



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOMEDICINA

CARACTERIZAÇÃO CONFORMACIONAL DE SAPONINAS

Conrado Pedebos

ORIENTADOR: Hugo Verli
CO-ORIENTADOR: Laércio Pol-Fachin

Porto Alegre – Brasil

2011

CARACTERIZAÇÃO CONFORMACIONAL DE SAPONINAS

Conrado Pedebos

Trabalho de conclusão de curso de Biomedicina elaborado no Grupo de Bioinformática Estrutural do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob orientação do professor doutor:

Hugo Verli

Porto Alegre – Brasil

2011

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao prof. Hugo Verli, primeiramente, pela oportunidade de desenvolver projetos na área que, desde a disciplina de Bioinformática, me identifiquei prontamente e também pela confiança depositada no meu trabalho. Toda sabedoria e ensinamentos compartilhados nesse período, além de ser um orientador presente e acessível, tornaram possível o meu crescimento intelectual e como pesquisador e profissional.

Agradeço aos colegas do Grupo de Bioinformática Estrutural por todo suporte e convivência. Em especial, menciono o Laércio Pol-Fachin, não só por me passar os detalhes metodológicos, sempre me auxiliando nos primeiros passos na modelagem molecular, mas também pela amizade, pela paciência e pelos momentos de descontração. Agradeço também a Cláudia Lemelle Fernandes pelo auxílio na resolução das dificuldades enfrentadas durante a confecção desse trabalho.

À UFRGS, aos que trabalham em prol do curso de Biomedicina e ao Centro de Biotecnologia por todas as possibilidades, pelo incentivo à pesquisa e pela grande qualidade do ensino oferecido.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite.

Agradeço aos meus pais por sempre terem me incentivado e por todo esforço direcionado ao meu desenvolvimento humano e intelectual. Por todo apoio, amor e por sempre me auxiliarem em todos os caminhos da vida, me colocando sempre em primeiro lugar. À minha mãe, pelo cuidado e preocupação constante. Ao meu pai, pelos valores e pela sabedoria.

Agradeço à Soraia Da Cás, por todo carinho, compreensão e apoio em todos os momentos, sempre me fazendo acreditar no meu potencial. Por toda a amizade, o amor e as grandes experiências compartilhadas nesses anos.

Aos meus velhos amigos, por estarem sempre presentes e por todos os anos que aproveitamos e continuaremos aproveitando juntos. Também agradeço aos amigos que conquistei durante o período acadêmico.

***“A dúvida é o princípio da
sabedoria.”***

Aristóteles

*Dedico este trabalho a José
Augusto da Rosa Bifano Filho, cuja
amizade levarei comigo eternamente.*

ÍNDICE GERAL

LISTA DE ABREVIATURAS	VII
RESUMO	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Saponinas	1
1.1.1. Características Gerais	1
1.1.2. Classificação e estrutura	2
1.1.3. Biossíntese	3
1.2. Saponinas Triterpênicas	4
1.2.1. Erucasaponina A e Estelatosídeo B	6
1.2.2. Chikusetsusaponin IVa	7
1.2.3. Quillaja Saponaria – 21 (QS-21)	8
1.3. A dinâmica molecular e a modelagem molecular de biomoléculas	9
1.4. Os carboidratos e o estudo conformacional de saponinas	10
2. OBJETIVOS	12
3. METODOLOGIA	13
3.1. Construção de Topologias	13
3.2. Cálculos ab initio	14
3.3. Simulações por dinâmica molecular	14
3.4. Validação	15
4. RESULTADOS	16
4.1. Parte I: Erucasaponina A e Estelatosídeo B	17
4.2. Parte II: Chikusetsusaponin IVa	35
4.3. Parte III: QS-21	37
5. DISCUSSÃO GERAL	44
6. CONCLUSÕES	46
7. AGRADECIMENTOS	47
8. BIBLIOGRAFIA	48
9. APÊNDICE	52
9.1. Topologia da molécula de piridina	52
9.2. Topologia da Erucasaponina A	54
9.3. Topologia do Estelatosídeo B	60
9.4. Topologia da Chikusetsusaponin	65
9.5. Topologia da QS-21	69
10. ANEXOS	81

LISTA DE ABREVIATURAS

C3 – carbono 3

C28 – carbono 28

IPP (isopentenyl pyrophosphate) – Pirofosfato de isopentenila

DMPP (dimethylallyl pyrophosphate) - Pirofosfato de dimetilalila

GPP (geranyl pyrophosphate) – Pirofosfato de geranila

FPP (farnesyl pyrophosphate) - Pirofosfato de farnesila

OSCs (oxidosqualene cyclases) – Oxidosqualeno ciclases

UGTs (uridine diphosphate glycosyltransferases) – Uridina difosfato glicosiltransferases

Xil - D-Xilose

Glc - D-Glicose

MeGlcA – D-Ácido glicurônico metil-éster

GlcA – D-Ácido glicurônico

Ram – L-Ramnose

Gal – D-Galactose

Fuc – D-Fucose

Api – D-Apiose

Ara – L-Arabinose

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

NOE – *Nuclear overhauser effect* – efeito overhauser nuclear

DM – dinâmica molecular

QS-21 – *Quillaja saponaria* - 21

SAXS (*small-angle X-ray scattering*) – espalhamento de raios X a baixo ângulo

RDF - (Radial distribution function) – função da distribuição radial

RESUMO

O estudo da interação entre ligantes e seus receptores-alvo tende a iniciar pela caracterização da conformação adotada pelos determinados compostos. Dessa forma, as saponinas, que são glicosídeos formados por uma porção hidrofílica, composta por carboidratos, e uma lipofílica, composta por um triterpeno ou um esteróide, foram identificadas como moléculas que possuem diversas ações e atividades biológicas. Entretanto, ainda existem muitas dificuldades na elucidação estrutural desses compostos, principalmente devido à alta flexibilidade encontrada nas regiões compostas por sacarídeos. Desafios adicionais ainda incluem o fato de muitas saponinas terem suas estruturas elucidadas em solventes não-aquosos, para o caso das saponinas Erucasaponina A e Estelatosídeo B, e a instabilidade química e a formação micelar, no caso da *Quillaja saponaria* – 21. Dessa forma, o presente trabalho emprega técnicas de modelagem molecular para realizar a caracterização conformacional em nível atômico de quatro saponinas (Erucasaponina A, Estelatosídeo B, *Chikusetsusaponin* IVa e *Quillaja saponaria* – 21), utilizando mapas de contorno de energia e simulações de dinâmica molecular para refinamento dos modelos. Os modelos tridimensionais das saponinas Erucasaponina A e Estelatosídeo B foram devidamente validados em solvente aromático (piridina) e um modelo adicional para cada uma foi proposto em ambiente fisiológico. A *Chikusetsusaponin* IVa e a *Quillaja saponaria* – 21 tiveram modelos construídos também, sendo que a formação micelar da última pode ser observada em solução aquosa e validada com dados experimentais. Assim, espera-se que os modelos obtidos demonstrem a força dos métodos computacionais na caracterização de biomoléculas e possam contribuir para futuras pesquisas envolvendo glicoconjugados.

