

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E CONFORMACIONAL DO SULFATO DE
CONDROITINA ATRAVÉS DE SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR**

Pablo Ricardo Arantes

Porto Alegre, novembro de 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E CONFORMACIONAL DO SULFATO DE
CONDROITINA ATRAVÉS DE SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR**

Pablo Ricardo Arantes

Trabalho de Conclusão da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

Prof. Dr. Hugo Verli

Orientador

Claudia Lemelle Fernandes

Co-orientadora

Porto Alegre, novembro de 2011

“... A ciência ilumina, a descoberta contagia
O laboratório fascina com toda sua magia
E, a passos largos, avança a tecnologia
Vou junto, mili, micro, nano, pico, dia após dia
Querendo pesquisar tudo que se experiencia
Aos poucos, a expectativa de vida torna-se o resultado que alivia...”

Antônio Carlos Burlamaque Neto

AGRADECIMENTOS

Ao professor Hugo Verli, por me receber e acolher no Grupo de Bioinformática Estrutural, pelo apoio e confiança durante toda minha iniciação científica e por me demonstrar o lado humanístico da ciência. Hugo, você é um exemplo não só de profissional, mas de caráter e pessoa. Obrigado pelo aprendizado dentro e fora do laboratório que me permitiram crescer tanto intelectual quanto pessoa.

A minha co-orientadora Cláudia, por todo aprendizado, conhecimento, pela paciência, pelos momentos de companheirismo e amizade.

Aos colegas do Grupo de Bioinformática Estrutural, por me receberem de braços abertos, pela convivência em laboratório, pelo companheirismo e amizade presente em todos os momentos.

Aos membros da banca, por terem aceitado o convite.

Aos meus pais, Sergio e Adriana, por todo amor, apoio e carinho durante a realização deste trabalho. Pelo enorme dedicação e confiança, que possibilitaram-me chegar até aqui. Obrigado por todo esforço e constante incentivo para meu crescimento intelectual e como ser humano.

A minha namorada Mariana pelo amor, carinho e por sempre acreditar em mim. Obrigado pelo companheirismo, pela paciência e pelos momentos de felicidade.

Minha “baixinha”, Te amo!!!

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 A hemostasia e a cascata de coagulação	2
1.2 O uso de heparina como agente anticoagulante	4
1.3 Sulfato de condroitina supersulfatado como contaminante de heparinas	6
1.4 Nomenclatura da conformação de carboidratos	11
1.5 O uso de ferramentas computacionais de dinâmica molecular para o estudo conformacional de biomoléculas	12
2 OBJETIVOS	15
3 METODOLOGIA	16
3.1 Construção das topologias	16
3.2 Construção de mapas de contorno	17
3.3 Simulação por DM	17
3.4 Análise dos resultados	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 Dissacarídeos de CS e OSCS $\beta 1 \rightarrow 3$ ligados	19
4.2 Dissacarídeos de CS e OSCS $\beta 1 \rightarrow 4$ ligados	26
4.3 Implicações para a toxicidade de OSCS	34
5 CONCLUSÃO	36
6 COLABORADORES	37
7 BIBLIOGRAFIA	38
8 APÊNDICE	42
8.1 Topologias	42
8.1.1 CS $\beta 1 \rightarrow 3$ ligado	42
8.1.2 OSCS $\beta 1 \rightarrow 3$ ligado	46
8.1.3 CS $\beta 1 \rightarrow 4$ ligado	51
8.1.4 OSCS $\beta 1 \rightarrow 4$ ligado	55

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CASCATA DA COAGULAÇÃO. OS PERCUSSORES INATIVOS ESTÃO APRESENTADOS EM LETRAS PRETAS (PROTROMBINA, V, VII, VIII, IX, X E XIII), ENQUANTO QUE AS PROTEÍNAS ATIVAS ESTÃO APRESENTADAS EM VERMELHO (TROMBINA, Va, VIIa, VIIIa, IXa, Xa E XIIIa). AS SETAS EM VERMELHO APRESENTAM ALÇAS DE RETRO-ALIMENTAÇÃO POSITIVA DA TROMBINA, AS ALÇAS PRETAS, VERDES E AZUIS REPRESENTAM AS VIAS DE ATIVAÇÃO DE FATORES DE COAGULAÇÃO E AS ALÇAS EM COR LARANJA DEMONSTRAM AS VIAS DE INIBIÇÃO DAS SERINO-PROTEINASES PELA ANTITROMBINA (Verli, 2005).....	3
FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO DE UM PENTASSACARÍDEO DE HEPARINA, COMPOSTO POR RESÍDUOS DE ÁCIDO URÔNICO (ÁCIDO GLICURÔNICO, GLCA, E ÁCIDO IDURÔNICO, IDOA) E GLICOSAMINA (GLCN) (Nader <i>et al.</i> , 2001).....	4
FIGURA 3: INIBIÇÃO DA TROMBINA E fXa NA PRESENÇA DE AT E HEPARINA. DOIS MECANISMOS ESTÃO ILUSTRADOS, SENDO UM MECANISMO ENVOLVENDO A SIMPLES LIGAÇÃO DA SERPINA À PROTEINASE PELA HEPARINA (PONTE), E UM MECANISMO BASEADO NA INDUÇÃO DE MUDANÇA CONFORMACIONAL NA AT PELA HEPARINA. AMBOS OS MECANISMOS RESULTAM EM UMA POTENCIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DA AT, EMBORA DIFERENÇAS NO TAMANHO DA CADEIA POLISSACARÍDICA NA HEPARINA INFLUENCIAM NA RESPOSTAS DESTES MECANISMOS (Becker, 2007).....	5
FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO BIDIMENSIONAL E TRIDIMENSIONAL DO CS, SULFATADO EM TODAS AS POSIÇÕES DESCRITAS BIOLÓGICAMENTE. À ESQUERDA A LIGAÇÃO GLICOSÍDICA $\beta 1 \rightarrow 3$ E À DIREITA A LIGAÇÃO GLICOSÍDICA $\beta 1 \rightarrow 4$	6
FIGURA 5: CS ENCONTRADOS NA NATUREZA, DIVIDIDOS POR LIGAÇÃO GLICOSÍDICA.....	7
FIGURA 6: REPRESENTAÇÃO BIDIMENSIONAL E TRIDIMENSIONAL DO OSCS, COM DESTAQUE PARA O SULFATO NA POSIÇÃO 3 DO GLCA. FRUTO DE SULFATAÇÃO QUÍMICA E ESPECÍFICA. REPRESENTADA À ESQUERDA ALIGAÇÃO GLICOSÍDICA $\beta 1 \rightarrow 3$ E À DIREITA ALIGAÇÃO GLICOSÍDICA $\beta 1 \rightarrow 4$	8
FIGURA 7: OSCS JÁ DESCRITOS, DIVIDIDOS POR LIGAÇÃO GLICOSÍDICA. DIFERENTE DO CS, OS OSCS DESCRITOS NÃO SÃO ENCONTRADOS NA NATUREZA.....	9
FIGURA 8: (A) GLCA2-SULFATADO, 3-HIDROXILADO RESIDE NA CONFORMAÇÃO 4C_1 . (B) GLCA2,3-SULFATADO RESIDE NA CONFORMAÇÃO 1C_4 (Maruyama <i>et al.</i> , 1997).	9
FIGURA 9: COMPARAÇÃO ENTRE O RESÍDUO IDOA DE HEPARINA E O RESÍDUO GLCA DO OSCS.	10
FIGURA 10: GLOBO CONFORMACIONAL DO CICLO HEXANO (ADAPTADO DE CREMER & SZABO, 1995). AS FORMAS DE BOTE TORCIDO ESTÃO APRESENTADAS EM VERDES, ENQUANTO QUE AS DUAS POSSÍVEIS DE CADEIRA ESTÃO MARCADAS EM VERMELHO.....	11
FIGURA 11: REPRESENTAÇÃO DA NOMENCLATURA EMPREGADA NA DEFINIÇÃO CONFORMACIONAL DE CARBOIDRATOS, EMPREGANDO COMO EXEMPLO O RESÍDUO GLCA DO OSCS. EM VERMELHO, OS 4 ÁTOMOS DE CARBONO QUE SE ENCONTRAM NO MESMO PLANO. ESTÃO AINDA DESTACADOS OS ÁTOMOS LOCALIZADOS ACIMA E ABAIXO DESTES PLANO.....	12
FIGURA 12: FUNÇÕES DE ENERGIA QUE COMPÕEM O CAMPO DE FORÇA GROMOS96. AS FUNÇÕES FÍSICAS (PHYS, 1), QUE DESCREVEM INTERAÇÕES INTERATÔMICAS, DIVIDEM-SE EM FUNÇÕES QUE DESCREVEM INTERAÇÕES LIGADAS (BONDED, 2) E NÃO LIGADAS (NONBONDED, 3). AS PRIMEIRAS DIVIDEM-SE EM EQUAÇÕES QUE DESCREVEM 4 O ESTIRAMENTO DE LIGAÇÕES QUÍMICAS, 5 ÂNGULOS DE LIGAÇÃO, 6 DIEDROS IMPRÓPRIOS E 7 DIEDROS PRÓPRIOS; ENQUANTO AS ÚLTIMAS DESCREVEM INTERAÇÕES INTERMOLECULARES DO TIPO 8 INTERAÇÕES DE LENNARD-JONES E 9 INTERAÇÕES DE CARGA (BASEADO EM SCOTT ET AL., 1999).....	13
FIGURA 13: EXEMPLIFICAÇÃO DA METODOLOGIA UTILIZADA: A) CONSTRUÇÃO DE TOPOLOGIAS, B) CONSTRUÇÃO DE MAPAS DE CONTOURNO, C) DINÂMICA MOLECULAR, D) ANÁLISE DOS RESULTADOS (ADAPTADO POLFACHIN E VERLI 2011).....	16
FIGURA 14: CRITÉRIO GEOMÉTRICO PARA A EXISTÊNCIA DE LIGAÇÕES INTRAMOLECULARES DE HIDROGÊNIO. D = DOADOR, A = ACEPTOR (VAN DER SPOEL <i>ET AL.</i> , 2010).....	18
FIGURA 15: MAPAS DE CONTOURNO PARA DISSACARÍDEOS DE CS $\beta 1 \rightarrow 3$ LIGADOS. EM AZUL, REPRESENTAÇÃO DAS CONFORMAÇÕES ADOTADAS POR CADA DISSACARÍDEO DURANTE SIMULAÇÃO POR DM EM SOLUÇÃO. CURVAS DE NÍVEL REPRESENTANDO VALORES DE ENERGIA ADOTADO POR CADA CONFÔRMERO NO VÁCUO EM KJ/MOL.....	21
FIGURA 16: MAPAS DE CONTOURNO PARA DISSACARÍDEOS DE OSCS $\beta 1 \rightarrow 3$ LIGADOS. EM AZUL, REPRESENTAÇÃO DAS CONFORMAÇÕES ADOTADAS POR CADA DISSACARÍDEO DURANTE SIMULAÇÃO POR DM EM SOLUÇÃO. CURVAS DE NÍVEL REPRESENTANDO VALORES DE ENERGIA ADOTADO POR CADA CONFÔRMERO NO VÁCUO EM KJ/MOL.....	22

FIGURA 17: FLUTUAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS ÂNGULOS ϕ E ψ AO LONGO DAS SIMULAÇÕES DE DM PARA DISSACARÍDEOS DE CS $\beta 1 \rightarrow 3$ LIGADOS.	23
FIGURA 18: FLUTUAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS ÂNGULOS ϕ E ψ AO LONGO DAS SIMULAÇÕES DE DM PARA DISSACARÍDEOS DE OSCS $\beta 1 \rightarrow 3$ LIGADOS.	24
FIGURA 19: REPRESENTAÇÃO DA POSSÍVEL INTERAÇÃO INTRAMOLECULAR, RESPONSÁVEL PELA RIGIDEZ CONFORMACIONAL DAS LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS CS $\beta 1 \rightarrow 4$ LIGADOS.	27
FIGURA 20: REPRESENTAÇÃO DO VOLUME MOLECULAR DO GRUPAMENTO SULFATO, INTERFERINDO EM SUAS ABUNDÂNCIAS RELATIVAS EM SOLUÇÃO, IMPEDINDO QUE O OSCS ADOTE A CONFORMAÇÃO DO CS REPRESENTADO.	28
FIGURA 21: MAPAS DE CONTORNO PARA DISSACARÍDEOS DE CS $\beta 1 \rightarrow 4$ LIGADOS. EM AZUL, REPRESENTAÇÃO DAS CONFORMAÇÕES ADOTADAS POR CADA DISSACARÍDEO DURANTE SIMULAÇÃO POR DM EM SOLUÇÃO. CURVAS DE NÍVEL REPRESENTANDO VALORES DE ENERGIA ADOTADO POR CADA CONFÔRMERO NO VÁCUO EM KJ/MOL.	29
FIGURA 22: MAPAS DE CONTORNO PARA DISSACARÍDEOS DE OSCS $\beta 1 \rightarrow 4$ LIGADOS. EM AZUL, REPRESENTAÇÃO DAS CONFORMAÇÕES ADOTADAS POR CADA DISSACARÍDEO DURANTE SIMULAÇÃO POR DM EM SOLUÇÃO. CURVAS DE NÍVEL REPRESENTANDO VALORES DE ENERGIA ADOTADO POR CADA CONFÔRMERO NO VÁCUO EM KJ/MOL.	30
FIGURA 23: FLUTUAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS ÂNGULOS ϕ E ψ AO LONGO DAS SIMULAÇÕES DE DM PARA DISSACARÍDEOS DE CS $\beta 1 \rightarrow 4$ LIGADOS.	31
FIGURA 24: FLUTUAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS ÂNGULOS ϕ E ψ AO LONGO DAS SIMULAÇÕES DE DM PARA DISSACARÍDEOS DE OSCS $\beta 1 \rightarrow 4$ LIGADOS.	32
FIGURA 25: EFEITO DO GRAU DE SULFATAÇÃO NA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE. ATIVIDADE COMO ANTI-FATOR IIa (■) E ATIVIDADE COMO ANTI-FATOR Xa (●). É POSSÍVEL PERCEBER QUE A MOLÉCULA DE OSCS, COM 4 GRUPAMENTOS SULFATOS, POSSUI MAIOR ATIVIDADE (MARUYAMA <i>ET AL.</i> , 1997).	35

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: DISSACARÍDEOS CARACTERIZADOS NO PRESENTE TRABALHO.....	17
TABELA 2: PREFERÊNCIA CONFORMACIONAL DOS DISSACARÍDEOS DE CS E OSCS $\beta 1 \rightarrow 3$ LIGADOS, CONFORME OBSERVADO NAS SIMULAÇÕES POR DM.....	22
TABELA 3: LIGAÇÕES INTRAMOLECULARES DE HIDROGÊNIO, DURANTE AS SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR, OBSERVADAS NOS DISSCARÍDEOS DE CS E OSCS $\beta 1 \rightarrow 3$ LIGADOS.	24
TABELA 4: PREFERÊNCIA CONFORMACIONAL DOS ÂNGULOS ϕ E ψ NOS DISSACARÍDEOS DE CS E OSCS $\beta 1 \rightarrow 3$ LIGADOS, CONFORME OBSERVADO NAS SIMULAÇÕES POR DM.....	25
TABELA 5: PREFERÊNCIA CONFORMACIONAL DOS DISSACARÍDEOS DE CS E OSCS $\beta 1 \rightarrow 4$ LIGADOS, CONFORME OBSERVADO NAS SIMULAÇÕES POR DM.....	30
TABELA 6: LIGAÇÕES INTRAMOLECULARES DE HIDROGÊNIO, DURANTE AS SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR, OBSERVADAS NOS DISSCARÍDEOS DE CS E OSCS $\beta 1 \rightarrow 4$ LIGADOS.	32
TABELA 7: PREFERÊNCIA CONFORMACIONAL DOS ÂNGULOS ϕ E ψ NOS DISSACARÍDEOS DE CS E OSCS $\beta 1 \rightarrow 4$ LIGADOS, CONFORME OBSERVADO NAS SIMULAÇÕES POR DM.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

AT – antitrombina

CS – *chondroitin sulphate* (sulfato de condroitina)

DM – dinâmica molecular

FL – fosfolípidios

FT – fator tecidual

GAGs – glicosaminoglicanos

GlcA – ácido glicurônico

GlcN – glicosamina

GalNAc - N-acetilgalactosamina

HB – *Hydrogen bonds* (Ligações de hidrogênio)

HC II – *heparin cofactor II* (cofator de heparina II)

IdoA – ácido idurônico

OSCS – *oversulfated chondroitin sulfate* (sulfato de condroitina supersulfatado)

PDB – *protein data bank*

RMN – ressonância magnética nuclear

TFPI – *tissue factor pathway inhibitor* (inibidor da via do fator tecidual)

RESUMO

Sulfato de condroitina (CS) é um glicosaminoglicano (GAG) composto por unidades dissacarídicas de N-acetilgalactosamina (GalNAc) e ácido glicurônico (GlcA). Estes resíduos podem ser encontrados conectados através de ligações $\beta 1 \rightarrow 3$ e $\beta 1 \rightarrow 4$. Podem ainda ser sulfatados nas posições 4 e 6 do resíduo GalNAc e na posição 2 do GlcA. O CS atua contribuindo para a resistência à tensão em cartilagens, tendões, ligamentos e na parede da aorta. Por outro lado, sua forma supersulfatada (OSCS) foi identificada como contaminante de heparinas comerciais, tendo sido relatada como causa de reações adversas e mortes em pacientes. Essa sulfatação química e específica no OSCS, nas posições 2 e 3 do resíduo GlcA e 4 e 6 do GalNAc, cria novas formas moleculares e, possivelmente, estados conformacionais, originando novos arcaouços para interação com receptores específicos, de forma patológica. Nesse contexto, o presente trabalho tem por objetivo caracterizar a influência da sulfatação na dinâmica conformacional do OSCS, incluindo todos os possíveis padrões de sulfatação relatados na literatura. O protocolo utilizado inclui: 1) construção de mapas de contorno relaxados para cada ligação glicosídica; 2) simulações por dinâmica molecular empregando o pacote GROMACS e o campo de força GROMOS96 43a1; 3) análise da influência da sulfatação na conformação dos OSCS estudados e sua potencial relação à toxicidade observada clinicamente. Tais procedimentos nos permitiram caracterizar ligação glicosídica $\beta 1 \rightarrow 3$ como apresentando maior rigidez no OSCS quando comparada ao CS encontrado na natureza. Em contrapartida, a ligação glicosídica $\beta 1 \rightarrow 4$ mostrou-se mais flexível no OSCS em relação ao CS natural, indicando que a sulfatação química é capaz de interferir na dinâmica do CS e, por conseguinte, nas formas disponíveis para interação com macromoléculas biológicas, o que potencialmente está relacionado a sua toxicidade como contaminante da heparina.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A hemostasia e a cascata de coagulação

A iniciação da coagulação ocorre normalmente como um resposta a injúrias mecânicas ou estímulos pró-inflamatórios, ou seja a perturbações no endotélio vascular. Se tratando de um dano físico no endotélio vascular , há uma exposição de elementos teciduais no sub-endotélio, induzindo a ativação e acúmulo de plaquetas no local do dano, processo denominado tampão plaquetário (Jenny & Mann, 1998). Inicialmente, esse tampão fica solto, mas nas condições usuais, consegue bloquear a perda de sangue se a abertura vascular for pequena (Guyton e Hall, 2006).

Depois de ocorrido o início deste processo, a propagação se dará através da ação de complexos enzimáticos pró-coagulantes estruturados com elementos de matriz sub-endoteliais e na membrana de plaquetas (Jenny & Mann, 1998). Fazem parte deste complexo, como elementos, serino-proteases (fXIIa, fXIa, fIXa, fXa, fVIIa, trombina), cofatores protéicos não-enzimáticos (fator tecidual, fVIIIa, fVa, fIII), íons de cálcio e superfície de membrana celular (Jenny & Mann, 1998).

A coagulação é assim, um processo complexo que requer várias etapas até formação do coágulo. A primeira etapa da coagulação ocorre a partir da interação do fator VIIa plasmático com o fator tecidual (FT, Figura 1), ambos requerem um cofator não-protéico de superfícies fosfolipídicas. Formam assim o *Complexo Tenase Extrínseco*, cuja atividade é observada sobre os fatores IX e X, gerando fIXa e fXa (Figura 1). O fator IXa, por sua vez também é responsável pela ativação do fator X em Xa, na presença de FL e de fVIIIa, com os quais forma o *Complexo Tenase Intrínseco* (Figura 1). O fator Xa, formado pela ação de ambos os complexos, tem como função a conversão de protrombina em trombina na presença de cofatores FL e fVa, junto aos quais constitui o *Complexo Protombinase* (Figura 1) (Jenny & Mann, 1998).

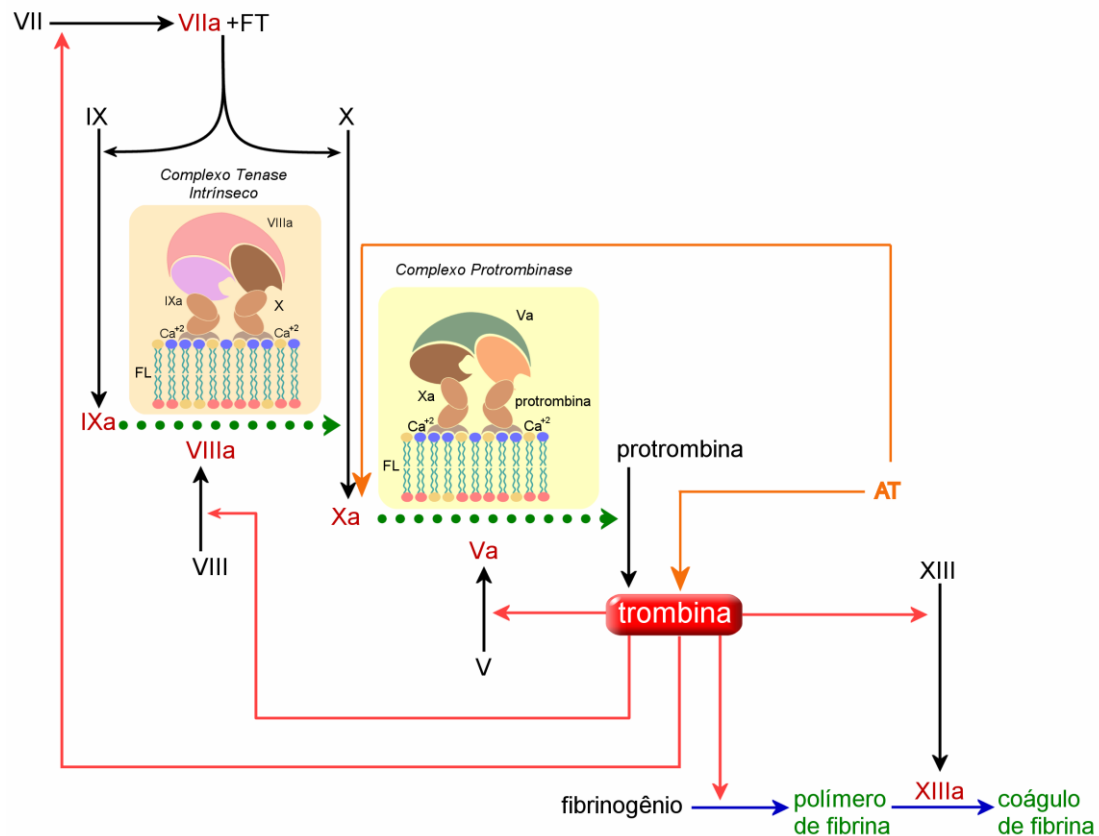


FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CASCATA DA COAGULAÇÃO. OS PRECUSSORES INATIVOS ESTÃO APRESENTADOS EM LETRAS PRETAS (PROTROMBINA, V, VII, VIII, IX, X E XIII), ENQUANTO QUE AS PROTEÍNAS ATIVAS ESTÃO APRESENTADAS EM VERMELHO (TROMBINA, Va, VIIa, VIIIa, IXa, Xa E XIIIa). AS SETAS EM VERMELHO APRESENTAM ALÇAS DE RETRO-ALIMENTAÇÃO POSITIVA DA TROMBINA, AS ALÇAS PRETAS, VERDES E AZUIS REPRESENTAM AS VIAS DE ATIVAÇÃO DE FATORES DE COAGULAÇÃO E AS ALÇAS EM COR LARANJA DEMONSTRAM AS VIAS DE INIBIÇÃO DAS SERINO-PROTEINASES PELA ANTITROMBINA (Verli, 2005).

O controle e a regulação da coagulação envolvem três moduladores fisiológicos principais em humanos: proteína C, TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*, inibidor da via do fator tecidual) e antitrombina (AT; Jenny & Mann, 1998). Devido a importância da AT no presente estudo nos deteremos apenas nesta proteína para o controle e regulação da coagulação.

A AT é uma alfa-globulina capaz de inibir a maior parte das serino-proteases da coagulação. Essa inibição ocorre principalmente sobre fator Xa e trombina (Olson *et al.*, 1997). A AT é o receptor-alvo da heparina e outros agentes coagulantes em casos de hipercoagulopatias, como o tromboembolismo e trombose. Também pode ser alvo de contaminantes de heparinas, como o Sulfato de condroitina (CS).

