

## Estudio mediante dinámica molecular de la estructura tridimensional del $\kappa$ -carragenano en diferentes solventes

C. Fernández Gauna<sup>a,b</sup>, M. Villegas<sup>c</sup>, S. Guidugli<sup>c</sup>, C. Esteban<sup>c</sup>, S. Paoletti<sup>d</sup>, S. Pantano<sup>e</sup> y J. Benegas<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Matemática Aplicada San Luis Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Ejército De Los Andes 950 - (5700) -San Luis – Argentina.

<sup>b</sup>Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Cuyo, Av. Libertador 80 Centro Universitario (5500) Mendoza Argentina.

<sup>c</sup>Instituto de Matemática Aplicada San Luis Departamento de Física, Universidad Nacional de San Luis- Ejército De Los Andes 950 - (5700) -San Luis – Argentina.

<sup>d</sup>Dipartimento di Biochimica, Biofisica e Chimica delle Macromolecole, Università di Trieste, Trieste, Italia.

<sup>e</sup>Instituto Pasteur, Montevideo, Uruguay.

Recibido el 21 de septiembre de 2009; aceptado el 15 de enero de 2010

El  $\kappa$ -carragenano es un polisacárido iónico extraído de algas marinas rojas constituido por unidades repetitivas copoliméricas de  $\alpha$ -(1-3) D-galactosa 4-sulfato y  $\beta$ -(1-4) 3,6-anhydro-D-galactosa. El conocimiento de las bases moleculares que determinan la conformación tridimensional de este polisacárido, es fundamental tanto para comprender las interacciones que llevan a la formación de geles como para regular sus propiedades industriales. Como sucede con tantos biopolímeros, si bien su estructura primaria es conocida, su estructura secundaria no está aún bien determinada, dependiendo la misma de las condiciones físico-químicas de la solución. En este trabajo proponemos estudiar el efecto de las moléculas de solvente sobre la conformación molecular. Para ello se ha realizado un estudio mediante dinámica molecular (MD) de un decámero de las unidades disacarídicas que forman el  $\kappa$ -carragenano, con el soluto sumergido en dos solventes moleculares explícitos de propiedades muy distintas: DMSO y agua. Las simulaciones fueron realizadas utilizando el paquete computacional GROMACS MD, utilizando en ambos cálculos átomos de Na<sup>+</sup> como contraiones. Se han calculado las trayectorias de los ángulos diedros glicosídicos, los enlaces hidrógenos y las distancias interatómicas más relevantes a la conformación polimérica, mostrándose un buen acuerdo con los resultados experimentales disponibles, así como una coherencia global con cálculos previos de mecánica y dinámica molecular en agua o vacío.

*Descriptor:*  $\kappa$ -carragenano; dinámica molecular; efecto del solvente.

The  $\kappa$ -carrageenan is an ionic polysaccharide extracted from marine red algae constituted by the copolymeric repetitive units of  $\alpha$ -(1-3) D-galactose 4 - sulfate and  $\beta$ -(1-4) 3,6-anhydro-D-galactose. The knowledge of the molecular bases that determine the three-dimensional conformation of this polysaccharide is fundamental to understand the interactions leading to gel formation, as well as the regulation of its industrial properties. As with other biopolymers, even though its primary structure is well-known, the secondary structure is still a matter of debate. This work present and discuss the results of Molecular Dynamics (MD) simulations of a decamer of the repeating disaccharide unit constituting the  $\kappa$ -carrageenan. The simulations were run using the GROMACS MD package, with the solute immersed in molecular solvent, either DMSO or water, and using Na<sup>+</sup> atoms as counterions. The dynamics of the central glycosidic angles are presented, as well as the pattern of possible intramolecular and solvent mediated H-bonds and some characteristics interatomic distances. These results are in good agreement with the available experimental data, as well as those of previous molecular mechanics and dynamics.

*Keywords:*  $\kappa$ -carrageenan; molecular dynamics; solvent effect.

PACS: 87.10.Tf; 87.14.Df; 87.15ap

### 1. Introducción

El  $\kappa$ -carragenano es un polisacárido sulfatado que se extrae de varias especies de algas rojas. Su estructura primaria consiste en una secuencia de unidades repetitivas del disacárido  $\alpha$ -(1→3)D-galactosa 4-sulfato (en adelante S)  $\beta$ -(1→4) 3,6-anhydro-D-galactosa (en adelante A), como muestra la Fig. 1. Bajo condiciones físico químicas apropiadas este polímero puede formar geles termorreversibles [1]. La gelificación se produce a baja temperatura, alta fuerza iónica, alta concentración de polímero y en presencia de contraiones alcalino-metálicos de gran radio iónico (K, Cs).

A pesar de que su estructura primaria está bien determinada, no ocurre lo mismo con su estructura secundaria la cual

aún está en discusión en la comunidad científica [2,3]. Soluciones diluidas de  $\kappa$ -carragenano han sido estudiadas en nuestro grupo tanto experimental como teóricamente, con el objeto de caracterizar y modelar la transición conformacional del tipo desorden-orden que inicia el proceso de gelificación [3-6]. El efecto del solvente (entendido como los cambios conformacionales consecuencia de la polarización del soluto y su entorno) sobre el comportamiento conformacional es muy complejo y a la vez de vital importancia para sus propiedades físicos-químicas y aplicaciones biotecnológicas. Este efecto generalmente se acentúa cuando el soluto está ionizado, como es el caso de los carragenanos.

