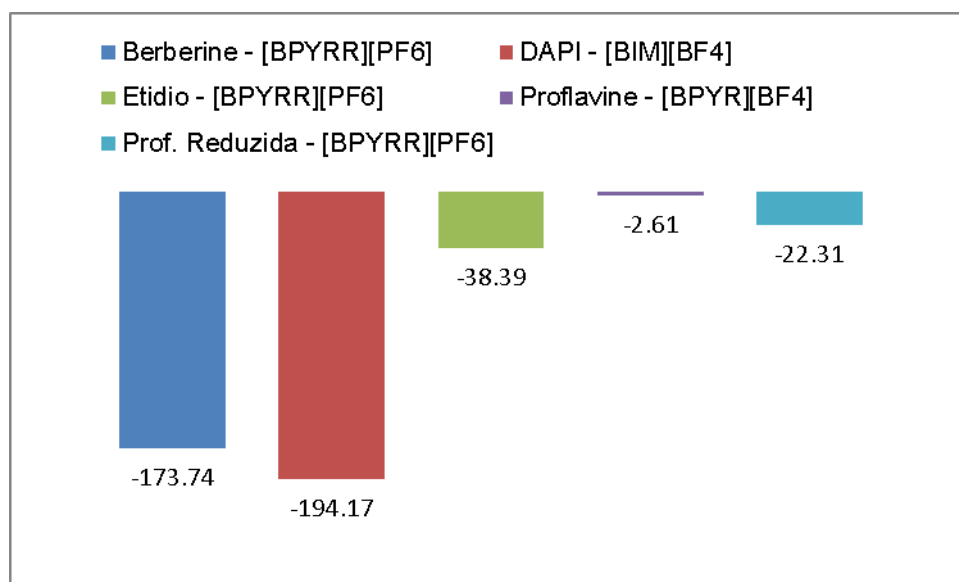


Figura 25 - Representação da intercalação da Proflavine Reduzida em ADN, em RTIL $[BPYRR^+]$ $[PF_6^-]$ desde o ponto de intercalação até a saída completa da cadeia de ADN.

4.1.3 – Comparação entre os RTILs com os melhores resultados quanto às interações de Coulomb, VdW e formação de pontes de Hidrogénio

Comparar os melhores resultados de cada intercalador com o intuito de ser capazes de sugerir, ao nível das interações energéticas, qual o intercalador que apresenta a intercalação mais forte e, também, uma análise sobre os Líquidos Iónicos usados.

A comparação dos vários intercaladores quanto às interações de Coulomb com a cadeia de ADN é feita através do histograma 26.



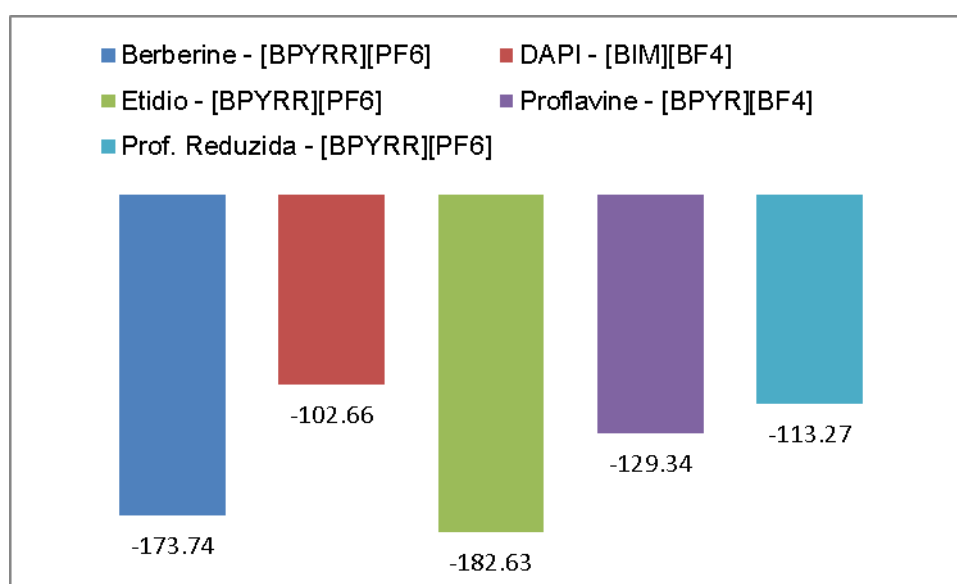
Histograma 26 - Comparação entre os vários Intercaladores quanto às interações de Coulomb com a cadeia de ADN. Valores em KJ/mol

Como podemos observar o intercalador que apresenta a interação electrostática mais forte é o DAPI. Isto prende-se com o facto de o DAPI ser um intercalador de carga positiva +2. Um intercalador que também apresenta uma interação elevada é a Berberine. Apesar de este intercalador apresentar uma carga positiva +1, o seu local de intercalação é entre os pares de base A-T. A diferença entre os locais de intercalação sugere que, quando a intercalação é feita entre os pares de base A-T as interações electrostáticas são mais acentuadas, apresentando valores máximos de aproximadamente -

195KJ/mol. No caso das interações verificadas entre os pares de base C-G, estas atingem o máximo de -40KJ/mol.

Podemos então verificar que, após o estudo intercaladores de cargas 0, +1 e +2; e de se estudar pontos de intercalação em pares de base diferentes, concluímos que o facto da carga, apesar de importante no que toca à promoção de uma intercalação mais forte, o seu efeito é mais relevante quando o intercalador se encontra intercalado em sanduiche ou nas *minor groove* dos pares de base A-T.

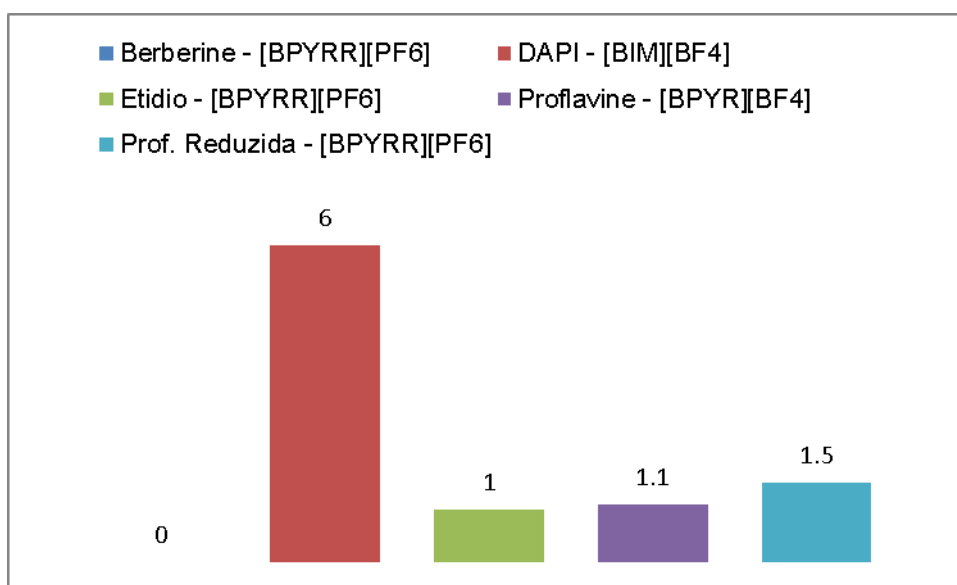
As interações de Van der Waals entre os intercaladores e a cadeia de ADN são comparadas no histograma 27.



Histograma 27 – Comparação entre os vários Intercaladores quanto às interações de Van der Waals com a cadeia de ADN. Valores em KJ/mol

Ao contrário das interações de Coulomb, nas interações de Van der Waals os valores encontram-se relativamente mais equilibrados. Os intercaladores Berberine e Etidio são os intercalantes com uma forma mais irregular o que promove um aumento das interações de Van der Waals com a cadeia de ADN e o com RTIL. As diferenças na estrutura dos intercalantes, Berberine e Etidio, faz com que estes apresentem os valores mais elevados para as interações de Van der Waals, sendo a Berberine o Intercalador com o valor mais elevado, -173.64KJ/mol.

Quanto às pontes de Hidrogénio formadas entre a cadeia de ADN e o intercalador, o histograma 28 ilustra uma comparação entre os intercaladores estudados e o número de pontes que formam com a cadeia de ADN. Sabemos que, quanto maior o numero de pontes de Hidrogénio formadas, mais forte será a ligação com a cadeia de ADN, ou seja, mais forte e estável será a intercalação. Observando o histograma podemos concluir que o DAPI é o que forma o maior número de pontes de Hidrogénio durante a intercalação, com um valor que chega às 6 pontes formadas com a cadeia de ADN. A Berberine, que era o intercalador com os melhores valores energéticos, não forma nenhuma ponte de Hidrogénio com o ADN.



Histograma 28 - comparação entre os intercaladores quanto ao número médio de pontes de Hidrogénio formadas entre eles e a Cadeia de ADN, no ponto de intercalação

Tendo em conta todos estas interações estudadas, desde as interações de Coulomb, Van der Waals e formação de pontes de Hidrogénio, o DAPI é o intercalador que apresenta o conjunto de resultados com os melhores valores para as interações electrostáticas, Van der Waals e também o elevado número de pontes de Hidrogénio formadas com a cadeia de ADN, o que sugere que a sua intercalação é a mais forte e estável, entre todos os intercaladores estudados, principalmente quando intercalado no RTIL [BIM⁺] [BF4⁻].

Uma consequência dos resultados energéticos, obtidos para o DAPI, é a importância da afinidade por pares de base e o modo de intercalação. As intercalações em pares de base A-T apresentam valores energéticos mais elevados do que as intercalações entre pares de base C-G. Comparando a Berberine com o DAPI, é também possível sugerir que a intercalação na *minor groove* da cadeia de ADN é mais favorável, energeticamente, do que a intercalação entre pares de base.

Concluimos, também, que o Líquido Iônico usado é importante para que as intercalações e que a sua escolha está diretamente ligada com o Intercalador que pretendemos usar. De salientar que o Líquido Iônico [BPYRR⁺] [PF6⁻] apresenta os melhores resultados em três intercaladores diferentes, sendo eles a Berberine, o Etídio e a Proflavine Reduzida. Este resultado sugere que, para intercaladores de carga positiva, este RTIL apresenta as melhores condições para uma intercalação.

No caso da Proflavine, o RTIL que promove uma intercalação mais favorável energeticamente, é o [BPYR⁺] [BF4⁻]. A redução da molécula da Proflavine fez com que houvesse uma alteração no RTIL que apresentava os melhores resultados, alterando a sua constituição tanto a nível do catião como do anião, ou seja, passamos do [BPYR⁺] [BF4⁻] para o Iônico [BPYRR⁺] [PF6⁻].

Conclusão

Estudos realizados promovem os Líquidos Iónicos como solventes eficientes e seguros para a extração e análise do ADN, utilizando agentes intercalantes como sonda fluorescente (4) (27). Estes estudos experimentais usaram do Brometo de Etídio como sonda fluorescente para quantificar o ADN na extração deste. Ambos os estudos experimentais concluíram o Brometo de Etídio não intercalava a cadeia de ADN mas criavam aglomerados junto da cadeia de ADN, criando um efeito de *light-scattering* de ressonância. Foi através deste efeito que foi possível extrair, e quantificar, o ADN usando o Brometo de Etídio como sonda fluorescente (4) (27).

O estudo que realizamos visou observar, do ponto de vista da intercalação, como se comporta o complexo ADN + intercalador, quando o solvente é um RTIL. Estudamos a diferença de energia livre entre dois estados, onde no primeiro o intercalador se encontra complexado com o ADN e no segundo o intercalador encontra-se livre em solução. Calculamos o potencial de força média entre estes dois estados para estudar a diferença de energia livre entre eles e complementamos esta informação com a análise das interações electrostáticas, Van der Waals e a formação de pontes de hidrogénio, entre o intercalador e a cadeia de ADN e também entre este e o RTIL. Desta forma foi possível analisar a espontaneidade da intercalação e se as forças envolvidas nas interações são favoráveis a uma intercalação. Foi possível concluir que:

- A intercalação em meio de Líquido Iónico é bastante estável e forte. Isto deve-se ao facto de a cadeia de ADN apresentar uma estrutura fortalecida pelas interações com os iões do RTIL envolvente, o que faz com que a cadeia não abra facilmente, tornando-a mais estável e permitindo uma interação mais forte entre os pares de base e o intercalador entre eles.

- Através do estudo de PMF foi possível concluir que a intercalação é espontânea para todas as combinações estudadas e não foi observado nenhum efeito de exclusão por parte do líquido iônico.
- Para o intercalador Proflavine foi possível concluir que, além de existir espontaneidade na intercalação, o RTIL que promove a intercalação mais forte é o [BPYR⁺] [BF₄⁻].
- O DAPI foi o intercalador que apresentou a Energia Livre mais elevada entre o estado complexado e o estado em solução, para qualquer RTIL estudado. E, comparando os resultados deste com a Berberine é podemos sugerir que a intercalação nas *minor groves* da cadeia de ADN é mais favorável do que a intercalação entre pares de base.
- Através do estudo das interações energéticas foi possível reforçar as conclusões do estudo de PMF e sugerir que o Líquido Iônico [BPYRR⁺] [PF₆⁻] é o melhor RTIL quando usado como solvente na intercalação da Berberine, do Etídio e da Proflavine Reduzida. Estes resultados, derivados da análise das interações energéticas, sugere que este RTIL é a melhor escolha para ser usado com intercaladores de carga positiva que intercalem entre os pares de base da cadeia de ADN.
- Não é possível dizer qual o RTIL com os piores resultados, em geral, mas, através dos resultados de PMF realizados, foi possível observar que a diferença de energia livre, entre o estado complexado e não complexado, diminui quando o anião é o [PF₆⁻]. Podemos então concluir que, para promover uma intercalação mais forte, a escolha do anião [BF₄⁻] será a mais favorável.

O nosso estudo veio contrariar as conclusões dos estudos experimentais realizados com o Etídio (4) (27), ou seja, mostramos que a intercalação é espontânea, observando-se este resultado para todas as combinações ADN / Intercalador / RTIL, estudadas. No entanto, a diferença na energia livre varia muito dependendo do Líquido Iônico utilizado e, também, do próprio intercalador, ou seja, apesar de a intercalação ser espontânea, a escolha de

um RTIL irá influenciar se essa intercalação irá acontecer ou não, dado os íons e o intercalador competirem na intercalação do ADN.

Estudos posteriores poderão incidir no uso de técnicas experimentais, análogas á da literatura, para observar a intercalação usando estes resultados. Também poderão ser realizados estudos baseados em simulações de *light-scattering* onde poderemos estudar a fluorescência destes agentes intercalantes nestes meios iónicos e verificar a existência destes efeitos de fluorescência, quantificar a sua intensidade e, também, estudar o efeito de *light-scattering* de ressonância.