1.2 O uso de heparina como agente anticoagulante

A heparina foi o primeiro composto usado como anticoagulante e agente antitrombótico. Foi isolada em 1916 e comercializada para ser utilizada na prática clínica há mais de 60 anos. É um polissacarídeo sulfatado composto por resíduos de ácido idurônico 2-O-sulfato (IdoA), glicosamina 2-6-disulfato (GlcN) e ácido glicurônico não sulfatado (GlcA) unidos entre si por ligações 1→4 (Figura 2) (Nader *et al.*, 2001).

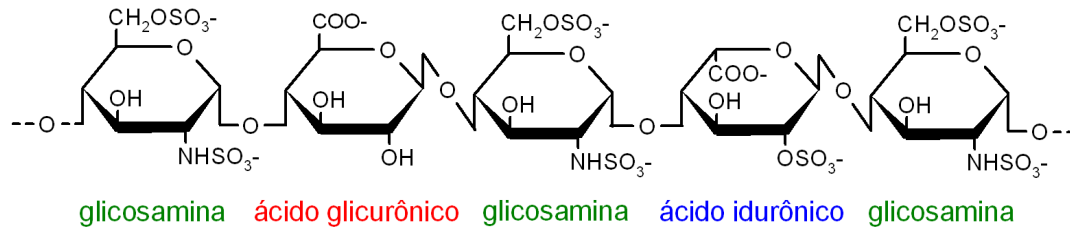


FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO DE UM PENTASSACARÍDEO DE HEPARINA, COMPOSTO POR RESÍDUOS DE ÁCIDO URÔNICO (ÁCIDO GLICURÔNICO, GLCA, E ÁCIDO IDURÔNICO, IDOA) E GLICOSAMINA (GLCN) (Nader *et al.*, 2001).

A propriedade anticoagulante da heparina é inexistente quando a mesma se encontra sozinha, contudo quando se combina com a AT forma um complexo ternário que acelera a inibição da trombina, assim como de serino-proteases principalmente o fXa. É importante ressaltar que a inibição da trombina pela AT é acelerada mais de mil vezes na presença de heparina. A heparina também é capaz de potencializar o efeito de outra serpina chamada Cofator de Heparina II, esta realiza efeito de inibição apenas na trombina (Nader *et al.*, 2001). Assim, em presença de heparina, a remoção da trombina livre do sangue circulante pela AT é quase instantânea. As outras serino-proteases que podem sofrer inibição são os fatores XII, XI, X e IX ativados (Guyton e Hall, 2006).

A AT se encontra na corrente sanguínea em uma moderadamente ativa, contudo quando um co-fator terapêutico como a heparina se liga a AT ocorre a inibição da trombina ou do fXa por dois mecanismos distintos. O primeiro mecanismo pelo qual a heparina é capaz de modular a atividade da AT, é chamado de “ponte”, onde ocorre a formação do complexo ternário AT-trombina-heparina (Figura 3). As interações eletrostáticas entre grupos carregados negativamente dos sulfatos da heparina e resíduos de aminoácidos carregados positivamente na AT e nas proteases são responsáveis por este mecanismo (Becker, 2007). É importante ressaltar que esse mecanismo é dependente do tamanho da cadeia polissacarídica, uma estrutura de 18 unidades monossacarídicas é a menor estrutura com capacidade de inativar a trombina.

O segundo mecanismo consiste na ativação da AT através de mudanças conformacionais nesta quando ligada a heparina, ocorrendo assim a inibição do fXa (Figura

3). Novamente esse segundo mecanismo é dependente de no mínimo um sequência de 5 unidades monossacarídicas para que ocorra a ativação alostérica na AT e assim induções conformacionais necessárias para a inibição do fXa (Becker, 2007).

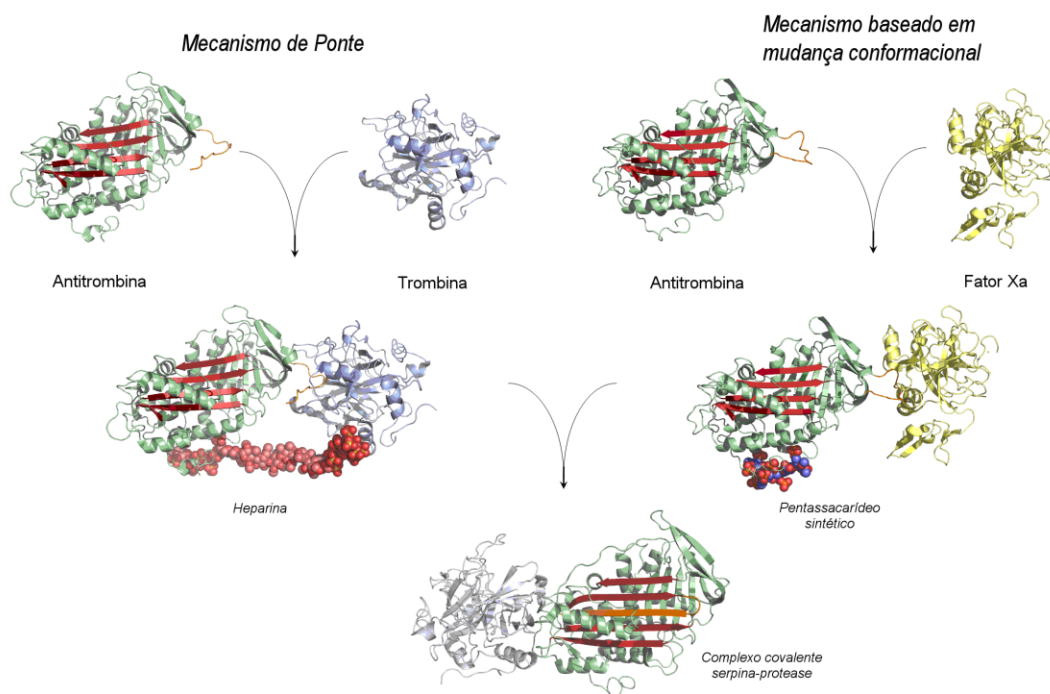


FIGURA 3: INIBIÇÃO DA TROMBINA E fXa NA PRESENÇA DE AT E HEPARINA. DOIS MECANISMOS ESTÃO ILUSTRADOS, SENDO UM MECANISMO ENVOLVENDO A SIMPLES LIGAÇÃO DA SERPINA À PROTEINASE PELA HEPARINA (PONTE), E UM MECANISMO BASEADO NA INDUÇÃO DE MUDANÇA CONFORMACIONAL NA AT PELA HEPARINA. AMBOS OS MECANISMOS RESULTAM EM UMA POTENCIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DA AT, EMBORA DIFERENÇAS NO TAMANHO DA CADEIA POLISSACARÍDICA NA HEPARINA INFLUENCIAM NA RESPOSTAS DESTES MECANISMOS (Becker, 2007).

Assim, o tamanho da cadeia polissacarídica na heparina é relevante, visto que, é fundamental para o desenvolvimento de co-fatores terapêuticos com menor tamanho e uma promissora estratégia terapêutica para inibidores seletivos do fXa. Exemplos desses co-fatores podem ser as Heparinas de Baixo Peso Molecular (HBPM) que contêm a mesma estrutura da heparina, contudo, o número de unidades monossacarídicas reduzidas. O uso terapêutico dessas unidades dissacarídicas iniciou-se na década de 1980, obtidos através da fragmentação de heparina convencional (Nader *et al.*, 2001).

Recentemente, certos lotes de heparina apresentaram efeitos adversos, reações alérgicas e em alguns casos até morte de pacientes, sendo esses retirado do mercado e proibidos de serem usados na terapêutica. Analisando as potenciais causas desses efeitos, descobriu-se que o contaminante responsável era o sulfato de condroitina supersulfatado (OSCS), que é um polissacarídeo composto por unidades dissacarídicas repetitivas de GlcA ligado $\beta 1 \rightarrow 3$ a GalNAc, ou GalNAc ligado $\beta 1 \rightarrow 4$ a GlcA (Guerrini *et al.*, 2008). Devido ao

não entendimento da atividade coagulante e os efeitos tóxicos desse contaminante, esses compostos tem sido alvo de vários estudos bioquímicos, químicos e, no caso deste trabalho, conformacionais relacionando a sulfatação com a toxicidade dessa molécula.

1.3 Sulfato de condroitina supersulfatado como contaminante de heparinas

O sulfato de condroitina (CS) é um glicosaminoglicano composto por unidades dissacarídicas de GalNAc e GlcA. É encontrado em duas formas específicas de ligação glicosídica ($\beta 1 \rightarrow 3$ e $\beta 1 \rightarrow 4$), onde GlcA liga GalNAc através da ligação glicosídica $\beta 1 \rightarrow 3$ e GalNAc liga GlcA através da ligação glicosídica $\beta 1 \rightarrow 4$. Esse glicosaminoglicano pode ser sulfatado nas posições 4 e 6 do GalNAc e na posição 2 do GlcA (Figura 4) (Volpi N., 2006).

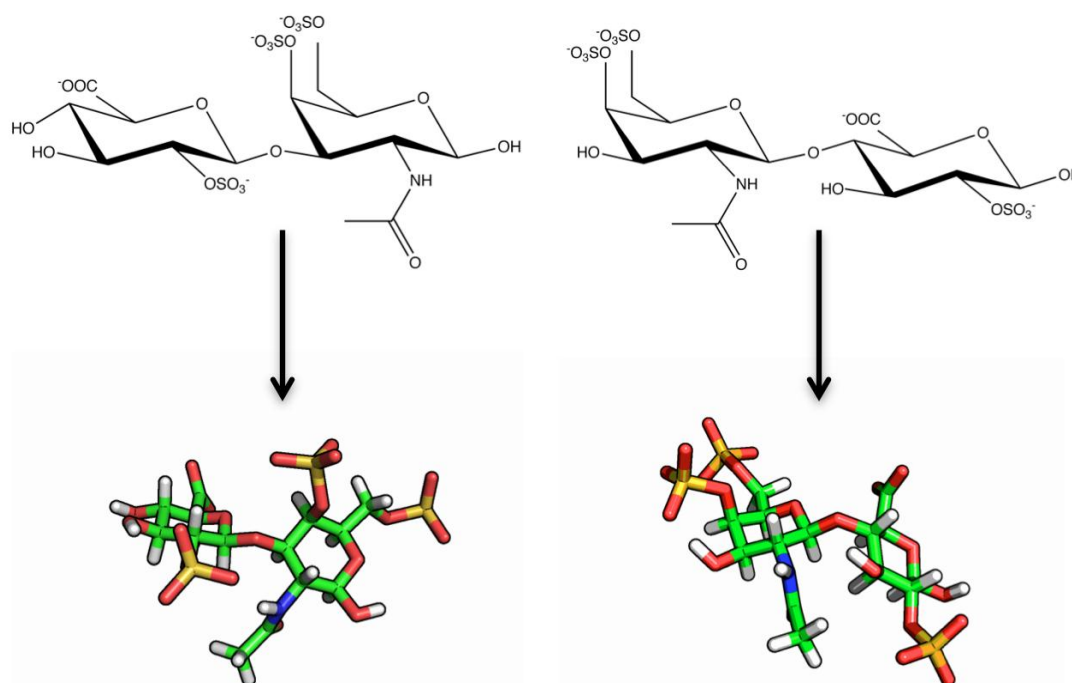


FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO BIDIMENSIONAL E TRIDIMENSIONAL DO CS, SULFATADO EM TODAS AS POSIÇÕES DESCRITAS BIOLÓGICAMENTE. À ESQUERDA A LIGAÇÃO GLICOSÍDICA $\beta 1 \rightarrow 3$ E À DIREITA A LIGAÇÃO GLICOSÍDICA $\beta 1 \rightarrow 4$.

O CS é encontrado biologicamente contribuindo para resistência à tensão em cartilagens, tendões, ligamentos e parede da aorta. São conhecidos biologicamente 8 compostos, com diferenças apenas no grau de sulfatação, ou seja, os sulfatos diferem nas posições possíveis de sulfatação dos compostos (Figura 5) (Nelson & Cox., 2006).

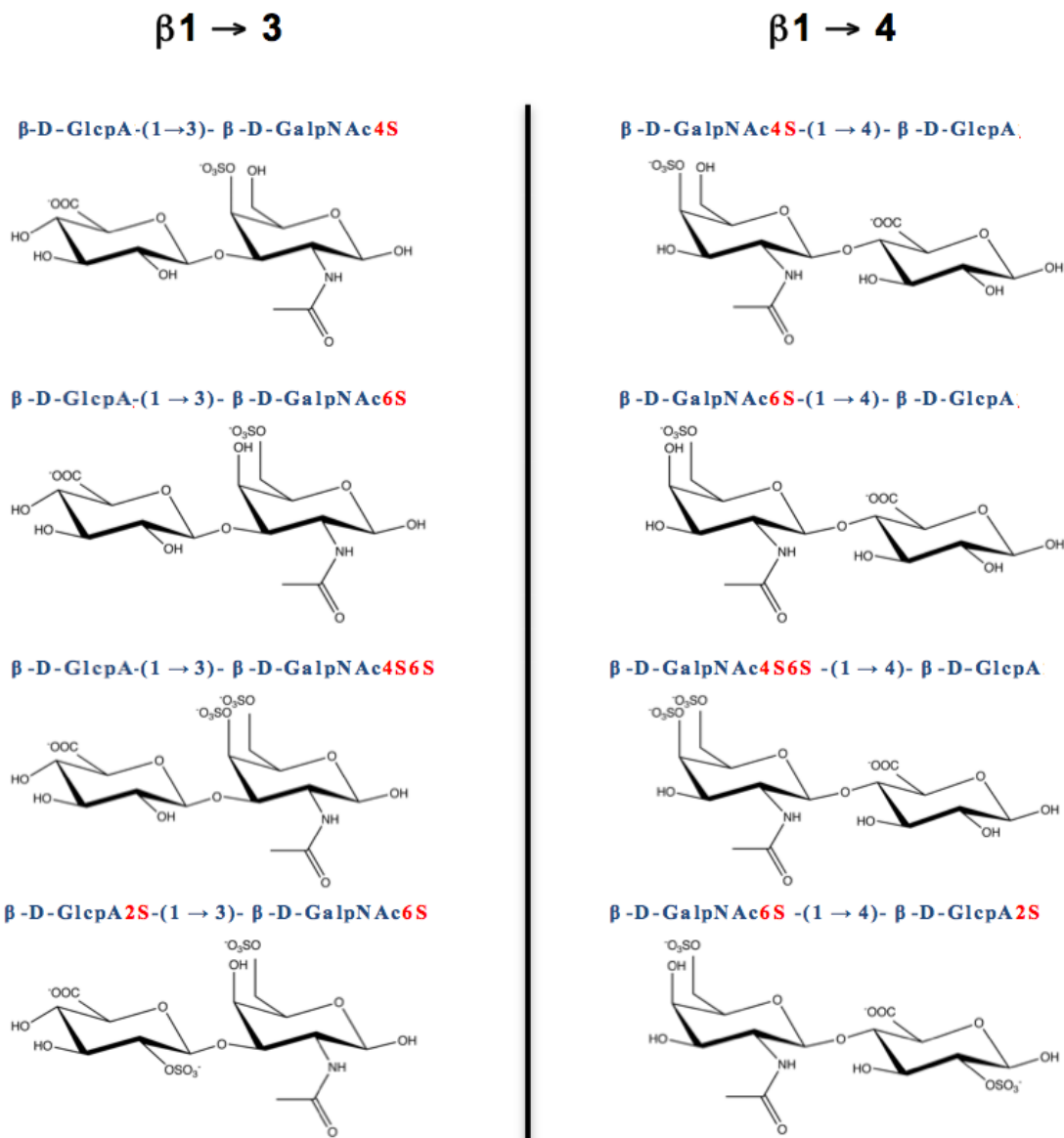


FIGURA 5: CS ENCONTRADOS NA NATUREZA, DIVIDOS POR LIGAÇÃO GLICOSÍDICA.

O sulfato de condroitina supersulfatado (OSCS) da mesma forma que o CS é um glicosaminoglicano formado por unidades dissacarídicas de GalNAc e GlcA. As ligações glicosídicas $\beta 1 \rightarrow 3$ e $\beta 1 \rightarrow 4$ ligam as unidades monossacarídicas, onde GlcA liga GalNAc através de ligação glicosídica $\beta 1 \rightarrow 3$ e GalNAc liga GlcA através de ligação glicosídica $\beta 1 \rightarrow 4$. Por outro lado apresenta um padrão diferente de sulfatação no monossacarídeo GlcA quando comparado ao CS. O OSCS é sulfatado quimicamente nas posições 4 e 6 do GalNAc, contudo no GlcA, além da posição 2 normal na molécula no CS, também é sulfatado na posição 3 deste monossacarídeo (Figura 6) (Maruyama *et al.*, 1997).

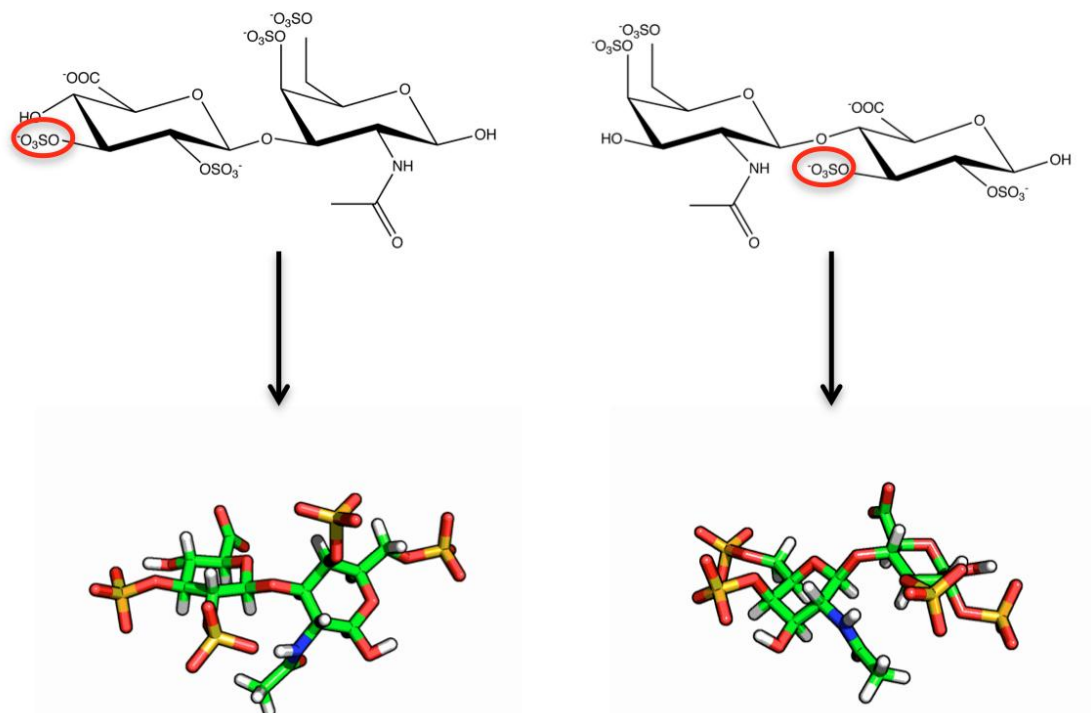


FIGURA 6: REPRESENTAÇÃO BIDIMENSIONAL E TRIDIMENSIONAL DO OSCS, COM DESTAQUE PARA O SULFATO NA POSIÇÃO 3 DO GLcA. FRUTO DE SULFATAÇÃO QUÍMICA E ESPECÍFICA. REPRESENTADA À ESQUERDA A LIGAÇÃO GLICOSÍDICA $\beta 1 \rightarrow 3$ E À DIREITA A LIGAÇÃO GLICOSÍDICA $\beta 1 \rightarrow 4$.

Recentemente o OSCS foi encontrado como contaminante de heparinas e assim associado a efeitos adversos, reações alérgicas e em alguns casos até morte de pacientes que utilizaram os lotes de heparina, com o OSCS como contaminante. Como a sulfatação específica nessa molécula é apenas química, são conhecidos 4 compostos que diferem apenas no estado conformacional no anel do monossacarídeo GlcA (Maruyama *et al.*, 1997) (Figura 7).

A sulfatação química e específica na posição 3 do anel do GlcA no OSCS, causa uma mudança conformacional e estrutural de grande relevância. No CS encontrado biologicamente na posição 3 temos uma hidroxila e assim o anel do GlcA permanece na conformação chamada 4C_1 na temperatura de 30°C (Figura 8, A). Entretanto, no OSCS, a adição de um sulfato na posição 3 desse mesmo GlcA, torna-o com conformação preferencial de anel na temperatura de 30°C chamada 1C_4 (Figura 8, B). Essa mudança conformacional pode ser explicada pela repulsão entre as cargas negativas dos grupamentos sulfatos. Quando um ciclohexano sofre mudança conformacional de 4C_1 para 1C_4 em seu anel ocorre mudança conformacional nos ligantes do ciclo, onde ligantes que se encontravam em posição axial passam para equatorial, assim como ligantes que eram equatorial passam para axial (Maruyama *et al.*, 1997) (Figura 8).

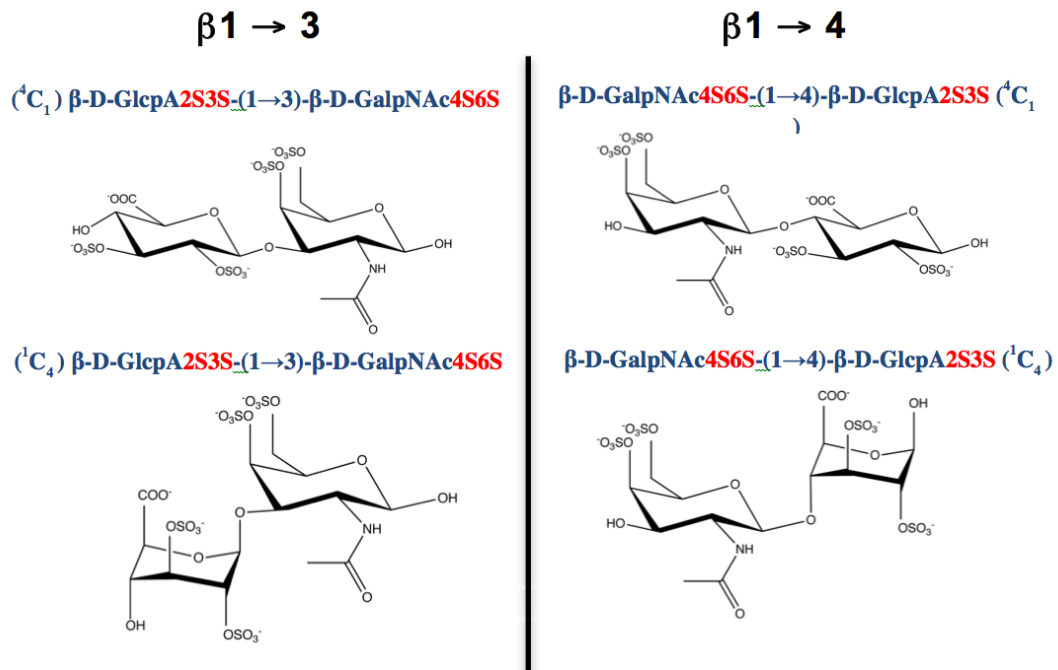


FIGURA 7: OSCS JÁ DESCRITOS, DIVIDIDOS POR LIGAÇÃO GLICOSÍDICA. DIFERENTE DO CS, OS OSCS DESCRITOS NÃO SÃO ENCONTRADOS NA NATUREZA.

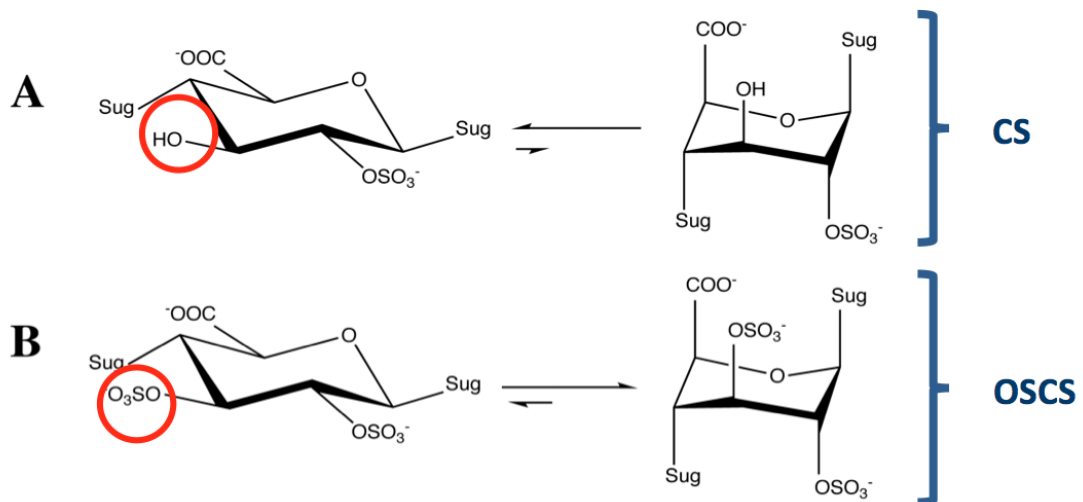


FIGURA 8: (A) GLCA2S-SULFATADO, 3-HIDROXILADO RESIDE NA CONFORMAÇÃO 1C_1 . (B) GLCA2,3S-SULFATADO RESIDE NA CONFORMAÇÃO 1C_4 (Maruyama *et al.*, 1997).