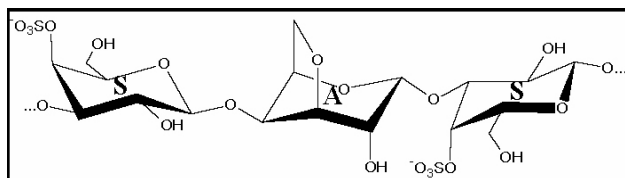


FIGURA 1. Estructura primaria del  $\kappa$ -carragenano, donde se pueden observar los dos tipos de uniones: SA y AS.

A pesar de la importancia biotecnológica e industrial del  $\kappa$ -carragenano, y de la importancia que la conformación molecular tiene sobre las mismas, relativamente pocos estudios se han realizado para determinar sus preferencias conformacionales, y cómo las mismas están influenciadas por variables físico-químicas como temperatura, fuerza iónica y naturaleza del solvente. Existen trabajos de simulaciones moleculares, pero éstos han sido realizados sobre pequeñas moléculas (disacáridos o tetrasacáridos), para estudiar la unión AS (o para su versión no sulfatada). Los cálculos más recientes fueron realizados por Bosco *et al.* [4], quienes simularon mediante mecánica molecular (MM) tetrámeros A-S-A-S, de manera de estudiar tanto las uniones AS como las SA. Utilizando el campo de fuerzas CVFF del paquete Insight II BIOSYM obtuvieron un diagrama de Ramachandran con una región energéticamente favorable constituida por tres mínimos relativos, un mínimo principal, que denominaron AS-a, y los otros dos mínimos, conectados al mismo, pero separados por barreras energéticas de alrededor de 1 y 2,5 kcal mol<sup>-1</sup> por encima del mínimo principal, respectivamente. En el mismo trabajo Bosco *et al.* [4] realizaron un estudio de RMN de polímeros de  $\kappa$ -carragenano en solución de dimetilsulfóxido (DMSO). Obtuvieron que las distancias interatómicas deducidas de los espectros de resonancia implican que, en solución, las conformaciones posibles son las ubicadas en el mínimo principal. Por otro lado Ueda *et al.* [7] obtuvieron, mediante espectroscopía de RMN, un resultado similar para la unión AS del disacárido en solución acuosa. Estos autores realizaron simulaciones de MM y de dinámica molecular (DM) del correspondiente disacárido (ambas realizadas con el programa CHARMM25). Por el primer método encontraron una sola región accesible, constituida de dos mínimos interconectados por barreras de relativamente baja energía, que identificaron como a y b. El mínimo principal, “a”, es muy similar al mínimo AS-a de Bosco *et al.* [4]. Las simulaciones de DM en agua muestran que dinámicas comenzadas en un dado mínimo, permanecen en el mismo, aunque la corta duración de las simulaciones (menos de un nanosegundo) no permite la generalización de estas conclusiones. Los resultados de RMN de Ueda *et al.* [7] muestran que, en solución acuosa, el disacárido permanece la mayor parte del tiempo en la región conformacional correspondiente al mínimo principal. Bosco *et al.* [4] resaltan el hecho que los resultados, tanto experimentales como de simulación molecular, del disacárido AS y del polímero sean tan parecidos. Al respecto es notable que las simulaciones de MM de Le Questel *et al.* [8] y de Urbani *et al.* [9] obtuvieron, con distintos campos de fuerzas, resultados similares, aún cuando estos últimos autores en sus

simulaciones no incluyeran interacciones electrostáticas.

Con respecto a la unión SA, los cálculos de MM de Bosco *et al.* [4] muestran dos regiones permitidas, simétricas para valores positivos y negativos del ángulo  $\psi_{SA}$ . Las dos regiones permitidas están separadas por una barrera de potencial relativamente pequeña (alrededor de 1 cal mol<sup>-1</sup>), denotando que el sistema debería visitar ambas zonas con similar probabilidad y con frecuentes intercambios entre ellas. Sin embargo mediante un análisis de RMN deducen que, para el polímero en solución solo una de ellas es permitida, llamada SA-a en su trabajo. Los resultados de simulación [8,10] como los de NMR de Parra *et al.* [10], parecen confirmar que el disacárido prefiere la región de  $\psi_{SA} > 0$ , mientras que los resultados de Bosco *et al.* [4], apuntan a que en el comportamiento polimérico la otra zona, con ángulos  $\psi_{SA} < 0$ , parece ser la preferida. Uno de los objetivos de nuestro trabajo es comprobar si este comportamiento polimérico se puede apreciar en oligómeros de 10 unidades repetitivas.

En este panorama el presente estudio propone utilizar simulaciones de dinámica molecular para contribuir a la comprensión a nivel molecular de las propiedades conformacionales del  $\kappa$ -carragenano en dos solventes de características bien distintas (en particular su capacidad para intercambiar protones): dimetilsulfóxido (DMSO) y agua. Los resultados muestran, que durante los 10 ns de las DM, todas las uniones AS y SA frecuentan respectivas regiones similarmente extendidas del espacio conformacional ( $\phi, \psi$ ), en acuerdo global con cálculos previos [4,8,9]. Nuestro estudio muestra sin embargo que el número, ubicación e importancia relativa de los máximos de la probabilidad  $P(\phi, \psi)$  dependen del solvente. Se logra además un excelente acuerdo con distancias interatómicas experimentalmente determinadas [4] y en la descripción de puentes H, tanto intramoleculares como con las moléculas de solvente. Es destacable que el tamaño del soluto simulado y la duración de las respectivas DM han mejorado la estadística en más de dos ordenes de magnitud respecto a cálculos previos, permitiendo calcular con excelente precisión la probabilidad  $P(\phi, \psi)$  de encontrar una unión glicosídica (AS o SA) con ángulos en un entorno de ( $\phi, \psi$ ).