Bibliografia

1. *Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen.* **Miescher, F.** s.l. : Med. Chem. Unters, 1871, Vol. 4.
2. *A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid.* **F.H.C., Watson J.D. and Crick.** s.l. : Nature, 1953, Vol. 171.
3. *A new fluorometric method for RNA and DNA determination.* **Le Pecq, Jean-Bernard e Paoletti, Claude.** s.l. : Anal. Biochem, 1996, Vol. 17.
4. *An Abnormal Resonance Light Scattering Arising from Ionic-Liquid/DNA/Ethidium Interaction.* **Cheng, De Hong e Chen, Xu-Wei.** s.l. : Chem. Eur. J., 2007, Vol. 13.
5. *Synthetic metallomolecules as agents for the control of DNA structure.* **D. Richards, Adair e Rodger, Alison.** s.l. : Chem. Soc. Rev., 2007, Vol. 36.
6. *Structural considerations in the interactions of deoxyribonucleic acid and acridines.* **Lerman, LS.** s.l. : J. Mol. Biol, 1961, Vol. 3.
7. *Hydration Changes for DNA Intercalation Reactions.* **Qu, Xiaogang.** s.l. : J. Am. Chem. Soc, 2001, Vol. 123.
8. *The structure of the DNA-acridine complex.* **Lerman, LS.** s.l. : Proc. Natl. Acad. Sci, 1963, Vol. 49.
9. *Molecular Spectroscopy Evidence of Berberine Binding to DNA: Comparative Binding and Thermodynamic Profile of Intercalation.* **Li, Xiao-Ling e Hu, Yan-Jun.** s.l. : Am. Chem. Soc Biomacromolecules, 2012, Vol. 13.
10. *Effects of Surface Oxygen of Activated Carbon on Alkaloid Adsorption: A Molecular Dynamics Simulation Study.* **Wang, Dianxia e Sakoda, Akiyoshi.** s.l. : Kluwer Acad. Pub. Adsorption, 1999, Vol. 5.
11. *X-Ray diffraction analyses of the natural isoquinoline alkaloids Berberine and Sanguinarine complexed with double helix DNA d(CGTACG).* **Ferraroni, Marta e Bazzicalupi, Carla.** s.l. : Chem. Commun., 2011, Vol. 47.
12. *Dynamics in the DNA Recognition by DAPI: Exploration of the Various Binding Modes.* **Banerjee, Debapriya e Pal, Samir Kumar.** s.l. : J. Phys. Chem. B, 2008, Vol. 112.
13. *Solution structure and dynamics of a complex between DNA and the antitumor bisnaphthalimide LU-79553: intercalated ring flipping on the millisecond time scale.* **Gallego, J. e Reid, B.R.** s.l. : Biochemistry, 1999, Vol. 38.
14. *Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue.* **Nafisi, Shohreh, Saboury, Ali Akbar e Keramat, Nahid.** s.l. : J. Molecular Structure, 2007, Vol. 827.

15. *Steroid diamine-nucleic acid interactions: partial insertion of dipyrandium between unstacked base pairs of the poly(dA-dT) duplex in solution.* **Patel, Dinshaw J.** s.l. : Proc. Natl. Acad. Sci., 1976, Vol. 73.
16. *Intercalators. 1. Nature of stacking interactions between intercalators (ethidium, daunomycin, ellipticine, and 4',6-diaminide-2-phenylindole) and DNA base pairs. Ab initio quantum chemical, density functional theory, and empirical potential study.* **Reha, David, Kabelac, Martin e Ryjacek, Filip.** s.l. : J. AM. Chem. Soc, 2002, Vol. 124.
17. *Computational study of the interaction of proflavine with d(ATATATATATAT)2 and d(GCGCGCGCGC)2.* **Ruiz, Rebeca e Garcia, Begona.** s.l. : J. Molecular Structure, 2009, Vol. 915.
18. *Grand Canonical Ensemble Monte Carlo Simulation of the dCpG/Proflavine Crystal Hydrate.* **Resat, H. e Mezei, M.** s.l. : Biophysical Journal, 1996, Vol. 71.
19. *Crystal Structure of Proflavine in Complex with a DNA hexamer duplex.* **Maehigashi, et al.** s.l. : To be Published.
20. *Ionic Liquids. Green solvents for the future.* **Earle, Martyn J.** s.l. : Pure. Appl. Chem, 2000, Vol. 72.
21. *Uses of Ionic Liquids in analytical chemistry.* **Berthod, A. e Carda-Broch.** s.l. : MarieCurie Annals, 2004, Vol. 3.
22. *What's an ionic liquid?* **Johnson, Keith E.** s.l. : The electrochemical soc., 2007.
23. *A refined force field for molecular simulation of imidazolium-based Ionic liquids.* **Liu, Zhiping, Huang, Shiping e Wang, Wenchuan.** s.l. : J. Phys. Chem. B, 2004, Vol. 108.
24. *A review of ionic liquids towards supercritical fluid applications.* **Keskin, Seda e Kayrak-Talay, Defne.** s.l. : J. of supercritical Fluids, 2007, Vol. 43.
25. *Parametrization of 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate/Nitrate ionic liquid for the GROMOS force field.* **Micaelo, Nuno, Baptista, Antonio e Soares, Claudio.** s.l. : J. Phys. Chem. B, 2006, Vol. 110.
26. *DNA molecular solvation in neat ionic liquids.* **Cardoso, Lena e Micaelo, Nuno.** s.l. : Chem. Phys. Chem, 2001, Vol. 12.
27. *Direct extraction of double stranded DNA into ionic liquid BmimPF6 and its quantification.* **Wang, Jian-Hua, et al.** s.l. : Anal. Chem, 2007, Vol. 79.
28. *Molecular dynamics simulations of biomolecules.* **Karplus, Martin.** s.l. : Nature structural biology, 2002, Vol. 9.
29. *Biomolecular modelling: goals, problems, prespectives.* **Gunsteren, wilfred F. van.** s.l. : Angew. Chem. Int. Ed, 2006, Vol. 45.
30. *GROMACS MANUAL.* **Apol, Emile, et al.** s.l. : www.gromacs.com, 2010.
31. *The GROMOS biomolecular simulation program package.* **Scott, Walter R.P.** s.l. : J. Phys. Chem. A, 1999, Vol. 103.
32. *LINCS, a linear constraint solver for molecular simulations.* **Hess, B e H., Becker.** s.l. : J. Comp. Chem., 1997, Vol. 18.

33. **Leach, Andrew.** *Molecular modelling: principles and applications.* s.l. : Pearson, 2001. 0582382106.
34. *SSPBE: um programa para solução numérica da equação de Poisson-Boltzmann em simetria esférica com modelo de adsorção.* **Dias, Luis Gustavo, Chaimovich, Herman e Politi, Mário José.** s.l. : Quim. Nova, 2002, Vol. 15.
35. *Intermolecular potentials of mean force of amino acid side chain interactions in aqueous medium.* **Hassan, Sergio A.** s.l. : J. Phys. Chem. B, 2004, Vol. 108.
36. *Computer simulation study of the mean forces between ferrous and ferric ions in water.* **Bader, J.S e Chandler, D.** s.l. : J. Phys. Chem., 1992, Vol. 96.
37. **McQuarrie, D. A.** *Statistical Mechanics.* New York : Harper and Row.
38. *Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free energy estimation: Umbrella sampling.* **Torrie, G. M. e Valleau, J. P.** s.l. : J. Comput. Phys., 1977, Vol. 23.
39. *The structure of DAPI bound to DNA.* **Larsen, T.A. e Goodsell, D.S.** s.l. : J. biomol. Struct. Dynamics, 1989, Vol. 7.
40. *rystal structures of the multidrug binding repressor Corynebacterium glutamicum CgmR in complex with inducers and with an operator.* **Itou, H., et al.** s.l. : J. Mol. Biol., 2010, Vol. 403.
41. *A biochemical logic Gate using an enzyme and its inhibitor. 1. The inhibitor as switching element.* **Sivan, Sarit e Lotan, Noah.** s.l. : Biotechnol Prog, 1999, Vol. 15.
42. *Gnuplot 4.5: an interactive plotting program.* **Williams, T. e Kelley, C.** URL <http://gnuplot.info> : s.n., 2011.
43. <http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>.

ANEXO 1 – Estruturas e Topologias

Neste capítulo serão apresentadas as estruturas dos agentes intercalantes e dos complexos ADN + intercalante. Serão também apresentadas as informações mais relevantes das topologias criadas para cada intercalador estudado. O ponto 4.1 descreve as informações genéricas sobre as topologias utilizadas. No ponto 4.2 passamos para apresentação da estrutura de cada intercalador e o complexo formado por esse intercalador e a cadeia de ADN.

4.1 – Informação geral das topologias

As informações utilizadas, para a criação das topologias, foram retiradas dos ficheiros do campo de forças GROMOS. Os pontos seguintes descrevem, de uma forma generalizada, a informação relativa aos tipos de átomos, ligações, ângulos, diedros, usadas nas topologias de cada intercalador.

4.1.1 – Informação relativa aos tipos de átomos usados

O que constitui uma molécula são os átomos mas, apesar de uma molécula de água ser formada por dois átomos de Hidrogénio e um átomo de Oxigénio, quando a vamos submeter a uma simulação molecular, esses átomos terão um tipo associado que irá depender da posição deste átomo na molécula. Esses tipos de átomos apresentam um nome e uma massa atómica.

A tabela 1 descreve todos os tipos de átomos utilizados na criação das topologias dos intercaladores.

Átomo	Tipo	Massa atômica	Descrição
Oxigénio	OE	15.99994	Éter ou éster
Azoto	NT	14.00670	Terminal (NH2)
	NL	14.00670	Terminal (NH3)
Carbono	C	12.01100	Simples
	CH2	14.02700	Alifático ou grupo açúcar CH2
	CH3	15.03500	Alifático CH3
	CR1	13.01900	Aromático CH
Hidrogénio	HC	1.00800	Ligado a um carbono
	H	1.00800	Não ligado a carbono

Tabela 2 - Tabela descritiva dos tipos de átomos utilizados na criação das topologias

4.1.2 – Informação relativa às ligações interatómicas

As ligações interatómicas dependem do tipo de átomo que ligam e do contexto em que se encontram (grupos aromáticos, terminais, etc.). A tabela 2 descreve os tipos de ligações utilizados.

Tipos de átomos que liga	Código GROMOS	b_0 (nm)	k_b (KJ mol ⁻¹ nm ⁻²)
H – N (all)	gb_2	0.1000	1.8700e+07
HC – C	gb_3	0.1090	1.2300e+07
C – NT,NL	gb_9	0.1330	1.0600e+07
C, CR1 – N, NR, CR1, C	gb_10	0.1330	1.1800e+07
C – NR (sem H) (anel-6)	gb_12	0.1340	1.1700e+07
C, CR1 – CH2, C, CR1 (anel-6)	gb_16	0.1390	1.0800e+07
CHn – AO	gb_18	0.1430	8.1800e+06
CHn – NR (anel-6)	gb_23	0.1480	7.6400e+06
C, CHn – C, CHn	gb_27	0.1530	7.1500e+06
HChI – CChI	gb_39	0.1100	1.2100e+07

Tabela 3 - Tabela descritiva das ligações interatómicas utilizadas na criação das topologias dos intercaladores. r_{b_0} é o comprimento da ligação entre os átomos; K_b é a energia associada à ligação estabelecida.

4.1.3 – Informação relativa aos ângulos formados entre os átomos.

Esta informação descreve a posição que dos átomos, uns em relação aos outros, num mesmo plano dimensional. A tabela 3 descreve os ângulos utilizados na criação das topologias.

Tipos de átomos ligados	Código GROMOS	θ_0	k_θ
CHn, AO – CHn – AO, NR (anel) (açúcar)	ga_9	109.50	320.00
H – NL, NT – H, CHn – AO – CHn (açúcar)	Ga_10	109.50	380.00
CHn, C – CHn – C, CHn, AO, OM, N, NE	ga_13	109.50	520.00
CHn – CHn – C, CHn, OA, NR, NT, NL	ga_15	111.00	530.00
CH3 – N – C, CHn – C – OM	ga_22	117.00	635.00
H – NT, NZ, NE – C	ga_23	120.00	390.00
H – NT, NZ – H	ga_24	120.00	445.00
H – N – CH3, H, HC – anel-6, H – NT – CHn	ga_25	120.00	505.00
N, C, CR1 (anel-6, sem H)	ga_27	120.00	560.00
O – C – CHn, C CH3 – N – CHn	ga_30	121.00	685.00
X (qualquer átomo, sem H) – anel-5	ga_37	126.00	640.00

Tabela 4 - Descrição dos ângulos usados na criação das topologias dos intercaladores. θ_0 é o ângulo formado; k_θ energia associada ao ângulo

4.1.4 – Informação relativa aos diedros, próprios e impróprios, formados entre os átomos.

Os diedros descrevem a posição relativa entre quatro átomos. Estes átomos podem, ou não, ser consecutivos. A tabela seguinte descreve os diedros, próprios e impróprios, utilizados na criação das topologias dos intercaladores estudados.

Tipos de átomos ligados	Código GROMOS	ξ_0	k_ξ	multiplicidade
Grupos planares	gi_1	0.0	167.42309	Impróprio
Centros tetraédricos	gi_2	35.26439	334.84617	Impróprio
- C – N, NT, NE, NZ, NR -	gd_14	180.000	33.5	2
O-CH1-CHn-O	gd_18	0.000	2.09	2

Tabela 5 - Descrição dos diedros utilizados na criação das topologias dos intercaladores estudados. ξ_0 é o ângulo formado. k_ξ energia associada ao ângulo.

4.2 – Estrutura dos intercaladores e dos complexos.

A estrutura dos intercaladores, tal como a informação relevante sobre a topologia destes, será agora apresentada. Também serão apresentadas as estruturas dos complexos formados entre os intercaladores e a cadeia de ADN.