A conformação de 1C_4 adquirida pelo GlcA no OSCS tem uma grande relevância visto que, se torna similar ao resíduo idurônico sulfatado na posição 2 encontrado em moléculas de heparina (Figura 9)(Maruyama *et al.*, 1997). Essa similaridade entre o OSCS e a heparina, pode explicar o fato da dificuldade de análise da presença do OSCS como contaminante de heparinas.

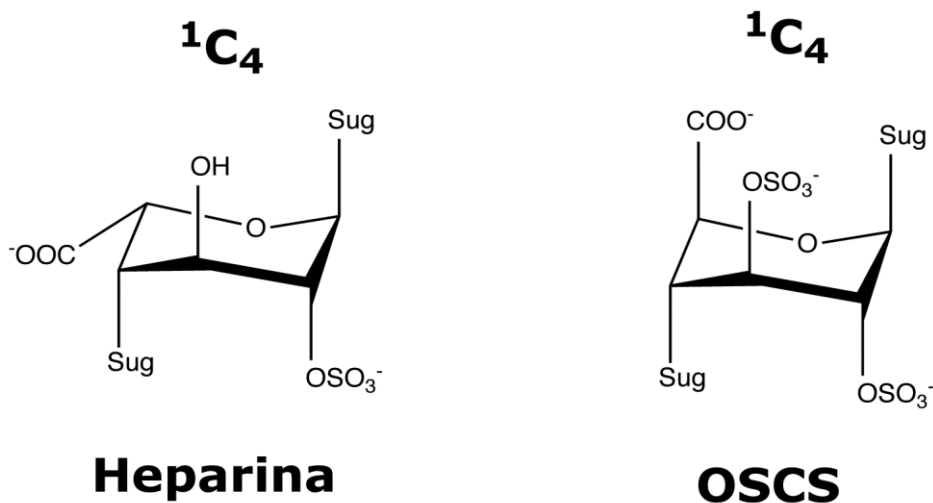


FIGURA 9: COMPARAÇÃO ENTRE O RESÍDUO IDOA DE HEPARINA E O RESÍDUO GLCA DO OSCS.

Essa mudança conformacional, devido a sulfatação, que ocorre na molécula do OSCS corresponde a um substancial aumento na atividade como anti-fator IIa e assim um aumento na atividade anticoagulante. Contudo, apesar da similaridade com a molécula de heparina, devido ao resíduo glicurônico, não apresenta aumento na atividade como anti-fator Xa. Isso nos demonstra que o OSCS, apresenta atividade como anti-fator IIa e a não como anti-fator Xa, diferente da heparina que possui atividade como anti-fator IIa e anti-fator Xa. Essas situações podem ser explicadas pelas diferentes proteases inibidoras do fIIa e do fXa, já que o fIIa pode ser inibido pela AT ou pela cofator de heparina II (HCII), enquanto o fXa é apenas inibido pela AT. AT é conhecida por apenas se ligar a uma seqüência específica de um pentassacarídeo de heparina, já o HCII se liga com menos especificidade a heparina. Isso nos demonstra que a atividade como anti-fator IIa do OSCS, é mediada pelo HCII (Maruyama *et al.*, 1997).

Por outro lado o fato de OSCS não apresentar atividade anti-fator Xa não significa que o mesmo não se ligue na AT. A heparina se liga a AT e é capaz de causar uma mudança conformacional necessária para que a AT possa inibir o fXa, contudo, OSCS se liga na AT em um sítio diferente da heparina, e essa ligação não é suficiente para causar a mudança conformacional necessária na AT para que a mesma possa inibir o fXa. Isso nos explica o porque do OSCS falhar na inibição do fXa mediado por AT (Li *et al.*, 2009).

Dessa forma, a descoberta da influência da sulfatação na conformação do CS e do OSCS e sua relação com a toxicidade, ou atividade biológica ainda é alvo de estudos para o desenvolvimento de fármacos anticoagulantes, melhores, seguros e eficazes.

1.4 Nomenclatura da conformação de carboidratos

A conformação de carboidratos é usualmente descrita de acordo com as recomendações da IUPAC (IUPAC-IUB, 1996). Estas recomendações seguem a seguinte regra: o arranjo espacial dos átomos de carbono no anel do monossacarídeo na forma cíclica, pode ser indicado com letra maiúscula em itálico e por números que indicam as possíveis variantes conformacionais desse monossacarídeo. As letras que podem ser utilizadas para descrição das formas dos anéis nos monossacarídeos são:

a) Anéis de 05 membros:

- *E*, utilizada para a conformação envelope;
- *T*, utilizada para a conformação torcida (*twist*).

b) Anéis de 06 membros:

- *C*, utilizada para a conformação de cadeira (Figura 10);
- *B*, utilizada para a conformação de bote;
- *S*, utilizada para a conformação de bote-torcido (*skew-boat*)(Figura 10);
- *H*, utilizada para a conformação de meia-cadeira (*half-chair*);
- *E*, utilizada para a conformação de envelope.

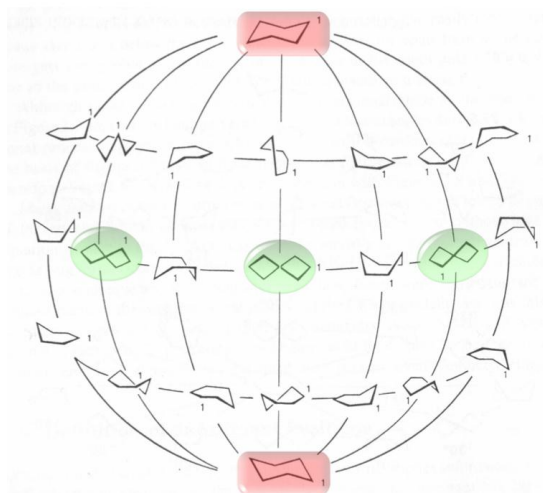


FIGURA 10: GLOBO CONFORMACIONAL DO CICLO HEXANO (ADAPTADO DE CREMER & SZABO, 1995). AS FORMAS DE BOTE TORCIDO ESTÃO APRESENTADAS EM VERDES, ENQUANTO QUE AS DUAS POSSÍVEIS DE CADEIRA ESTÃO MARCADAS EM VERMELHO.

As variantes possíveis são distinguidas por 4 átomos do anel do que se encontram em um mesmo plano. O átomo de carbono que se encontra sobre este plano deverá vir sobrescrito antes da letra maiúscula, enquanto que o átomo de carbono que se encontra abaixo deste plano deverá vir subscrito após a letra maiúscula (Figura 11). Quando se trata de heteroátomos (O, S) deverá ser indicado pelos seus próprios símbolos, como exemplo, o resíduo idurônico de heparinas onde pode adotar a conformação 2S_O . O S corresponde ao bote torcido, enquanto que o número 2 ao carbono do anel que está sobre o plano e a letra O corresponde ao oxigênio do anel que se encontra abaixo do plano.

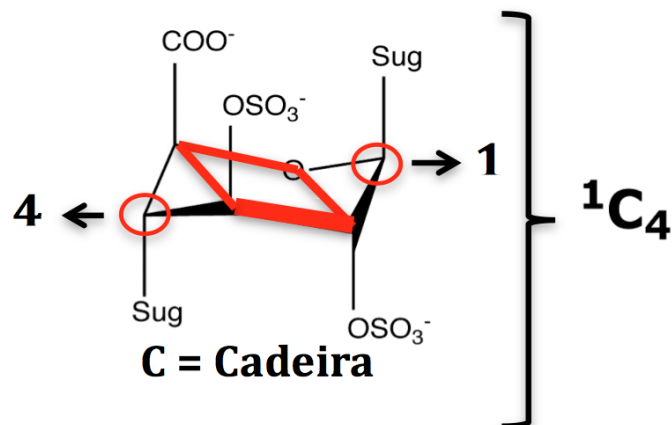


FIGURA 11: REPRESENTAÇÃO DA NOMENCLATURA EMPREGADA NA DEFINIÇÃO CONFORMACIONAL DE CARBOIDRATAOS, EMPREGANDO COMO EXEMPLO O RESÍDUO GLCA DO OSCS. EM VERMELHO, OS 4 ÁTOMOS DE CARBONO QUE SE ENCONTRAM NO MESMO PLANO. ESTÃO AINDA DESTACADOS OS ÁTOMOS LOCALIZADOS ACIMA E ABAIXO DESTES PLANOS.

1.5 O uso de ferramentas computacionais de dinâmica molecular para o estudo conformacional de biomoléculas

O termo preciso para definição de bioinformática, ainda é um ponto de muita discussão. Alguns pesquisadores definem bioinformática somente como o desenvolvimento de bancos de dados, para podermos armazenar e manipular a informação genética. Outros definem como tudo que engloba a biologia computacional. Baseado na literatura científica bioinformática pode ser definida como o estudo de dois fluxos de informações na biologia molecular. O primeiro é baseado na transferência de informação, incluindo a organização e controle dos genes na sequência de DNA, a identificação da transcrição de unidades de DNA, a predição da estrutura protéica a partir da sequência de DNA e análise de sua função molecular. O segundo fluxo de informação é baseado no método científico: Cria-se hipóteses sobre atividade biológica, desenvolve-se experimentos para testar essa hipótese, avalia-se os dados resultantes baseado na compatibilidade com as hipóteses e estende-se ou modifica-se as hipóteses em respostas aos dados obtidos. Assim a segunda classe de definição da bioinformática, baseada nesse protocolo é a inclusão de sistemas que geram hipóteses, desenvolvimento de experimentos, armazenamento e organização dos dados obtidos em uma base de dados, testes de compatibilidade com esses modelos e modificação das hipóteses (Bourne e Weissig, 2003).

O grande interesse na bioinformática tem sido impulsionada pelo surgimento de técnicas experimentais que geram grande volumes de dados, com grandes possibilidades de estudo com ferramentas computacionais. O rápido aumento do número de estruturas macromoleculares tridimensionais em base de dados como o Protein Data Bank (PDB), gerou uma necessidade de criação de uma subárea na bioinformática, a bioinformática estrutural. Bioinformática estrutural é uma subdisciplina que foca na representação,

armazenamento, recuperação, análise e visualização estrutural em nível atômico e subcelular (Bourne e Weissig, 2003).

A bioinformática estrutural também é dividida em dois objetivos: a criação de métodos de uso geral para a manipulação de informação sobre macromoléculas biológicas, e aplicação desses métodos para a resolução de problemas biológicos (Bourne e Weissig, 2003). Dentro da aplicação de métodos para resolução de problemas biológicos, temos como exemplo a dinâmica molecular (DM), onde no presente trabalho utilizamos para o estudo da conformação de biomoléculas.

O método de dinâmica molecular (DM) é baseado na equação de movimento da segunda lei de Newton, $F_i = m_i \cdot a_i$. A trajetória é obtida resolvendo a integração da equação da segunda lei de Newton, onde a_i é aceleração sobre o átomo i , a massa " m_i " corresponde à massa do átomo i e a força " F_i " sobre o átomo i (Leach, 2001). Aplica-se essa equação a todos os átomos do sistema e assim poderemos ter um conjunto de coordenadas, para o sistema em estudo, que pode representar por exemplo as mudanças conformacionais de biomoléculas em solução aquosa.

A definição de parâmetros, como as energias de estiramento de ligação e a distorção do ângulo de ligação de uma molécula na dinâmica molecular, quando comparadas com sua conformação não tensionada, é realizada por um conjunto de funções de energia (Figura 12). Assim definimos campo de força como um conjunto de funções e parametrização usado em cálculos de dinâmica molecular (Sant'Anna, 2002).

$$V_{\text{①}}^{\text{phys}}(\vec{r}(t); \lambda, \mu) = V_{\text{②}}^{\text{bon}}(\vec{r}(t); \lambda, \mu) + V_{\text{③}}^{\text{nonb}}(\vec{r}(t); \lambda, \mu)$$

$$V_{\text{④}}^{\text{bond}}(\vec{r}(t)) = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^{N_b} K_{b_n} [b_n(t) - b_{0_n}]^2$$

$$V_{\text{⑤}}^{\text{angle}}(\vec{r}(t)) = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^{N_\theta} K_{\theta_n} [\cos(\theta_n(t)) - \cos(\theta_{0_n})]^2$$

$$V_{\text{⑥}}^{\text{diar}}(\vec{r}(t)) = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^{N_\xi} K_{\xi_n} [\xi_n(t) - \xi_{0_n}]^2$$

$$V_{\text{⑦}}^{\text{trig}}(\vec{r}(t)) = \sum_{n=1}^{N_\phi} K_{\phi_n} [1 + \cos(\delta_n) \cos(m_n \phi_n(t))]$$

$$\text{⑧} \sum_{\text{nonbonded pairs } (i,j)} \left[\frac{C_{12}(i,j)}{r_{ij}^{4D}(t)^6} - C_6(i,j) \right] \frac{1}{r_{ij}^{4D}(t)^6} +$$

$$\text{⑨} \sum_{\text{nonbonded pairs } (i,j)} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_1} \left[\frac{1}{r_{ij}^{4D}(t)} - \frac{C_{rf}^{3D}(t)^2}{2R_{rf}^3} - \frac{1 - 1/2 C_{rf}}{R_{rf}} \right]$$

FIGURA 12: FUNÇÕES DE ENERGIA QUE COMPÕEM O CAMPO DE FORÇA GROMOS96. AS FUNÇÕES FÍSICAS (PHYS, 1), QUE DESCREVEM INTERAÇÕES INTERATÔMICAS, DIVIDEM-SE EM FUNÇÕES QUE DESCREVEM INTERAÇÕES LIGADAS (BONDED, 2) E NÃO LIGADAS (NONBONDED, 3). AS PRIMEIRAS

DIVIDEM-SE EM EQUAÇÕES QUE DESCREVEM 4 O ESTIRAMENTO DE LIGAÇÕES QUÍMICAS, 5 ÂNGULOS DE LIGAÇÃO, 6 DIEDROS IMPRÓPRIOS E 7 DIEDROS PRÓPRIOS; ENQUANTO AS ÚLTIMAS DESCREVEM INTERAÇÕES INTERMOLECULARES DO TIPO 8 INTERAÇÕES DE LENNARD-JONES E 9 INTERAÇÕES DE CARGA (BASEADO EM SCOTT ET AL.,1999).

A confiabilidade da predição de dinâmica molecular, basicamente depende de dois fatores. O primeiro, a precisão do modelo molecular e do campo de força e o segundo a busca do espaço conformacional durante a dinâmica molecular com espaço suficientemente necessário para descrever as possíveis conformações do sistema (van Gunsteren e Berendsen, 1990). O teste final para estimar a precisão do modelo deve ser realizado quando possível com a comparação com dados experimentais. Utiliza-se os confôrmeros com maior população na dinâmica molecular, e o compara-se com confôrmeros já descritos na literatura.

2 OBJETIVOS

A partir do exposto, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar a influência dos padrões de sulfatações nas conformações adotadas pelo CS e OSCS em solução aquosa. Para tanto, os objetivos específicos seguintes forma traçados:

- Construção de mapas de contorno relaxados para todas as possíveis ligações glicosídicas encontradas no CS e no OSCS;
- Uso de DM no refinamento das geometrias de menor energia obtidas nos mapas de contorno;
- Caracterização do papel da sulfatação no perfil conformacional de CS e OSCS e, a partir destas informações, buscar identificar potenciais relações destas com a toxicidade ou a atividade biológica dos compostos estudados.

3 METODOLOGIA

A realização deste trabalho seguiu a abordagem de construção de estruturas glicosídicas previamente desenvolvidas em nosso grupo de pesquisas (Verli e Guimarães, 2004; Verli e Guimarães, 2005; Becker *et al.*, 2005; Pol-Fachin e Verli, 2008; Fernandes *et al.*, 2010), conforme ilustrado brevemente na Figura 13 e detalhado a seguir.

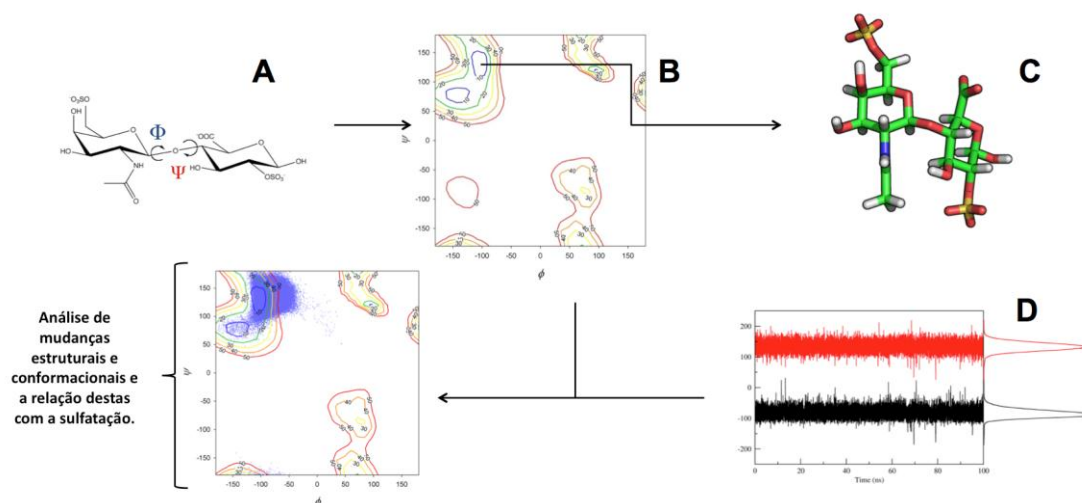


FIGURA 13: EXEMPLIFICAÇÃO DA METODOLOGIA UTILIZADA: A) CONSTRUÇÃO DE TOPOLOGIAS¹, B) CONSTRUÇÃO DE MAPAS DE CONTOURNO, C) DINÂMICA MOLECULAR, D) ANÁLISE DOS RESULTADOS (ADAPTADO POL-FACHIN E VERLI 2011).

3.1 Construção das topologias

A nomenclatura e os símbolos utilizados seguiram recomendação proposta pela IUPAC (IUPAC, 1996). A ligação glicosídica, que une dois resíduos de monossacarídeos consecutivos, é descrita pelos ângulos de torção ϕ e ψ que, para as moléculas de CS e no OSCS, são definidas pelos seguintes átomos:

- $\beta 1 \rightarrow 3$:
 $\phi = O5 - C1 - O1 - C3'$
 $\psi = C1 - O1 - C3' - C2'$
- $\beta 1 \rightarrow 4$:
 $\phi = O5 - C1 - O1 - C4'$
 $\psi = C1 - O1 - C4' - C3'$

Inicialmente, a topologia¹ da unidade dissacarídica foi construída a partir de dados da literatura para moléculas de CS e OSCS, no programa MOLDEN (Schaffenaar e Noordik, 2000) e submetidas ao servidor PRODRG (Schuettelkopf e van Aalten, 2004), de onde retiramos as topologias¹ e as coordenadas atômicas. Essas topologias¹, por sua vez,

¹Topologia: Descrição do modo pelo qual os átomos estão ligados em uma molécula.

receberam ajustes, incluindo o emprego de cargas atômicas de Löwdin na base HF/6-31** (Becker *et al.*, 2005) e a inclusão de diedros impróprios para manutenção dos estados conformacionais experimentais dos monossacarídeos de CS ou OSCS (4C_1 ou 1C_4). No total, foram construídos 20 dissacarídeos, listados da Tabela 1.

TABELA 1: DISSACARÍDEOS CARACTERIZADOS NO PRESENTE TRABALHO

Ligação Glicosídica	
$\beta 1 \rightarrow 3$	$\beta 1 \rightarrow 4$
β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc	β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA
β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc4S	β -D-GalpNAc4S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA
β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc6S	β -D-GalpNAc6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA
β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc4S6S	β -D-GalpNAc4S6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA
β -D-GlcpA2S-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc	β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S
β -D-GlcpA2S-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc4S	β -D-GalpNAc4S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S
β -D-GlcpA2S-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc6S	β -D-GalpNAc6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S
β -D-GlcpA2S-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc4S6S	β -D-GalpNAc4S6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S
$({}^4C_1)$ β -D-GlcpA2S3S-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc4S6S	β -D-GalpNAc4S6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S3S (4C_1)
$({}^1C_4)$ β -D-GlcpA2S3S-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc4S6S	β -D-GalpNAc4S6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S3S (1C_4)

3.2 Construção de mapas de contorno

A descrição conformacional das ligações glicosídicas dos dissacarídeos construídos (Tabela 1) foi realizada a partir da rotação dos ângulos ϕ e ψ entre -180° a 150° , em passos de 30° , resultando em um total de 144 confôrmeros para cada dissacarídeo (Figura 13 A). Este passo foi realizado utilizando uma constante de força de $334.8 \text{ kJ mol}^{-1}$ para restringir apenas os diedros ϕ e ψ durante o processo de minimização de energia, permitindo assim um relaxamento do restante da molécula (Pol-Fachin e Verli 2008; Castro *et al.*, 2009). Cada confôrmero gerado foi submetido em seguida a uma DM de 20ps a 10K com tempo de integração de 0,05 fs, para ajudar na determinação da conformação com menor energia. Nesse processo, a rotação dos grupos exocíclicos permaneceram livres para a busca de orientações com menor energia, caracterizando um mapa de contorno do tipo relaxado. A estabilidade relativa de cada conformação, obtida da última geometria gerada pela DM, baseada no campo de força GROMOS96 43a1 e cargas atômicas de Löwdin na base HF/6-31**, foi empregada na construção de mapas de contorno descrevendo a conformação de cada ligação glicosídica e a influência da sulfatação nas mesmas (Figura 13 B).

3.3 Simulação por DM

Os confôrmeros de menor energia obtidos através das regiões de mínimo de energia dos mapas de contorno foram submetidos a simulações por DM em solvente aquoso,

modelo SPC (Berendsen *et al.*, 1987) (Figura 13 C). Foram utilizadas nessas simulações caixas cúbicas, com adição de contra-íons (Na^+), quando necessário, para neutralizar os sistemas. O sistema composto pela unidade dissacarídica, água e íons foi então submetido à minimização de energia pelo algoritmo *Steepest Descents* e serviu de ponto de partida para as simulações por DM. O método Lincs (Hess *et al.*, 1997) foi empregado para restrição de ligações covalentes de forma a permitir um passo de integração de 2fs. A temperatura e a pressão foram mantidas constantes através do acoplamento de carboidratos, íons e solventes a banhos externos de temperatura e pressão, utilizando constantes de acoplamento de $\tau = 0,1$ e $0,5$ ps, (Berendsen *et al.*, 1984) respectivamente. A constante dielétrica do meio foi tratada como $\epsilon = 1$. Por fim, as simulações foram realizadas a temperatura constante de 310K por $0,1 \mu\text{s}$.

3.4 Análise dos resultados

Para facilitar as análises das conformações obtidas dos dissacarídeos em solução, foi desenvolvida uma nova forma de análise capaz de avaliar o resultado de uma curva de distribuição conformacional para o ângulo ϕ correlacionando os valores obtidos nessa com os valores do ângulo na curva ψ , ou vice versa. A partir dos dados de uma das distribuições selecionadas os dados correspondentes a outra curva eram avaliados conjuntamente. Esse tipo de análise desenvolvida, nos permitiu quantificar com maior precisão as prováveis populações conformacionais das ligações glicosídicas adotadas nos dissacarídeos caracterizados em solução.

Para analisar as possíveis ligações intramoleculares de hidrogênio foram utilizados os seguintes parâmetros:

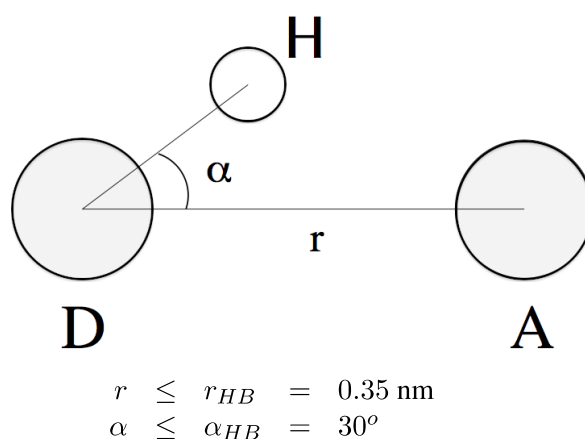


FIGURA 14: CRITÉRIO GEOMÉTRICO PARA A EXISTÊNCIA DE LIGAÇÕES INTRAMOLECULARES DE HIDROGÊNIO. D = DOADOR, A = ACEPTOR (VAN DER SPOEL *ET AL.*, 2010).

Analizamos as possíveis ligações intramoleculares de hidrogênio inter-resíduos em todos dissacarídeos de CS e OSCS durante a simulação com solvente explícito.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Dissacarídeos de CS e OSCS $\beta 1 \rightarrow 3$ ligados

Inicialmente, os mapas de contorno obtidos para os dissacarídeos de CS e OSCS apresentaram perfis conformacionais dependentes da presença do grupamento sulfato; a sulfatação tanto na posição 2 do GlcA quanto na posição 4 da GalNAc levaram à observação de menos estados conformacionais de menor energia quando comparadas a moléculas não sulfatadas (Figura 15 e Figura 16).