## 2. Método

Para realizar la dinámica molecular se construyó un modelo estructural del decámero del disacárido ( $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)D-galactosa 4-sulfato  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)3,6-anhidro-D-galactosa), unidad repetitiva que forma el  $\kappa$ -carragenano. Para este modelo se tomaron las conformaciones de más baja energía obtenidas en cálculos previos de mecánica molecular [9]. El soluto se sumergió en una caja de simulación con moléculas de DMSO (modelizado con los grupos metilos unificados) ó H<sub>2</sub>O. La Tabla I muestra los detalles de ambos cálculos. Para la parametrización del sistema se utilizó en ambos casos el campo de fuerza GROMOS96 [11] y el modelo de agua SPC [12] (modelo que además de ser computacionalmente eficiente, ha demostrado dar resultados correctos en otras moléculas

TABLA I. Características de las simulaciones.

	Simulación con DMSO	Simulación con H <sub>2</sub> O
Átomos de $\kappa$ -carragenano	420	420
Contraiones	10 átomos de Na	10 átomos de Na
N° de átomos de solvente	42888	87408
N° de moléculas de solvente	10722	29136
Tamaño total del sistema	43318	87838
Conformación inicial del k-carragenano	$(\Phi, \Psi)_{A-S} = (-40^\circ, -30^\circ)$ $(\Phi, \Psi)_{S-A} = (40^\circ, -30^\circ)^{(89)}$ .	$(\Phi, \Psi)_{A-S} = (-40^\circ, -30^\circ)$ $(\Phi, \Psi)_{S-A} = (40^\circ, -30^\circ)^{(89)}$ .
Tipo de asamblea	NPT	NPT
Acoplamiento Térmico	Nose-Hoover 363K	Nose-Hoover 300K
Acoplamiento de Presión	Parrinello-Rahman (1bar)	Parrinello-Rahman (1bar)
Interacción electrostática	Particle Mesh Ewald	Particle Mesh Ewald
Interacción de van der Waals	Cut-off	Cut-off
Tipo de caja	Cúbica	octahédrica
Dimensiones de la caja (nm)	10,710,23 × 10,3	10,5 × 10,5 × 10,5
Concentración	5,67 g/l	7,26 g/l
Tiempo de simulación	10ns	10ns
$\Delta t$	1,5fs	2fs

polisacarídicas [13,14]). Se usaron condiciones de contorno periódicas y una distancia de corte de 1nm para las interacciones no-enlazantes. Se restringieron todas las longitudes de enlace usando el algoritmo LINCS [15]. Las simulaciones se hicieron a temperatura [16,17] y presión [18,19] constantes. Las interacciones electrostáticas de largo alcance se calcularon usando la sumatoria *Particle Mesh Ewald (PME)* [20,21]. Inicialmente, se sometió el sistema a una minimización de energía y estabilización térmica acoplando la caja de simulación a un baño de 1 bar de presión. El sistema partió de una temperatura de 0K y luego se le aplicaron incrementos de 50K en predinámicas de 150 ps cada una hasta alcanzar las respectivas temperaturas de trabajo. A partir de ese momento se realizaron las dinámicas de 10ns utilizadas en el presente análisis. Las temperaturas finales fueron elegidas a partir de los diagramas de fase experimental temperatura-concentración [22,23], de manera de asegurar que a esa temperatura y concentración el polímero en el respectivo solvente estuviera mayormente en conformación desordenada.

Para el análisis de puentes hidrógenos se ha considerado que esta interacción existe si la distancia<sub>donor-acceptor</sub> ≤ 0,3 nm y si el ángulo<sub>A-D-A</sub> ≤ 45°. Se estudiaron todos los posibles pares aceptor-donor a lo largo de la cadena, calculando en cada caso la fracción del tiempo total de simulación en que las condiciones de puente hidrógeno se satisficieron. Esta fracción fue tomada como la probabilidad de existencia de dicho puente.

También se calcularon las funciones de probabilidad de ocurrencia de los ángulos diedros ( $\Phi, \Psi$ ) de cada unión glicosídica, definida como la fracción del número total de even-

tos de la DM que caen dentro de un rectángulo de  $5^\circ \times 5^\circ$  alrededor del punto ( $\Phi, \Psi$ ) en que se dividió todo el espacio conformacional. Los ángulos glicosídicos fueron definidos como sigue:

$$\Phi_{A-S} = H_1 - C_1(A) - O - C_3(S),$$

$$\Phi_{S-A} = H_1 - C_1(S) - O - C_4(A),$$

$$\Psi_{A-S} = C_1(A) - O - C_3 - H_3(S),$$

$$\Psi_{S-A} = C_1(S) - O - C_4 - H_4(A).$$

La Fig. 2 muestra un esquema del sistema estudiado e indica cómo se numeraron las 19 uniones glicosídicas del decámero de unidades disacarídicas.