4.2.1 – Berberine e complexo Berberine + ADN d(CGTCAG) (10) (11)

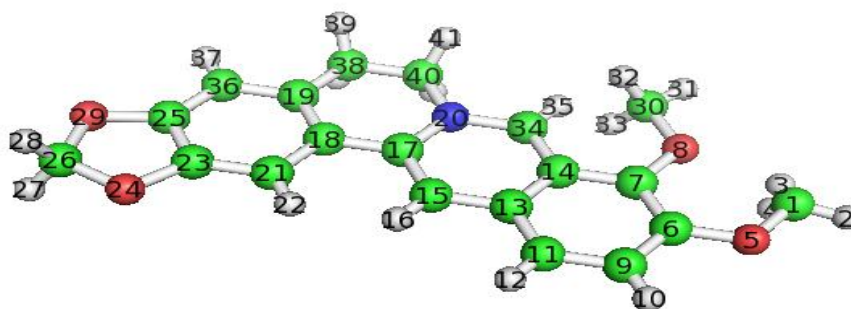


Figura 26 - Estrutura do intercalador Berberine após a primeira minimização de Energia

Informação dos átomos											
nr	tipo	átomo	cgnr	carga	massa	nr	tipo	átomo	cgnr	carga	massa
1	C	C	1	-0.070	12,011	23	C	C	9	0.320	12,011
2	HC	H	1	0.170	1,008	24	OE	O	9	-0.560	15,999
3	HC	H	1	0.140	1,008	25	C	C	9	0.330	12,011
4	HC	H	1	0.140	1,008	26	C	C	10	0.320	12,011
5	OE	O	2	-0.590	15,999	27	HC	H	10	0.160	1,008
6	C	C	2	0.330	12,011	28	HC	H	10	0.160	1,008
7	C	C	2	0.330	12,011	29	OE	O	11	-0.550	15,999
8	OE	O	2	-0.590	15,999	30	C	C	12	0.000	12,011
9	C	C	3	-0.120	12,011	31	HC	H	12	0.150	1,008
10	HC	H	3	0.140	1,008	32	HC	H	12	0.170	1,008
11	C	C	4	-0.160	12,011	33	HC	H	12	0.170	1,008
12	HC	H	4	0.150	1,008	34	C	C	13	0.070	12,011
13	C	C	5	-0.010	12,011	35	HC	H	13	0.170	1,008
14	C	C	5	0.040	12,011	36	C	C	14	-0.100	12,011
15	C	C	6	-0.080	12,011	37	HC	H	14	0.160	1,008
16	HC	H	6	0.110	1,008	38	C	C	15	-0.220	12,011
17	C	C	7	0.200	12,011	39	HC	H	15	0.140	1,008
18	C	C	7	0.000	12,011	40	C	C	16	-0.110	12,011
19	C	C	7	-0.020	12,011	41	HC	H	16	0.140	1,008
20	NR	N	7	-0.380	14,007	42	HC	H	15	0.170	1,008
21	C	C	8	-0.130	12,011	43	HC	H	16	0.170	1,008
22	HC	H	8	0.140	1,008						

Tabela 6 – Informação de cada átomo que constitui a molécula Berberine

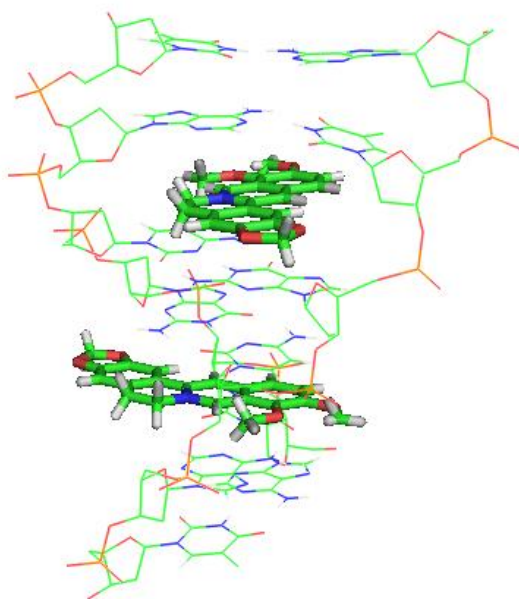


Figura 27 - Complexo formado entre a Berberine e a cadeia de ADN

4.2.2 - DAPI e complexo DAPI + ADN D(CGCGAATTCGCG) (16)(41)

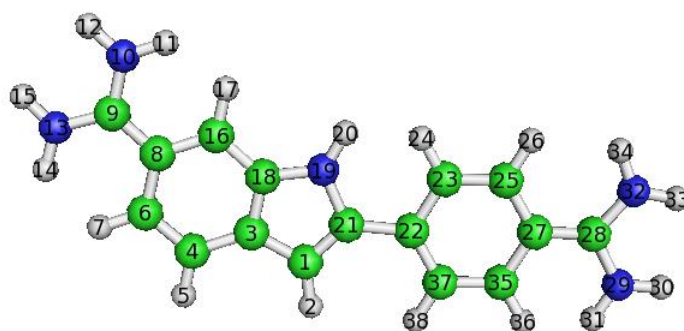


Figura 28 - Estrutura do DAPI após a primeira minimização de energia

Informação dos átomos											
nr	tipo	átomo	cgnr	carga	massa	nr	tipo	átomo	cgnr	carga	massa
1	CR1	C3	1	-0,28	12,011	20	H	H1	9	0,35	1,008
2	HC	H31	1	0,2	1,008	21	C	C2	10	0,08	12,011
3	C	C9	2	0,15	12,011	22	C	C1'	10	0,08	12,011
4	CR1	C4	3	-0,2	12,011	23	CR1	C6'	11	-0,09	12,011
5	HC	H41	3	0,2	1,008	24	HC	H6'	11	0,14	1,008
6	CR1	C5	4	-0,16	12,011	25	CR1	C5'	12	-0,17	12,011
7	HC	H51	4	0,16	1,008	26	HC	H5'	12	0,17	1,008
8	C	C6	5	-0,06	12,011	27	C	C4'	13	-0,03	12,011
9	C	C10	5	0,53	12,011	28	C	C11	13	0,53	12,011
10	NT	N3	6	-0,66	14,0067	29	NT	N5	14	-0,66	14,0067
11	H	H33	6	0,4	1,008	30	H	H53	14	0,4	1,008
12	H	H32	6	0,4	1,008	31	H	H52	14	0,4	1,008
13	NT	N2	7	-0,66	14,0067	32	NT	N4	15	-0,66	14,0067
14	H	H22	7	0,4	1,008	33	H	H43	15	0,4	1,008
15	H	H21	7	0,4	1,008	34	H	H42	15	0,4	1,008
16	CR1	C7	8	-0,19	12,011	35	CR1	C3'	16	-0,15	12,011
17	HC	H7	8	0,19	1,008	36	HC	H3'	16	0,17	1,008
18	C	C8	2	0,09	12,011	37	CR1	C2'	17	-0,11	12,011
19	NR	N1	9	-0,32	14,0067	38	HC	H2'	17	0,16	1,008

Tabela 7 – Informação de cada átomo que constitui o DAPI

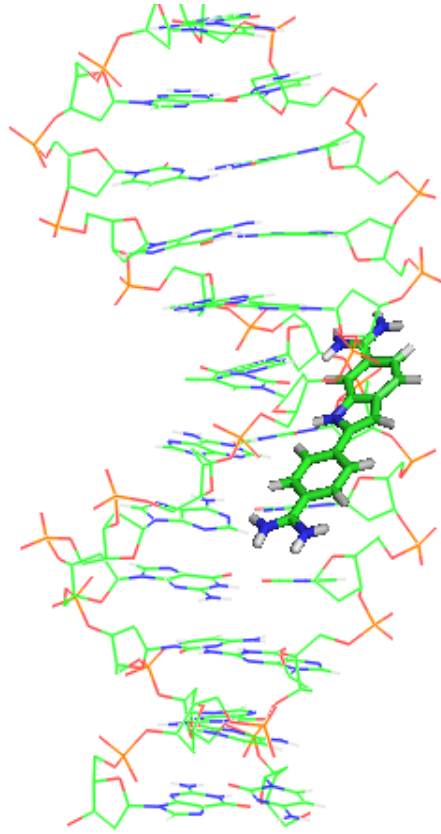


Figura 29 - Complexo formado entre o DAPI e a cadeia de ADN

4.2.3 - Etídio e complexo Etídio + ADN d(CGATCG) (16) (19) (40)

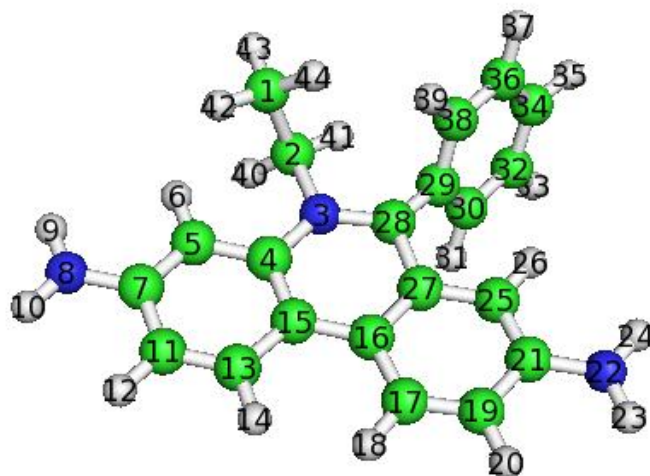


Figura 30 - Estrutura do Etídio após a primeira minimização de energia

Informação dos átomos											
nr	tipo	átomo	cgnr	carga	massa	nr	tipo	átomo	cgnr	carga	massa
1	CH3	C22	1	-0,08	15,035	23	H	H9P	12	0,4	1,008
2	CH2	C21	6	0,02	14,027	24	H	H24	12	0,39	1,008
3	NR	N5	4	0,03	14,0067	25	CR1	C7	13	-0,28	12,011
4	C	C14	7	-0,01	12,011	26	HC	H7	13	0,19	1,008
5	CR1	C4	8	-0,18	12,011	27	C	C11	4	0	12,011
6	HC	H4	8	0,18	1,008	28	C	C6	4	0,09	12,011
7	C	C3	2	0,24	12,011	29	C	C15	4	0,11	12,011
8	NT	N23	2	-0,87	14,0067	30	CR1	C16	14	-0,12	12,011
9	H	H9O	2	0,42	1,008	31	HC	H16	14	0,15	1,008
10	H	H23	2	0,4	1,008	32	CR1	C17	15	-0,19	12,011
11	CR1	C2	9	-0,13	12,011	33	HC	H17	15	0,17	1,008
12	HC	H2	9	0,17	1,008	34	CR1	C18	16	-0,05	12,011
13	CR1	C1	10	-0,21	12,011	35	HC	H18	16	0,15	1,008
14	HC	H1	10	0,18	1,008	36	CR1	C19	17	-0,18	12,011
15	C	C13	7	0,05	12,011	37	HC	H19	17	0,17	1,008
16	C	C12	7	0,1	12,011	38	CR1	C20	18	-0,15	12,011
17	CR1	C10	3	-0,24	12,011	39	HC	H20	18	0,16	1,008
18	HC	H10	3	0,17	1,008	40	HC	H21	6	0,07	1,008
19	CR1	C9	11	-0,06	12,011	41	HC	H9L	6	0,06	1,008
20	HC	H9	11	0,17	1,008	42	HC	H22	1	0,03	1,008
21	C	C8	12	0,26	12,011	43	HC	H9M	1	0,06	1,008
22	NT	N24	12	-0,86	14,0067	44	HC	H9N	1	0,02	1,008

Tabela 8 - Informação de cada átomo que constitui a molécula de Etídio

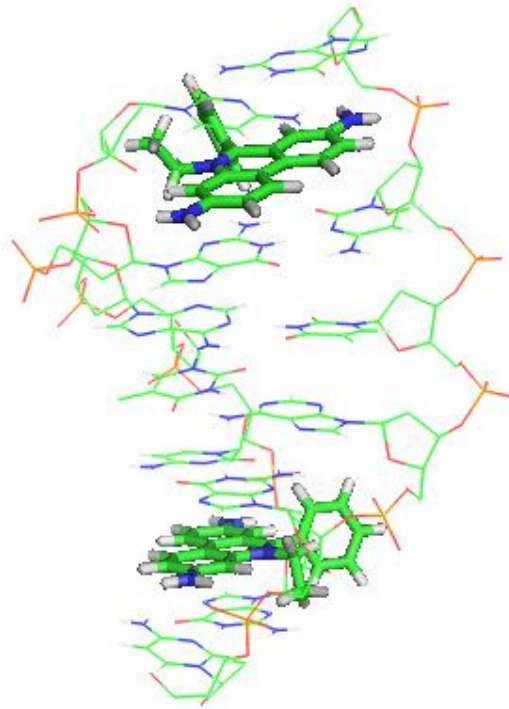


Figura 31 - Complexo formado entre o Etídio e a cadeia de ADN

4.2.4 – Proflavine, Proflavine Reduzida e os complexos, por elas formados, com o ADN d(CGATCG) (18) (19) (43)

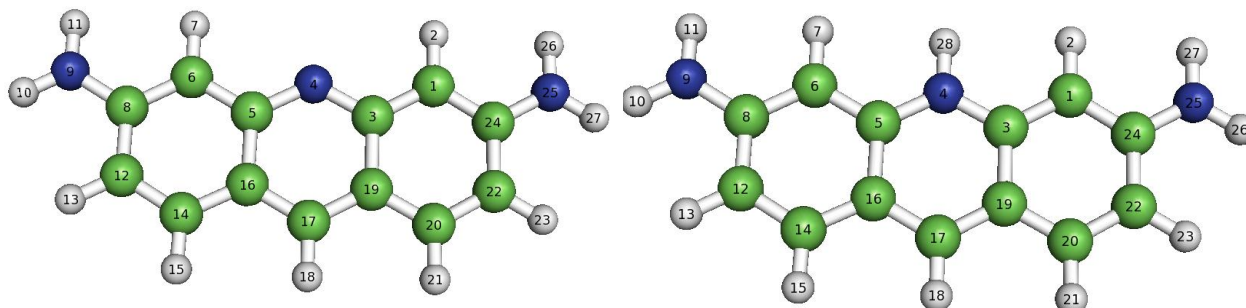


Figura 32 – Estrutura da Proflavine (esquerda) e da Proflavine Reduzida (direita) após a primeira minimização de energia

Informação dos átomos - Proflavine						Informação dos - Proflavine Reduzida					
nr	tipo	átomo	cgnr	carga	massa	nr	tipo	átomo	cgnr	carga	massa
1	CR1	C4	1	0	12,011	1	CR1	C4	1	-0,4451	12,011
2	HC	H4	1	0	1,008	2	HC	H4	1	0,1471	1,008
3	C	C11	2	0,245	12,011	3	C	C11	2	0,3131	12,011
4	NR	N10	2	-0,49	14,0067	4	NR	N10	2	-0,3781	14,0067
5	C	C14	2	0,245	12,011	5	C	C14	2	0,3131	12,011
6	CR1	C5	3	0	12,011	6	CR1	C5	3	-0,4451	12,011
7	HC	H5	3	0	1,008	7	HC	H5	3	0,1471	1,008
8	C	C6	4	0,157	12,011	8	C	C6	4	0,5931	12,011
9	NT	N16	4	-0,691	14,0067	9	NT	N16	4	-0,7631	14,0067
10	H	H9M	4	0,267	1,008	10	H	H9M	4	0,3461	1,008
11	H	H16	4	0,267	1,008	11	H	H16	4	0,3461	1,008
12	CR1	C7	5	0	12,011	12	CR1	C7	5	-0,2674	12,011
13	HC	H7	5	0	1,008	13	HC	H7	5	0,1231	1,008
14	CR1	C8	6	0	12,011	14	CR1	C8	6	-0,0441	12,011
15	HC	H8	6	0	1,008	15	HC	H8	6	0,1111	1,008
16	C	C12	7	0	12,011	16	C	C12	7	-0,0051	12,011
17	CR1	C9	7	0	12,011	17	CR1	C9	7	0,0261	12,011
18	HC	H9	7	0	1,008	18	HC	H9	7	0,1191	1,008
19	C	C13	7	0	12,011	19	C	C13	7	-0,0051	12,011
20	CR1	C1	8	0	12,011	20	CR1	C1	8	-0,0441	12,011
21	HC	H1	8	0	1,008	21	HC	H1	8	0,1111	1,008
22	CR1	C2	9	0	12,011	22	CR1	C2	9	-0,2674	12,011
23	HC	H2	9	0	1,008	23	HC	H2	9	0,1231	1,008
24	C	C3	10	0,157	12,011	24	C	C3	10	0,5931	12,011
25	NT	N15	10	-0,691	14,0067	25	NT	N15	10	-0,7531	14,0067
26	H	H9L	10	0,267	1,008	26	H	H9L	10	0,3461	1,008
27	H	H15	10	0,267	1,008	27	H	H15	10	0,3461	1,008
						28	H	H12	2	0,3131	1,008