Palavras Chave: saponina; dinâmica molecular; piridina; modelagem molecular; glicoconjugados.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Exemplo dos esqueletos básicos que compõem as saponinas e de duas classes de saponinas encontradas na natureza: A) Esqueleto triterpênico - Saponina triterpênica Avenacina A-1; B) Esqueleto esteroidal - Saponina esteroidal Gracilina (Haralampidis <i>et al</i> , 2002).....	1
Figura 2. Representação da biossíntese das agliconas presentes na estrutura de saponinas, iniciando pela síntese do precursor comum entre as saponinas esteroidais e triterpênicas, o óxido de esqualeno.	3
Figura 3. Representação dos núcleos triterpênicos de maior distribuição entre as saponinas. Adaptado de Simões <i>et al</i> , 2000.	5
Figura 4. Estruturas das saponinas Erucasaponina A e Estelatosídeo B.	7
Figura 5. Estrutura da saponina Chikusetsusaponin IVa.	8
Figura 6. Estrutura da saponina QS-21 (Adams <i>et al</i> , 2010), com detalhamento das cadeias presentes, tanto a parte sacarídica como a cadeia acila, com destaque para a ligação éster onde ocorre a hidrólise espontânea.....	9
Figura 7. Mapas de contorno dos dissacarídeos que compõem a <i>Chikusetsusaponin IVa</i> (A e B). Os mapas de energia mostram as curvas a cada -10 kJ/mol, de -10 a 50 kJ/mol. As geometrias populadas em solução do dissacarídeo isolado (pontos cinza) e dos dissacarídeos na estrutura completa da saponina (pontos vermelhos), retiradas das simulações de DM, estão sobrepostas aos mapas.....	35
Figura 8. Distribuição dos ângulos ϕ e ψ das ligações glicosídicas presentes na saponina <i>Chikusetsusaponin IVa</i> , tanto na forma de dissacarídeo isolado (preto) como na estrutura da saponina completa (vermelho).....	36
Figura 9. Estado conformacional mais abundante da saponina <i>Chikusetsusaponin IVa</i>	36
Figura 10. A-G) Mapas de contorno dos dissacarídeos que compõem a saponina QS-21. Os mapas de energia mostram as curvas a cada -10 kJ/mol, de -10 a 50 kJ/mol. As geometrias populadas em solução, retiradas das simulações de DM, estão sobrepostas aos mapas, de forma que os pontos cinza representam o dissacarídeo na forma isolada, enquanto os pontos vermelhos representam o dissacarídeo na molécula completa a 298K e com o GlcA protonado (pH = 2) e os pontos azuis representam a molécula em 310K e com o GlcA não protonado; H) Representação das estruturas mais prevalentes em solução (Cluster nº 75 e 180) para a unidade Fuc-Acila-Ara; I) Representação da estrutura da QS-21 na sua conformação mais prevalente em solução.	38
Figura 11. Distribuição dos ângulos ϕ e ψ das ligações glicosídicas presentes na saponina QS-21, tanto na forma de dissacarídeo isolado (preto) como na estrutura da saponina completa não-protonada (azul) e protonada (vermelho).....	39
Figura 12. Esquema da formação de uma micela de 10 moléculas e uma de 20 moléculas de QS-21. A) Momento inicial da simulação; formação das primeiras três micelas (10 ns); formação de duas micelas (20 ns); formação da micela final (40ns). B) Momento inicial da simulação; primeiras interações entre as saponinas (10 ns); formação de algumas micelas (20 ns); início da formação da micela final (30ns); micela quase formada (45ns) e formação final (70 ns).....	41

Figura 13. Representação da disposição na micela das unidades componentes da saponina QS-21. Os triterpenos (esferas vermelhas) e as Acilas (esferas marrons) são mais hidrofóbicos, enquanto os carboidratos (linhas azuis) são mais hidrofílicos. A) Micela de 10 moléculas; B) Micela de 20 moléculas..... 42

Figura 14. RDF da ligação éster entre o resíduo Fuc e cadeia acila. A) Simulação por DM de duas moléculas (QS-21)₂; B) Simulação por DM de três moléculas (QS-21)₃; C) Simulação por DM de 10 moléculas (QS-21)₁₀; D) Simulação por DM de 20 moléculas (QS-21)₂₀. Em todos os gráficos, uma comparação com a saponina isolada em solução foi realizada. Nos gráficos C e D, uma aproximação para as saponinas que apresentaram resultados similares foi realizada, de maneira que os algarismos romanos entre parênteses correspondem a qual(is) saponina(s) estão representadas em cada uma das linhas. Os átomos em azul na estrutura 2D foram os utilizados no cálculo de RDF..... 43

Figura 15. Representação do aumento do raio de giro das micelas conforme aumentam as moléculas de saponinas presentes em solução e, conseqüentemente, agregadas. 45

1 Introdução

1.1 Saponinas

1.1.1 Características gerais

As saponinas (Figura 1) são metabólitos secundários de plantas, quimicamente caracterizados como glicosídeos compostos de uma ou mais porções hidrofílicas e uma porção hidrofóbica apresentando, portanto, propriedades anfifílicas. A porção hidrofílica das saponinas é composta por resíduos de carboidratos, enquanto que a parte hidrofóbica é denominada aglicona (triterpênica ou esteroidal) (Figura 1). O nome saponina é derivado da palavra *sapo*, que em latim significa sabão, e remete a uma característica marcante desses compostos: a habilidade de formar espuma resistente a ação de ácidos minerais diluídos. Outras características físico-químicas importantes desta família de moléculas incluem sua elevada solubilidade em água, ação sobre membranas e complexação com colesterol (Simões *et al*, 2000). Estes metabólitos vegetais atuam, principalmente, no mecanismo de defesa das plantas, atuando como agentes antimicrobianos, antivirais e inseticidas (Francis *et al*, 2002), bem como participando do controle da fluidez de membranas celulares (Dinda *et al*, 2010). Além de sua ocorrência em planta, saponinas podem também ser encontradas em alguns organismos marinhos, como no pepino-do-mar (Van Dyck *et al*, 2010) e na estrela-do-mar (Liu *et al*, 2008).

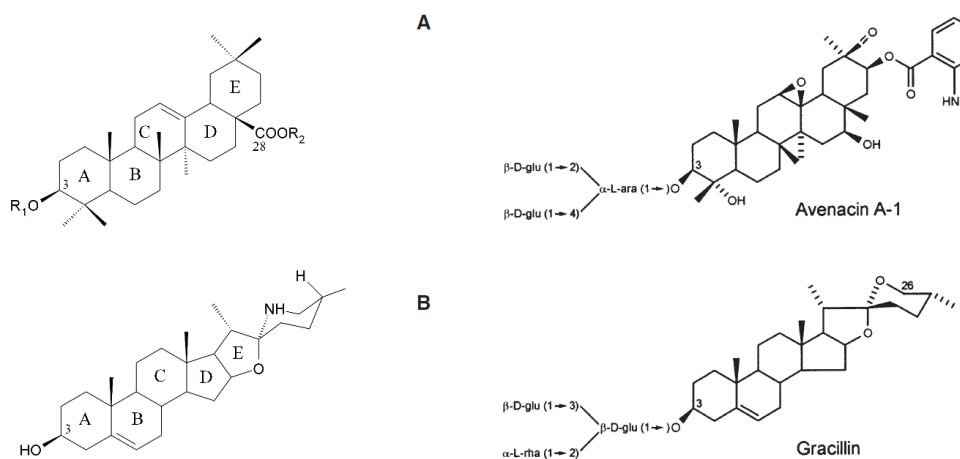


Figura 1. Exemplo dos esqueletos básicos que compõem as saponinas e de duas classes de saponinas encontradas na natureza: A) Esqueleto triterpênico - Saponina triterpênica Avenacina A-1; B) Esqueleto esteroidal - Saponina esteroidal Gracilina (Haralampidis *et al*, 2002).

1.1.2 Classificação e estrutura

Saponinas podem ser classificadas de diferentes maneiras. Quanto à natureza química da sua porção hidrofóbica, as saponinas podem ser classificadas como *triterpenóides*, que possuem um triterpeno como aglicona e são encontradas majoritariamente nas dicotiledôneas, ou *esteroidais*, que possuem um esteróide como aglicona e são quase exclusivamente pertencentes às monocotiledôneas. A diferença entre essas agliconas, além da conformação e da distribuição, consiste no tamanho de seus esqueletos: o núcleo triterpênico possui 30 carbonos, enquanto o esteroidal possui 27 (Figura 1).

Outra forma de classificação das saponinas envolve o número de grupos ligados na aglicona. Quando há apenas uma cadeia de carboidratos ligados a aglicona, normalmente no carbono 3 (C3, Figura 1), a saponina é considerada *monodesmosídica*. Caso ocorram duas ligações, comumente uma em C3 e outra no carbono 28 (C28, Figura 1) (Simões *et al*, 2000), sendo a primeira uma ligação éter e a segunda uma ligação éster, a saponina é *bidesmosídica*. Há também casos de saponinas *tridesmosídicas*, onde ocorrem ligações de três cadeias sacarídicas, embora sejam casos menos frequentes (Oleszek *et al*, 1992.; Mahato *et al*, 1992).