Nos resultados das simulações de dinâmica molecular, obtidos através dos gráficos de flutuação e distribuição, nas moléculas de CS $\beta 1 \rightarrow 3$ ligados observamos uma flexibilidade elevada em todas as moléculas. Este dado fica claro, pois tanto os gráficos de flutuação ou distribuição apresentam variação entre mais de um estado conformacional prevalente em solução (Figura 17 e Tabela 2). Apesar de apresentarem mais de um estado conformacional é possível observar que nessas moléculas, mesmo com os diferentes padrões de sulfatação, temos uma torção de ângulos ϕ e ψ , ou seja, variação conformacional da ligação glicosídica, similar (Tabela 2 e Tabela 4). A molécula de OSCS com conformação do resíduo glicurônico de 4C_1 apresentou-se similar, no que diz respeito à flexibilidade e valores de ϕ e ψ , com as moléculas de CS citadas (Figura 18 e Tabela 2). Contudo no OSCS a molécula com resíduo glicurônico na conformação 1C_4 apresentou um rigidez, na torção dos ângulos ϕ e ψ , não encontrada em nenhuma molécula de CS $\beta 1 \rightarrow 3$ ligado (Figura 18 e Tabela 2).

Foi possível observar que na tabela 4 todos dissacarídeos de CS $\beta 1 \rightarrow 3$ ligados apresentam estados conformacionais entre dois valores de ângulo ϕ e dois valores de ângulo ψ . Com esses valores e os gráficos de distribuição da dinâmica molecular é possível inferir que todos esses CS podem assumir até quatro possíveis combinações de conformação da ligação glicosídica. Observamos que a adição de grupamentos sulfatos nas posições 2 do GlcA e 4 da GalNAc, originou a prevalência conformacional de um ângulo ϕ e um ângulo ψ antes presente com menor abundância relativa em todas as outras moléculas de CS (Tabela 4). No OSCS com o GlcA na forma 4C_1 , também ficou claro a presença de quatro possíveis combinações, e os valores de ϕ e ψ encontrados foram próximos aos do CS. Contudo analisando o OSCS com resíduo glicurônico na conformação 1C_4 apenas um valor de ϕ e um de ψ , foi observado, confirmando a rigidez conformacional da ligação glicosídica (Tabela 4).

Conforme o indicado na Tabela 3, pôde-se identificar a menor ou nenhuma ocorrência de interações por ligação de hidrogênio intramoleculares nos CS $\beta 1 \rightarrow 3$ ligados. Essa possível ausência de interações de hidrogênio sugere o envolvimento na flexibilidade dessas moléculas, podendo essas alternar entre mais de um valor para ϕ e ψ . Nos dissacarídeos com sulfatação nas posições 2 do GlcA e 4 do GalNAc observou-se um aumento dessas ligações de hidrogênio. Na molécula de OSCS na forma 1C_4 houve o

aparecimento de ligações de hidrogênio intramoleculares, praticamente durante toda a simulação.

Nos dissacarídeos de CS sulfatados na posição 2 do GlcA e na posição 4 do GalNAc, o aumento de suas ligações de hidrogênio intramoleculares sugere o porquê desses dissacarídeos adotarem um único estado conformacional, com valores de ϕ e ψ , menos prevalente nas demais moléculas de CS (Tabela 3 e Tabela 4). O grande volume molecular desses grupamentos sulfatos, nessas posições específicas dessa molécula, surge também como um dos responsáveis por impedir que o dissacarídeo assumira valores de ϕ e ψ comumente encontrados com maior prevalência nas moléculas de CS.

No que diz respeito às moléculas de OCS $\beta 1 \rightarrow 3$ ligado, observamos mudanças conformacionais apenas na molécula com resíduo glicurônico na forma 1C_4 . A adição química e específica do grupamento sulfato e a mudança conformacional do anel de GlcA em resposta a essa sulfatação, surge como responsável pelo aparecimento de ligações de hidrogênio intramoleculares durante a simulação e assim responsáveis pelo enrijecimento da ligação glicosídica desse dissacarídeo. Com o surgimento dessas interações, o número de estado conformacionais prevalentes fica restrito a um para ambos os ângulos, demonstrando o impedimento na torção da ligação glicosídica em mais de um estado conformacional.

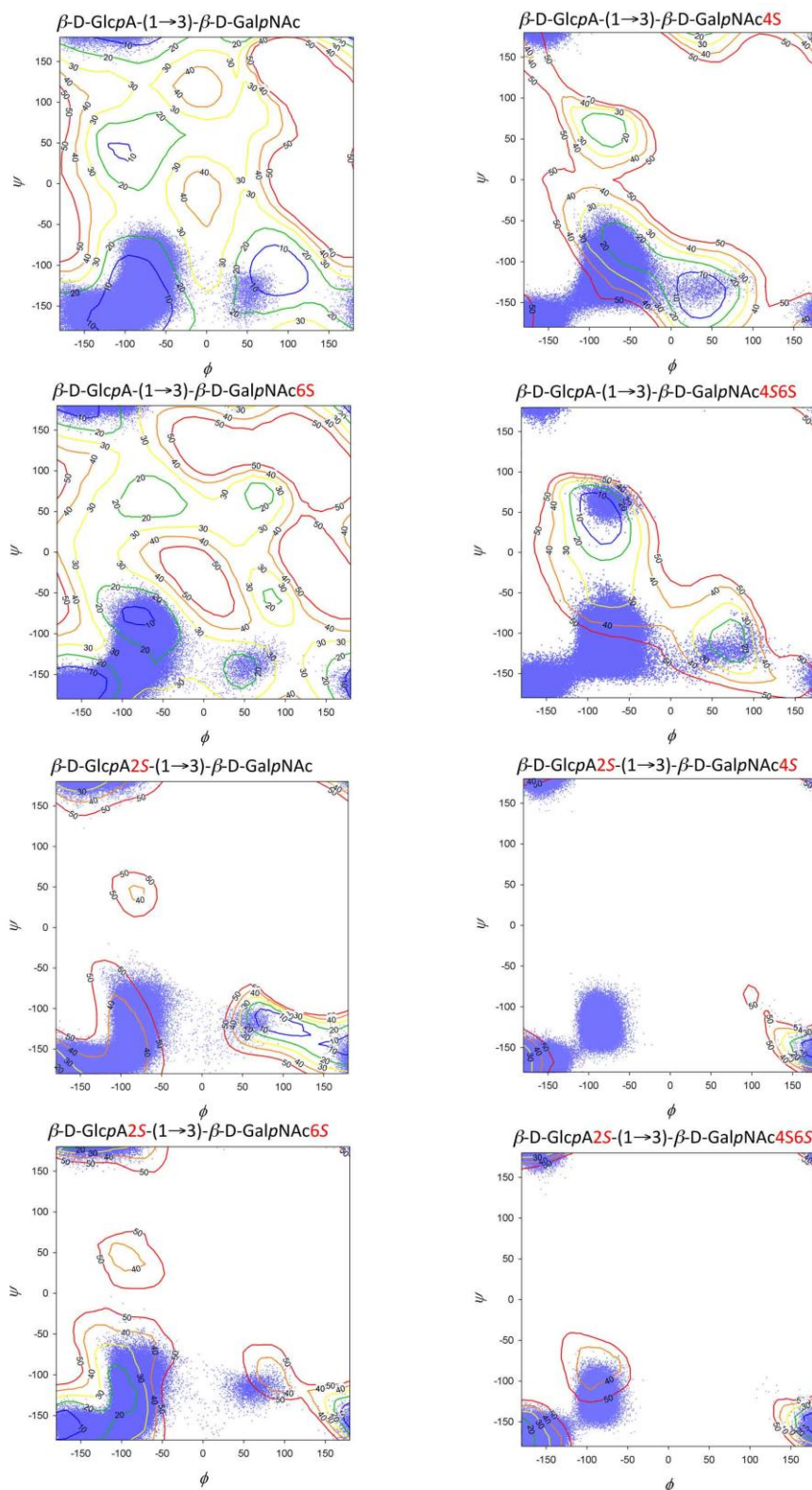


FIGURA 15: MAPAS DE CONTORNO PARA DISSACÁRÍDEOS DE CS $\beta 1 \rightarrow 3$ LIGADOS. EM AZUL, REPRESENTAÇÃO DAS CONFORMAÇÕES ADOTADAS POR CADA DISSACÁRÍDEO DURANTE SIMULAÇÃO POR DM EM SOLUÇÃO. CURVAS DE NÍVEL REPRESENTANDO VALORES DE ENERGIA ADOTADO POR CADA CONFÔRMERO NO VÁCUO EM KJ/MOL. ■ 10 KJ/MOL ■ 20 KJ/MOL ■ 30 KJ/MOL ■ 40 KJ/MOL ■ 50 KJ/MOL

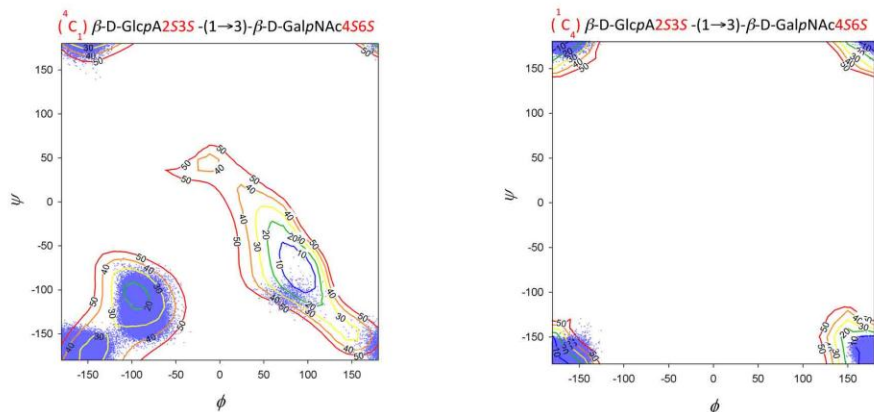


FIGURA 16: MAPAS DE CONTOURO PARA DISSACARÍDEOS DE OCS $\beta 1 \rightarrow 3$ LIGADOS. EM AZUL, REPRESENTAÇÃO DAS CONFORMAÇÕES ADOTADAS POR CADA DISSACARÍDEO DURANTE SIMULAÇÃO POR DM EM SOLUÇÃO. CURVAS DE NÍVEL REPRESENTANDO VALORES DE ENERGIA ADOTADO POR CADA CONFORMÊRO NO VÁCUO EM KJ/MOL. — 10 KJ/MOL — 20 KJ/MOL — 30 KJ/MOL — 40 KJ/MOL — 50 KJ/MOL

TABELA 2: PREFERÊNCIA CONFORMACIONAL DOS DISSACARÍDEOS DE CS E OCS $\beta 1 \rightarrow 3$ LIGADOS, CONFORME OBSERVADO NAS SIMULAÇÕES POR DM.

Dissacarídeo	Abundância Relativa (%)	Ângulo (°)	
		Φ	Ψ
β -D-GlcpA-(1→3)- β -D-GalpNAc	48	-75 ± 30	-160 ± 23
	39	-70 ± 27	-80 ± 25
	13	-160 ± 22	-160 ± 23
β -D-GlcpA-(1→3)- β -D-GalpNAc4S	85	-65 ± 34	-105 ± 33
	15	-170 ± 25	-170 ± 20
β -D-GlcpA-(1→3)- β -D-GalpNAc6S	56	-80 ± 30	-150 ± 20
	30	-70 ± 28	-85 ± 20
	12	-155 ± 15	-155 ± 16
	02	-150 ± 28	165 ± 11
β -D-GlcpA-(1→3)- β -D-GalpNAc4S6S	80	-70 ± 30	-105 ± 32
	18	-160 ± 25	-160 ± 23
	02	-70 ± 30	60 ± 20
β -D-GlcpA2S-(1→3)- β -D-GalpNAc	61	-75 ± 24	-125 ± 36
	37	-155 ± 25	-165 ± 20
	02	50 ± 30	-130 ± 30
β -D-GlcpA2S-(1→3)- β -D-GalpNAc4S	58	-170 ± 28	-170 ± 22
	42	-80 ± 22	-120 ± 26
β -D-GlcpA2S-(1→3)- β -D-GalpNAc6S	81	-80 ± 23	-120 ± 34
	18	-150 ± 20	-155 ± 15
	01	-150 ± 20	165 ± 10
β -D-GlcpA2S-(1→3)- β -D-GalpNAc4S6S	69	-150 ± 20	-150 ± 20
	24	-80 ± 20	-115 ± 22
	05	-150 ± 20	165 ± 16
	02	160 ± 11	-165 ± 10
⁽⁴ C ₁) β -D-GlcpA2S3S-(1→3)- β -D-GalpNAc4S6S	68	-85 ± 20	-120 ± 25
	30	-150 ± 20	-150 ± 20
	02	-150 ± 20	160 ± 12
⁽² C ₄) β -D-GlcpA2S3S-(1→3)- β -D-GalpNAc4S6S	100	-170 ± 26	-170 ± 25

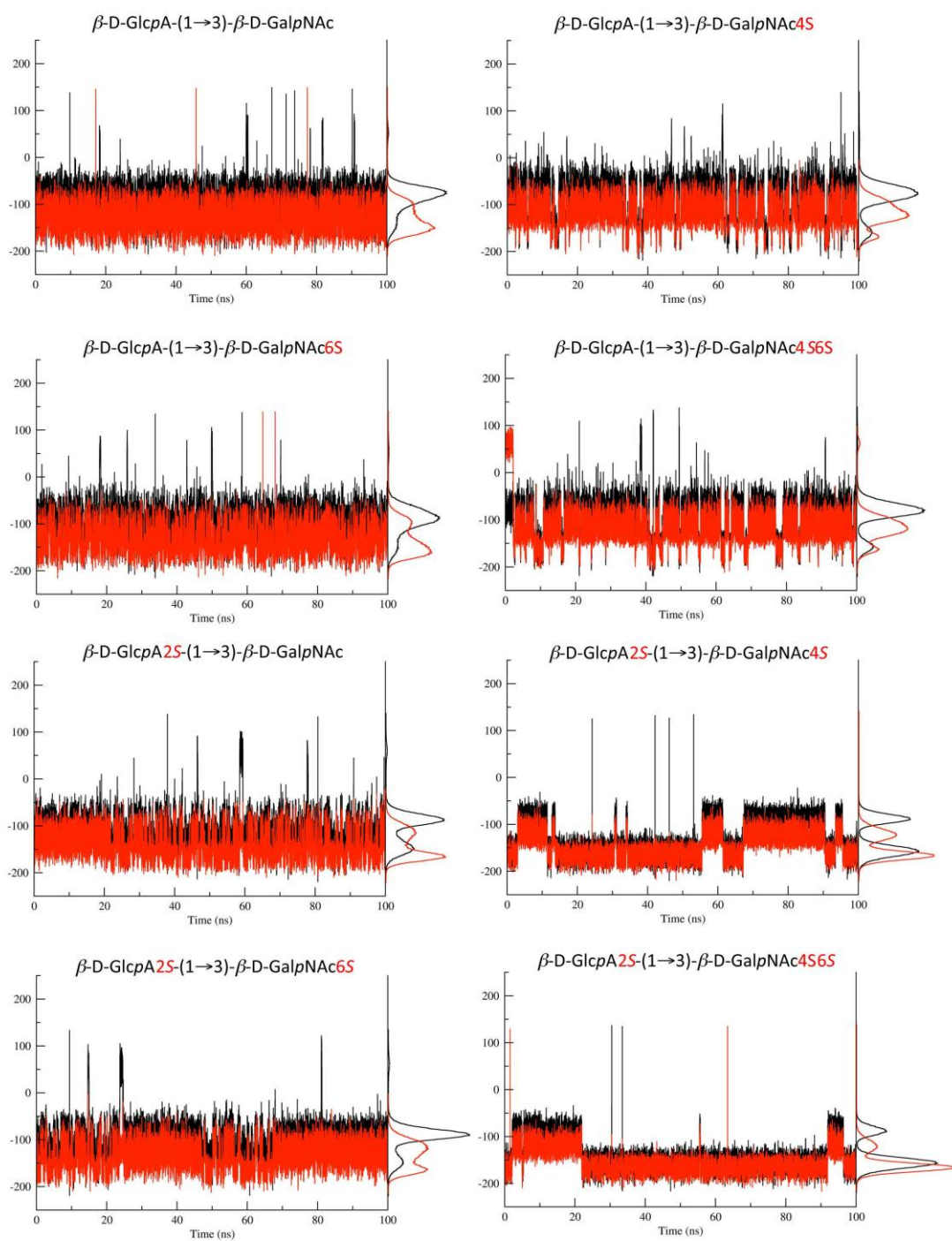


FIGURA 17: FLUTUAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS ÂNGULOS ϕ E ψ AO LONGO DAS SIMULAÇÕES DE DM PARA DISSACARÍDEOS DE CS $\beta 1 \rightarrow 3$ LIGADOS.

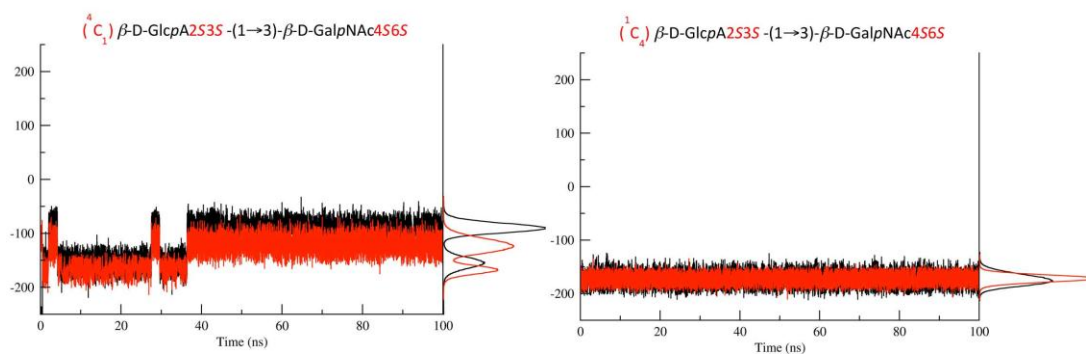


FIGURA 18: FLUTUAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS ÂNGULOS ϕ e ψ AO LONGO DAS SIMULAÇÕES DE DM PARA DISSACARÍDEOS DE OSCS $\beta 1 \rightarrow 3$ LIGADOS.

TABELA 3: LIGAÇÕES INTRAMOLECULARES DE HIDROGÊNIO INTER-RESÍDUO, DURANTE AS SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR, OBSERVADAS NOS DISSACARÍDEOS DE CS E OSCS $\beta 1 \rightarrow 3$ LIGADOS.

Dissacarídeo	Existência de ligação intramolecular de hidrogênio durante a simulação(%)	Ligação intramolecular de hidrogênio mais abundante	Média das ligações intramoleculares de hidrogênio durante a simulação
β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc	13,00	01 (12,60 %)	0,13 \pm 0,35
β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc4S	04,12	01 (03,99 %)	0,04 \pm 0,21
β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc6S	03,11	01 (03,01 %)	0,03 \pm 0,18
β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc4S6S	11,37	01 (11,23 %)	0,12 \pm 0,32
β -D-GlcpA2S-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc	29,93	01 (28,17 %)	0,32 \pm 0,50
β -D-GlcpA2S-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc4S	46,00	01 (43,87 %)	0,49 \pm 0,55
β -D-GlcpA2S-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc6S	20,18	01 (19,28 %)	0,21 \pm 0,43
β -D-GlcpA2S-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc4S6S	58,04	01 (54,81 %)	0,61 \pm 0,55
(⁴ C ₁) β -D-GlcpA2S3S-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc4S6S	34,28	01 (32,70 %)	0,36 \pm 0,51
(¹ C ₄) β -D-GlcpA2S3S-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc4S6S	81,99	01 (69,68 %)	0,94 \pm 0,55

TABELA 4: PREFERÊNCIA CONFORMACIONAL DOS ÂNGULOS ϕ E ψ NOS DISSACARÍDEOS DE CS E OSCS $\beta 1 \rightarrow 3$ LIGADOS, CONFORME OBSERVADO NAS SIMULAÇÕES POR DM.

Dissacarídeo		Abundância Relativa (%)	Ângulo (°)
β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc		88	-85 \pm 26
	Φ	12	-170 \pm 24
	Ψ	66	-165 \pm 26
β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc4S		34	-90 \pm 18
	Φ	84	-70 \pm 30
	Ψ	16	-170 \pm 28
β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc6S		85	-100 \pm 28
	Φ	15	-185 \pm 20
	Ψ	69	-170 \pm 30
β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc4S6S		31	-85 \pm 18
	Φ	83	-75 \pm 28
	Ψ	17	-170 \pm 28
β -D-GlcpA2S-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc		83	-100 \pm 27
	Φ	17	-180 \pm 18
	Ψ	83	-80 \pm 20
β -D-GlcpA2S-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc4S		37	-170 \pm 30
	Φ	56	-180 \pm 23
	Ψ	44	-100 \pm 22
β -D-GlcpA2S-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc6S		58	-170 \pm 30
	Φ	42	-85 \pm 20
	Ψ	59	-180 \pm 22
β -D-GlcpA2S-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc4S6S		41	-110 \pm 18
	Φ	80	-80 \pm 20
	Ψ	20	-170 \pm 30
$^{13}\text{C}_1$ β -D-GlcpA2S3S-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc4S6S		64	-100 \pm 25
	Φ	36	-180 \pm 20
	Ψ	75	-170 \pm 30
$^{13}\text{C}_4$ β -D-GlcpA2S3S-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc4S6S		25	-90 \pm 18
	Φ	77	-180 \pm 20
	Ψ	23	-110 \pm 15
$^{13}\text{C}_1$ β -D-GlcpA2S3S-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc4S6S		68	-75 \pm 25
	Φ	32	-155 \pm 20
	Ψ	68	-115 \pm 20
$^{13}\text{C}_4$ β -D-GlcpA2S3S-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc4S6S		32	-185 \pm 20
	Φ	100	-170 \pm 25
	Ψ	100	-170 \pm 25

4.2 Dissacarídeos de CS e OSCS $\beta 1 \rightarrow 4$ ligados

As moléculas de CS $\beta 1 \rightarrow 4$ ligados, diferentemente dos $\beta 1 \rightarrow 3$ ligados, apresentaram nos mapas de contorno uma conformação similar entre todos os CS $\beta 1 \rightarrow 4$ ligados, caracterizados. Observou-se mudança no OSCS, onde mais de uma região energeticamente favorável foi observada. Predominantemente, os confôrmeros dessas moléculas apresentaram-se em sua maior parte em regiões desfavoráveis energeticamente, assim nos mapas de todos os dissacarídeos podemos ver menos linhas de contorno (Figura 21 e Figura 22).

Nos gráficos de flutuação e distribuição das simulações de dinâmica molecular das moléculas de CS $\beta 1 \rightarrow 4$ ligado, observamos em todos dissacarídeos uma rigidez conformacional na torção dos ângulos ϕ e ψ (Figura 23). Através desses resultados observamos também que além da rigidez, a faixa de torção dos ângulos ϕ e ψ nas moléculas de CS permaneceu similar entre todos os dissacarídeos. No dissacarídeos de OSCS $\beta 1 \rightarrow 4$ ligado, no resíduo glicurônico na conformação 4C_1 , nos seus gráficos de distribuição e flutuação, a rigidez conformacional permaneceu, contudo apresentando valores de torção de ϕ e ψ diferentes (Figura 24 e Tabela 5). Por outro lado na outra molécula de OSCS, com o GlcA em 1C_4 , observou-se uma flexibilidade não presente em nenhuma molécula anterior de CS, a rigidez presente anteriormente em todas as moléculas de CS $\beta 1 \rightarrow 4$ ligado desapareceu. Nos gráficos de flutuação e distribuição dessa molécula é possível ver claramente a alternância entre dois estados conformacionais durante a simulação (Figura 24 e Tabela 5).

Segundo resultados de preferência conformacional dos ângulos ϕ e ψ , foi possível identificar que todos os CS $\beta 1 \rightarrow 4$ ligados apresentaram praticamente uma conformação preferencial para o ângulo ϕ e ψ , reforçando o que os gráficos de flutuação de distribuição já haviam nos mostrados (Tabela 7). Três dissacarídeos apresentam um segundo estado conformacional para os ângulos ϕ e ψ , entretanto devido a sua baixa abundância relativa, não apresenta importância na conformação da ligação (Tabela 7). Assim, devido a presença de apenas um ângulo ϕ e ψ mais abundante essas moléculas possivelmente adotam, independente do padrão de sulfatação, somente um estado conformacional para sua ligação glicosídica. No OSCS com GlcA em 4C_1 também foi prevalente apenas um valor para ϕ e ψ , contudo os valores encontrados, diferem das moléculas de CS $\beta 1 \rightarrow 4$ ligados. O OSCS com conformação 1C_4 no seu resíduo GlcA apresentou estados conformacionais entre dois valores de ângulo ϕ e dois valores de ângulo ψ , confirmando novamente a flexibilidade desse dissacarídeos (Tabela 7).

O perfil conformacional semelhante observado em solução para os dissacarídeos de CS $\beta 1 \rightarrow 4$ ligados, levou-nos a considerar a possibilidade de interações intramoleculares intrínsecas na molécula de CS, que seriam então responsável pela rigidez na conformação dessa ligação glicosídica (Figura 19).