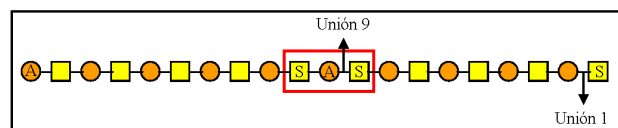


FIGURA 2. Esquema de la cadena de  $\kappa$ -carragenano. Círculos: monómeros  $\beta$ -(1-4) 3,6-anhidro-D-galactosa (A), cuadrados: monómeros  $\alpha$ -(1-3) D-galactosa 4-sulfato (S). El rectángulo sobreimpreso marca las uniones centrales analizadas.

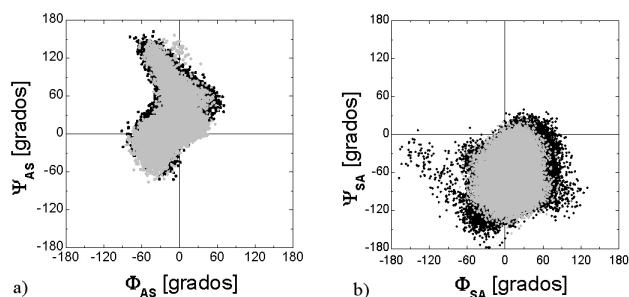


FIGURA 3. Mapas de Ramachandran para la unión 9 (AS) y 10 (SA). En DMSO (negro) y en H<sub>2</sub>O (gris).

### 3. Resultados

#### 3.1. Análisis de ángulos diedros

Un análisis de la trayectoria de los ángulos glicosídicos de las uniones AS y SA muestra que las zonas visitadas por los ángulos de las uniones centrales son representativas del conjunto. Por ello en la Fig. 3 se presentan solo los mapas tipo Ramachandran correspondientes a dichas uniones centrales (9 y 10) de la cadena en ambos solventes, suponiéndolas además características del comportamiento polimérico.

Se observa que las zonas de los dos ángulos glicosídicos visitadas en ambos solventes son similares. Un análisis detallado de las funciones de distribución de probabilidad  $P(\phi, \psi)$  permite distinguir algunas diferencias en los espacios conformacionales para cada solvente. La Tabla II presenta un resumen de las zonas más visitadas y de sus probabilidades de ocurrencia. Las principales características de cada zona son:

**Unión AS:** La Fig. 4a muestra que en la simulación en DMSO la zona más visitada por el sistema es **D1<sub>AS</sub>**, que contiene más del 70 % de los eventos con ángulos en el sector

$(\Phi, \Psi)_{D1AS} = (-35^\circ \pm 10^\circ, -1^\circ \pm 10^\circ)$ . Para valores algo mayores de ambos ángulos se encuentra una zona secundaria **D2<sub>AS</sub>**, definida por  $(\Phi, \Psi)_{D2AS} = (-8^\circ \pm 34^\circ, 69^\circ \pm 23^\circ)$ , que contiene alrededor del 20 % de los eventos.

En la simulación en AGUA se pueden identificar tres regiones. La denominada **W2<sub>AS</sub>**,

$$(\Phi, \Psi)_{W2AS} = (-36^\circ \pm 12^\circ, -9^\circ \pm 17^\circ),$$

es una región similar a **D1<sub>AS</sub>**, sin embargo, es menos visitada que en DMSO (alrededor de 1/3 del total). La zona más frecuente (algo más del 60 %) es la **W1<sub>AS</sub>**, definida por  $(\Phi, \Psi)_{W1AS} = (5^\circ \pm 13^\circ, 13^\circ \pm 10^\circ)$ . Se puede definir una tercer región, **W3<sub>AS</sub>**, para valores positivos de  $\Psi_{AS}$  ( $68^\circ \pm 25^\circ$ ), similares a los valores de la zona **D2<sub>AS</sub>**, pero distribuidos en un amplio rango de valores de  $\Phi_{AS}$ . Una visión cualitativa de estas distribuciones indica que el decámero en agua toma una mayor diversidad de conformaciones que en DMSO, que podría resultar en una mayor flexibilidad del soluto en ese solvente.

**Unión SA.** En DMSO el sistema visita, con similar probabilidad, dos zonas: **D1<sub>SA</sub>**, caracterizada por

$$(\Phi, \Psi)_{D1SA} = (18^\circ \pm 24^\circ, -30^\circ \pm 21^\circ)$$

y **D2<sub>SA</sub>** con  $(\Phi, \Psi)_{D2SA} = (18^\circ \pm 24^\circ, -85^\circ \pm 22^\circ)$ . Estas zonas son muy similares a las visitadas por el sistema en H<sub>2</sub>O, pero con una marcada preferencia por la zona de mayor ángulo  $\Psi$ , **W1<sub>SA</sub>**,  $(\Phi, \Psi)_{W1SA} = (10^\circ \pm 19^\circ, -48^\circ \pm 21^\circ)$  (alrededor de dos tercios del total de eventos) con respecto a la zona **W2<sub>SA</sub>**, caracterizada por

$$(\Phi, \Psi)_{W2SA} = (10^\circ \pm 19^\circ, -89^\circ \pm 16^\circ),$$

que contiene alrededor de un tercio de los eventos.