Quanto ao seu conteúdo hidrofílico, as saponinas costumam apresentar uma altíssima variação, tanto no tipo de monossacarídeo ou oligossacarídeo ligado, como resíduos de xilose (Xil), glicose (Glc), ácido glicurônico (GlcA), ramnose (Ram), apiose (Api), arabinose (Ara), galactose (Gal) e fucose (Fuc), dentre outros, quanto na sua posição de inserção na aglicona, como nos átomos de carbono C3, C4, C16, C17, C20, C21, C22 e C28.

Dada a elevada complexidade e variedade de estruturas moleculares de saponinas, algumas outras formas de classificação podem ser empregadas, como pelo tipo de aglicona (também chamada de sapogenina) presente na estrutura da molécula (Vincken *et al*, 2007). Adicionalmente, além de cadeias sacarídicas, outros tipos de substituintes podem ser encontrados em saponinas, tais como cadeias acila, monoterpênóides, cinamoila e benzoila, dentre outros (Vincken *et al*, 2007).

1.1.3 Biossíntese.

A biossíntese desses compostos (Figura 2) se inicia a partir do óxido de esqualeno. Este, por sua vez, é proveniente da via do mevalonato, cujo processo envolve condensação de acetil-coenzima A (Acetil-CoA) que, conseqüentemente, irá gerar o pirofosfato de isopentenila (IPP) e o pirofosfato de dimetilalila (DMPP). Essas moléculas sofrem condensação e formam pirofosfato de geranila (GPP) que, com a adição de mais uma molécula de IPP, irá gerar o pirofosfato de farnesila (FPP). Finalmente, com a adição de mais uma molécula de FPP forma-se o esqualeno, que sofrerá ação da esqualeno epoxidase, tornando-se óxido de esqualeno. Este constitui-se no precursor comum entre as saponinas triterpênicas e esteroidais. A maneira como ocorre a ciclização do óxido de esqualeno, mediada por oxido-esqualeno ciclases (OSCs), determina o tipo de aglicona formada: caso a conformação adotada seja cadeira-barco-cadeira-barco, ocorrerá formação de esteróides, enquanto com a conformação cadeira-cadeira-cadeira-barco adotada, ocorrerá formação de triterpenos (podendo ser tetracíclicos ou pentacíclicos). Sabe-se também que o tipo de OSC participante do processo de síntese da aglicona é importante na definição do produto formado, chegando a gerar mais de 80 possíveis produtos nesta reação (Haralampidis et al, 2002; Augustin *et al*, 2011).

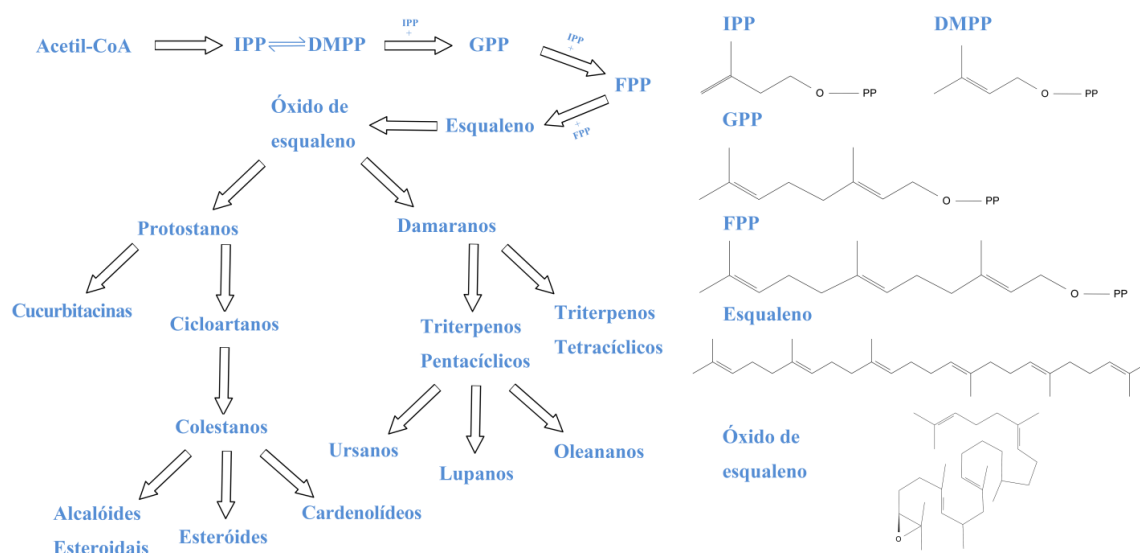


Figura 2. Representação da biossíntese das agliconas presentes na estrutura de saponinas, iniciando pela síntese do precursor comum entre as saponinas esteroidais e triterpênicas, o óxido de esqualeno.

Após a síntese do núcleo triterpênico ou esteroidal ocorre a sua glicosilação, completando o processo de biossíntese das saponinas. Esta reação é catalisada por enzimas da família 1 uridina difosfato glicosiltransferases (UGTs), que agem transferindo um resíduo de carboidrato ativado para moléculas de baixo peso molecular (agliconas) (Ross *et al*, 2001).

1.2 Saponinas Triterpênicas

As saponinas triterpênicas possuem núcleos triterpênicos que podem ser classificados em três grupos principais: oleananos, ursanos e lupanos (Figura 3). Alguns grupos são encontrados com menor frequência, como os fridelanos, os hopanos e os taraxastanos, bem como outros grupos que envolvem triterpenos tetracíclicos, como os damaranos e os tirucalanos. A estereoquímica de oleananos e ursanos envolve a configuração *trans* entre os anéis A/B, B/C e C/D, e *cis* entre os anéis D/E. Esta estereoquímica difere no triterpeno tipo lupano entre os anéis D/E, que também são *trans* (Simões *et al*, 2000). Outra diferença entre lupano e os outros dois grupos reside no quinto anel (E), que é de cinco membros neste grupo e de seis membros nos outros. Em termos de estrutura, mais diferenças podem ser ressaltadas: no grupo dos oleananos, duas metilas estão ligadas em C20; nos ursanos, uma metila está ligada em C20 e outra em C19; no grupo dos lupanos, o C20 estará fora do anel, ligado em C19, com duas metilas ligadas a ele. Além disso, podem ocorrer ligações duplas dentro do anel, geralmente entre C12 e C13. Por fim, esses glicosídeos possuem, normalmente, em torno de duas a cinco unidades sacarídicas ligadas, principalmente, a C3 e C28.

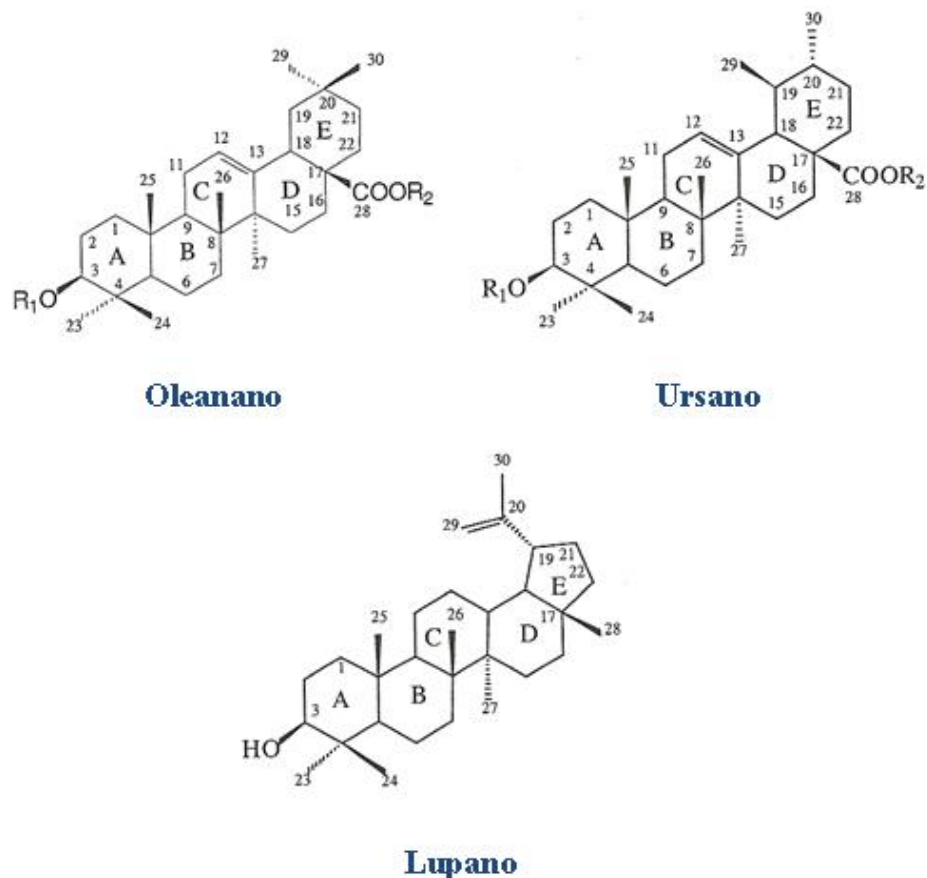


Figura 3. Representação dos núcleos triterpênicos de maior distribuição entre as saponinas. Adaptado de Simões *et al*, 2000.