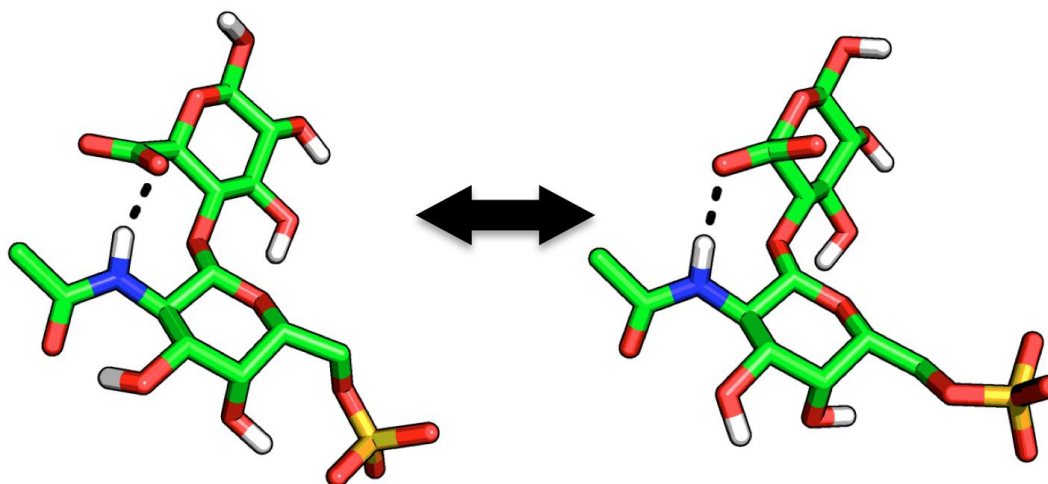


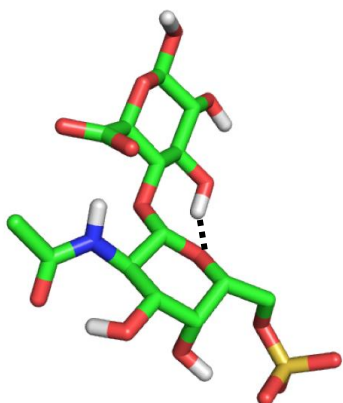
FIGURA 19: REPRESENTAÇÃO DA POSSÍVEL INTERAÇÃO INTRAMOLECULAR, RESPONSÁVEL PELA RIGIDEZ CONFORMACIONAL DAS LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS CS $\beta 1 \rightarrow 4$ LIGADOS.

De fato, conforme indicado na Tabela 6, pôde-se identificar a ocorrência de interações por ligação de hidrogênio em todas as moléculas de CS $\beta 1 \rightarrow 4$ ligados. Embora não tenhamos caracterizado até o momento os grupamentos envolvidos nesta interação, ela se mantém presente na maioria dos dissacarídeos estudados, independentemente dos padrões de sulfatação, sugerindo seu envolvimento na adoção de um estado conformacional comum. Na molécula de heparina as ligações intramoleculares de hidrogênio também ocorrem em seus dissacarídeos e, da mesma forma que no CS, influenciam a conformação destes (Pol-Fachin e Verli, 2008).

Por outro lado, nas moléculas de OSCS, observamos no dissacarídeo com conformação de GlcA 4C_1 , uma menor prevalência de ligações de hidrogênio intramoleculares, sugerindo que o perfil conformacional de rigidez dessa molécula não pode ser explicado por este tipo de interação (Tabela 6). Neste caso, dois efeitos parecem ocorrer: 1) a repulsão eletrostática entre o grupamento sulfato na posição 3 do resíduo GlcA e átomos de oxigênio do resíduo GalNAc, e 2) a eliminação de uma interação intramolecular entre a hidroxila ligada em C-3 no resíduo GlcA e o átomo de oxigênio do anel do resíduo GalNAc (Figura 20).

Em relação ao dissacarídeo de OSCS $\beta 1 \rightarrow 4$ ligado apresentando o resíduo GlcA em 1C_4 , observou-se que a adição química e específica do grupamento sulfato na posição 3 e a mudança conformacional em resposta a adição, desfaz as ligações intramoleculares de hidrogênio, explicando o perfil conformacional de flexibilidade desse dissacarídeo (Tabela 6).

CS
 β -D-GalpNAc6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA



OSCS
 β -D-GalpNAc4S6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S3S (4C_1)

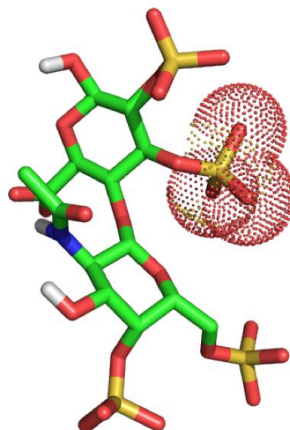


FIGURA 20: REPRESENTAÇÃO DO VOLUME MOLECULAR DO GRUPAMENTO SULFATO, INTERFERINDO EM SUAS ABUNDÂNCIAS RELATIVAS EM SOLUÇÃO, IMPEDINDO QUE O OS CS ADOTE A CONFORMAÇÃO DO CS REPRESENTADO.

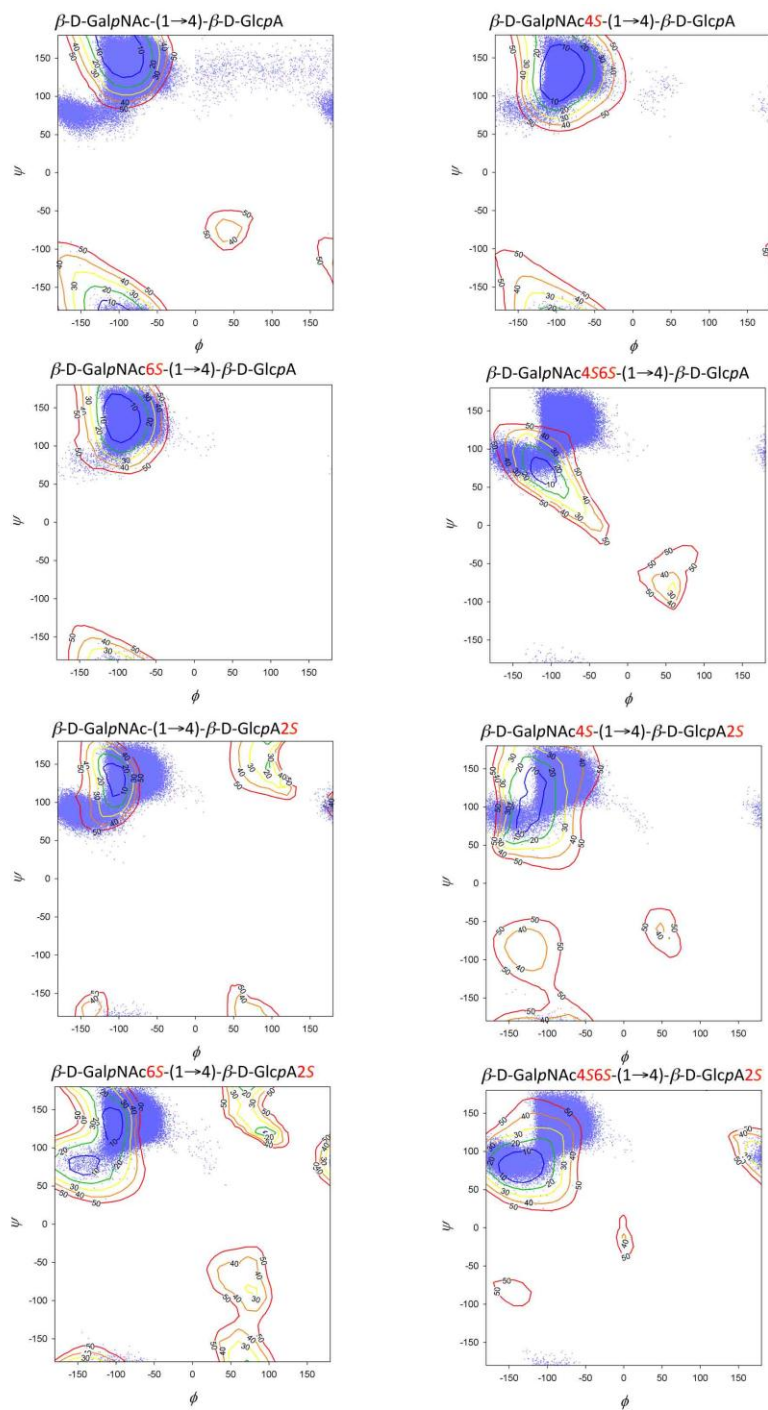


FIGURA 21: MAPAS DE CONTORNO PARA DISSACARÍDEOS DE CS $\beta 1 \rightarrow 4$ LIGADOS. EM AZUL, REPRESENTAÇÃO DAS CONFORMAÇÕES ADOTADAS POR CADA DISSACARÍDEO DURANTE SIMULAÇÃO POR DM EM SOLUÇÃO. CURVAS DE NÍVEL REPRESENTANDO VALORES DE ENERGIA ADOTADO POR CADA CONFÔRMERO NO VÁCUO EM KJ/MOL. — 10 KJ/MOL — 20 KJ/MOL — 30 KJ/MOL — 40 KJ/MOL — 50 KJ/MOL

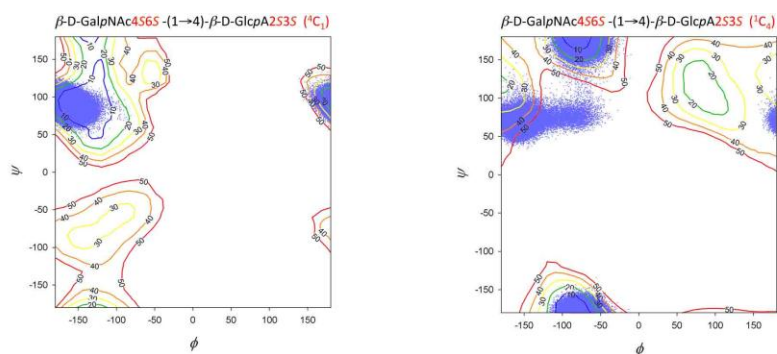


FIGURA 22: MAPAS DE CONTORNO PARA DISSACARÍDEOS DE OCS $\beta 1 \rightarrow 4$ LIGADOS. EM AZUL, REPRESENTAÇÃO DAS CONFORMAÇÕES ADOTADAS POR CADA DISSACARÍDEO DURANTE SIMULAÇÃO POR DM EM SOLUÇÃO. CURVAS DE NÍVEL REPRESENTANDO VALORES DE ENERGIA ADOTADO POR CADA CONFORMÊRO NO VÁCUO EM KJ/MOL. — 10 KJ/MOL — 20 KJ/MOL — 30 KJ/MOL — 40 KJ/MOL — 50 KJ/MOL

TABELA 5: PREFERÊNCIA CONFORMACIONAL DOS DISSACARÍDEOS DE CS E OCS $\beta 1 \rightarrow 4$ LIGADOS, CONFORME OBSERVADO NAS SIMULAÇÕES POR DM.

Dissacarídeo	Abundância Relativa (%)	Ângulo (°)	
		Φ	Ψ
β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA	97	-80 \pm 30	120 \pm 33
	03	-155 \pm 15	75 \pm 20
β -D-GalpNAc4S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA	100	-80 \pm 30	120 \pm 32
β -D-GalpNAc6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA	100	-80 \pm 25	130 \pm 30
β -D-GalpNAc4S6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA	96	-75 \pm 26	125 \pm 30
	04	-150 \pm 20	80 \pm 20
β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S	100	-80 \pm 25	130 \pm 27
β -D-GalpNAc4S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S	98	-80 \pm 25	130 \pm 30
	02	-150 \pm 18	85 \pm 20
β -D-GalpNAc6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S	100	-80 \pm 25	125 \pm 30
β -D-GalpNAc4S6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S	92	-75 \pm 27	125 \pm 33
	08	-150 \pm 18	90 \pm 20
β -D-GalpNAc4S6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S3S (4C_1)	100	-160 \pm 25	90 \pm 20
β -D-GalpNAc4S6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S3S (1C_4)	39	-70 \pm 28	155 \pm 15
	32	-150 \pm 20	75 \pm 20
	27	-70 \pm 28	-165 \pm 10
	02	-70 \pm 26	75 \pm 15

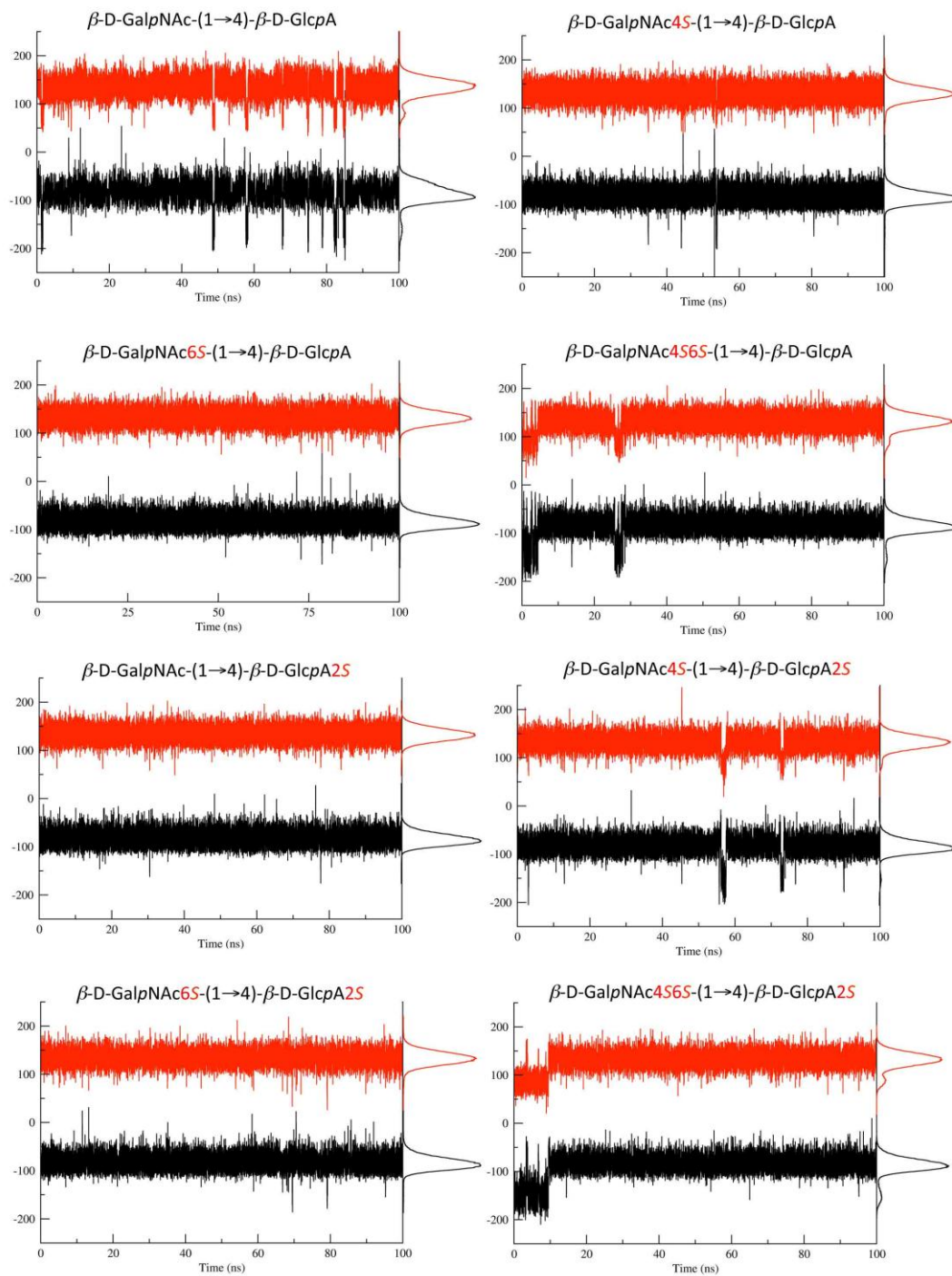


FIGURA 23: FLUTUAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS ÂNGULOS ϕ E ψ AO LONGO DAS SIMULAÇÕES DE DM PARA DISSACARÍDEOS DE CS $\beta 1 \rightarrow 4$ LIGADOS.

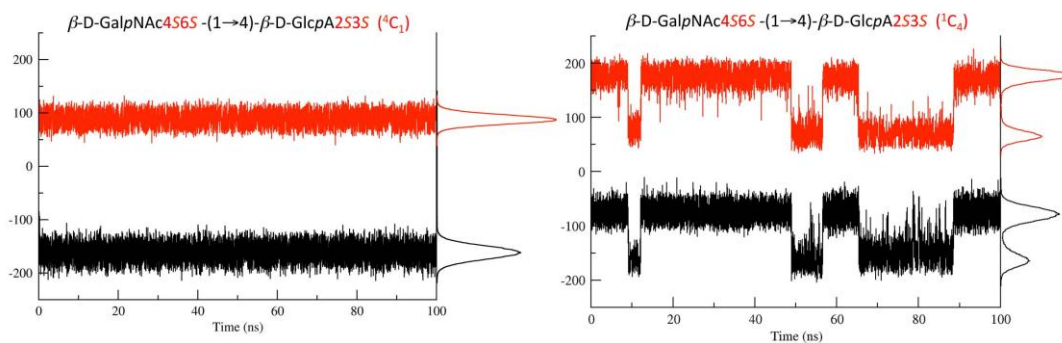


FIGURA 24: FLUTUAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS ÂNGULOS ϕ E ψ AO LONGO DAS SIMULAÇÕES DE DM PARA DISSACARÍDEOS DE OSCS $\beta 1 \rightarrow 4$ LIGADOS.

TABELA 6: LIGAÇÕES INTRAMOLECULARES DE HIDROGÊNIO INTER-RESÍDUO, DURANTE AS SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR, OBSERVADAS NOS DISSACARÍDEOS DE CS E OSCS $\beta 1 \rightarrow 4$ LIGADOS.

Dissacarídeo	Existência de ligação intramolecular de hidrogênio durante a simulação (%)	Ligação intramolecular de hidrogênio mais abundante	Média das ligações intramoleculares de hidrogênio durante a simulação
β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA	65,09	01 (41,36 %)	0,74 \pm 0,75
β -D-GalpNAc4S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA	59,99	01 (45,50 %)	0,76 \pm 0,72
β -D-GalpNAc6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA	65,10	01 (46,82 %)	0,85 \pm 0,74
β -D-GalpNAc4S6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA	62,31	01 (45,80 %)	0,80 \pm 0,74
β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S	63,78	01 (46,26 %)	0,83 \pm 0,74
β -D-GalpNAc4S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S	62,09	01 (45,30 %)	0,80 \pm 0,74
β -D-GalpNAc6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S	63,32	01 (45,82 %)	0,82 \pm 0,75
β -D-GalpNAc4S6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S	61,78	01 (45,34 %)	0,80 \pm 0,74
β -D-GalpNAc4S6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S3S (4C_1)	35,17	01 (34,85 %)	0,36 \pm 0,49
β -D-GalpNAc4S6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S3S (1C_4)	17,84	01 (17,81 %)	0,18 \pm 0,38

TABELA 7: PREFERÊNCIA CONFORMACIONAL DOS ÂNGULOS ϕ E ψ NOS DISSACARÍDEOS DE CS E OSCS $\beta 1 \rightarrow 4$ LIGADOS, CONFORME OBSERVADO NAS SIMULAÇÕES POR DM.

Dissacarídeo		Abundância Relativa (%)	Ângulo (°)
β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA		96	-80 \pm 28
	Φ	04	-175 \pm 28
	Ψ	95	140 \pm 25
β -D-GalpNAc4S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA	Φ	05	65 \pm 20
	Ψ	100	-80 \pm 25
β -D-GalpNAc6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA	Φ	100	120 \pm 30
	Ψ	100	-80 \pm 23
β -D-GalpNAc4S6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA	Φ	100	130 \pm 25
	Ψ	100	-80 \pm 25
	Φ	04	-160 \pm 25
β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S	Ψ	95	140 \pm 20
	Φ	05	55 \pm 25
	Ψ	100	-80 \pm 25
β -D-GalpNAc4S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S	Φ	100	130 \pm 25
	Ψ	100	-80 \pm 25
β -D-GalpNAc6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S	Φ	100	125 \pm 30
	Ψ	100	-80 \pm 25
β -D-GalpNAc4S6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S	Φ	100	130 \pm 27
	Ψ	100	-80 \pm 22
	Φ	91	-150 \pm 20
β -D-GalpNAc4S6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S	Ψ	09	140 \pm 20
	Φ	91	80 \pm 10
	Ψ	09	-160 \pm 25
β -D-GalpNAc4S6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S3S ($^{13}C_1$)	Φ	100	90 \pm 20
	Ψ	100	-75 \pm 24
β -D-GalpNAc4S6S-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA2S3S ($^{13}C_4$)	Φ	68	-160 \pm 25
	Ψ	32	170 \pm 20
	Φ	66	75 \pm 20
	Ψ	34	

4.3 Implicações para a toxicidade de OSCS

Como visto anteriormente, as moléculas OSCS, independente da ligação glicosídica apresentam diferenças conformacionais relevantes em comparação com as moléculas de CS. Essa diferenças conformacionais e estruturais na molécula de OSCS pode ser responsável pelos efeitos adversos, reações alérgicas e toxicidade desse contaminante de heparinas.

O grau de sulfatação nas moléculas de CS e OSCS está diretamente relacionado com o aumento da atividade anticoagulante. Contudo, ao contrário da heparina, essa atividade anticoagulante é apenas observada através da inibição do fator IIa. O fator Xa não sofre inibição considerável (Maruyama *et al.*, 1997) (Figura 25).

Assim, as moléculas de OSCS por possuírem, devido a adição do sulfato específico na posição 3 do GlcA, um grupamento sulfato a mais do que os dissacarídeos de CS tendem a ter atividade como anti-fator IIa maior. Como o fator IIa pode ser inibido tanto pela AT como pelo HCII, sabendo que o OSCS não é capaz de ativar a AT, a mediação do efeito anti-fator IIa pelo OSCS é mediada pelo HCII. Como esse HCII se liga com menos especificidade com a heparina as mudanças conformacionais referentes ao OSCS, relatadas anteriormente, podem aumentar a especificidade desse polissacarídeo pelo HCII, aumentar a inibição do fator IIa e assim causar um aumento na atividade anticoagulante, podendo em certos casos levar o paciente ao óbito.

Sabe-se que o OSCS, apesar de não possuir atividade anti-fator Xa, é capaz de se ligar também a AT. O OSCS como contaminante de heparina pode competir com a mesma pela ligação na AT, contudo ambas as moléculas se ligam em sítios diferentes na proteína, esse fato nos ajuda no entendimento do porque a heparina pode causar a mudança conformacional necessária para inibição do fXa enquanto que o OSCS, não consegue realizar essa mudança nessa proteína (Li *et al*, 2009). É importante ressaltar que além de inibir o fXa a AT, também é capaz de inibir mediadores de inflamação como a calicreína e essa inibição é aumentada quando a AT se encontra ligada a heparina (Li *et al*, 2009). Assim, com as mudanças conformacionais nas ligações glicosídicas do OSCS relatadas no presente trabalho, devido a sulfatação química, podemos inferir que essas mudanças podem ocasionar uma especificidade de ligação maior com a AT e assim quando encontrado como contaminante de heparinas pode se ligar com maior afinidade a AT. Essa ligação impede a ligação da heparina e devido a isso a mudança conformacional necessária na AT não ocorre, não inibindo fXa e principalmente outros mediadores da inflamação, podendo gerar reações alérgicas, e em casos mais graves, reações anafiláticas.

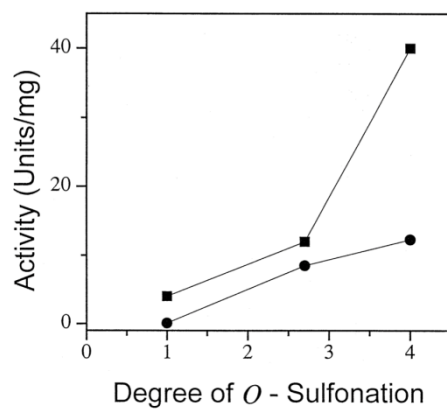


FIGURA 25: EFEITO DO GRAU DE SULFATAÇÃO NA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE. ATIVIDADE COMO ANTI-FATOR IIa (■) E ATIVIDADE COMO ANTI-FATOR Xa (●). É POSSÍVEL PERCEBER QUE A MOLÉCULA DE OSCS, COM 4 GRUPAMENTOS SULFATOS, POSSUI MAIOR ATIVIDADE (Maruyama *et al.*, 1997).

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos, da caracterização conformacional e estrutural do CS e do OSCS possibilitaram-nos inferir respostas para busca da influência do sulfato na conformação dessas moléculas e a relação destas com a atividade biológica ou tóxica.

Através dos resultados obtidos para os dissacarídeos de CS e OSCS com ligação $\beta 1 \rightarrow 3$ ligados, concluímos:

- A ligação glicosídica de todos as moléculas de CS $\beta 1 \rightarrow 3$ ligados, apresenta uma flexibilidade variando entre quatro possíveis estados conformacionais, a baixa predominância de ligações de hidrogênio intramoleculares durante a simulação nos sugere uma explicação para essa flexibilidade;
- A adição de grupamentos sulfatos na posição 2 do GlcA e 4 da GalNAc, gera a prevalência de um único estado conformacional, antes presente em todas os outros CS com menor abundância. A explicação para este fenômeno, é possivelmente o aumento das ligações de hidrogênios intramoleculares nas moléculas sulfatadas nessas posições específicas;
- No OSCS, a molécula com o GlcA na forma 1C_4 apresentou um aumento das ligações de hidrogênio durante a simulação e assim um estado conformacional rígido de sua ligação glicosídica.