TABLA II. Características de los máximos de la función de distribución.

a) Enlace A-S					
Solvente	Zona	$\Phi_{A-S}$ (°)	Probabilidad (%)	$\Psi_{A-S}$ (°)	Probabilidad (%)
DMSO	D1 <sub>AS</sub>	-35±10	72	-1±10	80
	D2 <sub>AS</sub>	-8±24	28	69±23	14
H <sub>2</sub> O	W1 <sub>AS</sub>	5±13	63	13±10	58
	W2 <sub>AS</sub>	-36±12	32	-9±17	36
	W3 <sub>AS</sub>	-50 < $\Phi$ < 45	5	68±25	5
b) Enlace S-A					
Solvente	Zona	$\Phi_{S-A}$ (°)	$\Psi_{S-A}$ (°)	Probabilidad (%)	
DMSO	D1 <sub>SA</sub>	18±24	-30±21	50	
	D2 <sub>SA</sub>	18±24	-85±22	50	
H <sub>2</sub> O	W1 <sub>SA</sub>	10±19	-48±21	67	
	W2 <sub>SA</sub>	10±19	-89±16	33	

TABLA III. Tiempo de Existencia (% del total) de los puentes H de la unión AS

Tipo de puente Hidrógeno	DMSO (%)	H <sub>2</sub> O Directos (%)	H <sub>2</sub> O Con inserción de agua (%)
I	17	1	< 1
II	44	7	6
III	92	82	85
IV	<1	14	0

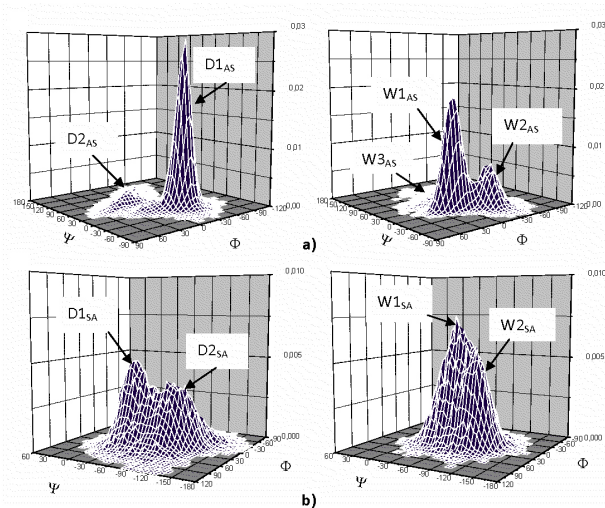


FIGURA 4. Funciones de distribución  $P(\Phi, \Psi)$  para: a) unión central A-S del decámero simulado (unión 9, Fig. 2). y b) unión central S-A (unión 10). En ambos casos la gráfica de la izquierda es para DMSO y la de la derecha para H<sub>2</sub>O. Se han rotulado las zonas accedidas por la DM de acuerdo a lo descrito en el texto.

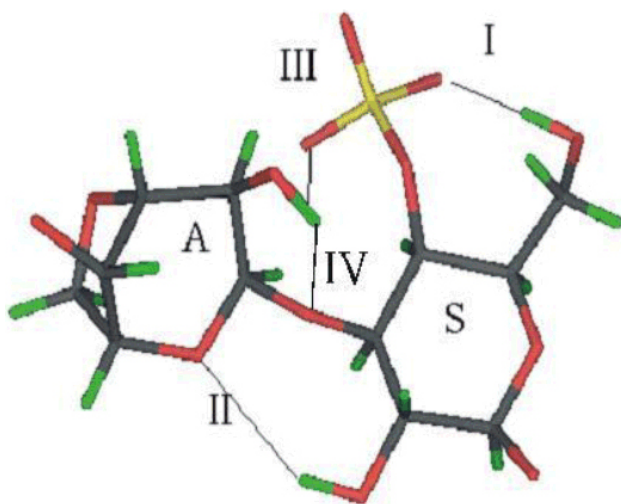


FIGURA 5. Clasificación de los enlaces puente hidrógeno en la Unión AS. **Tipo I:** Entre OH<sub>6</sub>(S) y los O(S) unidos al azufre. **Tipo II:** Entre el OH<sub>2</sub>(S) y el O<sub>5</sub>(A). **Tipo III:** Entre el OH<sub>2</sub>(A) y los O(S) unidos al azufre. **Tipo IV:** Entre el OH<sub>2</sub>(A) y el O de la unión AS.

Estos resultados se pueden apreciar en la Fig. 4, que muestra claramente que en DMSO la Unión AS intercambia la ubicación de su zona más probable respecto de Agua, donde además se identifican tres zonas posibles. En DMSO D1<sub>AS</sub> es además sustancialmente mejor definida que la zona secundaria, D2<sub>AS</sub>.

### 3.2. Análisis de enlaces puente hidrógeno

Para el análisis de los puentes hidrógeno, y siguiendo lo establecido en Métodos, se calcularon estos enlaces para todos los posibles pares aceptor/donador de la molécula. Se encontró que en la unión S-A no aparece de manera significativa ningún puente hidrógeno a lo largo de las diferentes trayectorias, tanto en DMSO como en H<sub>2</sub>O.

En cambio en la unión A-S se encontraron 4 puentes hidrógeno de alguna relevancia, los cuales se rotularon Tipo I, Tipo II, Tipo III y Tipo IV, como se muestra esquemáticamente en la Fig. 5.

El enlaces del Tipo I es entre átomos del mismo anillo, mientras los otros 3 unen los anillos A y S. La Tabla III presenta el porcentaje de tiempo total que estos cuatro tipos de puente Hidrógeno aparecen a lo largo de las trayectorias en ambos solventes. Se observa que en DMSO existe mayor porcentaje de puentes de Tipo I, lo cual en principio podría atribuirse a la característica aprótica de ese solvente; mientras que en agua aparece el puente Tipo IV que en DMSO no se presenta. Para correlacionar los puentes hidrógeno con la conformación molecular en la Fig. 6 se han graficado los tiempos de existencia de cada tipo de puente, según la zona ( $\Phi, \Psi$ ) visitada por la DM.