Tabela 9 - informação dos átomos que constituem a Proflavine e a Proflavine Reduzida

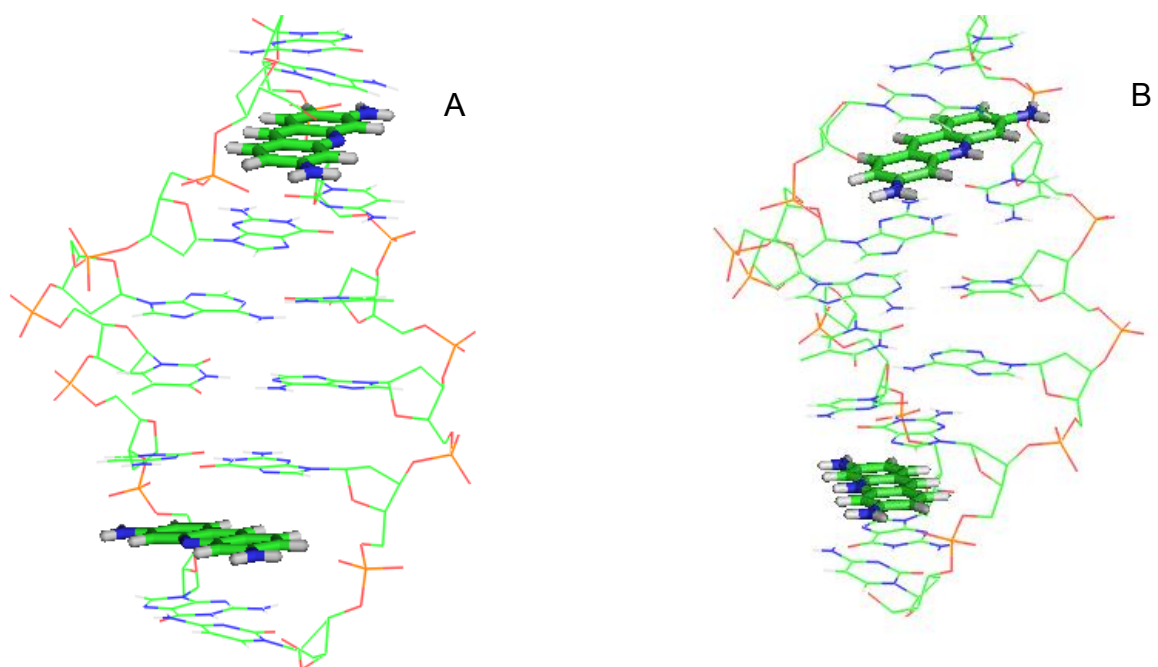


Figura 33 - Complexos formados entre a cadeia de ADN e as moléculas Proflavine (A) e Proflavine Reduzida (B)

ANEXO 2 – Gráficos relativos às interações intermoleculares

Nesta secção serão apresentados os gráficos relativos às medições dos Potências de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogénio para cada combinação ADN+ Intercalador + RTIL [Catião] [Anião].

Gráficos Relativos ao intercalador Berberine

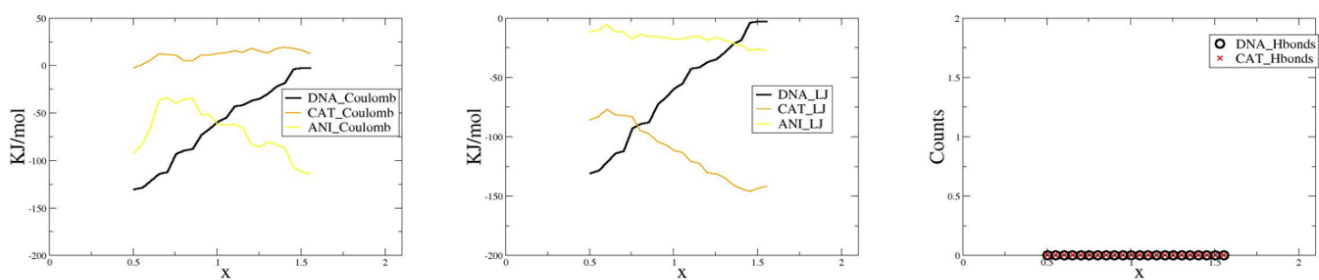


Gráfico 11 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogénio em RTIL [BDHYDOZA][BF4]

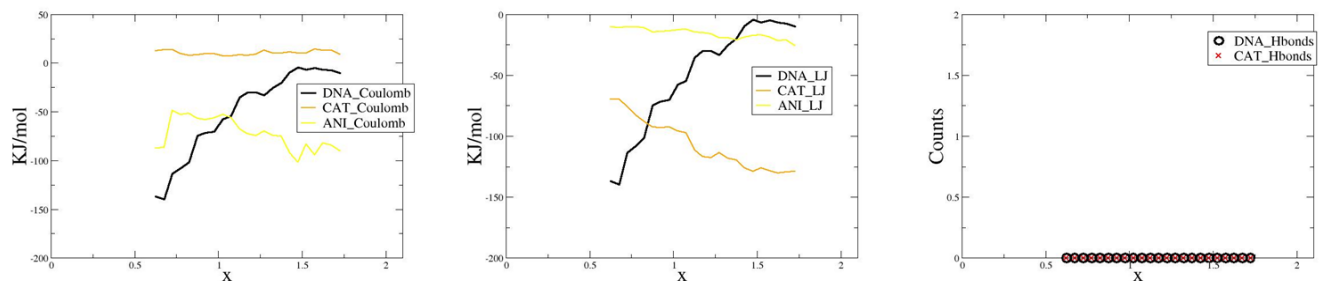


Gráfico 12 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogénio em RTIL [BDHYDOZA][PF6]

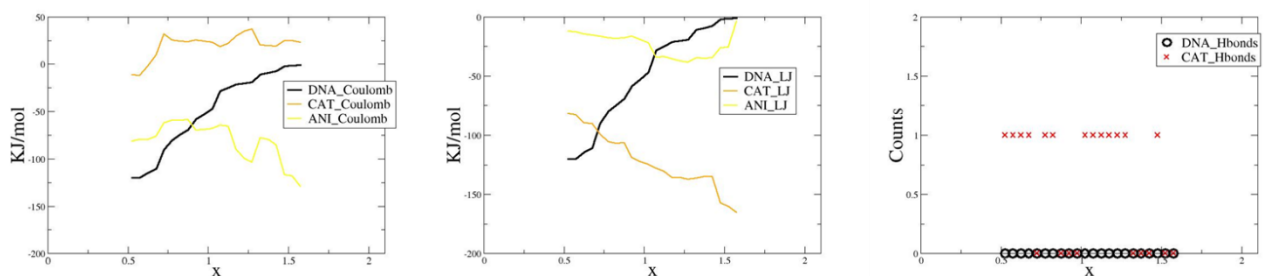


Gráfico 13 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogénio em RTIL [BIM][BF4]

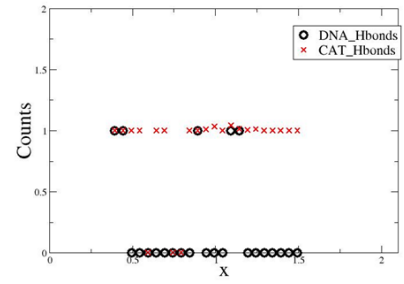
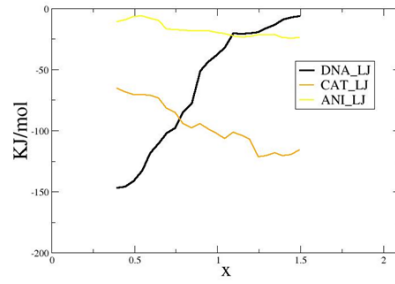
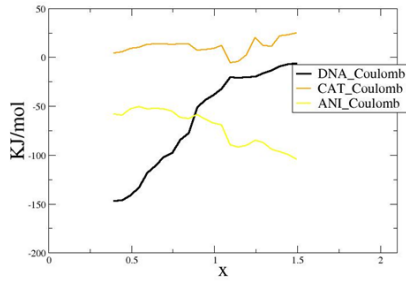


Gráfico 14 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BIM][PF6]

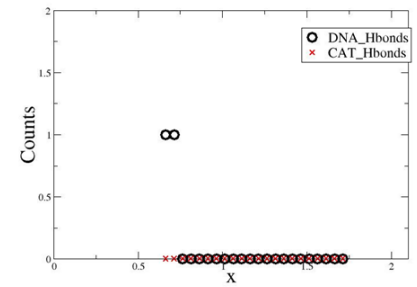
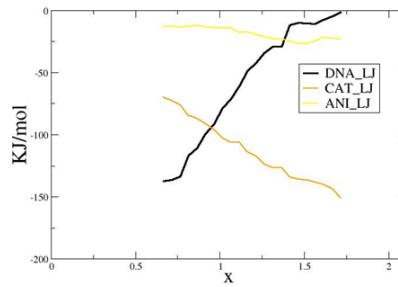
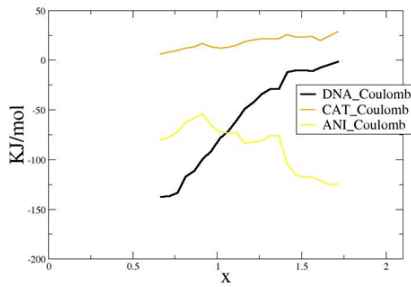


Gráfico 16 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BPYR][BF4]

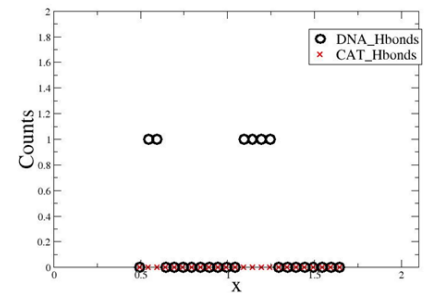
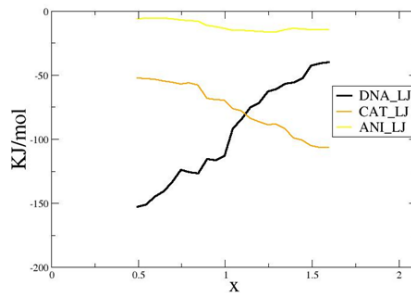
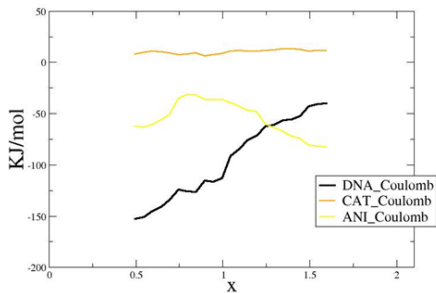


Gráfico 15 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BPYR][PF6]

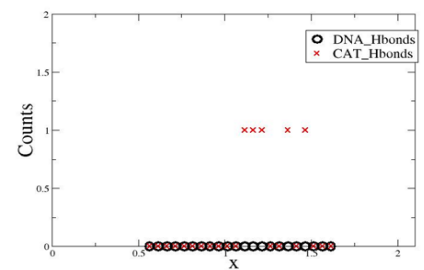
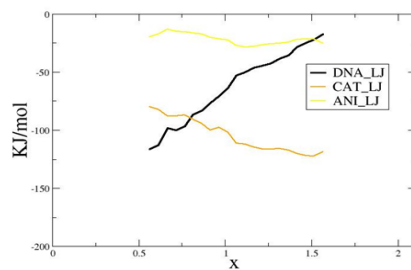
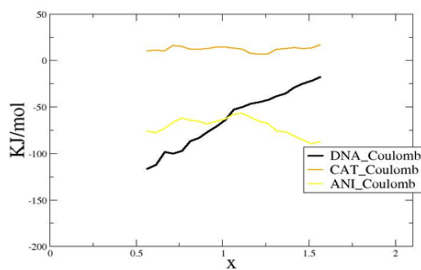


Gráfico 17 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BPYRR][BF4]

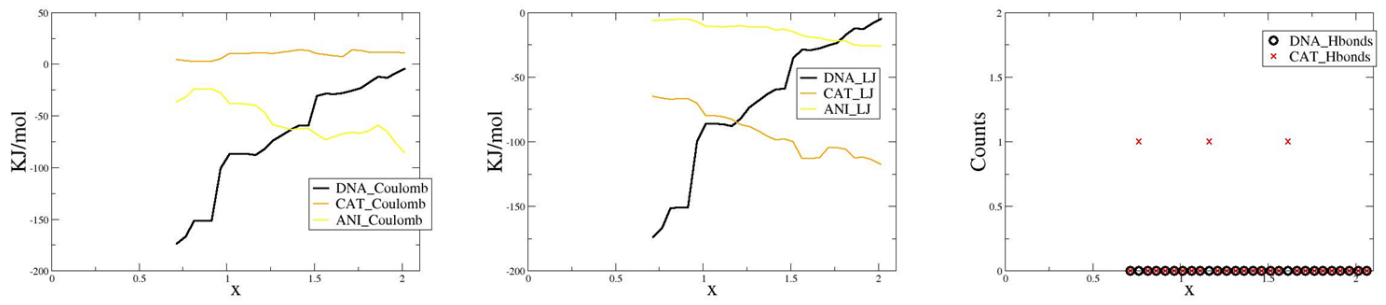


Gráfico 18 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BPYRR][PF6]