Por outro lado nos dissacarídeos de CS e OSCS $\beta 1 \rightarrow 4$ ligados concluímos:

- A ligação glicosídica de todos as moléculas de CS $\beta 1 \rightarrow 4$ ligados, apresenta uma rigidez conformacional, possuindo apenas um estado conformacional com maior abundância relativa. Os diferentes padrões de sulfatação não influenciam nos estados conformacionais, já que a torção dos ângulos ϕ e ψ não sofre variação;
- A predominância de ligações de hidrogênio intramoleculares, nessas moléculas de CS nos sugere uma explicação para a rigidez dos estados conformacionais da ligação glicosídica;
- No OSCS, com o GlcA na forma 4C_1 , foi possível perceber que a rigidez dos estados conformacionais se manteve, contudo o estado conformacional mais abundante apresentou valores de ϕ e ψ diferentes. A ligação de hidrogênio intramolecular desapareceu, sugerindo que a rigidez dessa ligação glicosídica ocorre por outros fatores;
- No OSCS, com resíduo glicurônico na forma 1C_4 , as ligações de hidrogênio intramoleculares desapareceram, e assim a molécula apresentou uma flexibilidade nos dissacarídeos $\beta 1 \rightarrow 4$ ligados.

Por último concluímos que as mudanças conformacionais no contaminante OSCS podem ser responsáveis pelo aumento da atividade anticoagulante, reações adversas e óbito de pacientes que utilizaram heparinas contaminadas. As mudanças conformacionais no OSCS podem aumentar a especificidade desse pelo HCII e AT, aumentando respectivamente a atividade anticoagulante e as reações alérgicas.

6 COLABORADORES

Esta pesquisa recebeu auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, MCT) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), MEC, Brasília, DF, Brasil.

7 BIBLIOGRAFIA

- ALTMAN R. B.; DUGAN J. M. : Defining Bioinformatics and Structural Bioinformatics. In: BOURNE, P. E.; WEISSIG, H.: *Structural Bioinformatics*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, **2003**, 3-11.
- ANGULO, J.; NIETO, P. M.; MARTÍN-LOMAS, M.: A molecular dynamics description of the conformational flexibility of the L-iduronate ring in glycosaminoglycans. *Chem. Commun.*, **2003**, 13, 1512-1513.
- BANNER, D. W.; D'ARCY, A.; CHÈNE, C.; WINKLER, F. K.; GUHA, A.; KONIGSBERG, W. H.; NEMERSON, Y.; KIRCHHOFER, D.: The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature*, **1996**, 380, 41-46.
- BECKER, C. F.; GUIMARÃES, J. A.; VERLI, H.: Molecular dynamics and atomic charge calculations in the study of heparin conformation in aqueous solution. *Carbohydr. Res.*, **2005**, 340, 1499-1507.
- BECKER, C. F.; GUIMARÃES, J. A.; MOURÃO, P. A. S.; VERLI, H.: Conformation of sulfated galactan and sulfated fucan in aqueous solutions: Implications to their anticoagulant activities. *J. Mol. Graph. Model.*, **2007**, 26, 391-399.
- BECKER, C. F.: Caracterização do reconhecimento molecular de polissacarídeos de ouriço-do-mar pela antitrombina utilizando técnicas de modelagem molecular. *Dissertação de mestrado*, **2007**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.
- BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; DINOLA, A.; HAAK, J. R.: Molecular-dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.*, **1984**, 81, 3684-3690.
- BERENDSEN, H. J. C.; GRIGERA, J. R.; STRAATSMA, T. P.: The missing term in effective pair potentials. *J. Phys. Chem.*, **1987**, 91, 6269-6271.
- BLANCHARD, V.; CHEVALIER F.; IMBERTY, A.; LEEFLANG, B. R.; BASAPPA; SUGAHARA, K.; KAMERLING, J. P.: Conformational Studies on Five Octasaccharides Isolated from Chondroitin Sulfate Using NMR Spectroscopy and Molecular Modeling. *Biochemistry*, **2007**, 46, 1167-11175.
- CASTRO, M. O.; POMIN, V. H.; SANTOS, L. L.; VILELA-SILVA, A.-C. E. S.; HIROHASHI, N.; POL-FACHIN, L.; VERLI, H.; MOURÃO, P. A. S.: A Unique 2-Sulfated α -Galactan from the Egg Jelly of the Sea Urchin *Glyptocidaris crenularis*: CONFORMATION FLEXIBILITY VERSUS INDUCTION OF THE SPERM ACROSOME REACTION. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 18790-18800.
- CREMER, D.; SZABO, K. J.: Ab Initio Studies of Six-Membered Rings: Present Status and Future Developments. In *Conformational Behavior of Six-Membered Rings: Analysis, Dynamics, and Stereoelectronic Effects*, Juaristi, E., Ed.; VCH Publishers Inc., New York, **1995**, 71-77.
- DE SANT'ANNA, C. M. R.: Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações IUPAC 1997). *Quim. Nova*, **2002**, 25, 505-512.
- DELANO, W. L.: The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific, Sao Carlos, CA, USA, 2002. <http://www.pymol.org>

- FERNANDES, C. L. *ET AL.*: GROMOS96 43a1 performance in predicting oligosaccharide conformational ensembles within glycoproteins. *Carbohydr. Res.* **2010**, *345*, 663–671.
- GUERRINI, M.; BECCATI, D.; SHRIVER, Z.; NAGGI, A.; VISWANATHAN, K.; BISIO, A.; CAPILA, I.; LANSING, J. C.; GUGLIERI, S.; FRASER, B.; AL-HAKIM, A.; GUNAY, N. S.; ZHANG, Z.; ROBINSON, L.; BUHSE, L.; NASR, M.; WOODCOCK, J.; LANGER, R.; VENKATARAMAN, G.; LINHARDT, R. J.; CASU, B.; TORRI, G.; SASISEKHARAN, R.: Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events. *Nature Biotechnology.*, **2008**, *26*, 669-675.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E.: Hemostasia e Coagulação Sanguínea. Em *Tratado de Fisiologia Médica*, 11ª Ed.; Elsevier, Rio de Janeiro, **2006**, 459-464.
- HESS, B.; BEKKER, H.; BERENDSEN, H. J. C.; FRAAIJE, J. G. E. M.: LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.*, **1997**, *18*, 1463-1472.
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K.: VMD – Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.*,
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature: Nomenclature for carbohydrates. *Pure Appl. Chem.*, **1996**, *68*, 1919-2008.
- JENNY, N. S.; MANN, K. G.: Coagulation Cascade: An Overview. Em *Thrombosis and Hemorrhage*, 2ª Ed., Loscalzo, J.; Schafer, A. I. Eds.; Williams & Wilkins, Baltimore, **1998**, pp 3-8.
- LEACH, A. R.: Molecular Modelling Principles and Applications, 2nd Ed., **2001**, Longman, Cingapura.
- LI, B.; SUWAN, J.; SHARON, N.; MARTIN J. G.; ZHANG, F.; ZHANG, Z.; HOPPENSTEADT, D.; CLARK, M.; FAREED, J.; LINHARDT, R. J.: Oversulfated chondroitin sulfate interaction with heparin-binding protein: New insights into adverse reaction from contaminated heparins. *Biochemical Pharmacology.*, **2009**, *78*, 292-300.
- LÜTTEKE, T.: Analysis and validation of carbohydrate three-dimensional structures. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **2009**, *65*, 156-168.
- MARUYAMA, T.; TOIDA, T.; IMANARI, T.; YU, G.; LINHARDT R. J.: Conformational changes and anticoagulant activity of chondroitin sulfate following its O-sulfonation. *Carbohydr. Res.*, **1998**, *306*, 35–43
- MISENHEIMER, T. M.; SHEEHAN, J. P.: The Regulation of Factor IXa by Supersulfated Low Molecular Weight Heparin. *Biochemistry*, **2010**, *49*, Nº 46, 9997-10005.
- MULLOY, B.; FORSTER, M. J.; JONES, C.; DAVIES, D. B.: N.m.r. and molecular-modelling studies of the solution conformation of heparin. *Biochem. J.*, **1993**, *293*, 849-858.
- NADER, H. B.: Characterization of a Heparan Sulfate and a Peculiar Chondroitin 4-Sulfate Proteoglycan from Platelets. *J. Biol. Chem.*, **1991**, *16*, 10518-10523.
- NADER, H. B.; PINHAL, M. A. S.; BAÚ, E. C.; CASTRO, R. A. B.; MEDEIROS, G. F.; CHAVANTE, S. F.; LEITE, E. L.; TRINDADE, E. S.; SHINJO, S. K.; ROCHA, H. A. O.; TERSARIOL, I. L. S.; MENDES, A.; DIETRICH, C. P.: Development of new

- heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vacular endothelial cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **2001**, *34*, 699-709.
- NELSON, D. L.; COX, M. M.: Lehninger Principles of Biochemistry, 4ed., Nova Iorque, Freeman, W. H., **2004**, 251-254.
- POL-FACHIN, L.; VERLI, H.: Depiction of the forces participating in the 2-O-sulfo- α -L-iduronic acid conformational preference in heparin sequences in aqueous solutions. *Carbohydr. Res.*, **2008**, *343*, 1435-1445.
- POL-FACHIN, L.; FERNANDES, C. L.; VERLI, H.: GROMOS96 43a1 performance on the characterization of glycoproteins conformational ensemble through molecular dynamics simulations. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 491-500.
- POL-FACHIN, L.; VERLI, H.: Assessment of Glycoproteins Dynamics from Computer Simulations. *Mini-Reviews in Organic Chemistry.* **2011**, *8*, 00-00.
- SATELLE, B. M.; SHAKERI, J.; ROBERTS, I. S.; ALMOND, A.: A 3D-structural model of unsulfated chondroitin from high-field NMR: 4-sulfation has little effect on backbone conformation. *Carbohydr. Res.*, **2010**, *345*, 291-302.
- SCOTT, W. R. P.; HÜNENBERGUER, P. H.; TIRONI, I.G.; MARK, A. E.; BILLETER, S. R.; FENNENN, J.; TORDA, A. E.; HUBER, T.; KRÜGUER, P.; VAN GUNSTEREN, W.F.: The GROMOS biomolecular simulation program package. *J. Phys. Chem. A*, **1999**, *103*, 3596-3607.
- SCHAFTENAAR, G.: MOLDEN. CAOS/CAMM Center, University of Nijmegen, Toernooiveld 1, 6525 ED NIJMEGEN, The Netherlands, 1997.
- SCHUETTELKOPF, A. W.; VAN AALTEN, D. M. F.: PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Cryst.*, **2004**, *D60*, 1355-1363 (b) <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg/prodrg.html>.
- VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; GROENHOF, G.; MARK, A. E.; BERENDSEN, H. J. C.: GROMACS: fast, flexible and free. *J. Comput. Chem.*, **2005**, *26*, 1701-1718.
- VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; VAN BUUREN, A. R.; APOL, E.; MEULENHOF, P. J.; TIELEMAN, D. P.; SIJBERS, A. L. T. M.; FEENSTRA, K. A.; VAN DRUNEN, R.; BERENDSEN, H. J. C.: Gromacs User Manual version 4.5.4, www.gromacs.org (2010)
- VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C.: Computer simulations of molecular dynamics: methodology, applications, and perspectives in chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1990**, *29*, 992-1023.
- VAN GUNSTEREN, W. F.; BILLETER, S. R.; EISING, A. A.; HUENENBERGER, P. H.; KRUEGER, P.; MARK, A. E.; SCOTT, W. R. P.; TIRONI, I. G.: Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide. Vdf Hochschulverlag AG, Zuriq, Suiça, 1996.
- VAN GUNSTEREN, W. F.; MARK, A. E.: Validation of molecular dynamics simulation. *J. Chem. Phys.*, **1998**, *108*, 6109-6116.

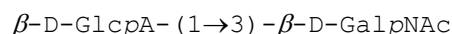
- VERLI, H.; GUIMARÃES, J. A.: Molecular dynamics simulation of a decasaccharide fragment of heparin in aqueous solution. *Carbohydr. Res.*, **2004**, 339, 281-290.
- VERLI, H.; GUIMARÃES, J. A.: Insights into the induced fit mechanism in antithrombin–heparin interaction using molecular dynamics simulations. *J. Mol. Graph. Model.*, **2005**, 24, 203-212.
- VERLI, H.; CALAZANS, A.; BRINDEIRO, R.; TANURI, A.; GUIMARAES, J. A.: Molecular dynamics analysis of HIV-1 matrix protein: clarifying differences between crystallographic and solution structures. *J. Mol. Graph. Mod.*, **2007**, 26, 62-68.
- VERLI, H.: *Tese de Doutorado*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, **2005**.
- VOLPI, N.: Chondroitin sulfate: structure, role and pharmacological activity. London. Elsevier. **2006**.
- ZHANG, Z.; WEIWER, M.; LI, B.; KEMP, M. M.; DAMAN, T. H.; LINHARDT R. J.: Oversulfated Chondroitin Sulfate: Impact of a Heparin Impurity, Associated with Adverse Clinical Events, on Low-Molecular-Weight Heparin Preparation. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 5498–5501

8 APÊNDICE

8.1 Topologias

Abaixo segue algumas topologias para representar os dissacarídeos de CS e OSCS $\beta 1 \rightarrow 3$ ligado, assim como para os dissacarídeos de CS e OSCS $\beta 1 \rightarrow 4$ ligados. Esses arquivos, gerados através do servidor PRODRG (Schuettelkopf e van Aalten, 2004), contêm os parâmetros de ligação, ângulo de ligação e diedros para as moléculas em estudo.

8.1.1 CS $\beta 1 \rightarrow 3$ ligado



```
[ moleculetype ]
; Name nrexcl
DRG      3

[ atoms ]
;  nr      type  resnr  resid  atom  cgnr  charge  mass
   1      CH3    1     DRG    CBA    1     0.070  15.0350
   2       C     1     DRG    CAX    1     0.271  12.0110
   3       O     1     DRG    OAY    1    -0.405  15.9994
   4      NL     1     DRG    N2     1    -0.231  14.0067
   5       H     1     DRG    H22    1     0.201   1.0080
   6      CH1    1     DRG    C2     1     0.094  13.0190
   7      CH1    1     DRG    C1     2     0.160  13.0190
   8       OA    1     DRG    O1     2    -0.400  15.9994
   9       H     1     DRG    H12    2     0.240   1.0080
  10      OA    1     DRG    O5     3    -0.242  15.9994
  11      CH1    1     DRG    C5     3     0.242  13.0190
  12      CH2    1     DRG    C6     4     0.160  14.0270
  13      OA    1     DRG    O6     4    -0.400  15.9994
  14       H     1     DRG    H65    4     0.240   1.0080
  15      CH1    1     DRG    C4     5     0.160  13.0190
  16      OA    1     DRG    O4     5    -0.400  15.9994
  17       H     1     DRG    H42    5     0.240   1.0080
  18      CH1    1     DRG    C3     6     0.142  13.0190
  19      OA    1     DRG    O3     6    -0.396  15.9994
  20      CH1    1     DRG    CAH    6     0.254  13.0190
  21      OA    1     DRG    OAM    7    -0.242  15.9994
  22      CH1    1     DRG    CAL    7     0.242  13.0190
  23       C     1     DRG    CAO    8     0.172  12.0110
  24      OM     1     DRG    OAZ    8    -0.586  15.9994
  25      OM     1     DRG    OAP    8    -0.586  15.9994
  26      CH1    1     DRG    CAK    9     0.160  13.0190
  27      OA    1     DRG    OAQ    9    -0.400  15.9994
  28       H     1     DRG    HAQ    9     0.240   1.0080
  29      CH1    1     DRG    CAJ    10    0.160  13.0190
  30      OA    1     DRG    OAR    10   -0.400  15.9994
  31       H     1     DRG    HAR    10    0.240   1.0080
  32      CH1    1     DRG    CAI    11    0.160  13.0190
  33      OA    1     DRG    OAN    11   -0.400  15.9994
  34       H     1     DRG    HAN    11    0.240   1.0080

[ bonds ]
; ai  aj  fu  c0, c1, ...
   2  1  2  0.153  7150000.0  0.153  7150000.0 ; CAX  CBA
   2  3  2  0.123  16600000.0  0.123  16600000.0 ; CAX  OAY
   2  4  2  0.133  10600000.0  0.133  10600000.0 ; CAX  N2
   4  5  2  0.100  18700000.0  0.100  18700000.0 ; N2  H22
   6  4  2  0.147  8710000.0  0.147  8710000.0 ; C2  N2
   6  7  2  0.152  5430000.0  0.152  5430000.0 ; C2  C1
   6  18  2  0.152  5430000.0  0.152  5430000.0 ; C2  C3
   7  8  2  0.144  6100000.0  0.144  6100000.0 ; C1  O1
   7  10  2  0.144  6100000.0  0.144  6100000.0 ; C1  O5
   8  9  2  0.100  15700000.0  0.100  15700000.0 ; O1  H12
  11  10  2  0.144  6100000.0  0.144  6100000.0 ; C5  O5
```

11	12	2	0.153	7150000.0	0.153	7150000.0	;	C5	C6
11	15	2	0.152	5430000.0	0.152	5430000.0	;	C5	C4
12	13	2	0.143	8180000.0	0.143	8180000.0	;	C6	O6
13	14	2	0.100	15700000.0	0.100	15700000.0	;	O6	H65
15	16	2	0.144	6100000.0	0.144	6100000.0	;	C4	O4
15	18	2	0.152	5430000.0	0.152	5430000.0	;	C4	C3
16	17	2	0.100	15700000.0	0.100	15700000.0	;	O4	H42
18	19	2	0.144	6100000.0	0.144	6100000.0	;	C3	O3
20	19	2	0.144	6100000.0	0.144	6100000.0	;	CAH	O3
20	21	2	0.144	6100000.0	0.144	6100000.0	;	CAH	OAM
20	32	2	0.152	5430000.0	0.152	5430000.0	;	CAH	CAI
22	21	2	0.144	6100000.0	0.144	6100000.0	;	CAL	OAM
22	23	2	0.153	7150000.0	0.153	7150000.0	;	CAL	CAO
22	26	2	0.152	5430000.0	0.152	5430000.0	;	CAL	CAK
23	24	2	0.125	13400000.0	0.125	13400000.0	;	CAO	OAZ
23	25	2	0.125	13400000.0	0.125	13400000.0	;	CAO	OAP
26	27	2	0.144	6100000.0	0.144	6100000.0	;	CAK	OAQ
26	29	2	0.152	5430000.0	0.152	5430000.0	;	CAK	CAJ
27	28	2	0.100	15700000.0	0.100	15700000.0	;	OAQ	HAQ
29	30	2	0.144	6100000.0	0.144	6100000.0	;	CAJ	OAR
29	32	2	0.152	5430000.0	0.152	5430000.0	;	CAJ	CAI
30	31	2	0.100	15700000.0	0.100	15700000.0	;	OAR	HAR
32	33	2	0.144	6100000.0	0.144	6100000.0	;	CAI	OAN
33	34	2	0.100	15700000.0	0.100	15700000.0	;	OAN	HAN

[pairs]

;	ai	aj	fu	c0, c1, ...					
	1	5	1				;	CBA	H22
	1	6	1				;	CBA	C2
	2	7	1				;	CAX	C1
	2	18	1				;	CAX	C3
	3	5	1				;	OAY	H22
	3	6	1				;	OAY	C2
	4	8	1				;	N2	O1
	4	10	1				;	N2	O5
	4	15	1				;	N2	C4
	4	19	1				;	N2	O3
	5	7	1				;	H22	C1
	5	18	1				;	H22	C3
	6	9	1				;	C2	H12
	6	11	1				;	C2	C5
	6	16	1				;	C2	O4
	6	20	1				;	C2	CAH
	7	12	1				;	C1	C6
	7	15	1				;	C1	C4
	7	19	1				;	C1	O3
	8	11	1				;	O1	C5
	8	18	1				;	O1	C3
	9	10	1				;	H12	O5
	10	13	1				;	O5	O6
	10	16	1				;	O5	O4
	10	18	1				;	O5	C3
	11	14	1				;	C5	H65
	11	17	1				;	C5	H42
	11	19	1				;	C5	O3
	12	16	1				;	C6	O4
	12	18	1				;	C6	C3
	13	15	1				;	O6	C4
	15	20	1				;	C4	CAH
	16	19	1				;	O4	O3
	17	18	1				;	H42	C3
	18	21	1				;	C3	OAM
	18	32	1				;	C3	CAI
	19	22	1				;	O3	CAL
	19	29	1				;	O3	CAJ
	19	33	1				;	O3	OAN
	20	23	1				;	CAH	CAO
	20	26	1				;	CAH	CAK
	20	30	1				;	CAH	OAR
	20	34	1				;	CAH	HAN
	21	24	1				;	OAM	OAZ
	21	25	1				;	OAM	OAP
	21	27	1				;	OAM	OAQ
	21	29	1				;	OAM	CAJ
	21	33	1				;	OAM	OAN
	22	28	1				;	CAL	HAQ
	22	30	1				;	CAL	OAR

```

22 32 1 ; CAL CAI
23 27 1 ; CAO OAQ
23 29 1 ; CAO CAJ
24 26 1 ; OAZ CAK
25 26 1 ; OAP CAK
26 31 1 ; CAK HAR
26 33 1 ; CAK OAN
27 30 1 ; OAQ OAR
27 32 1 ; OAQ CAI
28 29 1 ; HAQ CAJ
29 34 1 ; CAJ HAN
30 33 1 ; OAR OAN
31 32 1 ; HAR CAI

```

[angles]

```

; ai aj ak fu c0, c1, ...
  1  2  3  2 121.0 685.0 121.0 685.0 ; CBA CAX OAY
  1  2  4  2 115.0 610.0 115.0 610.0 ; CBA CAX N2
  3  2  4  2 124.0 730.0 124.0 730.0 ; OAY CAX N2
  2  4  5  2 109.5 425.0 109.5 425.0 ; CAX N2 H22
  2  4  6  2 109.5 425.0 109.5 425.0 ; CAX N2 C2
  5  4  6  2 109.5 425.0 109.5 425.0 ; H22 N2 C2
  4  6  7  2 111.0 530.0 111.0 530.0 ; N2 C2 C1
  4  6 18  2 111.0 530.0 111.0 530.0 ; N2 C2 C3
  7  6 18  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; C1 C2 C3
  6  7  8  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; C2 C1 O1
  6  7 10  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; C2 C1 O5
  8  7 10  2 109.5 320.0 109.5 320.0 ; O1 C1 O5
  7  8  9  2 109.5 450.0 109.5 450.0 ; C1 O1 H12
  7 10 11  2 109.5 380.0 109.5 380.0 ; C1 O5 C5
 10 11 12  2 109.5 320.0 109.5 320.0 ; O5 C5 C6
 10 11 15  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; O5 C5 C4
 12 11 15  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; C6 C5 C4
 11 12 13  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; C5 C6 O6
 12 13 14  2 109.5 450.0 109.5 450.0 ; C6 O6 H65
 11 15 16  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; C5 C4 O4
 11 15 18  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; C5 C4 C3
 16 15 18  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; O4 C4 C3
 15 16 17  2 109.5 450.0 109.5 450.0 ; C4 O4 H42
   6 18 15  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; C2 C3 C4
   6 18 19  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; C2 C3 O3
 15 18 19  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; C4 C3 O3
 18 19 20  2 109.5 380.0 109.5 380.0 ; C3 O3 CAH
 19 20 21  2 109.5 320.0 109.5 320.0 ; O3 CAH OAM
 19 20 32  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; O3 CAH CAI
 21 20 32  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; OAM CAH CAI
 20 21 22  2 109.5 380.0 109.5 380.0 ; CAH OAM CAL
 21 22 23  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; OAM CAL CAO
 21 22 26  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; OAM CAL CAK
 23 22 26  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAO CAL CAK
 22 23 24  2 117.0 635.0 117.0 635.0 ; CAL CAO OAZ
 22 23 25  2 117.0 635.0 117.0 635.0 ; CAL CAO OAP
 24 23 25  2 126.0 770.0 126.0 770.0 ; OAZ CAO OAP
 22 26 27  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAL CAK OAQ
 22 26 29  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAL CAK CAJ
 27 26 29  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; OAQ CAK CAJ
 26 27 28  2 109.5 450.0 109.5 450.0 ; CAK OAQ HAQ
 26 29 30  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAK CAJ OAR
 26 29 32  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAK CAJ CAI
 30 29 32  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; OAR CAJ CAI
 29 30 31  2 109.5 450.0 109.5 450.0 ; CAJ OAR HAR
 20 32 29  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAH CAI CAJ
 20 32 33  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAH CAI OAN
 29 32 33  2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAJ CAI OAN
 32 33 34  2 109.5 450.0 109.5 450.0 ; CAI OAN HAN

```

[dihedrals]