**DMSO:** En este caso no son posibles los enlaces mediados por moléculas de solvente. La Fig. 7a muestra que en la zona de mayor probabilidad (D1<sub>AS</sub>) existen enlaces de Tipo I, II y III, mientras que en la zona D2<sub>AS</sub> desaparece el enlace Tipo II, indicando que conformaciones de la zona D1<sub>AS</sub> deberían ser más rígidas aquellas de la zona D2<sub>AS</sub>. La distribución más afilada de D1<sub>AS</sub> parece confirmar esta conclusión, relegando por tanto el posible rol estabilizador del enlace H Tipo III, que es más frecuente en la región D2<sub>AS</sub>.

**AGUA:** Se analizaron tanto los enlaces puente hidrógeno directos como aquellos mediados por moléculas de agua, encontrándose en ambos casos que los enlaces Tipo III son los más importantes (alrededor del 85 % del tiempo total). En la Fig. 6 b) se muestra que, en concordancia con los resultados obtenidos para DMSO, la zona W2<sub>AS</sub>, que es la más similar a la D1<sub>AS</sub>, está asociada con la existencia del puente H Tipo II, mientras que las regiones W1<sub>AS</sub> y W3<sub>AS</sub> favorecen la formación del enlace Tipo III y también el Tipo IV, aunque el tiempo de existencia de este enlace intraresiduo es solo del 14 %.

### 3.3. Análisis de distancias entre protones

La distribución de la distancia entre átomos particulares, calculados con los datos de la DM, se compara con las distancias

interatómicas obtenidas de experimentos de RMN-NOE en soluciones diluidas. La Fig. 7 muestra el esquema molecular de las tres distancias calculadas, cuyos resultados se resumen en la Tabla IV, que incluye también un análisis de esas distancias separando los eventos según las zonas del espacio ( $\Phi, \Psi$ ) definidas en la Tabla II.

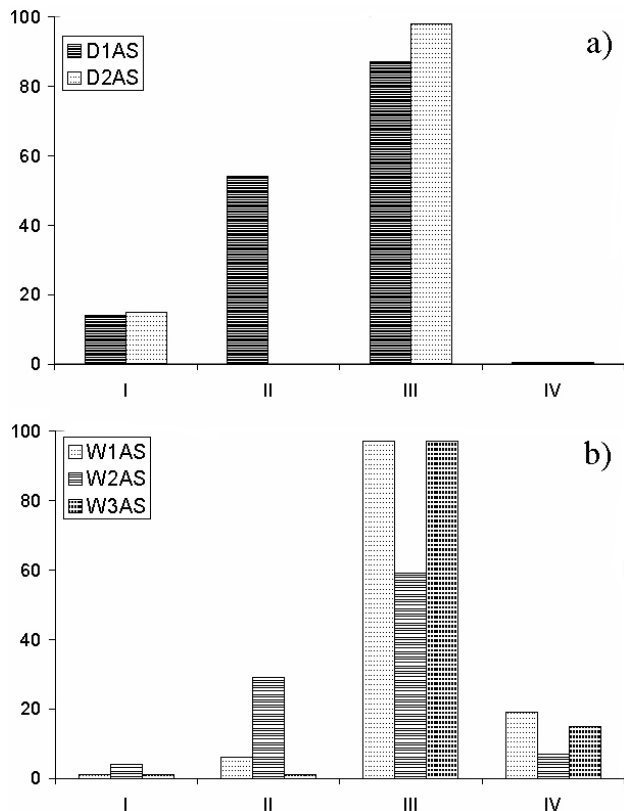


FIGURA 6. Fracción (en %) del tiempo total de simulación de existencia de los distintos tipos de enlaces hidrógeno, según las zonas visitadas por el sistema. a) DM en DMSO. b) DM en H<sub>2</sub>O.

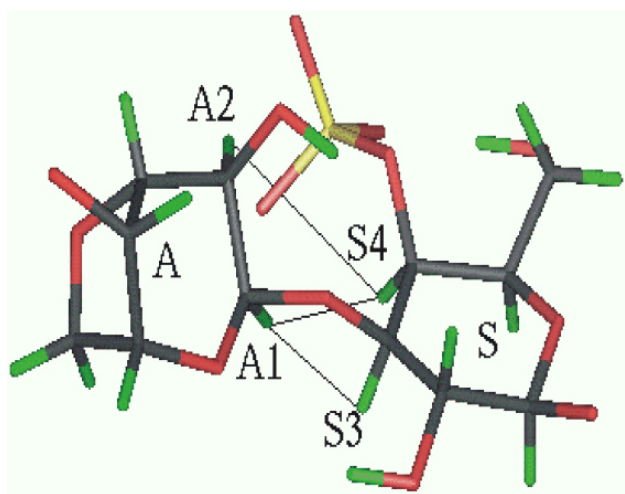


FIGURA 7. Distancias calculadas en la unión AS. **A1-S3**: Desde H<sub>1</sub>(A) hasta H<sub>3</sub>(S) **A1-S4**: Desde H<sub>1</sub>(A) hasta H<sub>4</sub>(S) **A2-S4**: Desde H<sub>2</sub>(A) hasta H<sub>4</sub>(S).