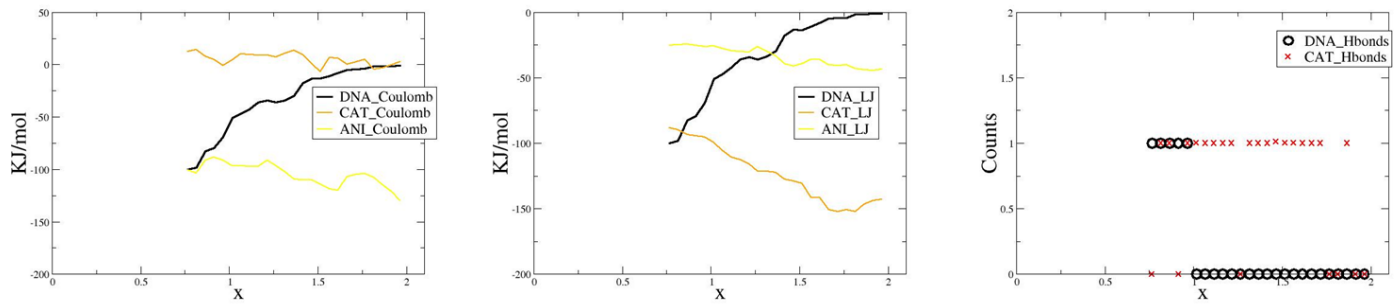


Gráfico 19 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [HYDETMAZ][BF4]

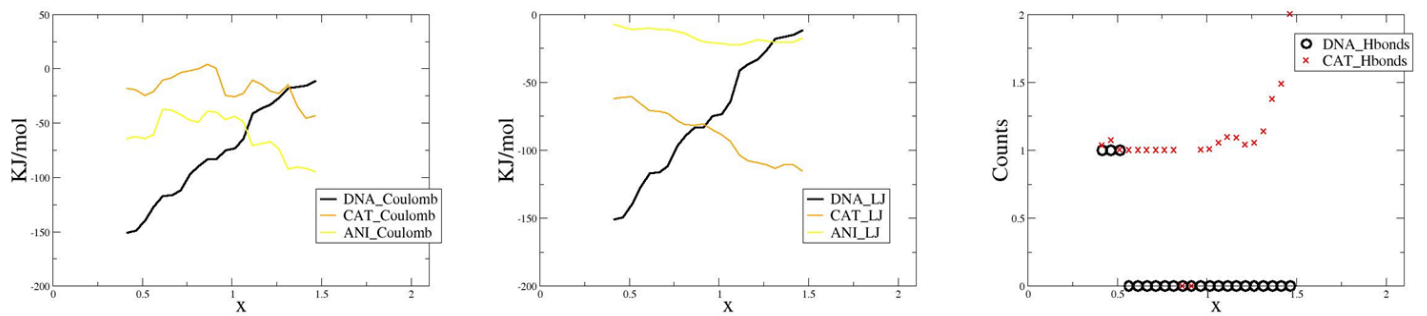


Gráfico 20 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [HYDETMAZ][PF6]

Gráficos Relativos ao intercalador DAPI

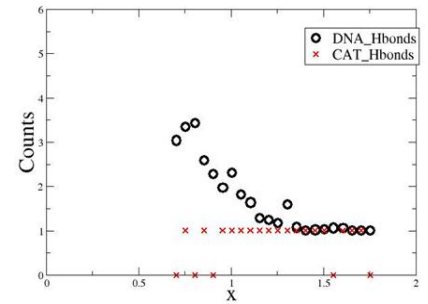
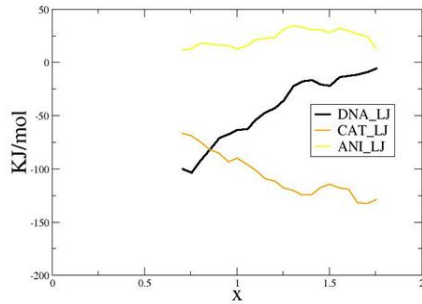
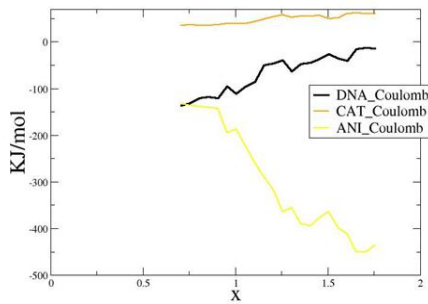


Gráfico 21 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BDHYDOZA][BF4]

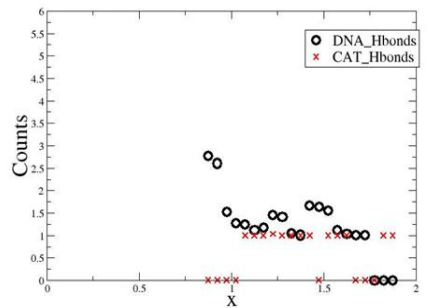
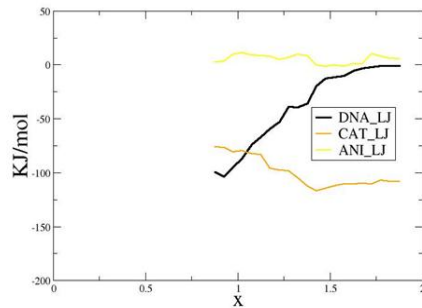
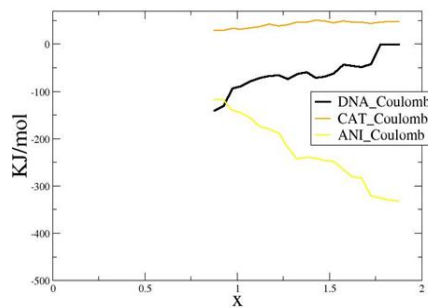


Gráfico 22 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BDHYDOZA][PF6]

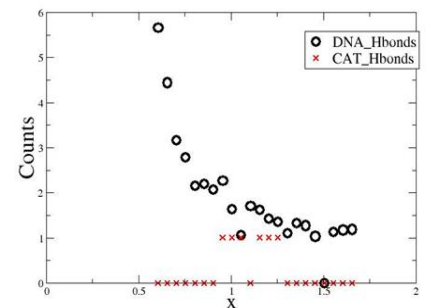
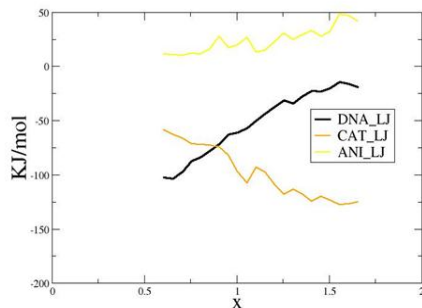
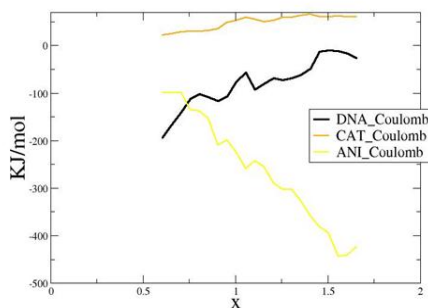


Gráfico 23 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BIM][BF4]

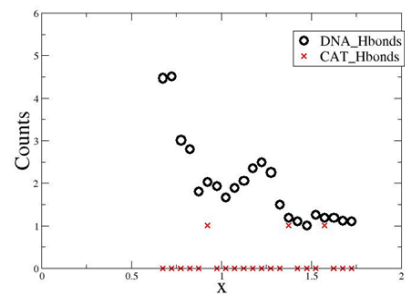
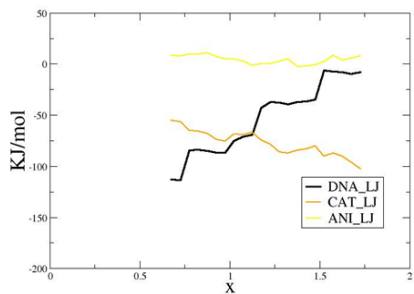
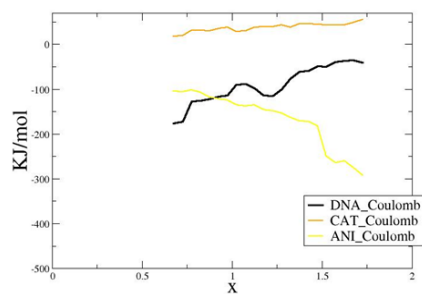


Gráfico 24 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BIM][PF6]

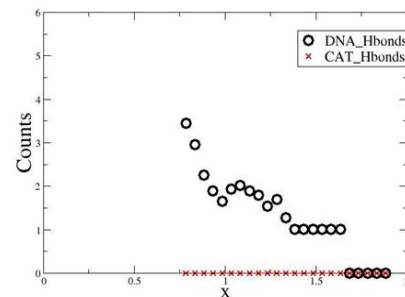
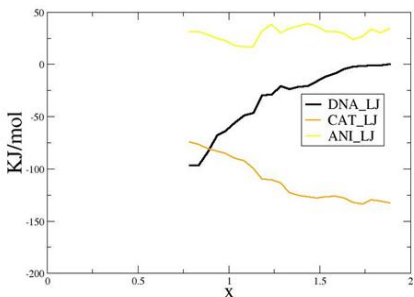
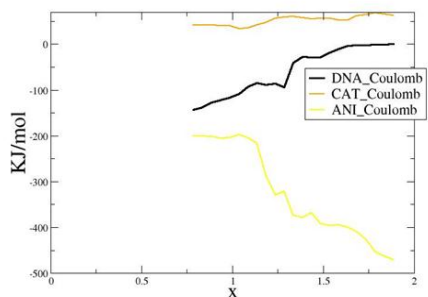


Gráfico 25 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BPYR][BF4]

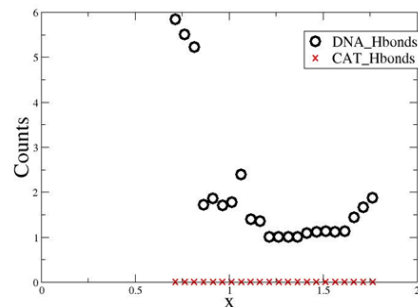
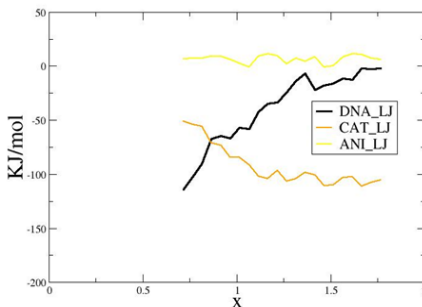
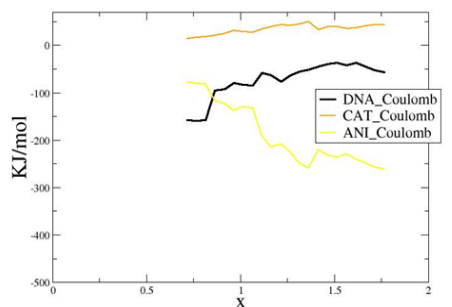


Gráfico 26 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BPYR][PF6]

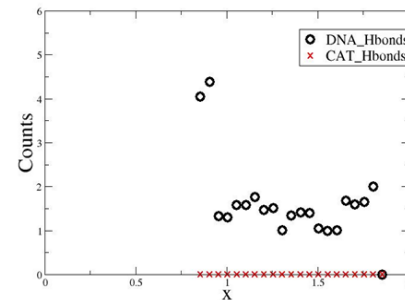
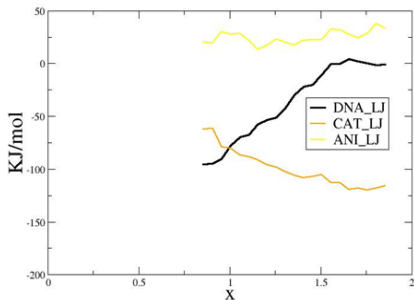
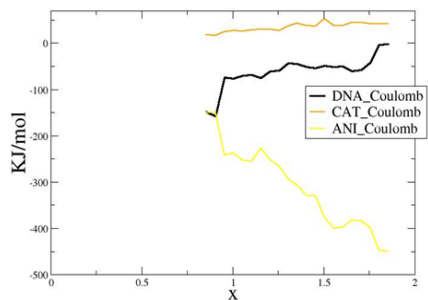


Gráfico 27 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BPYR][BF4]

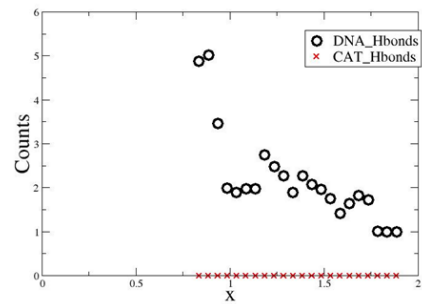
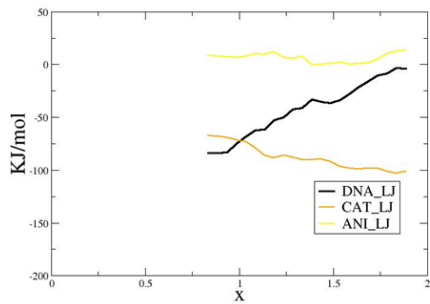
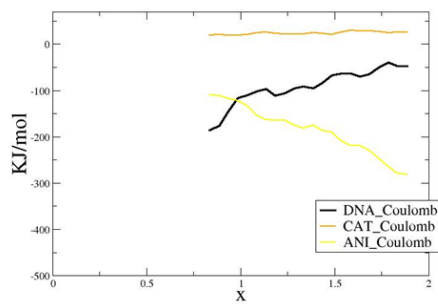


Gráfico 28 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogénio em RTIL [BPYRR][PF6]

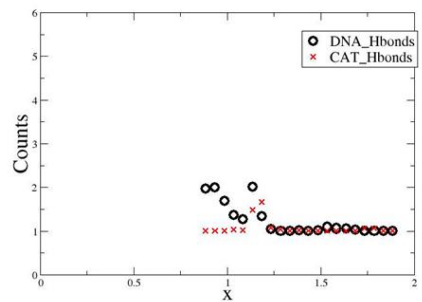
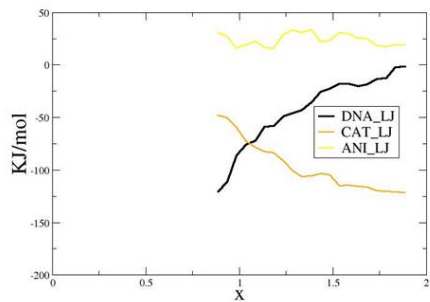
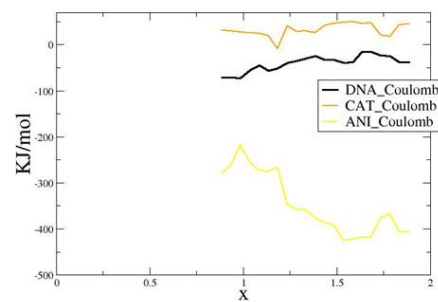