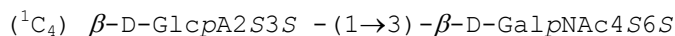
```

; ai aj ak al fu c0, c1, m, ...
  2  1  3  4  2  0.0 167.4 0.0 167.4 ; imp CAX CBA OAY N2
  4  2  5  6  2 35.3 334.8 35.3 334.8 ; imp N2 CAX H22 C2
   6  4 18  7  2 35.3 334.8 35.3 334.8 ; imp C2 N2 C3 C1
   7  6  8 10  2 35.3 334.8 35.3 334.8 ; imp C1 C2 O1 O5
 11 10 12 15  2 35.3 334.8 35.3 334.8 ; imp C5 O5 C6 C4
 15 11 16 18  2 35.3 334.8 35.3 334.8 ; imp C4 C5 O4 C3
 18 19  6 15  2 35.3 334.8 35.3 334.8 ; imp C3 O3 C2 C4
 20 19 21 32  2 35.3 334.8 35.3 334.8 ; imp CAH O3 OAM CAI
 22 21 23 26  2 35.3 334.8 35.3 334.8 ; imp CAL OAM CAO CAK

```

23	22	24	25	2	0.0	167.4	0.0	167.4	; imp	CAO	CAL	OAZ	OAP
26	22	29	27	2	35.3	334.8	35.3	334.8	; imp	CAK	CAL	CAJ	OAQ
29	26	30	32	2	35.3	334.8	35.3	334.8	; imp	CAJ	CAK	OAR	CAI
32	33	29	20	2	35.3	334.8	35.3	334.8	; imp	CAI	OAN	CAJ	CAH
11	6	15	7	2	2.2	334.8	2.2	334.8	; imp	C5	C2	C4	C1
11	6	18	7	2	27.0	334.8	27.0	334.8	; imp	C5	C2	C3	C1
11	6	18	10	2	-1.4	334.8	-1.4	334.8	; imp	C5	C2	C3	O5
22	32	26	20	2	2.2	334.8	2.2	334.8	; imp	CAL	CAI	CAK	CAH
22	32	29	20	2	27.0	334.8	27.0	334.8	; imp	CAL	CAI	CAJ	CAH
22	32	29	21	2	-1.4	334.8	-1.4	334.8	; imp	CAL	CAI	CAJ	OAM
1	2	4	6	1	0.0	3.8 3	0.0	3.8 3	; dih	CBA	CAX	N2	C2
18	6	4	2	1	0.0	3.8 3	0.0	3.8 3	; dih	C3	C2	N2	CAX
10	7	6	4	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3	; dih	O5	C1	C2	N2
19	18	6	4	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3	; dih	O3	C3	C2	N2
6	7	8	9	1	0.0	1.3 3	0.0	1.3 3	; dih	C2	C1	O1	H12
6	7	10	11	1	0.0	3.8 3	0.0	3.8 3	; dih	C2	C1	O5	C5
15	11	10	7	1	0.0	3.8 3	0.0	3.8 3	; dih	C4	C5	O5	C1
13	12	11	10	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3	; dih	O6	C6	C5	O5
18	15	11	10	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3	; dih	C3	C4	C5	O5
11	12	13	14	1	0.0	1.3 3	0.0	1.3 3	; dih	C5	C6	O6	H65
11	15	16	17	1	0.0	1.3 3	0.0	1.3 3	; dih	C5	C4	O4	H42
19	18	15	11	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3	; dih	O3	C3	C4	C5
6	18	19	20	1	0.0	3.8 3	0.0	3.8 3	; dih	C2	C3	O3	CAH
32	20	19	18	1	0.0	3.8 3	0.0	3.8 3	; dih	CAI	CAH	O3	C3
19	20	21	22	1	0.0	3.8 3	0.0	3.8 3	; dih	O3	CAH	OAM	CAL
33	32	20	19	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3	; dih	OAN	CAI	CAH	O3
26	22	21	20	1	0.0	3.8 3	0.0	3.8 3	; dih	CAK	CAL	OAM	CAH
21	22	23	25	1	0.0	2.1 3	0.0	2.1 3	; dih	OAM	CAL	CAO	OAP
29	26	22	21	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3	; dih	CAJ	CAK	CAL	OAM
22	26	27	28	1	0.0	1.3 3	0.0	1.3 3	; dih	CAL	CAK	OAQ	HAQ
32	29	26	22	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3	; dih	CAI	CAJ	CAK	CAL
26	29	30	31	1	0.0	1.3 3	0.0	1.3 3	; dih	CAK	CAJ	OAR	HAR
33	32	29	26	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3	; dih	OAN	CAI	CAJ	CAK
20	32	33	34	1	0.0	1.3 3	0.0	1.3 3	; dih	CAH	CAI	OAN	HAN
21	20	32	29	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3	; dih	OAM	CAH	CAI	CAJ
20	32	29	26	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3	; dih	CAH	CAI	CAJ	CAK
32	20	21	22	1	0.0	3.8 3	0.0	3.8 3	; dih	CAI	CAH	OAM	CAL
23	22	26	29	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3	; dih	CAO	CAL	CAK	CAJ
23	22	26	27	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3	; dih	CAO	CAL	CAK	OAQ
21	20	32	33	1	0.0	2.1 3	0.0	2.1 3	; dih	OAM	CAH	CAI	OAN
33	32	29	30	1	0.0	2.1 3	0.0	2.1 3	; dih	OAN	CAI	CAJ	OAR
20	32	29	30	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3	; dih	CAH	CAI	CAJ	OAR
30	29	26	22	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3	; dih	OAR	CAJ	CAK	CAL
30	29	26	27	1	0.0	2.1 3	0.0	2.1 3	; dih	OAR	CAJ	CAK	OAQ
32	29	26	27	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3	; dih	CAI	CAJ	CAK	OAQ
21	22	26	27	1	0.0	2.1 3	0.0	2.1 3	; dih	OAM	CAL	CAK	OAQ
29	32	20	19	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3	; dih	CAJ	CAI	CAH	O3
33	32	20	19	1	0.0	2.1 3	0.0	2.1 3	; dih	OAN	CAI	CAH	O3
19	20	21	22	1	0.0	2.1 3	0.0	2.1 3	; dih	O3	CAH	OAM	CAL
26	22	23	25	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3	; dih	CAK	CAL	CAO	OAP
26	22	23	25	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3	; dih	CAK	CAL	CAO	OAP
32	29	30	31	1	0.0	1.3 3	0.0	1.3 3	; dih	CAI	CAJ	OAR	HAR
29	26	27	28	1	0.0	1.3 3	0.0	1.3 3	; dih	CAJ	CAK	OAQ	HAQ

8.1.2 OSCS β 1 \rightarrow 3 ligado



```
[ moleculetype ]
; Name nrexcl
DRG      3

[ atoms ]
;  nr      type  resnr  resid  atom  cgnr  charge  mass
   1         OM    1     DRG    OAP    1    -0.774  15.9994
   2        SDMSO  1     DRG    SAO    1     1.612  32.0600
   3         OM    1     DRG    OBH    1    -0.774  15.9994
   4         OM    1     DRG    OBI    1    -0.774  15.9994
   5         OA    1     DRG    OAN    1    -0.515  15.9994
   6         CH1   1     DRG    CAI    1     0.225  13.0190
   7         CH1   1     DRG    CAJ    2     0.225  13.0190
   8         OA    1     DRG    OAQ    2    -0.515  15.9994
   9        SDMSO  1     DRG    SAR    2     1.612  32.0600
  10         OM    1     DRG    OBJ    2    -0.774  15.9994
  11         OM    1     DRG    OBK    2    -0.774  15.9994
  12         OM    1     DRG    OAS    2    -0.774  15.9994
  13         CH1   1     DRG    CAK    3     0.160  13.0190
  14         OA    1     DRG    OAT    3    -0.400  15.9994
  15         H     1     DRG    HAT    3     0.240   1.0080
  16         CH1   1     DRG    CAL    4     0.242  13.0190
  17         C     1     DRG    CAU    5     0.172  12.0110
  18         OM    1     DRG    OBL    5    -0.586  15.9994
  19         OM    1     DRG    OAV    5    -0.586  15.9994
  20         OA    1     DRG    OAM    4    -0.242  15.9994
  21         CH1   1     DRG    CAH    6     0.254  13.0190
  22         OA    1     DRG    O3     6    -0.396  15.9994
  23         CH1   1     DRG    C3     6     0.142  13.0190
  24         CH1   1     DRG    C4     7     0.225  13.0190
  25         OA    1     DRG    O4     7    -0.515  15.9994
  26        SDMSO  1     DRG    SAX    7     1.612  32.0600
  27         OM    1     DRG    OBM    7    -0.774  15.9994
  28         OM    1     DRG    OBN    7    -0.774  15.9994
  29         OM    1     DRG    OAY    7    -0.774  15.9994
  30         CH1   1     DRG    C5     8     0.242  13.0190
  31         CH2   1     DRG    C6     9     0.225  14.0270
  32         OA    1     DRG    O6     9    -0.515  15.9994
  33        SDMSO  1     DRG    SBB    9     1.612  32.0600
  34         OM    1     DRG    OBO    9    -0.774  15.9994
  35         OM    1     DRG    OBP    9    -0.774  15.9994
  36         OM    1     DRG    OBC    9    -0.774  15.9994
  37         OA    1     DRG    O5     8    -0.242  15.9994
  38         CH1   1     DRG    C1    10     0.160  13.0190
  39         OA    1     DRG    O1    10    -0.400  15.9994
  40         H     1     DRG    H12   10     0.240   1.0080
  41         CH1   1     DRG    C2    11     0.094  13.0190
  42         N     1     DRG    N2    11    -0.231  14.0067
  43         H     1     DRG    H22   11     0.201   1.0080
  44         C     1     DRG    C7    11     0.271  12.0110
  45         O     1     DRG    O7    11    -0.405  15.9994
  46         CH3   1     DRG    C8    11     0.070  15.0350

[ bonds ]
; ai  aj  fu  c0, c1, ...
   2   1   2   0.153  8040000.0  0.153  8040000.0 ; SAO  OAP
   2   3   2   0.153  8040000.0  0.153  8040000.0 ; SAO  OBH
   2   4   2   0.153  8040000.0  0.153  8040000.0 ; SAO  OBI
   2   5   2   0.153  8040000.0  0.153  8040000.0 ; SAO  OAN
   6   5   2   0.144  6100000.0  0.144  6100000.0 ; CAI  OAN
   6   7   2   0.152  5430000.0  0.152  5430000.0 ; CAI  CAJ
   6  21   2   0.152  5430000.0  0.152  5430000.0 ; CAI  CAH
   7   8   2   0.144  6100000.0  0.144  6100000.0 ; CAJ  OAQ
   7  13   2   0.152  5430000.0  0.152  5430000.0 ; CAJ  CAK
   9   8   2   0.153  8040000.0  0.153  8040000.0 ; SAR  OAQ
   9  10   2   0.153  8040000.0  0.153  8040000.0 ; SAR  OBJ
   9  11   2   0.153  8040000.0  0.153  8040000.0 ; SAR  OBK
   9  12   2   0.153  8040000.0  0.153  8040000.0 ; SAR  OAS
  13  14   2   0.144  6100000.0  0.144  6100000.0 ; CAK  OAT
  13  16   2   0.152  5430000.0  0.152  5430000.0 ; CAK  CAL
  14  15   2   0.100  15700000.0  0.100  15700000.0 ; OAT  HAT
```

16	17	2	0.153	7150000.0	0.153	7150000.0 ;	CAL	CAU
16	20	2	0.144	6100000.0	0.144	6100000.0 ;	CAL	OAM
17	18	2	0.125	13400000.0	0.125	13400000.0 ;	CAU	OBL
17	19	2	0.125	13400000.0	0.125	13400000.0 ;	CAU	OAV
21	20	2	0.144	6100000.0	0.144	6100000.0 ;	CAH	OAM
21	22	2	0.144	6100000.0	0.144	6100000.0 ;	CAH	O3
23	22	2	0.144	6100000.0	0.144	6100000.0 ;	C3	O3
23	24	2	0.152	5430000.0	0.152	5430000.0 ;	C3	C4
23	41	2	0.152	5430000.0	0.152	5430000.0 ;	C3	C2
24	25	2	0.144	6100000.0	0.144	6100000.0 ;	C4	O4
24	30	2	0.152	5430000.0	0.152	5430000.0 ;	C4	C5
26	25	2	0.153	8040000.0	0.153	8040000.0 ;	SAX	O4
26	27	2	0.153	8040000.0	0.153	8040000.0 ;	SAX	OBM
26	28	2	0.153	8040000.0	0.153	8040000.0 ;	SAX	OBN
26	29	2	0.153	8040000.0	0.153	8040000.0 ;	SAX	OAY
30	31	2	0.153	7150000.0	0.153	7150000.0 ;	C5	C6
30	37	2	0.144	6100000.0	0.144	6100000.0 ;	C5	O5
31	32	2	0.143	8180000.0	0.143	8180000.0 ;	C6	O6
33	32	2	0.153	8040000.0	0.153	8040000.0 ;	SBB	O6
33	34	2	0.153	8040000.0	0.153	8040000.0 ;	SBB	OBO
33	35	2	0.153	8040000.0	0.153	8040000.0 ;	SBB	OBP
33	36	2	0.153	8040000.0	0.153	8040000.0 ;	SBB	OBC
38	37	2	0.144	6100000.0	0.144	6100000.0 ;	C1	O5
38	39	2	0.144	6100000.0	0.144	6100000.0 ;	C1	O1
38	41	2	0.152	5430000.0	0.152	5430000.0 ;	C1	C2
39	40	2	0.100	15700000.0	0.100	15700000.0 ;	O1	H12
41	42	2	0.147	8710000.0	0.147	8710000.0 ;	C2	N2
42	43	2	0.100	18700000.0	0.100	18700000.0 ;	N2	H22
44	42	2	0.134	10500000.0	0.134	10500000.0 ;	C7	N2
44	45	2	0.123	16600000.0	0.123	16600000.0 ;	C7	O7
44	46	2	0.153	7150000.0	0.153	7150000.0 ;	C7	C8

[pairs]

; ai	aj	fu	c0, c1, ...		
1	6	1		; OAP	CAI
2	7	1		; SAO	CAJ
2	21	1		; SAO	CAH
3	6	1		; OBH	CAI
4	6	1		; OBI	CAI
5	8	1		; OAN	OAQ
5	13	1		; OAN	CAK
5	20	1		; OAN	OAM
5	22	1		; OAN	O3
6	9	1		; CAI	SAR
6	14	1		; CAI	OAT
6	16	1		; CAI	CAL
6	23	1		; CAI	C3
7	10	1		; CAJ	OBJ
7	11	1		; CAJ	OBK
7	12	1		; CAJ	OAS
7	15	1		; CAJ	HAT
7	17	1		; CAJ	CAU
7	20	1		; CAJ	OAM
7	22	1		; CAJ	O3
8	14	1		; OAQ	OAT
8	16	1		; OAQ	CAL
8	21	1		; OAQ	CAH
9	13	1		; SAR	CAK
13	18	1		; CAK	OBL
13	19	1		; CAK	OAV
13	21	1		; CAK	CAH
14	17	1		; OAT	CAU
14	20	1		; OAT	OAM
15	16	1		; HAT	CAL
16	22	1		; CAL	O3
17	21	1		; CAU	CAH
18	20	1		; OBL	OAM
19	20	1		; OAV	OAM
20	23	1		; OAM	C3
21	24	1		; CAH	C4
21	41	1		; CAH	C2
22	25	1		; O3	O4
22	30	1		; O3	C5
22	38	1		; O3	C1
22	42	1		; O3	N2
23	26	1		; C3	SAX
23	31	1		; C3	C6


```

23 37 1 ; C3 O5
23 39 1 ; C3 O1
23 43 1 ; C3 H22
23 44 1 ; C3 C7
24 27 1 ; C4 OBM
24 28 1 ; C4 OBN
24 29 1 ; C4 OAY
24 32 1 ; C4 O6
24 38 1 ; C4 C1
24 42 1 ; C4 N2
25 31 1 ; O4 C6
25 37 1 ; O4 O5
25 41 1 ; O4 C2
26 30 1 ; SAX C5
30 33 1 ; C5 SBB
30 39 1 ; C5 O1
30 41 1 ; C5 C2
31 34 1 ; C6 OBO
31 35 1 ; C6 OBP
31 36 1 ; C6 OBC
31 38 1 ; C6 C1
32 37 1 ; O6 O5
37 40 1 ; O5 H12
37 42 1 ; O5 N2
38 43 1 ; C1 H22
38 44 1 ; C1 C7
39 42 1 ; O1 N2
40 41 1 ; H12 C2
41 45 1 ; C2 O7
41 46 1 ; C2 C8
43 45 1 ; H22 O7
43 46 1 ; H22 C8

```

[angles]

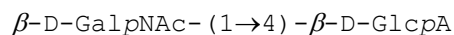
```

; ai aj ak fu c0, c1, ...
1 2 3 2 109.5 518.0 109.5 518.0 ; OAP SAO OBH
1 2 4 2 109.5 518.0 109.5 518.0 ; OAP SAO OBI
1 2 5 2 109.5 518.0 109.5 518.0 ; OAP SAO OAN
3 2 4 2 109.5 518.0 109.5 518.0 ; OBH SAO OBI
3 2 5 2 109.5 518.0 109.5 518.0 ; OBH SAO OAN
4 2 5 2 109.5 518.0 109.5 518.0 ; OBI SAO OAN
2 5 6 2 120.0 530.0 120.0 530.0 ; SAO OAN CAI
5 6 7 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; OAN CAI CAJ
5 6 21 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; OAN CAI CAH
7 6 21 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAJ CAI CAH
6 7 8 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAI CAJ OAQ
6 7 13 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAI CAJ CAK
8 7 13 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; OAQ CAJ CAK
7 8 9 2 120.0 530.0 120.0 530.0 ; CAJ OAQ SAR
8 9 10 2 109.5 518.0 109.5 518.0 ; OAQ SAR OBJ
8 9 11 2 109.5 518.0 109.5 518.0 ; OAQ SAR OBK
8 9 12 2 109.5 518.0 109.5 518.0 ; OAQ SAR OAS
10 9 11 2 109.5 518.0 109.5 518.0 ; OBJ SAR OBK
10 9 12 2 109.5 518.0 109.5 518.0 ; OBJ SAR OAS
11 9 12 2 109.5 518.0 109.5 518.0 ; OBK SAR OAS
7 13 14 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAJ CAK OAT
7 13 16 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAJ CAK CAL
14 13 16 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; OAT CAK CAL
13 14 15 2 109.5 450.0 109.5 450.0 ; CAK OAT HAT
13 16 17 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAK CAL CAU
13 16 20 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAK CAL OAM
17 16 20 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAU CAL OAM
16 17 18 2 117.0 635.0 117.0 635.0 ; CAL CAU OBL
16 17 19 2 117.0 635.0 117.0 635.0 ; CAL CAU OAV
18 17 19 2 126.0 770.0 126.0 770.0 ; OBL CAU OAV
16 20 21 2 109.5 380.0 109.5 380.0 ; CAL OAM CAH
6 21 20 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAI CAH OAM
6 21 22 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAI CAH O3
20 21 22 2 109.5 320.0 109.5 320.0 ; OAM CAH O3
21 22 23 2 109.5 380.0 109.5 380.0 ; CAH O3 C3
22 23 24 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; O3 C3 C4
22 23 41 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; O3 C3 C2
24 23 41 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; C4 C3 C2
23 24 25 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; C3 C4 O4
23 24 30 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; C3 C4 C5
25 24 30 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; O4 C4 C5
24 25 26 2 120.0 530.0 120.0 530.0 ; C4 O4 SAX

```


6	21	20	16	1	0.0	3.8 3	0.0	3.8 3 ; dih	CAI	CAH	OAM	CAL
13	16	20	21	1	0.0	3.8 3	0.0	3.8 3 ; dih	CAK	CAL	OAM	CAH
20	16	13	7	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	OAM	CAL	CAK	CAJ
17	16	13	7	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	CAU	CAL	CAK	CAJ
17	16	13	14	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	CAU	CAL	CAK	OAT
20	21	6	5	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	OAM	CAH	CAI	OAN
13	7	6	5	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	CAK	CAJ	CAI	OAN
8	7	6	5	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	OAQ	CAJ	CAI	OAN
8	7	6	21	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	OAQ	CAJ	CAI	CAH
16	13	7	8	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	CAL	CAK	CAJ	OAQ
14	13	7	8	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	OAT	CAK	CAJ	OAQ
14	13	7	6	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	OAT	CAK	CAJ	CAI
14	13	16	20	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	OAT	CAK	CAL	OAM
22	21	6	7	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	O3	CAH	CAI	CAJ
22	21	6	5	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	O3	CAH	OAI	OAN
22	21	20	16	1	0.0	3.8 3	0.0	3.8 3 ; dih	O3	CAH	OAM	CAL
13	16	17	19	1	0.0	1.0 6	0.0	1.0 6 ; dih	CAK	CAL	CAU	OAV
13	16	17	18	1	0.0	1.0 6	0.0	1.0 6 ; dih	CAK	CAL	CAU	OBL
20	16	17	19	1	0.0	1.0 6	0.0	1.0 6 ; dih	OAM	CAL	CAU	OAV
20	16	17	18	1	0.0	1.0 6	0.0	1.0 6 ; dih	OAM	CAL	CAU	OBL
21	6	5	2	1	0.0	1.3 3	0.0	1.3 3 ; dih	CAH	CAI	OAN	SAO
6	7	8	9	1	0.0	1.3 3	0.0	1.3 3 ; dih	CAI	CAJ	OAQ	SAR
7	13	14	15	1	0.0	1.3 3	0.0	1.3 3 ; dih	CAJ	CAK	OAT	HAT
6	21	22	23	1	0.0	3.8 3	0.0	3.8 3 ; dih	CAI	CAH	O3	C3
41	23	22	21	1	0.0	3.8 3	0.0	3.8 3 ; dih	C2	C3	O3	CAH
30	24	23	22	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	C5	C4	C3	O3
42	41	23	22	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	N2	C2	C3	O3
23	24	25	26	1	0.0	1.3 3	0.0	1.3 3 ; dih	C3	C4	O4	SAX
37	30	24	23	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	O5	C5	C4	C3
24	25	26	29	1	0.0	3.1 2	0.0	3.1 2 ; dih	C4	O4	SAX	OAY
24	25	26	28	1	0.0	3.1 2	0.0	3.1 2 ; dih	C4	O4	SAX	OBN
24	25	26	27	1	0.0	3.1 2	0.0	3.1 2 ; dih	C4	O4	SAX	OBM
32	31	30	24	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	O6	C6	C5	C4
24	30	37	38	1	0.0	3.8 3	0.0	3.8 3 ; dih	C4	C5	O5	C1
30	31	32	33	1	0.0	1.3 3	0.0	1.3 3 ; dih	C5	C6	O6	SBB
31	32	33	36	1	0.0	3.1 2	0.0	3.1 2 ; dih	C6	O6	SBB	OBC
31	32	33	35	1	0.0	3.1 2	0.0	3.1 2 ; dih	C6	O6	SBB	OBP
31	32	33	34	1	0.0	3.1 2	0.0	3.1 2 ; dih	C6	O6	SBB	OBO
41	38	37	30	1	0.0	3.8 3	0.0	3.8 3 ; dih	C2	C1	O5	C5
37	38	39	40	1	0.0	1.3 3	0.0	1.3 3 ; dih	O5	C1	O1	H12
42	41	38	37	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	N2	C2	C1	O5
23	41	42	44	1	0.0	3.8 3	0.0	3.8 3 ; dih	C3	C2	N2	C7
46	44	42	41	1	180.0	33.5 2	180.0	33.5 2 ; dih	C8	C7	N2	C2
37	38	41	23	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	O5	C1	C2	C3
38	41	23	24	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	C1	C2	C3	C4
30	24	23	41	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	C5	C4	C3	C2
41	38	37	30	1	0.0	3.8 3	0.0	3.8 3 ; dih	C2	C1	O5	C5
24	30	37	38	1	0.0	3.8 3	0.0	3.8 3 ; dih	C4	C5	O5	C1
37	30	24	23	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	O5	C5	C4	C3
31	30	24	23	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	C6	C5	C4	C3
31	30	24	25	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	C6	C5	C4	O4
37	38	41	42	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	O5	C1	C2	N2
24	23	41	42	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	C4	C3	C2	N2
22	23	41	42	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	O3	C3	C2	N2
22	23	41	38	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	O3	C3	C2	C1
30	24	23	22	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	C5	C4	C3	O3
25	24	23	22	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	O4	C4	C3	O3
25	24	23	41	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	O4	C4	C3	C2
25	24	30	37	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	O4	C4	C5	O5
39	38	41	23	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	O1	C1	C2	C3
39	38	41	42	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	O1	C1	C2	N2
39	38	37	30	1	0.0	3.8 3	0.0	3.8 3 ; dih	O1	C1	O5	C5
24	30	31	32	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	C4	C5	C6	O6
37	30	31	32	1	0.0	5.9 3	0.0	5.9 3 ; dih	O5	C5	C6	O6
38	41	42	43	1	0.0	1.3 3	0.0	1.3 3 ; dih	C1	C2	N2	H22
41	23	22	21	1	0.0	3.8 3	0.0	3.8 3 ; dih	C2	C3	O3	CAH
30	31	32	33	1	0.0	1.3 3	0.0	1.3 3 ; dih	C5	C6	O6	SBB
23	24	25	26	1	0.0	1.3 3	0.0	1.3 3 ; dih	C3	C4	O4	SAX
41	38	39	40	1	0.0	1.3 3	0.0	1.3 3 ; dih	C2	C1	O1	H12