A partir da enorme variedade de saponinas geradas pela combinação de diferentes agliconas e mono- ou oligossacarídeos, são criados inúmeros arcabouços moleculares, capazes de desempenharem diversas atividades biológicas independentes de suas funções como metabólitos vegetais. Sabe-se que diferentes agliconas podem conter a mesma atividade biológica, todavia pequenas alterações na estrutura da saponina, seja no triterpeno, seja nos carboidratos podem gerar desde pequenas alterações no nível de atividade, até mesmo a perda total da mesma (Man *et al*, 2010). Em uma recente compilação de novas saponinas triterpênicas (Dinda *et al*, 2010), diversas atividades foram relatadas (Tabela 1), demonstrando o potencial desses compostos como pontos de partida para o planejamento de novos agentes terapêuticos.

Tabela 1. Compilação de atividades biológicas em novas saponinas de 1996-2007 (Dinda *et al*, 2010).

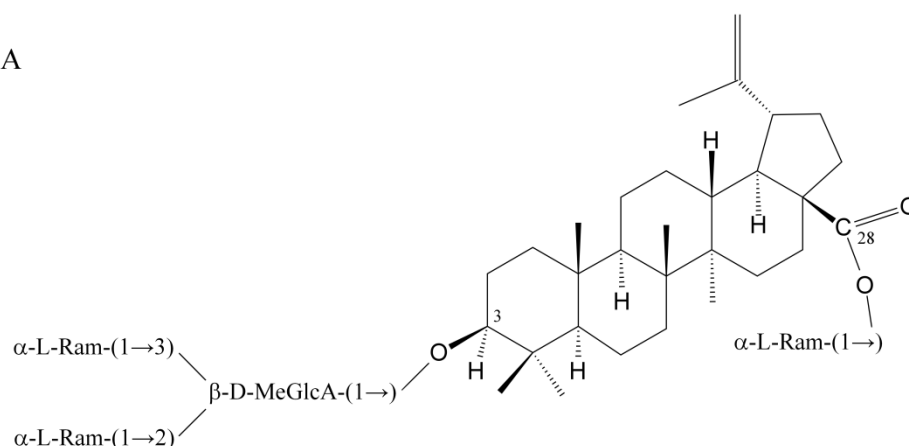
Ações, atividades e efeitos biológicos		
Antialérgica	Antiplasmodium	Imunomodulatória
Antiaterosclerose	Antiobesidade	Inibição da formação de osteoclasto
Antiplaquetária	Antiproliferativo	Inseticida
Antibacteriana	Antipsoríase	Efeito semelhante a insulina
Anticomplemento	Antiespasma	Efeito em membranas
Antidiabético	Antiviral	Moluscicida
Contraceptivo	Antitumoral / Citotóxica	Neurofarmacológica
Antifúngica	Desintoxicante	Atividade contra disfunção endotelial
Antiinflamatória	Gastroprotetor	Antiofídica
Antileishmaniose	Hemolítico	Adoçante / Antiadoçante
Antimalária	Hepatoprotetor	Efeito na atividade enzimática

A seguir apresentaremos as estruturas das saponinas triterpênicas alvo do presente trabalho, Erucasaponina A, Estelatosídeo B, *Chikusetsusaponin* IVa e QS-21.

1.2.1 Erucasaponina A e Estelatosídeo B

Estas saponinas foram previamente isoladas da cactácea *Stenocereus eruca* (Figura 4) (Okazaki *et al*, 2007). O Estelatosídeo B é uma saponina monodesmosídica, composta por três resíduos sacarídicos, Xil, Glc e MeGlcA. Sua aglicona é uma estelatogenina, um triterpeno do grupo lupano, identificada em 1955 (Djerassi *et al*, 1955) mas ainda sem relatos de atividade biológica. A Erucasaponina A é uma saponina bidesmosídica constituída de quatro resíduos sacarídicos, três resíduos de Ram e um MeGlcA. O seu triterpeno é o ácido betulínico, também pertencente ao grupo dos lupanos, que já foi associado a diversos tipos de atividade, como anti-HIV-1 e 2, anti-helmíntico, antibacteriana, antimalária, antiinflamatório e, principalmente, antitumoral, com diversos estudos demonstrando eficácia contra diversos tipos de tumor (Cichewicz *et al*, 2004). Um dos problemas no seu uso terapêutico é sua baixa hidrossolubilidade e farmacocinética pouco favorável (Petronelli *et al*, 2009).

A) Erucasaponina A



B) Estelatosídeo B

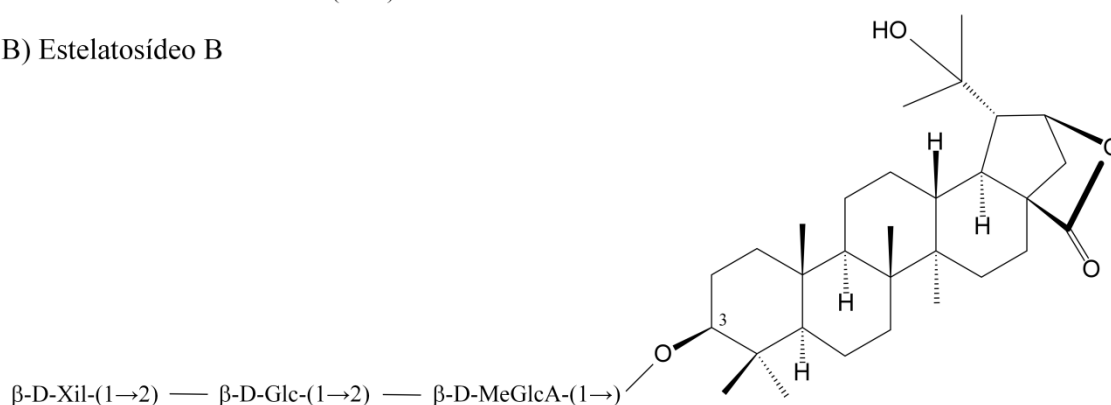


Figura 4. Estruturas das saponinas Erucasaponina A e Estelatosídeo B.

1.2.2 Chikusetsusaponin IVa

A Chikusetsusaponin IVa (Figura 5) é uma saponina bidesmosídica constituída de dois resíduos sacarídicos: Glc e GlcA. Possui um ácido oleanólico como sua aglicona, pertencente ao grupo dos oleananos. Essa saponina tem sido estudada em busca de possíveis atividades biológicas, como anti-herpética (Rattanathongkom *et al*, 2009), visto que o ácido oleanólico (e derivados sintéticos) possui diversas atividades já identificadas (Liu, 2005), tais como, antitumoral (Liby *et al*, 2007), anti-inflamatória (Suh *et al*, 1998; Liby *et al*, 2007), anti-ulcerante (Farina *et al*, 1998) e hepatoprotetora (Liu, 1995).