**DMSO:** Se observa en la Tabla IV que el valor medio (y dispersión) de la distancia A1-S3 es menor para los eventos de la zona D1<sub>AS</sub> (80 % del total) que para los eventos de la zona D2<sub>AS</sub> (20 % del total), indicando la cercanía de esos átomos durante la mayor parte de la simulación. El valor experimental ( $0,26 \pm 0,03$  nm) de RMN (que implica un promedio termodinámico en un tiempo del orden del milisegundo) concuerda mejor con el valor medio de los eventos de la zona D2<sub>AS</sub>.

El valor medio de la distancia A1-S4 para los eventos de la zona D1<sub>AS</sub> (83 % del total) muestra un excelente acuerdo con los datos experimentales de RMN [4,7] que obtienen también una fuerte señal para este par de átomos. En zona D2<sub>AS</sub> (17 % del total) estos átomos están bastante más separados, aportando relativamente poco a la señal de RMN.

Por último para la distancia A2-S4 los eventos de ambas zonas del diagrama ( $\Phi, \Psi$ ) muestran una mayor separación entre los correspondientes átomos H. Los valores encontrados para los eventos de la zona D1<sub>AS</sub> (92 % del total) muestran un muy buen acuerdo con los datos derivados de los experimentos de RMN. Los de la zona D2<sub>AS</sub> (7 % del total) están a una distancia en el límite de la detección experimental y además son pocos, por lo cual su incidencia en el promedio termodinámico debería ser nuevamente poco significativa.

**AGUA:** Respecto a la simulación en agua, si bien no se dispone de resultados experimentales para comparación, estos cálculos indican para la distancia A1-S3 valores ligeramente menores que los calculados en DMSO y también menores a los reportados por Ueda *et al.* [7]. Respecto de la distancia A1-S4 la Tabla IV muestra que los valores calculados para los eventos de las zonas W1<sub>AS</sub> y W2<sub>AS</sub>, enmarcan perfectamente los valores experimentales (en DMSO), mientras que los eventos de la tercera zona (solo 4 %) indican distancias mayores. El valor obtenido en los eventos de la zona W2<sub>AS</sub> coincide con el reportado por Ueda *et al.* [7] en la misma zona del mapa conformacional. Para la distancia A2-S4, el valor experimental está ubicado entre los valores obtenidos para ambas zonas del espacio ( $\Phi, \Psi$ ), y dentro de las incertezas experimentales y teóricas.

De confirmarse experimentalmente estos resultados implicaría que las conformaciones obtenidas por estas DM de 10 ns de duración, son representativas de tiempos del orden del promedio termodinámico de los experimentos de NMR (algunos milisegundos), confirmando por lo tanto que el sistema no visita otras zonas que las encontradas en el presente cálculo.

#### 4. Conclusiones

El análisis de las trayectorias de los ángulos glicosídicos de las dos uniones centrales del decámero de  $\kappa$ -carragenano muestra que las regiones visitadas por la DM, tanto en la unión AS como en la SA son esencialmente coincidentes tanto en agua como en DMSO, aunque con particularidades de acuerdo al solvente. Se encuentra que en ambas uniones la región visitada por las respectivas DM tiene más de un máxi-

TABLA IV. Comparación de las distancias (nm) calculadas con los valores experimentales de rmn-noe

	DMSO Teórico	Probabilidad (%)	H <sub>2</sub> O Teórico	Probabilidad (%)	Experimental en DMSO <sup>(4)</sup> (363K)
A1-S3	D1 <sub>AS</sub> : 0.18±0.03	80	W1 <sub>AS</sub> :0.16±0.04	44	0.26±0.03
	D2 <sub>AS</sub> : 0.24±0.04	20	W2 <sub>AS</sub> :0.20±0.06	39	
	Media=0.19±0.04		W3 <sub>AS</sub> :0.25±0.08	17	
			Media=0.17±0.05		
A1-S4	D1 <sub>AS</sub> : 0.26±0.03	83	W1 <sub>AS</sub> :0.32±0.07	58	0.27±0.03
	D2 <sub>AS</sub> : 0.42±0.05	17	W2 <sub>AS</sub> :0.26±0.05	38	
	Media=0.29±0.06		W3 <sub>AS</sub> :0.42±0.05	4	
			Media=0.30±0.11		
A2-S4	D1 <sub>AS</sub> : 0.4±0.03	92	W1 <sub>AS</sub> :0.33±0.08	53	0.36±0.04
	D2 <sub>AS</sub> : 0.5 ±0.03	8	W2 <sub>AS</sub> : 0.40±0.06	45	
	Media=0.40±0.05		W3 <sub>AS</sub> :0.47±0.12	2	
			Media=0.35±0.05		

mo (indicando la existencia de más de un mínimo en el perfil energético), pero que los máximos de probabilidad cambian su importancia relativa de acuerdo al solvente, y también, aunque ligeramente, su ubicación en el espacio ( $\phi, \psi$ ) Este resultado está globalmente de acuerdo con simulaciones previas en pequeños segmentos de 2 a 4 monosacáridos [8,9,24,10], que muestran que el espacio conformacional disponible es muy similar para la familia de carbohidratos que dan origen a los distintos carragenanos, aún considerando las versiones no sulfatadas de dichos monosacáridos.