8.1.3 CS $\beta 1 \rightarrow 4$ ligado



```
[ moleculetype ]
; Name nrexcl
DRG      3

[ atoms ]
;  nr      type  resnr  resid  atom  cgnr  charge  mass
   1      OM    1  DRG   OAO    1   0.172  15.9994
   2      C     1  DRG   CAN    1  -0.586  12.0110
   3      OM    1  DRG   OAZ    1  -0.586  15.9994
   4      CH1   1  DRG   CAI    1   0.242  13.0190
   5      OA    1  DRG   OAJ    2  -0.242  15.9994
   6      CH1   1  DRG   CAK    2   0.160  13.0190
   7      OA    1  DRG   OAR    2  -0.400  15.9994
   8      H     1  DRG   HAR    2   0.240   1.0080
   9      CH1   1  DRG   CAL    3   0.160  13.0190
  10      OA    1  DRG   OAQ    3  -0.400  15.9994
  11      H     1  DRG   HAQ    3   0.240   1.0080
  12      CH1   1  DRG   CAM    3   0.160  13.0190
  13      OA    1  DRG   OAP    3  -0.400  15.9994
  14      H     1  DRG   HAP    3   0.240   1.0080
  15      CH1   1  DRG   CAH    3   0.142  13.0190
  16      OA    1  DRG   O1     3  -0.396  15.9994
  17      CH1   1  DRG   C1     3   0.254  13.0190
  18      OA    1  DRG   O5     4  -0.242  15.9994
  19      CH1   1  DRG   C5     4   0.242  13.0190
  20      CH2   1  DRG   C6     4   0.160  14.0270
  21      OA    1  DRG   O6     4  -0.400  15.9994
  22      H     1  DRG   H63    4   0.240   1.0080
  23      CH1   1  DRG   C4     4   0.160  13.0190
  24      OA    1  DRG   O4     4  -0.400  15.9994
  25      H     1  DRG   H42    4   0.240   1.0080
  26      CH1   1  DRG   C3     5   0.160  13.0190
  27      OA    1  DRG   O3     5  -0.400  15.9994
  28      H     1  DRG   H32    5   0.240   1.0080
  29      CH1   1  DRG   C2     5   0.094  13.0190
  30      N     1  DRG   N2     5  -0.231  14.0067
  31      H     1  DRG   H22    5   0.201   1.0080
  32      C     1  DRG   C7     5   0.271  12.0110
  33      O     1  DRG   O7     5  -0.405  15.9994
  34      CH3   1  DRG   C8     5   0.070  15.0350

[ bonds ]
; ai  aj  fu  c0, c1, ...
   2  1  2  0.125  13400000.0  0.125  13400000.0 ; CAN  OAO
   2  3  2  0.125  13400000.0  0.125  13400000.0 ; CAN  OAZ
   4  2  2  0.153  7150000.0  0.153  7150000.0 ; CAI  CAN
   4  5  2  0.144  6100000.0  0.144  6100000.0 ; CAI  OAJ
   4  15 2  0.152  5430000.0  0.152  5430000.0 ; CAI  CAH
   6  5  2  0.144  6100000.0  0.144  6100000.0 ; CAK  OAJ
   6  7  2  0.144  6100000.0  0.144  6100000.0 ; CAK  OAR
   6  9  2  0.152  5430000.0  0.152  5430000.0 ; CAK  CAL
   7  8  2  0.100  15700000.0  0.100  15700000.0 ; OAR  HAR
   9  10 2  0.144  6100000.0  0.144  6100000.0 ; CAL  OAQ
   9  12 2  0.152  5430000.0  0.152  5430000.0 ; CAL  CAM
  10  11 2  0.100  15700000.0  0.100  15700000.0 ; OAQ  HAQ
  12  13 2  0.144  6100000.0  0.144  6100000.0 ; CAM  OAP
  12  15 2  0.152  5430000.0  0.152  5430000.0 ; CAM  CAH
  13  14 2  0.100  15700000.0  0.100  15700000.0 ; OAP  HAP
  15  16 2  0.144  6100000.0  0.144  6100000.0 ; CAH  O1
  17  16 2  0.144  6100000.0  0.144  6100000.0 ; C1   O1
  17  18 2  0.144  6100000.0  0.144  6100000.0 ; C1   O5
  17  29 2  0.152  5430000.0  0.152  5430000.0 ; C1   C2
  19  18 2  0.144  6100000.0  0.144  6100000.0 ; C5   O5
  19  20 2  0.153  7150000.0  0.153  7150000.0 ; C5   C6
  19  23 2  0.152  5430000.0  0.152  5430000.0 ; C5   C4
  20  21 2  0.143  8180000.0  0.143  8180000.0 ; C6   O6
  21  22 2  0.100  15700000.0  0.100  15700000.0 ; O6   H63
  23  24 2  0.144  6100000.0  0.144  6100000.0 ; C4   O4
  23  26 2  0.152  5430000.0  0.152  5430000.0 ; C4   C3
  24  25 2  0.100  15700000.0  0.100  15700000.0 ; O4   H42
```

```

26 27 2 0.144 6100000.0 0.144 6100000.0 ; C3 O3
26 29 2 0.152 5430000.0 0.152 5430000.0 ; C3 C2
27 28 2 0.100 15700000.0 0.100 15700000.0 ; O3 H32
29 30 2 0.147 8710000.0 0.147 8710000.0 ; C2 N2
30 31 2 0.100 18700000.0 0.100 18700000.0 ; N2 H22
32 30 2 0.134 10500000.0 0.134 10500000.0 ; C7 N2
32 33 2 0.123 16600000.0 0.123 16600000.0 ; C7 O7
32 34 2 0.153 7150000.0 0.153 7150000.0 ; C7 C8

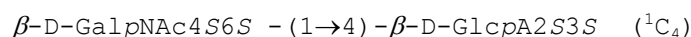
[ pairs ]
; ai aj fu c0, c1, ...
1 5 1 ; OAO OAJ
1 15 1 ; OAO CAH
2 6 1 ; CAN CAK
2 12 1 ; CAN CAM
2 16 1 ; CAN O1
3 5 1 ; OAZ OAJ
3 15 1 ; OAZ CAH
4 7 1 ; CAI OAR
4 9 1 ; CAI CAL
4 13 1 ; CAI OAP
4 17 1 ; CAI C1
5 8 1 ; OAJ HAR
5 10 1 ; OAJ OAQ
5 12 1 ; OAJ CAM
5 16 1 ; OAJ O1
6 11 1 ; CAK HAQ
6 13 1 ; CAK OAP
6 15 1 ; CAK CAH
7 10 1 ; OAR OAQ
7 12 1 ; OAR CAM
8 9 1 ; HAR CAL
9 14 1 ; CAL HAP
9 16 1 ; CAL O1
10 13 1 ; OAQ OAP
10 15 1 ; OAQ CAH
11 12 1 ; HAQ CAM
12 17 1 ; CAM C1
13 16 1 ; OAP O1
14 15 1 ; HAP CAH
15 18 1 ; CAH O5
15 29 1 ; CAH C2
16 19 1 ; O1 C5
16 26 1 ; O1 C3
16 30 1 ; O1 N2
17 20 1 ; C1 C6
17 23 1 ; C1 C4
17 27 1 ; C1 O3
17 31 1 ; C1 H22
17 32 1 ; C1 C7
18 21 1 ; O5 O6
18 24 1 ; O5 O4
18 26 1 ; O5 C3
18 30 1 ; O5 N2
19 22 1 ; C5 H63
19 25 1 ; C5 H42
19 27 1 ; C5 O3
19 29 1 ; C5 C2
20 24 1 ; C6 O4
20 26 1 ; C6 C3
21 23 1 ; O6 C4
23 28 1 ; C4 H32
23 30 1 ; C4 N2
24 27 1 ; O4 O3
24 29 1 ; O4 C2
25 26 1 ; H42 C3
26 31 1 ; C3 H22
26 32 1 ; C3 C7
27 30 1 ; O3 N2
28 29 1 ; H32 C2
29 33 1 ; C2 O7
29 34 1 ; C2 C8
31 33 1 ; H22 O7
31 34 1 ; H22 C8

[ angles ]
; ai aj ak fu c0, c1, ...

```


6	9	10	11	1	0.0	1.3	3	0.0	1.3	3 ; dih	CAK	CAL	OAQ	HAQ
15	12	9	6	1	0.0	5.9	3	0.0	5.9	3 ; dih	CAH	CAM	CAL	CAK
9	12	13	14	1	0.0	1.3	3	0.0	1.3	3 ; dih	CAL	CAM	OAP	HAP
16	15	12	9	1	0.0	5.9	3	0.0	5.9	3 ; dih	O1	CAH	CAM	CAL
4	15	16	17	1	0.0	3.8	3	0.0	3.8	3 ; dih	CAI	CAH	O1	C1
29	17	16	15	1	0.0	3.8	3	0.0	3.8	3 ; dih	C2	C1	O1	CAH
16	17	18	19	1	0.0	3.8	3	0.0	3.8	3 ; dih	O1	C1	O5	C5
30	29	17	16	1	0.0	5.9	3	0.0	5.9	3 ; dih	N2	C2	C1	O1
23	19	18	17	1	0.0	3.8	3	0.0	3.8	3 ; dih	C4	C5	O5	C1
21	20	19	18	1	0.0	5.9	3	0.0	5.9	3 ; dih	O6	C6	C5	O5
26	23	19	18	1	0.0	5.9	3	0.0	5.9	3 ; dih	C3	C4	C5	O5
19	20	21	22	1	0.0	1.3	3	0.0	1.3	3 ; dih	C5	C6	O6	H63
19	23	24	25	1	0.0	1.3	3	0.0	1.3	3 ; dih	C5	C4	O4	H42
29	26	23	19	1	0.0	5.9	3	0.0	5.9	3 ; dih	C2	C3	C4	C5
23	26	27	28	1	0.0	1.3	3	0.0	1.3	3 ; dih	C4	C3	O3	H32
30	29	26	23	1	0.0	5.9	3	0.0	5.9	3 ; dih	N2	C2	C3	C4
17	29	30	32	1	0.0	3.8	3	0.0	3.8	3 ; dih	C1	C2	N2	C7
34	32	30	29	1	180.0	33.5	2	180.0	33.5	2 ; dih	C8	C7	N2	C2
18	17	29	26	1	0.0	5.9	3	0.0	5.9	3 ; dih	O5	C1	C2	C3
17	29	26	23	1	0.0	5.9	3	0.0	5.9	3 ; dih	C1	C2	C3	C4
29	17	18	19	1	0.0	3.8	3	0.0	3.8	3 ; dih	C2	C1	O5	C5
20	19	23	26	1	0.0	5.9	3	0.0	5.9	3 ; dih	C6	C5	C4	C3
20	19	23	24	1	0.0	5.9	3	0.0	5.9	3 ; dih	C6	C5	C4	O4
18	17	29	30	1	0.0	2.1	3	0.0	2.1	3 ; dih	O5	C1	C2	N2
30	29	26	27	1	0.0	2.1	3	0.0	2.1	3 ; dih	N2	C2	C3	O3
17	29	26	27	1	0.0	5.9	3	0.0	5.9	3 ; dih	C1	C2	C3	O3
27	26	23	19	1	0.0	5.9	3	0.0	5.9	3 ; dih	O3	C3	C4	C5
27	26	23	24	1	0.0	2.1	3	0.0	2.1	3 ; dih	O3	C3	C4	O4
29	26	23	24	1	0.0	5.9	3	0.0	5.9	3 ; dih	C2	C3	C4	O4
18	19	23	24	1	0.0	2.1	3	0.0	2.1	3 ; dih	O5	C5	C4	O4
26	29	17	16	1	0.0	5.9	3	0.0	5.9	3 ; dih	C3	C2	C1	O1
23	19	20	21	1	0.0	5.9	3	0.0	5.9	3 ; dih	C4	C5	C6	O6
23	19	20	21	1	0.0	5.9	3	0.0	5.9	3 ; dih	C4	C5	C6	O6
17	29	30	31	1	0.0	1.3	3	0.0	1.3	3 ; dih	C1	C2	N2	H22
29	26	27	28	1	0.0	1.3	3	0.0	1.3	3 ; dih	C2	C3	O3	H32
26	23	24	25	1	0.0	1.3	3	0.0	1.3	3 ; dih	C3	C4	O4	H42

8.1.4 OSCS β 1 \rightarrow 4 ligado



```
[ moleculetype ]
; Name nrexcl
DRG      3

[ atoms ]
;  nr      type  resnr  resid  atom  cgnr  charge  mass
   1         OM    1     DRG   OBA    1   -0.774  15.9994
   2        SDMSO  1     DRG   SAZ    1    1.612  32.0600
   3         OM    1     DRG   OBJ    1   -0.774  15.9994
   4         OM    1     DRG   OBK    1   -0.774  15.9994
   5         OA    1     DRG   OAY    1   -0.515  15.9994
   6         CH1   1     DRG   CAQ    1    0.225  13.0190
   7         CH1   1     DRG   CAR    2    0.225  13.0190
   8         OA    1     DRG   OAV    2   -0.515  15.9994
   9        SDMSO  1     DRG   SAW    2    1.612  32.0600
  10         OM    1     DRG   OBH    2   -0.774  15.9994
  11         OM    1     DRG   OBI    2   -0.774  15.9994
  12         OM    1     DRG   OAX    2   -0.774  15.9994
  13         CH1   1     DRG   CAS    3    0.160  13.0190
  14         OA    1     DRG   OBD    3   -0.400  15.9994
  15         H     1     DRG   HBD    3    0.240   1.0080
  16         OA    1     DRG   OAT    4   -0.242  15.9994
  17         CH1   1     DRG   CAU    4    0.242  13.0190
  18         C     1     DRG   CBB    5    0.172  12.0110
  19         OM    1     DRG   OBL    5   -0.586  15.9994
  20         OM    1     DRG   OBC    5   -0.586  15.9994
  21         CH1   1     DRG   CAP    6    0.142  13.0190
  22         OA    1     DRG   O1     6   -0.396  15.9994
  23         CH1   1     DRG   C1     6    0.254  13.0190
  24         OA    1     DRG   O5     7   -0.242  15.9994
  25         CH1   1     DRG   C5     7    0.242  13.0190
  26         CH2   1     DRG   C6     8    0.225  14.0270
  27         OA    1     DRG   O6     8   -0.515  15.9994
  28        SDMSO  1     DRG   SAM    8    1.612  32.0600
  29         OM    1     DRG   OBO    8   -0.774  15.9994
  30         OM    1     DRG   OBP    8   -0.774  15.9994
  31         OM    1     DRG   OAN    8   -0.774  15.9994
  32         CH1   1     DRG   C4     9    0.225  13.0190
  33         OA    1     DRG   O4     9   -0.515  15.9994
  34        SDMSO  1     DRG   SAI    9    1.612  32.0600
  35         OM    1     DRG   OBM    9   -0.774  15.9994
  36         OM    1     DRG   OBN    9   -0.774  15.9994
  37         OM    1     DRG   OAJ    9   -0.774  15.9994
  38         CH1   1     DRG   C3    10    0.160  13.0190
  39         OA    1     DRG   O3    10   -0.400  15.9994
  40         H     1     DRG   H32   10    0.240   1.0080
  41         CH1   1     DRG   C2    11    0.094  13.0190
  42         N     1     DRG   N2    11   -0.231  14.0067
  43         H     1     DRG   H22   11    0.201   1.0080
  44         C     1     DRG   C7    11    0.271  12.0110
  45         O     1     DRG   O7    11   -0.405  15.9994
  46         CH3   1     DRG   C8    11    0.070  15.0350

[ bonds ]
; ai  aj  fu  c0, c1, ...
   2   1   2   0.153  8040000.0  0.153  8040000.0 ; SAZ  OBA
   2   3   2   0.153  8040000.0  0.153  8040000.0 ; SAZ  OBJ
   2   4   2   0.153  8040000.0  0.153  8040000.0 ; SAZ  OBK
   2   5   2   0.153  8040000.0  0.153  8040000.0 ; SAZ  OAY
   6   5   2   0.144  6100000.0  0.144  6100000.0 ; CAQ  OAY
   6   7   2   0.152  5430000.0  0.152  5430000.0 ; CAQ  CAR
   6  21   2   0.152  5430000.0  0.152  5430000.0 ; CAQ  CAP
   7   8   2   0.144  6100000.0  0.144  6100000.0 ; CAR  OAV
   7  13   2   0.152  5430000.0  0.152  5430000.0 ; CAR  CAS
   9   8   2   0.153  8040000.0  0.153  8040000.0 ; SAW  OAV
   9  10   2   0.153  8040000.0  0.153  8040000.0 ; SAW  OBH
   9  11   2   0.153  8040000.0  0.153  8040000.0 ; SAW  OBI
   9  12   2   0.153  8040000.0  0.153  8040000.0 ; SAW  OAX
  13  14   2   0.144  6100000.0  0.144  6100000.0 ; CAS  OBD
  13  16   2   0.144  6100000.0  0.144  6100000.0 ; CAS  OAT
  14  15   2   0.100  15700000.0  0.100  15700000.0 ; OBD  HBD
```


17	16	2	0.144	6100000.0	0.144	6100000.0 ;	CAU	OAT
17	18	2	0.153	7150000.0	0.153	7150000.0 ;	CAU	CBB
17	21	2	0.152	5430000.0	0.152	5430000.0 ;	CAU	CAP
18	19	2	0.125	13400000.0	0.125	13400000.0 ;	CBB	OBL
18	20	2	0.125	13400000.0	0.125	13400000.0 ;	CBB	OBC
21	22	2	0.144	6100000.0	0.144	6100000.0 ;	CAP	O1
23	22	2	0.144	6100000.0	0.144	6100000.0 ;	C1	O1
23	24	2	0.144	6100000.0	0.144	6100000.0 ;	C1	O5
23	41	2	0.152	5430000.0	0.152	5430000.0 ;	C1	C2
25	24	2	0.144	6100000.0	0.144	6100000.0 ;	C5	O5
25	26	2	0.153	7150000.0	0.153	7150000.0 ;	C5	C6
25	32	2	0.152	5430000.0	0.152	5430000.0 ;	C5	C4
26	27	2	0.143	8180000.0	0.143	8180000.0 ;	C6	O6
28	27	2	0.153	8040000.0	0.153	8040000.0 ;	SAM	O6
28	29	2	0.153	8040000.0	0.153	8040000.0 ;	SAM	OBO
28	30	2	0.153	8040000.0	0.153	8040000.0 ;	SAM	OBP
28	31	2	0.153	8040000.0	0.153	8040000.0 ;	SAM	OAN
32	33	2	0.144	6100000.0	0.144	6100000.0 ;	C4	O4
32	38	2	0.152	5430000.0	0.152	5430000.0 ;	C4	C3
34	33	2	0.153	8040000.0	0.153	8040000.0 ;	SAI	O4
34	35	2	0.153	8040000.0	0.153	8040000.0 ;	SAI	OBM
34	36	2	0.153	8040000.0	0.153	8040000.0 ;	SAI	OBN
34	37	2	0.153	8040000.0	0.153	8040000.0 ;	SAI	OAJ
38	39	2	0.144	6100000.0	0.144	6100000.0 ;	C3	O3
38	41	2	0.152	5430000.0	0.152	5430000.0 ;	C3	C2
39	40	2	0.100	15700000.0	0.100	15700000.0 ;	O3	H32
41	42	2	0.147	8710000.0	0.147	8710000.0 ;	C2	N2
42	43	2	0.100	18700000.0	0.100	18700000.0 ;	N2	H22
44	42	2	0.134	10500000.0	0.134	10500000.0 ;	C7	N2
44	45	2	0.123	16600000.0	0.123	16600000.0 ;	C7	O7
44	46	2	0.153	7150000.0	0.153	7150000.0 ;	C7	C8

[pairs]

; ai	aj	fu	c0, c1, ...		
1	6	1		;	OBA CAQ
2	7	1		;	SAZ CAR
2	21	1		;	SAZ CAP
3	6	1		;	OBJ CAQ
4	6	1		;	OBK CAQ
5	8	1		;	OAY OAV
5	13	1		;	OAY CAS
5	17	1		;	OAY CAU
5	22	1		;	OAY O1
6	9	1		;	CAQ SAW
6	14	1		;	CAQ OBD
6	16	1		;	CAQ OAT
6	18	1		;	CAQ CBB
6	23	1		;	CAQ C1
7	10	1		;	CAR OBH
7	11	1		;	CAR OBI
7	12	1		;	CAR OAX
7	15	1		;	CAR HBD
7	17	1		;	CAR CAU
7	22	1		;	CAR O1
8	14	1		;	OAV OBD
8	16	1		;	OAV OAT
8	21	1		;	OAV CAP
9	13	1		;	SAW CAS
13	18	1		;	CAS CBB
13	21	1		;	CAS CAP
14	17	1		;	OBD CAU
15	16	1		;	HBD OAT
16	19	1		;	OAT OBL
16	20	1		;	OAT OBC
16	22	1		;	OAT O1
17	23	1		;	CAU C1
18	22	1		;	CBB O1
19	21	1		;	OBL CAP
20	21	1		;	OBC CAP
21	24	1		;	CAP O5
21	41	1		;	CAP C2
22	25	1		;	O1 C5
22	38	1		;	O1 C3
22	42	1		;	O1 N2
23	26	1		;	C1 C6
23	32	1		;	C1 C4
23	39	1		;	C1 O3

```

23 43 1 ; C1 H22
23 44 1 ; C1 C7
24 27 1 ; O5 O6
24 33 1 ; O5 O4
24 38 1 ; O5 C3
24 42 1 ; O5 N2
25 28 1 ; C5 SAM
25 34 1 ; C5 SAI
25 39 1 ; C5 O3
25 41 1 ; C5 C2
26 29 1 ; C6 OBO
26 30 1 ; C6 OBP
26 31 1 ; C6 OAN
26 33 1 ; C6 O4
26 38 1 ; C6 C3
27 32 1 ; O6 C4
32 35 1 ; C4 OBM
32 36 1 ; C4 OBN
32 37 1 ; C4 OAJ
32 40 1 ; C4 H32
32 42 1 ; C4 N2
33 39 1 ; O4 O3
33 41 1 ; O4 C2
34 38 1 ; SAI C3
38 43 1 ; C3 H22
38 44 1 ; C3 C7
39 42 1 ; O3 N2
40 41 1 ; H32 C2
41 45 1 ; C2 O7
41 46 1 ; C2 C8
43 45 1 ; H22 O7
43 46 1 ; H22 C8

```

[angles]

```

; ai aj ak fu c0, c1, ...
1 2 3 2 109.5 518.0 109.5 518.0 ; OBA SAZ OBJ
1 2 4 2 109.5 518.0 109.5 518.0 ; OBA SAZ OBK
1 2 5 2 109.5 518.0 109.5 518.0 ; OBA SAZ OAY
3 2 4 2 109.5 518.0 109.5 518.0 ; OBJ SAZ OBK
3 2 5 2 109.5 518.0 109.5 518.0 ; OBJ SAZ OAY
4 2 5 2 109.5 518.0 109.5 518.0 ; OBK SAZ OAY
2 5 6 2 120.0 530.0 120.0 530.0 ; SAZ OAY CAQ
5 6 7 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; OAY CAQ CAR
5 6 21 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; OAY CAQ CAP
7 6 21 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAR CAQ CAP
6 7 8 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAQ CAR OAV
6 7 13 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAQ CAR CAS
8 7 13 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; OAV CAR CAS
7 8 9 2 120.0 530.0 120.0 530.0 ; CAR OAV SAW
8 9 10 2 109.5 518.0 109.5 518.0 ; OAV SAW OBH
8 9 11 2 109.5 518.0 109.5 518.0 ; OAV SAW OBI
8 9 12 2 109.5 518.0 109.5 518.0 ; OAV SAW OAX
10 9 11 2 109.5 518.0 109.5 518.0 ; OBH SAW OBI
10 9 12 2 109.5 518.0 109.5 518.0 ; OBH SAW OAX
11 9 12 2 109.5 518.0 109.5 518.0 ; OBI SAW OAX
7 13 14 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAR CAS OBD
7 13 16 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAR CAS OAT
14 13 16 2 109.5 320.0 109.5 320.0 ; OBD CAS OAT
13 14 15 2 109.5 450.0 109.5 450.0 ; CAS OBD HBD
13 16 17 2 109.5 380.0 109.5 380.0 ; CAS OAT CAU
16 17 18 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; OAT CAU CBB
16 17 21 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; OAT CAU CAP
18 17 21 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CBB CAU CAP
17 18 19 2 117.0 635.0 117.0 635.0 ; CAU CBB OBL
17 18 20 2 117.0 635.0 117.0 635.0 ; CAU CBB OBC
19 18 20 2 126.0 770.0 126.0 770.0 ; OBL CBB OBC
6 21 17 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAQ CAP CAU
6 21 22 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAQ CAP O1
17 21 22 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; CAU CAP O1
21 22 23 2 109.5 380.0 109.5 380.0 ; CAP O1 C1
22 23 24 2 109.5 320.0 109.5 320.0 ; O1 C1 O5
22 23 41 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; O1 C1 C2
24 23 41 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; O5 C1 C2
23 24 25 2 109.5 380.0 109.5 380.0 ; C1 O5 C5
24 25 26 2 109.5 320.0 109.5 320.0 ; O5 C5 C6
24 25 32 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; O5 C5 C4
26 25 32 2 109.5 520.0 109.5 520.0 ; C6 C5 C4

```