Gráfico 29 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogénio em RTIL [HYDETMAZ][BF4]

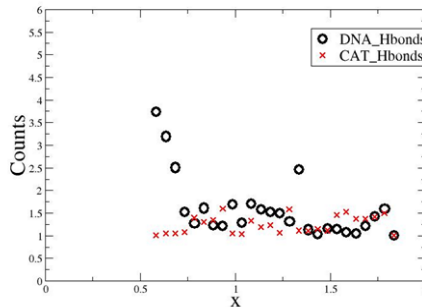
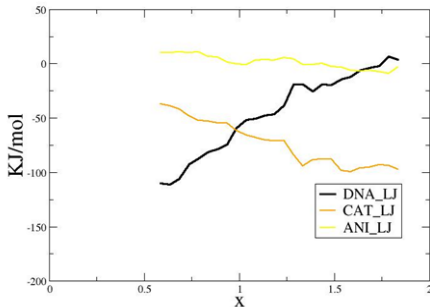
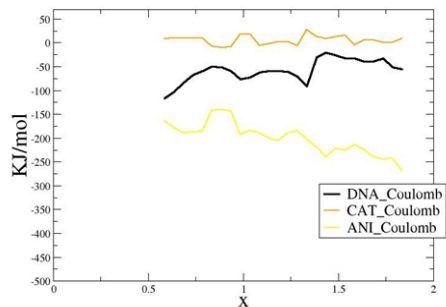


Gráfico 30 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogénio em RTIL [HYDETMAZ][PF6]

Gráficos Relativos ao intercalador Etídio

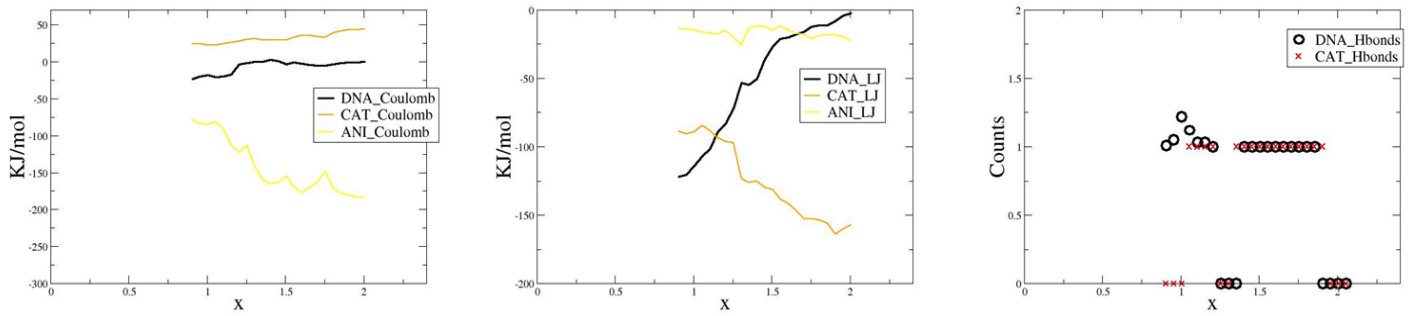


Gráfico 31 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BDHYDOZA][BF4]

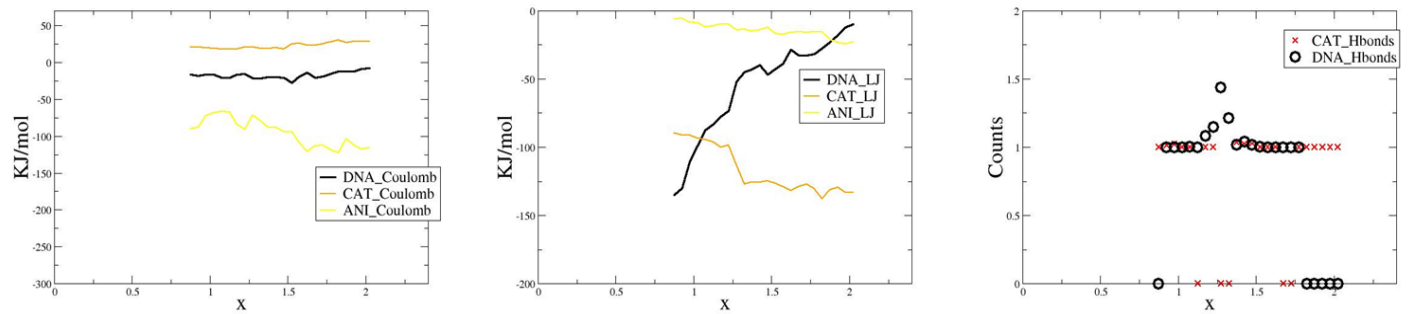


Gráfico 32 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BDHYDOZA][PF6]

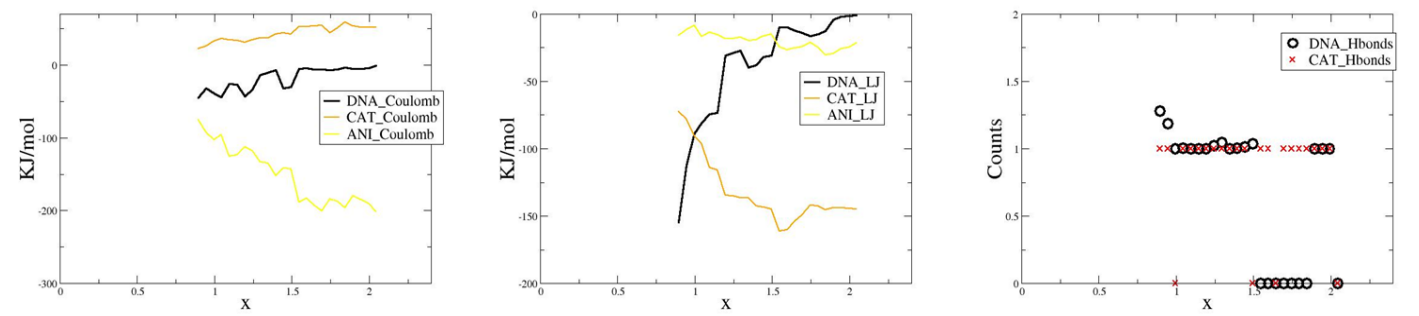


Gráfico 33 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BIM][BF4]

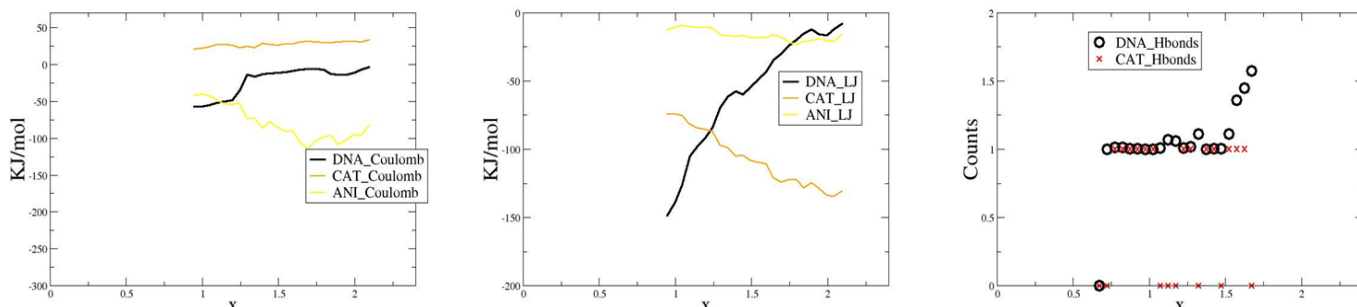


Gráfico 34 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BIM][PF6]

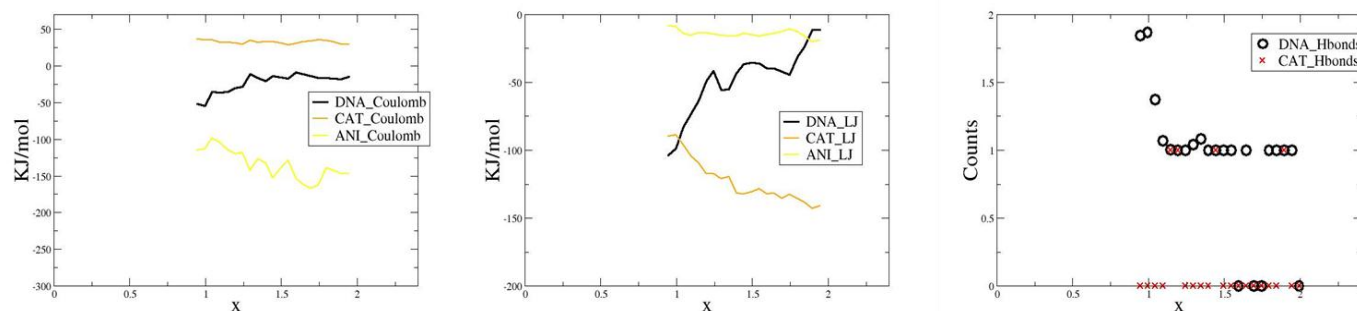


Gráfico 35 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BPYR][BF4]

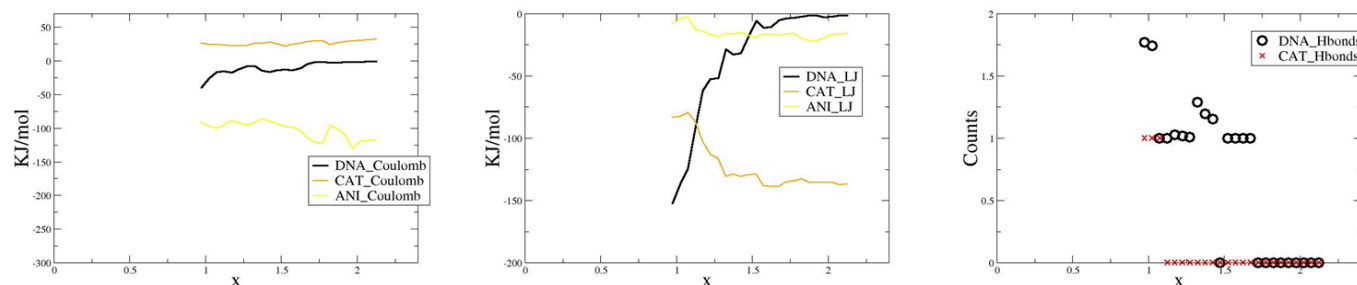


Gráfico 36 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BPYR][PF6]

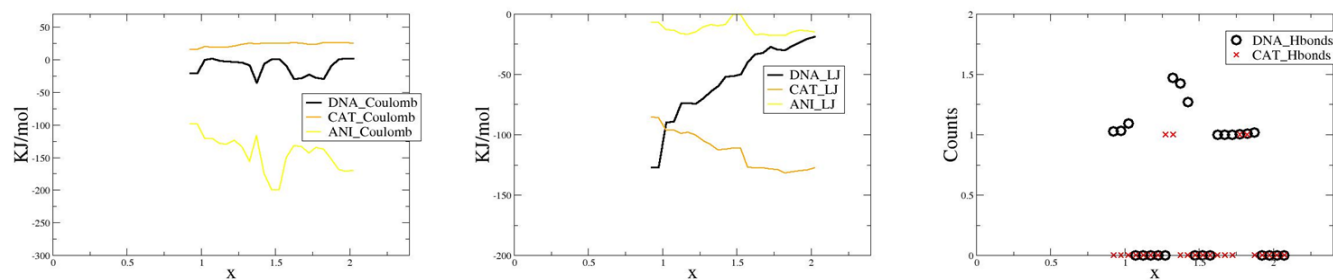


Gráfico 37 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BPYRR][BF4]

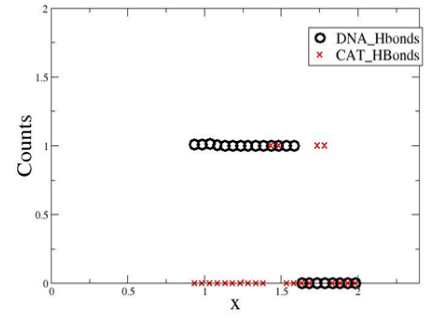
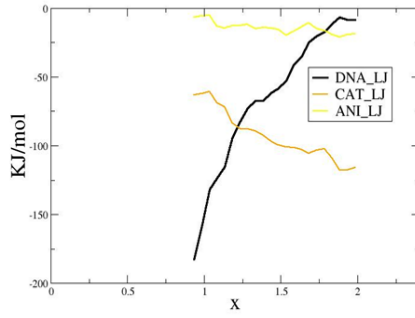
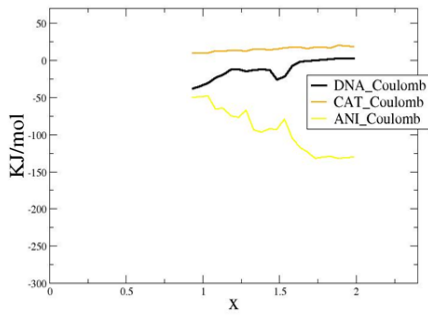


Gráfico 38 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BPYRR][PF6]

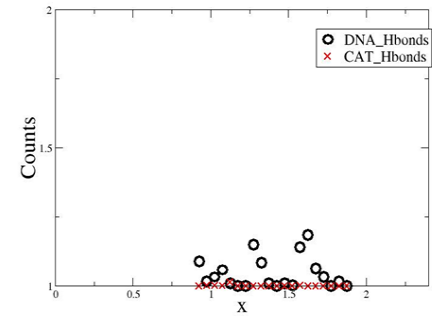
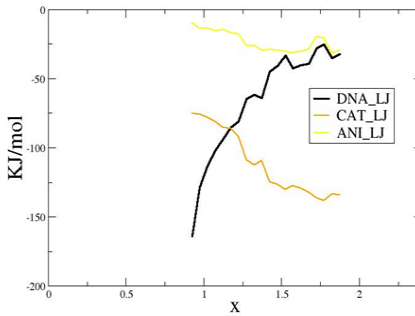
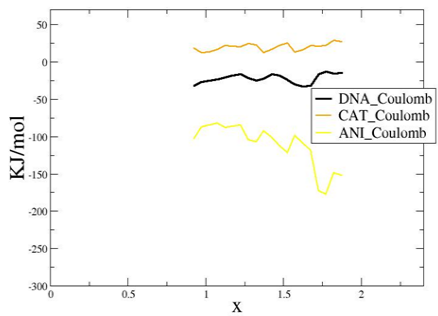


Gráfico 39 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [HYDETMAZ][BF4]