En particular los resultados de este trabajo sugieren una mayor flexibilidad conformacional del  $\kappa$ -carragenano en agua que en DMSO dado que:

- i) La función de distribución de probabilidad  $P(\Phi, \Psi)$  para la unión AS en DMSO muestra que el mínimo **D1<sub>AS</sub>** contiene la mayor cantidad de eventos y está definido en un rango relativamente pequeño de valores ( $\phi, \psi$ ), prevaleciendo sobre la zona **D2<sub>AS</sub>**, menos poblada y amplia, mientras que en agua si bien prevalece el **W1<sub>AS</sub>**, los dos mínimos son relevantes, separados por una zona de transición, similar a lo encontrado por Ueda *et al.* [24] para neocarrabiosio 4<sup>1</sup>-Sulfato.
- ii) En agua hay un menor número de enlaces puente Hidrógeno relevantes, sobre todo de Tipo II. En DMSO se observa además una clara preferencia del OH6 del anillo A por formar puente Hidrógeno con los O del grupo sulfato de S (enlace Tipo III), estabilizando aún más la unión, mientras que en agua el O glicosídico de la unión AS compite con los oxígenos del grupo sulfato (enlace tipo IV).

En ambos solventes los mapas de Ramachandran de las dos uniones centrales indican una mayor flexibilidad de la unión SA con respecto de la AS, probablemente debido a la existencia de puentes hidrógeno en la unión AS, principalmente en DMSO. Para la unión SA no se han detectado enlaces hidrógeno de relevancia. Dada la amplitud del espacio conformacional disponible en la unión SA, no esperamos que la preferencia a ocupar un solo mínimo **W1<sub>SA</sub>** en agua, frente a los dos mínimos **D1<sub>SA</sub>** y **D2<sub>SA</sub>** en DMSO tenga consecuencias sobre la flexibilidad del decámero.

Cabe destacar que con nuestros resultados se confirma la preferencia por valores de  $\Psi_{SA} < 0$ , en acuerdo con lo encontrado por Bosco *et al.* [4] con mediciones de RMN de polímeros de  $\kappa$ -carragenano en DMSO.

Con respecto a las distancias entre protones calculadas para la dinámica en DMSO, estas muestran un excelente acuerdo con los valores experimentales. En agua no se ve una diferencia sustancial entre lo calculado en DMSO y los valores encontrados para **W2<sub>AS</sub>**, que concuerdan con los reportados por Ueda *et al.* [7] en la misma región conformacional. Una caracterización experimental de estas distancias para el polímero en agua aportaría de manera importante a este problema.

En resumen, nuestros resultados indican que la conformación extendida del  $\kappa$ -carragenano en agua a 300K debería tener una mayor flexibilidad a la del mismo polímero en DMSO a 363K. Para una valoración cuantitativa de esta afirmación deberían calcularse algunas características poliméricas de cadenas de  $\kappa$ -carragenano en agua y en DMSO, como la longitud de persistencia o el cociente característico, trabajo que está en desarrollo en nuestro laboratorio.

1. D. Reid, in "Developments in Ionic Polymers I", A. Wilson y H. Prosser (Ed. Applied Science, London, 1983).
2. N. Anderson, J. Campbell, M. Harding D. Rees y J. Samuel, *J. Mol. Biol.* **45** (1969) 85.
3. F. Cuppo, H. Reynaers y S. Paoletti, *Macromolecules* **35** (2002) 539.
4. M. Bosco, A. Segre, S. Miertus, A. Cesàro y S. Paoletti, *carbohydrate Research* **340** (2005) 943.
5. J.C. Benegas, A. Cesàro, R. Rizzo y S. Paoletti, *Biopolymers* **45** (1998) 203.
6. J.C. Benegas, S. Pantano y A. Vetere, *Biopolymers* **49** (1999) 127.
7. K. Ueda, M. Saiki y W. Brady, *J. Phys. Chem. B* **105** (2001) 8629.
8. J. Le Questel, S. Cros, W. Mackie y S. Pérez, *Int. J. Biol. Macromol.* **17** (1995) 161.
9. R. Urbani, A. Di Blas y A. Cesàro, *Int. J. Biol. Macromol.* **15** (1992) 24.
10. E. Parra, H. Caro, J.K. Jiménez Barbero, M. Martín Lomas y M. Bernabé, *Carbohydr. Res.* **208** (1990) 83.
11. W.F. van Gunsteren *et al.*, in Biomolecular Simulation: the Gromos 96 manual and user guide. (Zurich: Vdf Hochschulverlag AG and der ETH Zurich 1996). GROMACS: <http://www.gromacs.org>
12. H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren y J. Hermans, *The Netherlands* (1981) 331.
13. H. Verli y J. Guimarães, *Carbohydrate Research* **339** (2004) 281.
14. J. Behler, D.W. Prince y M.G.B. Drew, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **3** (2001) 588.
15. B. Hess, H. Bekker, H. Berendsen y J. Fraaije, *J. Comp. Chem.* **18** (1997) 1463.
16. S. Nosé, *Mol. Phys.* **52** (1984) 255.
17. W. Hoover, *Phys. Rev. A* **31** (1985) 1695.
18. M. Parrinello y A. Rahman, *J. Appl. Phys.* **52** (1981) 7182.
19. S. Nosé y M. Klein, *Mol. Phys.* **50** (1983) 1055.
20. T. Darden, D. York y L. Pedersen, *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 10089.
21. U. Essmann *et al.*, *J. Chem. Phys.* **103** (1995) 8577.
22. M. Drifford *et al.*, *J. Phys. Chem.* **88** (1984) 1414.
23. C. Rochas y M. Rinaudo, *Biopolymers* **19** (1980) 1675.
24. K. Ueda, T. Ueda, T. Sato, H. Nakayama y J. Brady, *Carbohydrate Research* **339** (2004) 1953.