Chikusetsusaponin IVa

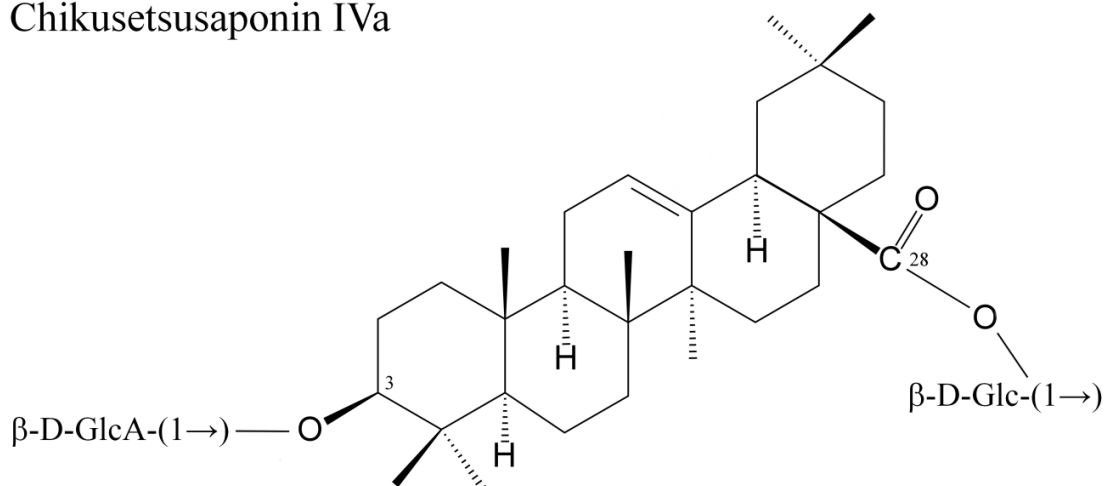


Figura 5. Estrutura da saponina Chikusetsusaponin IVa.

1.2.3 *Quillaja Saponaria* - 21 (QS-21)

A QS-21 (Figura 6) é uma saponina bidesmosídica constituída de dois oligossacarídeos, uma cadeia acila e um ácido quiláico (aglicona), pertencente ao grupo dos oleananos. O oligossacarídeo ligado a C3 do triterpeno é composto por resíduos de Xil, Gal e GlcA. O oligossacarídeo ligado a C28 do triterpeno é constituído por resíduos de Fuc, Ram, Xil e Api ou Xil, numa proporção quase duas vezes mais prevalente para Api. A cadeia acila está ligada a C4 ou C3 do resíduo de Fuc, sendo estes dois isômeros chamados QS-21A e QS-21B, respectivamente, numa proporção de 20:1. (Jacobsen *et al*, 1997) No final desta cadeia acila há mais um monossacarídeo ligado, um resíduo de Ara.

Esta saponina possui uma atividade imunoadjuvante bem caracterizada (Newman *et al*, 1992), além de diversos teste clínicos (Adams *et al*, 2010) para diferentes tipos de câncer como melanoma (Ragupathi *et al*, 2000, Ragupathi *et al*, 2003), mama (Gilewski *et al*, 2001), pulmão (Krug *et al*, 2004) e ainda infecções como malária (Kester *et al*, 2007), HIV (Evans *et al*, 2001; Kennedy *et al*, 2008), hepatite (Vandepapeliere *et al*, 2008) e tuberculose (Garcon *et al*, 2007). Entretanto, ainda residem alguns problemas no seu uso como imunopotenciador, sendo o principal desses sua instabilidade química, uma vez que ocorre hidrólise espontânea de sua cadeia acila e, como consequência, diminuição substancial de sua propriedade imunoadjuvante. Contudo, as moléculas de QS-21 agregam, formando micelas, a partir de uma concentração micelar crítica de $51 \pm 9 \mu\text{g/mL}$, possivelmente caracterizando uma formação que possui menor área acessível ao solvente para as ligações ésteres

envolvendo os resíduos de Fuc e suas Acilas. Como consequência, ocorre redução na solvatação da ligação éster entre o resíduo de Fuc e Acila, o que irá aumentar sua resistência à perda de atividade pela proteção da Acila.

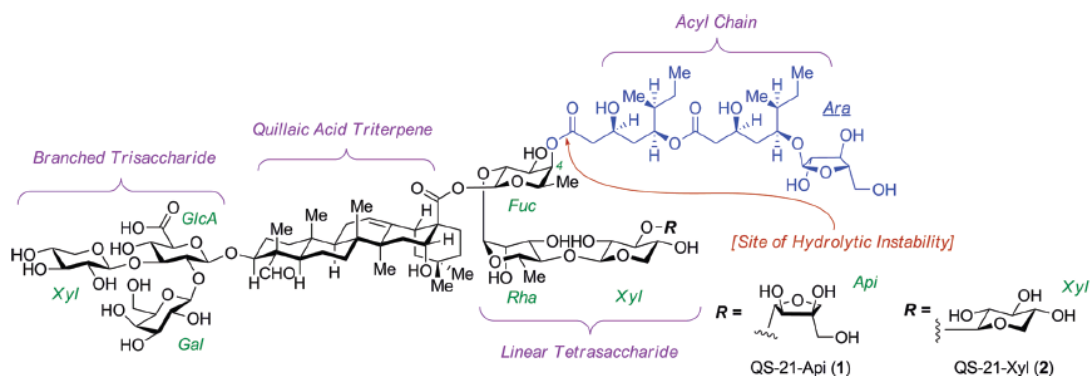


Figura 6. Estrutura da saponina QS-21 (Adams *et al*, 2010), com detalhamento das cadeias presentes, tanto a parte sacarídica como a cadeia acila, com destaque para a ligação éster onde ocorre a hidrólise espontânea.

1.3 A dinâmica molecular e a modelagem molecular de biomoléculas.

A dinâmica molecular (DM) constitui-se em uma abordagem computacional na qual a lei do movimento de Newton é empregada na geração de sucessivas configurações de um determinado sistema molecular (Leach, 2001). A trajetória dos átomos é definida por um conjunto de forças agindo sobre cada partícula e sua respectiva massa. Tal sucessão de coordenadas permite-nos acessar informações, em nível atômico, sobre o comportamento molecular em um determinado meio ou solução, incluindo sua conformação ou evento conformacional (Leach, 2001).

As forças inter-atômicas em uma simulação de DM são calculadas através da mecânica clássica. O conjunto de equações descrevendo tais forças é denominado Campo de Força e, por sua base na mecânica clássica ou mecânica molecular, ignora os elétrons do sistema, considerando somente a posição dos núcleos dos átomos. Através da inclusão no campo de força de termos para descrição de ângulos de diedro, ângulos de ligação, estiramento de ligações, forças de Coulomb e potenciais de Lennard-Jones, (Scott, 1999) os métodos de mecânica molecular muitas vezes proporcionam resultados capazes de reproduzirem com elevada fidelidade o comportamento de moléculas de interesse biológico ou terapêutico.

1.4 Os carboidratos e o estudo conformacional de saponinas.

A conformação que é adotada por um determinado ligante constitui-se em um dos principais determinantes de sua interação com um potencial receptor-alvo e, por conseguinte, em sua atividade biológica e/ou farmacológica. Assim, a caracterização conformacional de uma determinada molécula é um importante passo para a compreensão dos determinantes moleculares para sua ação em seres vivos. No caso das saponinas, este tipo de estudo é dificultado por diversos aspectos, como na identificação dos carbonos das ligações interglicosídicas (Simões *et al*, 2000), na elevada flexibilidade da parte sacarídica, dificuldade de cristalização e obtenção de sinais de Efeito Overhauser Nuclear (NOE) suficientes para uma elucidação de sua estrutura 3D (Woods *et al*, 1998; Imberty *et al*, 2000). Considerando-se que a porção sacarídica de saponinas frequentemente é fundamental para conferir a atividade biológica do composto (Augustin *et al*, 2011), pode-se evidenciar o potencial impacto de técnicas capazes de contribuir neste tipo de estudo.

Uma das principais abordagens para elucidação estrutural e conformacional de saponinas envolve técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em solventes não-aquosos, como a piridina, diferentemente do ambiente fisiológico. Entretanto, apesar de essa técnica poder identificar uma estrutura 3D, as coordenadas atômicas assim obtidas constituem-se em uma média dos estados conformacionais da molécula na solução onde o experimento foi realizado, o que pode não apresentar qualquer relevância biológica, funcional ou mesmo conformacional. Além disso, há dificuldade na caracterização dos sinais de NOE, principalmente devido ao fato de que os carboidratos possuem grande flexibilidade, o que acarretará em uma coleção conformacional complexa, com possibilidade de coexistência de múltiplos confôrmeros em uma determinada solução, uma pequena quantidade de contatos observados (gerando dados com menor confiabilidade) e a possibilidade da existência de conformações virtuais, médias, não-fisicamente presentes. (Woods *et al*, 1998). Em contrapartida, o emprego de técnicas de cristalografia de raios-X apresenta outros desafios, como dificuldades na cristalização da amostra devido à elevada flexibilidade dos carboidratos. (Woods *et al*, 1998)

Neste contexto, o uso de ferramentas de bioinformática e modelagem molecular pode propiciar índices de mais de 90% de fidelidade na reprodução de dados experimentais de RMN (Fernandes *et al*, 2010). Particularmente as simulações de DM

foram demonstradas como capazes de fornecerem condições de descrever e prever as conformações de diversas moléculas, como saponinas e outros glicoconjugados (Pol-Fachin e Verli, 2008; Pol-Fachin *et al*, 2010), oferecendo auxílio para a compreensão da estrutura e função de biomacromoléculas.