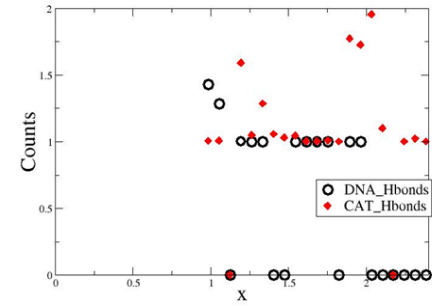
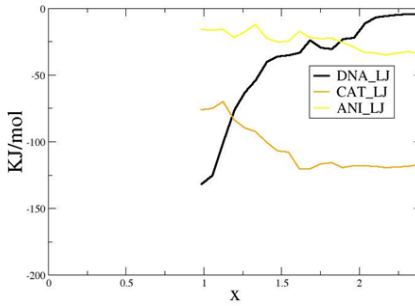
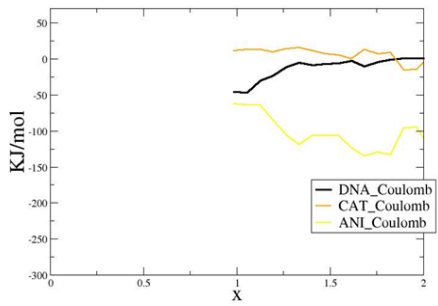


Gráfico 40 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [HYDETMAZ][PF6]

Gráficos Relativos ao intercalador Proflavine

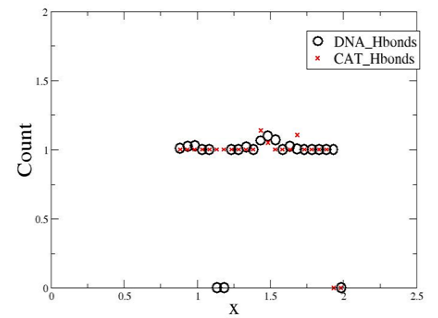
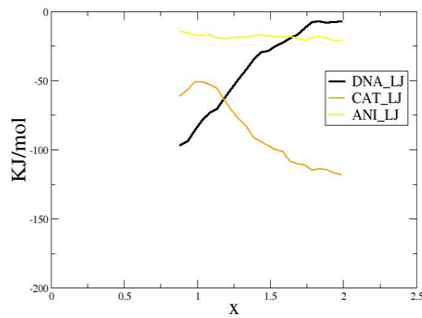
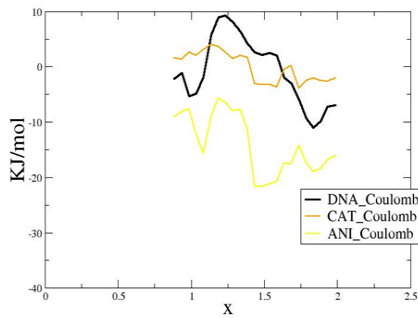


Gráfico 41 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BDHYDOZA][BF4]

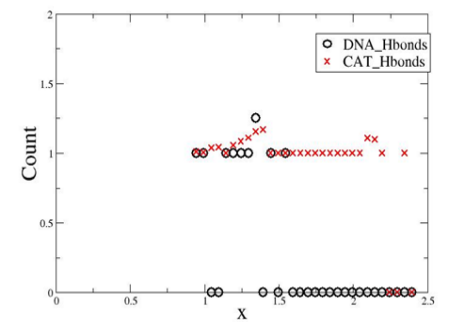
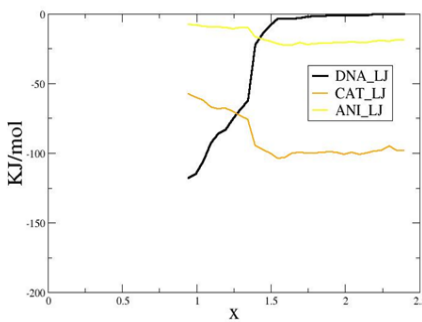
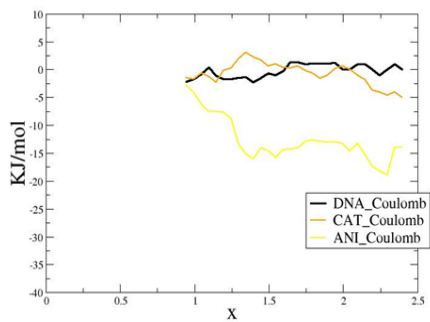


Gráfico 42 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BDHYDOZA][PF6]

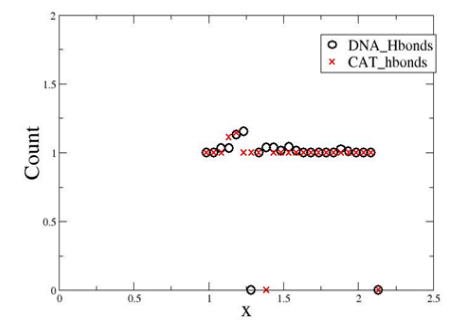
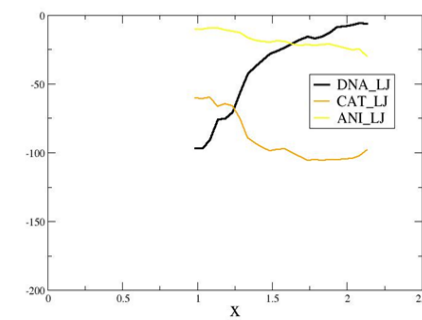
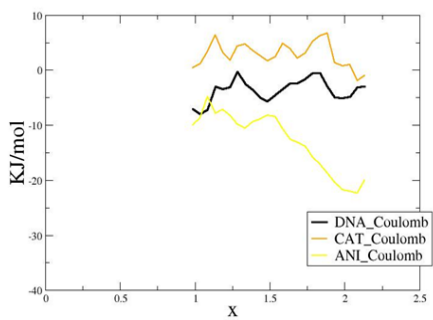


Gráfico 43 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BIM][BF4]

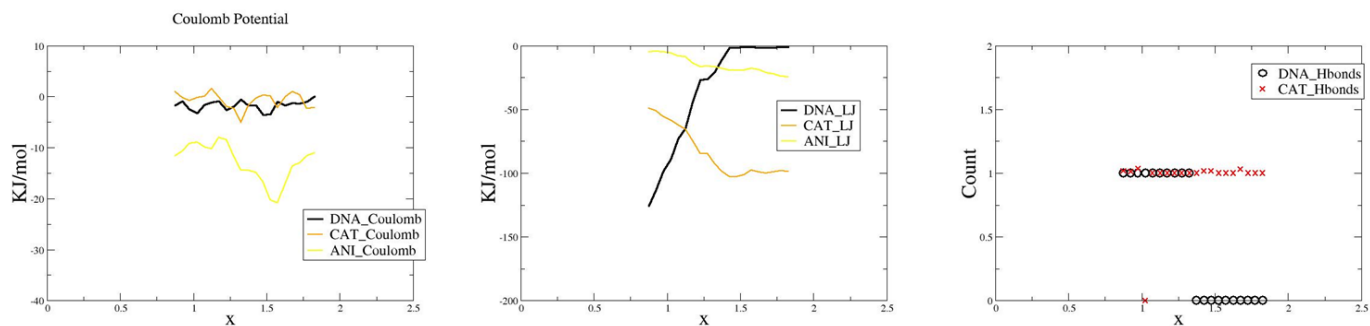


Gráfico 44 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BIM][PF6]

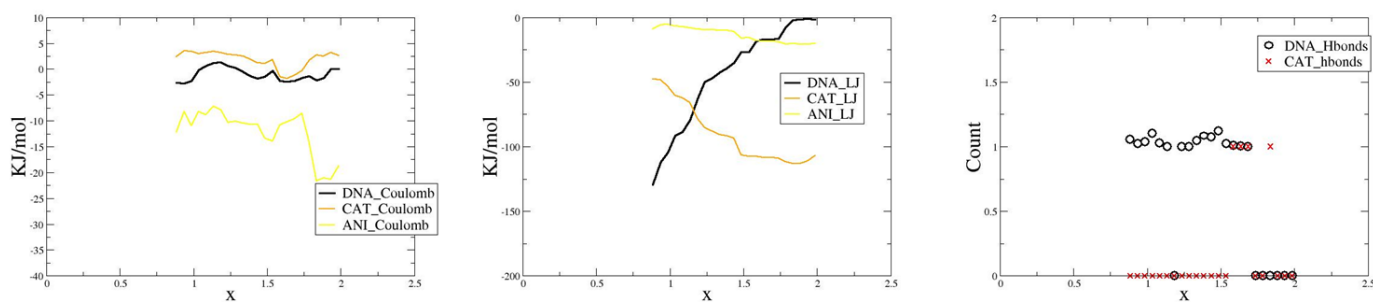


Gráfico 45 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BPYR][BF4]

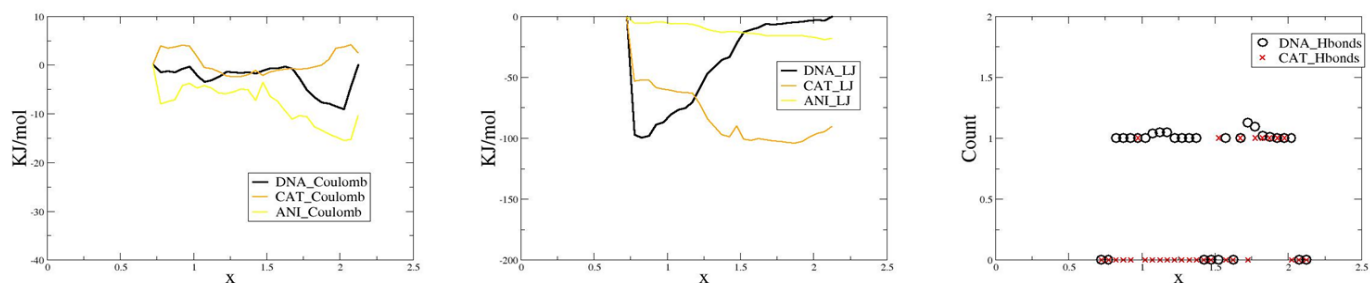


Gráfico 46 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BPYR][PF6]

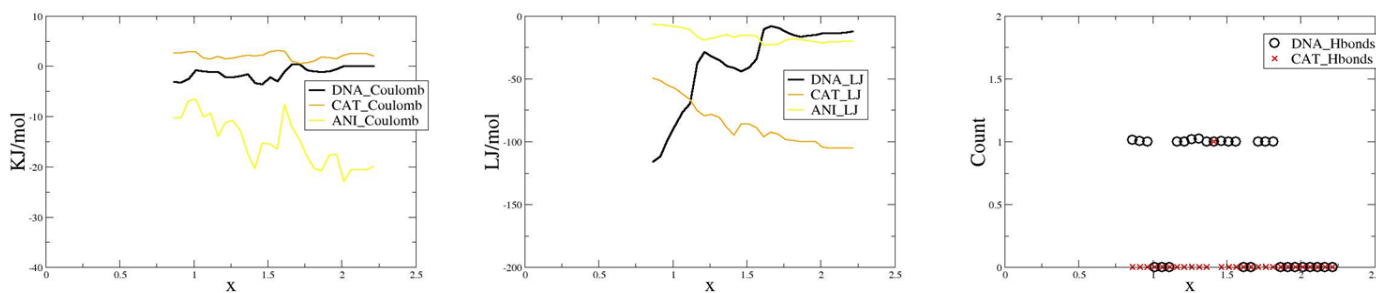


Gráfico 47 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BPYRR][BF4]

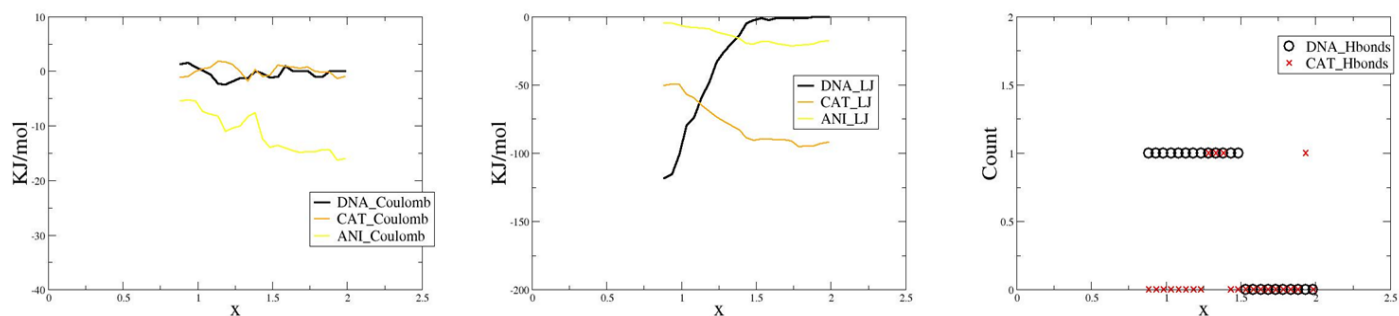


Gráfico 48 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BPYRR][PF6]

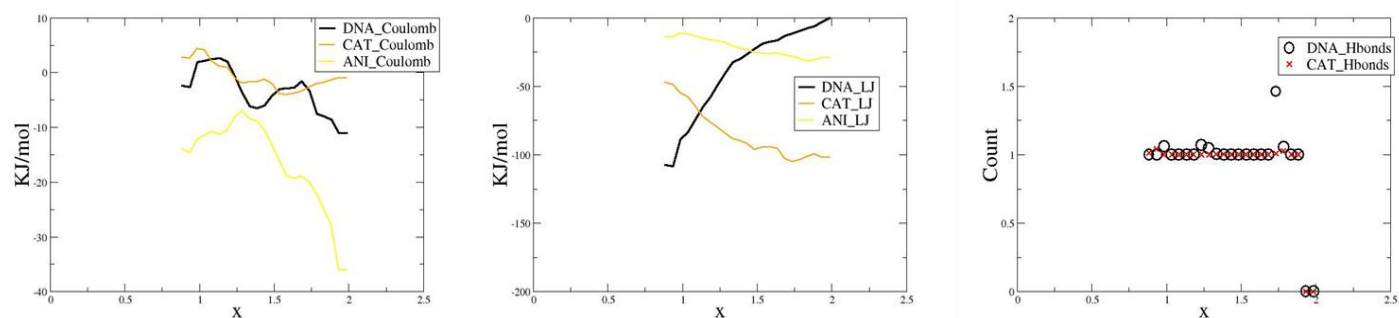


Gráfico 49 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [HYDETMAZ][BF4]