2 Objetivos

A partir do exposto, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar conformacionalmente em solução as seguintes saponinas: Erucasaponina A, Estelatosídeo B, *Chikusetsusaponin* IVa e QS-21, produzindo modelos teóricos tridimensionais respaldados por dados experimentais prévios. Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram traçados:

- Construção de modelos atomísticos para as saponinas Erucasaponina A, Estelatosídeo B, *Chikusetsusaponin* IVa e QS-21;
- Análise da flexibilidade de cada ligação glicosídica nestes compostos, em água ou piridina (Erucasaponina A e Estelatosídeo B), possibilitando a identificação dos respectivos estados conformacionais majoritários;
- Validação destes estados majoritários através de dados de NOE previamente descritos na literatura (Erucasaponina A e Estelatosídeo B);
- Caracterização da formação espontânea de micelas em solução (QS-21).

3 Metodologia

A construção de estruturas glicosídicas neste trabalho seguiu abordagem previamente desenvolvida 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). Esta estratégia emprega os estados conformacionais mais prevalentes em solução para unidades dissacarídicas como geometrias de partida para construção de glicoconjugados e glicanas complexas, conforme validado previamente (Becker *et al*, 2007; Pol-Fachin *et al*, 2009; Castro *et al*, 2009; Pol-Fachin *et al*, 2010).

Por fim, estes modelos iniciais são refinados através de simulações de DM de forma a permitir a observação de interações inter-resíduo e com o solvente circundante.

Para tal, torna-se necessária a construção de topologias para as moléculas em estudo, inexistentes no campo de força empregado. Em seguida, estas topologias são empregadas na construção de mapas de contorno relaxados e, por fim, nas simulações de DM, conforme detalhado abaixo.

3.1 Construção de topologias

As moléculas foram construídas fazendo uso da metodologia de building blocks, que consiste na construção dos compostos por suas menores unidades, neste caso, dissacarídeos, monossacarídeo-triterpeno e monossacarídeo-Acila. Essas porções foram construídas utilizando o software MOLDEN (Schaftenaar e Noordik, 2000) e foram submetidas ao servidor PRODRG (Schuettelkopf e van Aalten, 2004) de onde foram retiradas a topologia e as coordenadas atômicas. Essas topologias, por sua vez, receberam ajustes no que diz respeito a cargas, utilizando as cargas de Löwdin na base HF/6-31** de trabalhos prévios (Becker *et al*, 2005) ou calculadas em alguns casos (item 3.2). Além disso, foram adicionados diedros próprios e impróprios, os quais são ângulos de torção entre quatro átomos em seqüência ou não, respectivamente, visando obter simulações mais estáveis e manter a orientação pré-determinada dos estados conformacionais encontrados nos sacarídeos relativos a este trabalho (1C_4 , 4C_1 , E_3 , 4T_3). O solvente piridina teve sua topologia construída (Apêndice 9.1) tendo como base parâmetros e cargas presentes no campo de força GROMOS96 43a1 (van Gunsteren *et al*, 1996) para o aminoácido de fenilalanina.

A obtenção da descrição conformacional das porções estudadas foi realizada a partir da rotação dos ângulos de torção das ligações glicosídicas entre -180° e 180° em

passos de 30°, onde restrições aos ângulos ϕ e ψ foram aplicadas no processo de minimização de energia, objetivando a exploração do espaço conformacional para cada ligação glicosídica das unidades (Pol-Fachin e Verli 2008; Castro *et al.*, 2009). Esse passo permitiu a geração de 144 confôrmeros possíveis, que foram submetidos a uma dinâmica molecular por 20ps a 10K com tempo de integração de 0,5 fs, otimizando a busca de conformações de menor energia. A energia encontrada em cada confôrmero foi utilizada na construção de mapas de contorno relaxados que descrevem as conformações de menor energia das ligações glicosídicas.

3.2 Cálculos *ab initio*

Os cálculos *ab initio* foram realizados utilizando o software GAMESS (Gordon *et al.*, 1993), para que fosse possível obter cargas de Löwdin na base de HF/6-31**. Foram calculadas as cargas para o grupamento metil-éster do MeGlcA, para a ligação (1→28) entre os triterpenos de todas as saponinas, com exceção do Estelatosídeo B, para o grupamento aldeído ligado a C4 no ácido quillaíco e para a Acila.

3.3 Simulações por dinâmica molecular

As simulações por dinâmica molecular foram aplicadas em diversos procedimentos. A caixa de piridina foi construída e submetida a uma simulação de 0,1 μ s em 310 K para estabilizar o sistema. Na busca por uma possível conformação do bloco formado pela Fuc, Acila e Ara na saponina QS-21, esse foi submetido a uma simulação de 0,1 μ s a 310 K também. Ainda relacionado a essa saponina, a DM foi empregada para observar o processo de formação micelar. Além disso, os confôrmeros identificados nas regiões de mínimo de energia, obtidos a partir dos mapas de contorno, bem como as saponinas completas (Apêndices 9.2 a 9.5), foram submetidos à simulação de DM em piridina (no caso da Erucasaponina A e Estelatosídeo B) e em solvente aquoso (todos – modelo SPC) (Berendsen *et al.*, 1987). Nessas simulações foram utilizadas caixa cúbicas solvatadas com condições periódicas de contorno, sendo que contra-íons (Na^+) foram adicionados quando necessário para neutralizar o sistema. O método de LINCS (Hess *et al.*, 1997) foi aplicado para manter a distância das ligações covalentes, assim permitindo tempos de integração de 1 fs para a piridina e 2 fs para solvente aquoso após a primeira minimização usando algoritmo *Steepest Descent* (descida íngreme). Para os cálculos de interações eletrostáticas, o método de Partículas de Mesh-Ewald (Darden *et al.*, 1993) foi utilizado. A temperatura e a pressão foram

mantidas constantes por acoplamento de carboidratos, triterpenos, acila, saponinas, íons e solventes a banhos de temperatura e pressão com constantes de acoplamento de $\tau = 0,1$ and $0,5$ ps, (Berendsen *et al*, 1984) respectivamente. A constante dielétrica foi de $\epsilon = 1$ e todos os sistemas foram aquecidos lentamente de 50 a 310 K, em passos de 5 ps, aumentando a temperatura de referência em 50 K por passo. Por fim, as simulações foram estendidas até $0,1 \mu\text{s}$ a temperatura constante de 310 K.

3.4 Validação

Como forma de comparação, foram utilizados os contatos de NOE inter-resíduos provenientes da literatura (Okazaki *et al*, 2007) para a validação da estrutura da Erucasaponina A e do Estelatosídeo B. No caso da QS-21, as dimensões da micela elipsoidal retirados da literatura (Teixeira *et al*, 2010) servem como comparação para validar o sistema observado.

No caso da caixa de piridina, dois parâmetros físico-químicos foram utilizados para a validação: a densidade (d) e a entalpia de vaporização (ΔH_{vap}). A ΔH_{vap} foi calculada a partir da fórmula:

$$\Delta H_{\text{vap}} = E_{\text{pot}(g)} - E_{\text{pot}(i)} + R.T$$

Onde $E_{\text{pot}(g)}$ corresponde a energia potencial de uma molécula de piridina no vácuo e $E_{\text{pot}(i)}$ é calculado como $\frac{\text{Energia potencial}_{\text{caixa}}}{\text{número de moléculas}}$.

4 Resultados

O presente trabalho foi organizado em três partes:

- ⇒ Caracterização conformacional das saponinas Erucasaponina A e Estelatosídeo B, em piridina, e posterior comparação dos dados obtidos com dados experimentais de RMN, indicando sinais de NOE ao redor das ligações glicosídicas dos compostos, como ferramenta de validação da metodologia de construção de modelos atomísticos para as saponinas em solução;
- ⇒ Após a etapa inicial de validação da metodologia, aplicação da mesma estratégia na caracterização conformacional da saponina Chikusetsusaponin IVa, para a qual não existem dados prévios de RMN descrevendo sua estrutura 3D;
- ⇒ Por fim, construção da estrutura 3D da saponina QS-21 e, a partir desta estrutura, obtenção de um modelo para as micelas formadas por esta saponina em solução aquosa.

4.1 Parte I: *Erucasaponina A e Estelatosídeo B*

A revista escolhida para submissão deste trabalho, em forma de Nota (*Note*) foi o *Journal of Natural Products*. Sob a abreviação *J. Nat. Prod.*, a revista teve seu primeiro ano de publicação em 1938, em língua inglesa, ainda sob nome de *Lloydia* pelo *Lloyd Librarian and Museum*, em Cincinnati, Ohio. A partir de 1961, começou a ser publicado pela *American Society of Pharmacognosy* e, em 1978, mudou o nome para o atual *Journal of Natural Products*. Em 1996, a *American Society of Pharmacognosy* começou a co-publicar a revista em parceria com a *American Chemical Society (ACS)*. Os temas de foco da revista incluem contribuições para a química e a bioquímica de compostos de origem natural ou para a biologia dos organismos de onde foram obtidos os compostos. Especificamente:

- Metabólitos secundários de microorganismos como antibióticos e micotoxinas;
- Compostos bioativos de plantas marinhas e terrestres;
- Estudos bioquímicos, incluindo biossíntese e transformações microbiológicas;
- Fermentação e cultura tecidual de plantas;
- Isolamento, elucidação estrutural e síntese química de novos compostos naturais;
- Farmacologia de compostos naturais.

Esse periódico teve índice de impacto, em 2010, de 2,872 e 16.840 citações (*Journal Citation Reports®*, 2010, Thomson Reuters, 2011). Suas publicações incluem artigos de pesquisa, notas, comunicações, revisões e revisões de livros.

Conformational characterization of *Stenocereus eruca* saponins in aqueous and non-aqueous solvents

Conrado Pedebos[†], Laercio Pol-Fachin[†] and Hugo Verli^{†}.*

[†]Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av Bento Gonçalves 9500,
CP 15005, Porto Alegre 91500-970, RS, Brazil

*Corresponding Author. TEL.: +55 51 3308 7770; fax: +55 51 3308 7309. Email address:
hverli@cbiot.ufrgs.br (H. Verli)

Saponins may present many biological activities, but their 3D structure is usually determined in non-aqueous solvents. This work aims to analyze, through molecular dynamic (MD) simulations, saponins conformation, flexibility and interactions in pyridine and water, evaluating the methodology capability to reproduce and predict their conformational ensemble. Saponins glycosidic linkages were described by energy contour plots and further refinements by solution MD simulations. The results agree with previous NOESY distances in pyridine, allowing the characterization of saponins glycosidic linkages geometry and flexibility. Such data indicate that MD simulations could describe and predict glycoconjugates conformation.

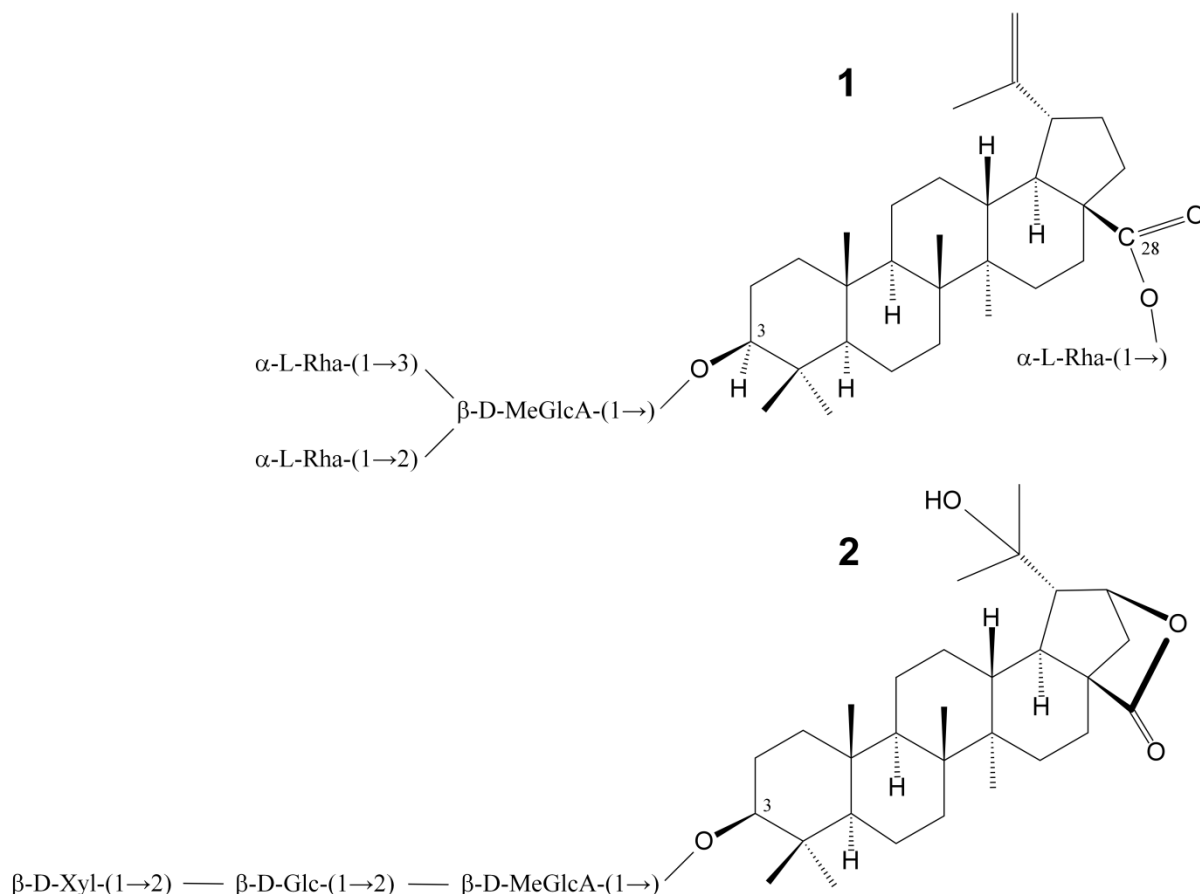
Keywords: *Stenocereus eruca*; Saponins; Molecular Dynamics; Pyridine; building blocks.

Saponins are glycosides generally derived from plants, composed by an aglycone portion (triterpene or steroid - hydrophobic), containing one or several saccharide chains (hydrophilic). Such compounds have been shown to present many properties of pharmacological interest, such as antitumoral, antiviral, anti-inflammatory, antinociceptive and antithrombotic actions.¹ Erucasaponin A (**1**) and Stellatoside B (**2**) are two saponin representatives, extracted from *Stenocereus eruca*, a member of the *Cactaceae* family, endemic to the Sonoran desert, located at the province of Baja California Sur, Mexico.² Although not shown to present any of the above mentioned activities in their complete forms, the Erucasaponin A pentacyclic lupane-type triterpene, betulinic acid, has demonstrated an anti-HIV-1 activity,³ and cytotoxicity against some tumor cell lines.⁴ Additionally, this triterpene displays anti-malarial,⁵ antimicrobial⁶ and anti-inflammatory activity,⁷ among others.³

For identifying the interactions responsible for the above mentioned activities, a reasonable conformation for such ligands, obtained from the characterization of their solution conformational ensemble, is required.⁸ In this context, saponins structures are mainly identified by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) methods, from which their conformation may also be inferred, if a reasonable amount of NOE contacts are obtained.⁹ However, due to the high flexibility of their linked carbohydrate chains,⁹⁻¹¹ and the multiple conformers co-existing in solution for such molecules,^{9,11-15} it is still hard to characterize glycans NOE contacts. Additionally, the environment in which the NMR experiments are usually carried out do not correspond to that of physiological solutions, as for *Stenocereus eruca* saponins,¹⁶ studied in pyridine.