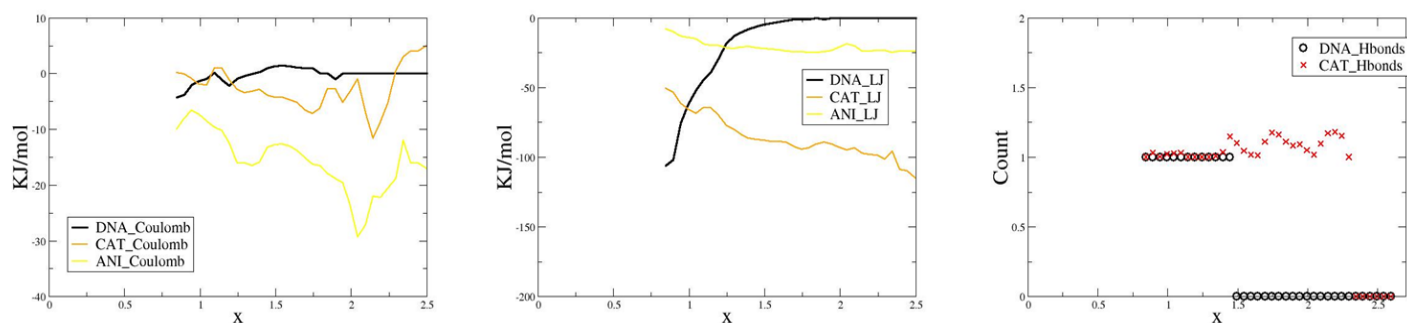


Gráfico 50 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [HYDETMAZ][PF6]

Gráficos Relativos ao intercalador Proflavine Reduzida

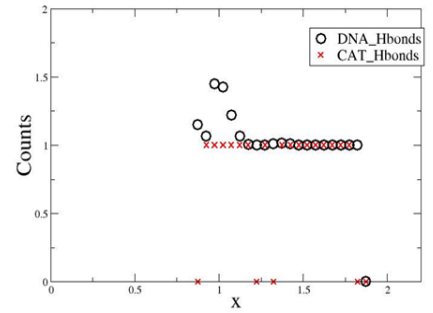
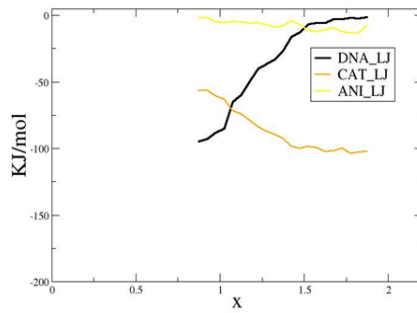
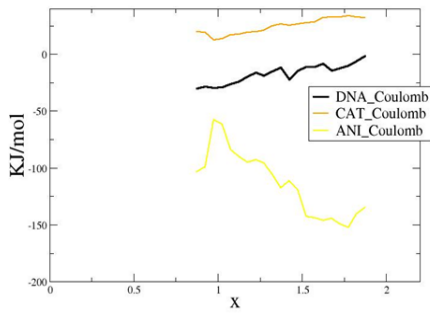


Gráfico 51 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BDHYDOZA][BF4]

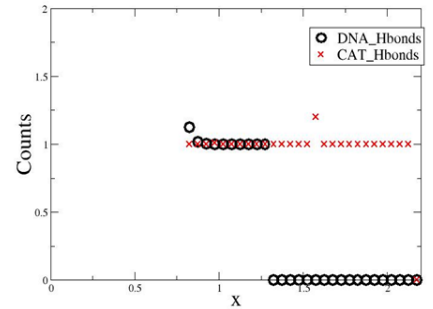
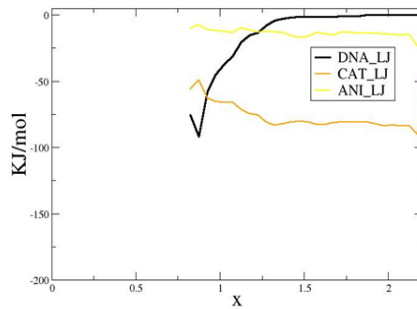
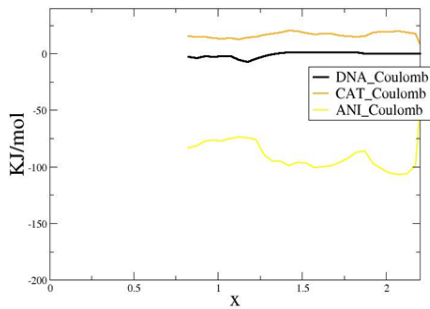


Gráfico 52 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BDHYDOZA][PF6]

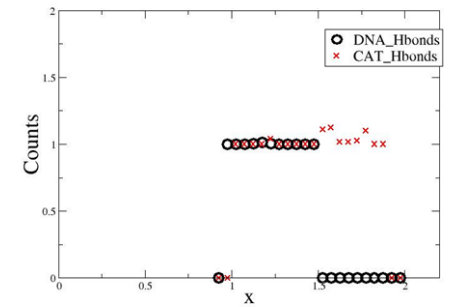
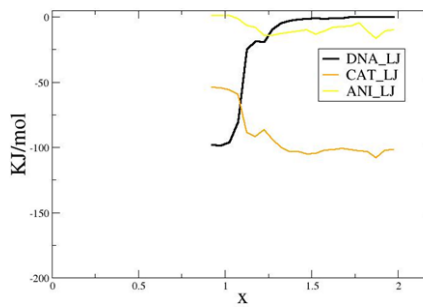
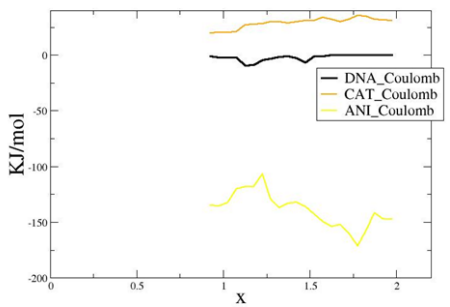


Gráfico 53 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BIM][BF4]

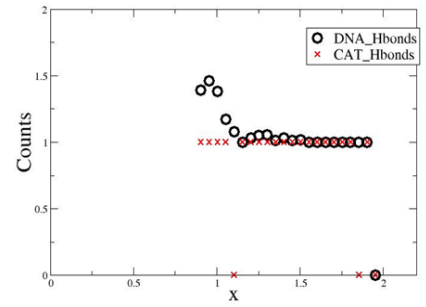
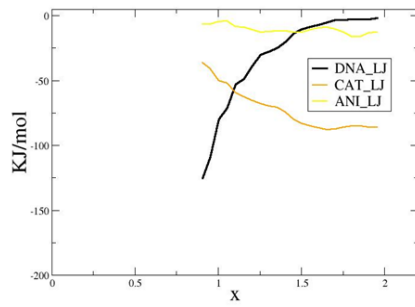
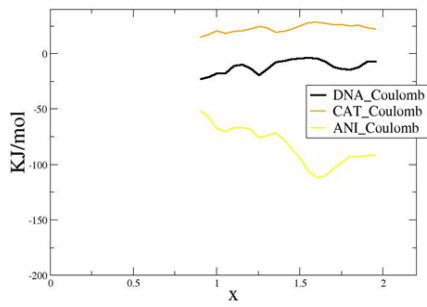


Gráfico 54 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BIM][PF6]

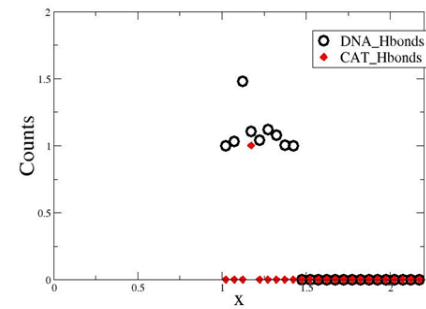
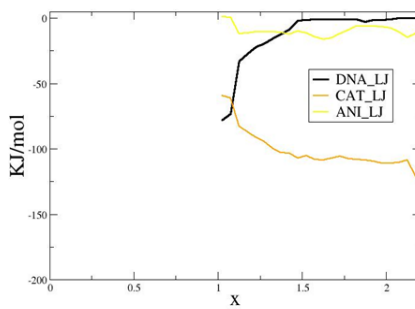
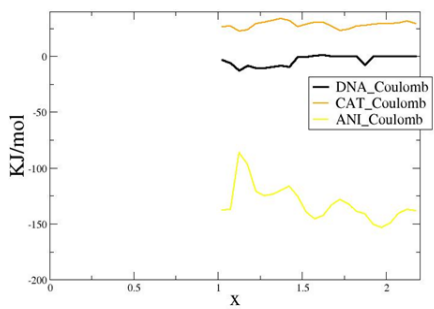


Gráfico 55 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BPYR][BF4]

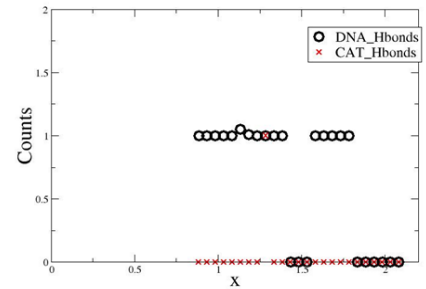
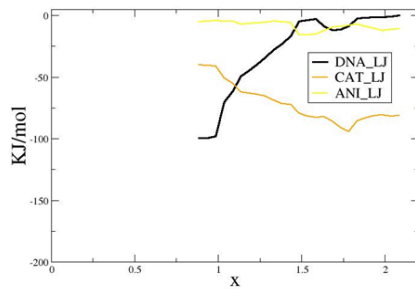
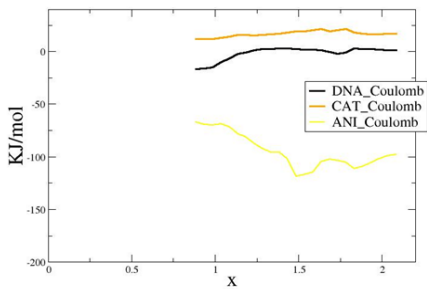


Gráfico 56 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BPYR][PF6]

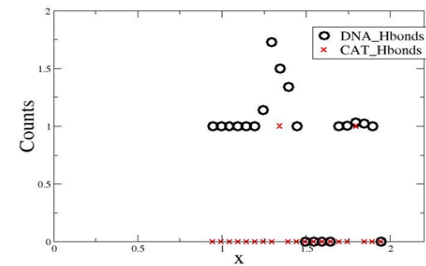
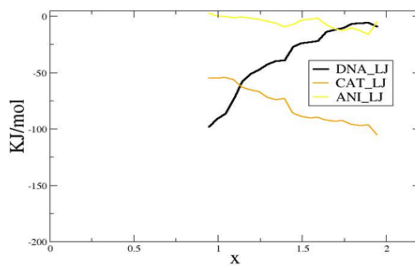
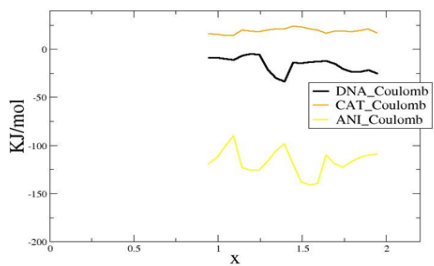


Gráfico 57 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BPYRR][BF4]

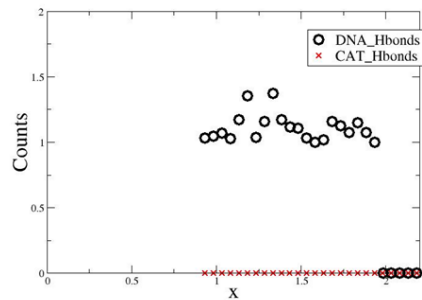
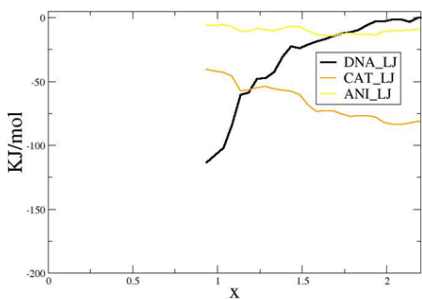
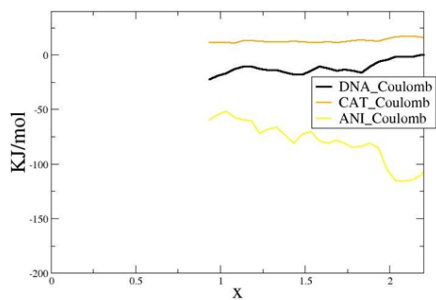


Gráfico 58 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [BPYRR][PF6]

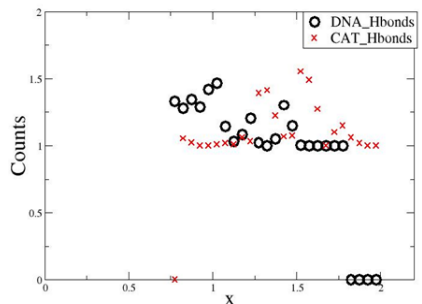
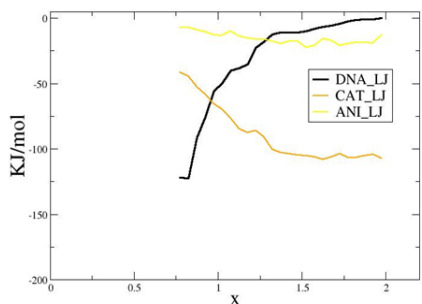
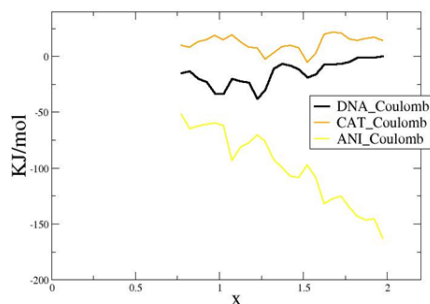


Gráfico 59 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [HYDETMAZ][BF4]

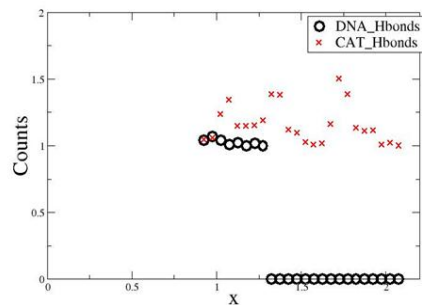
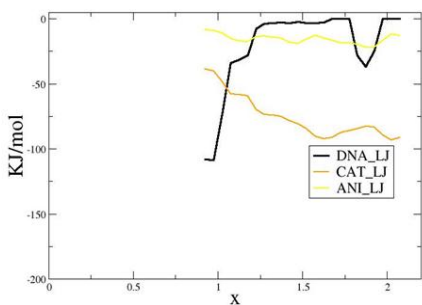
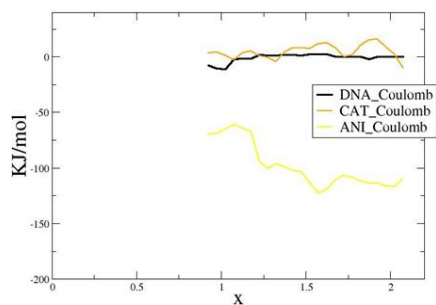


Gráfico 60 Potenciais de Coulomb, Leonard-Jones e formação de pontes de Hidrogênio em RTIL [HYDETMAZ][PF6]