Based on this information, the search for new approaches to contribute in the elucidation of ligands solution conformational ensemble is required. In this context, MD simulations have been shown as capable of describing biomolecules profile in conditions mimicking both aqueous^{17,18} and non-aqueous solvents.^{19,20} Therefore, the present work aims to analyze and characterize, at the atomic level, Erucasaponin A (**1**) and Stellatoside B (**2**) molecular properties, flexibility and interactions in a non-aqueous solvent (pyridine) through MD simulations. Such data was compared to their profile

observed from NMR, namely, inter-residue NOE contacts. Also, two models for these saponins were proposed in aqueous solvent, thus bringing insights on its conformational pattern in a physiological environment.



As saponin structures are usually assessed by NMR methods in non-aqueous solutions, a pyridine box was built and simulated in order to mimic the environment in which Erucasaponin A and Stellatoside B were studied¹⁶. Only a small number of works have previously simulated similar systems,²¹ but making usage of other force fields. Therefore, a MD simulation of 0.1 μs was performed in 310 K to stabilize the box. The physical chemistry parameters chosen in the comparison were the enthalpy of vaporization (ΔH_{vap}) and density (d) of the system. The ΔH_{vap} was calculated using the following equation:

$$\Delta H_{\text{vap}} = E_{\text{pot(g)}} - E_{\text{pot(l)}} + R.T$$

Where $E_{\text{pot(g)}}$ is the potential energy of a single pyridine molecule in the vacuum and $E_{\text{pot(l)}}$ was calculated as $\frac{\text{Potential Energy}_{\text{box}}}{\text{number of molecules}}$. From the obtained results (Table 1), quoted in *kJ/mol* and described with standard deviation, indicated that the density values were in good agreement with experimental data,²² while the enthalpy of vaporization was slightly underestimated.

Table 1. Experimental and theoretical data for pyridine.

Parameter	Experimental	Theoretical
d^a	0,9819	0,9835 ($\pm 0,007$)
ΔH_{vap}^b	40,2	33,325 ($\pm 4,023$)

^a Density in g/mL.

^b Enthalpy of vaporization in kJ/mol.

Based on Erucasaponin A and Stellatoside B structures, seven glycosidic linkages were studied. The energy contour plots generated for such compounds (Figure 1) indicate that multiple minimum energy conformations may co-exist, especially in the saccharidic portions because of their higher flexibility. The data demonstrated in the contour plots also indicates that the conformational ensemble adopted by the molecule is more strongly influenced by its glycosidic linkage pattern, such as (1→2), (1→3), than by the residues involved in the compound, as small variations may occur, but the main minimum-energy conformations still remain within similar geometries. In addition, the presence of an explicit solvent (pyridine) showed a discrete effect in comparison with the conformational general ensemble in vacuum, thus mostly populating geometries around their vacuum minimum energy regions, with only minor exceptions (Fig 1B and 1F). Also, a comparison regarding the most populated geometries around each glycosidic linkage, in their isolated forms and composing the complete saponins, was performed (Table 2). A few small fluctuations may be observed, as in Glc - MeGlcA glycosidic linkage Psi (ψ) angle that belongs to Stellatoside B saponin and in MeGlcA - BetA glycosidic linkage Phi (ϕ) angle that belongs to Erucasaponin A.

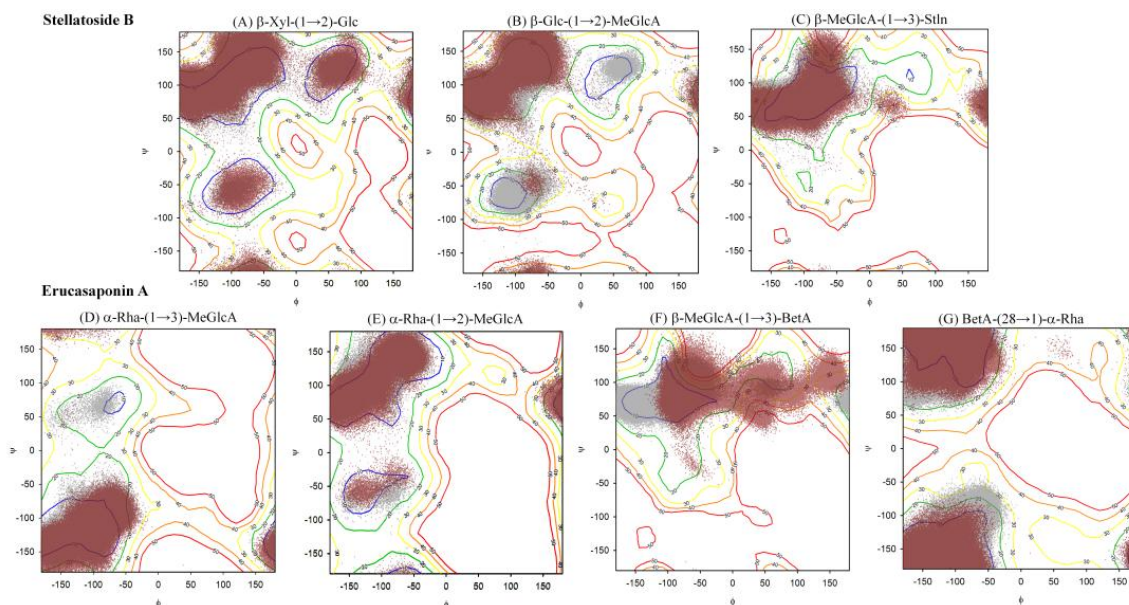


Figure 1. Contour plots of the disaccharides composing Stellatoside B (A-C) and Erucasaponin A (D-G). The energy maps are shown at every -10 kJ/mol, from -10 to 50 kJ/mol and, superimposed, are the geometries population in solution as isolated disaccharides (gray dots) and composing the complete saponin, extracted from the 0.1 μ s MD simulations.

Table 2. Comparison of the dihedral angles of Stellatoside B and Erucasaponin A glycosidic linkages in its isolated units and complete patterns obtained from MD simulations data.

Saponin	Glycosidic Linkage	Dihedral angle ($^{\circ}$)			
		Isolated		Complete	
		ϕ	ψ	ϕ	ψ
Stellatoside B	β -D-Xyl-(1 \rightarrow 2)-Glc	-81(\pm 53)	119(\pm 32)	-80(\pm 64)	120(\pm 41)
	β -D-Glc-(1 \rightarrow 2)-MeGlcA	-98(\pm 42)	91(\pm 66)	-102(\pm 30)	127(\pm 28)
	β -D-MeGlcA-(1 \rightarrow 3)-Stell	-108(\pm 34)	85(\pm 22)	-120(\pm 37)	69(\pm 17)
Erucasaponin A	α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)-MeGlcA	-107(\pm 36)	-109(\pm 30)	-111(\pm 37)	-120(\pm 25)
	α -L-Rha-(1 \rightarrow 2)-MeGlcA	-111(\pm 42)	108(\pm 40)	-142(\pm 39)	92(\pm 30)
	β -D-MeGlcA(1 \rightarrow 3)-BetA	-108(\pm 36)	85(\pm 21)	-52(\pm 39)	88(\pm 16)
	α -L-Rha (1 \rightarrow 28)-BetA	-131(\pm 49)	-159(\pm 31)	-105(\pm 38)	-157(\pm 29)

Both molecules presented in this work had their structure previously characterized by NMR-spectroscopy. The interresidue NOE contacts, derived from such methods, were used in the validation of the obtained conformational ensemble from MD simulations. For Erucasaponin A, the contacts depicted are between H1 (Rha1) and H3 (MeGlcA), H1 (Rha2) and H2 (MeGlcA) and H1 (MeGlcA) and H3 (BetA). As for Stellatoside B, experimental data demonstrated that no NOE contacts existed between hydrogen atoms from different monossacharides, however, we were able to observe contacts between H1 (Xyl) and H2 (Glc), H1 (Glc) and H2 (MeGlcA) and H1 (MeGlcA) and H3 (Stln). Possibly, the high flexibility of the saccharidic residues from Stellatoside B may be the main reason that these contacts were not depicted experimentally. The so obtained results for Erucasaponin A and Stellatoside B (Table 3) demonstrated good agreement with experimental data, as shown in *Okazaki et al.*, thus the methodology applied in the 3D characterization of these two saponins made possible the identification and characterization of the NOESY signals as in RMN determination.

Table 3. Comparison between NOE contacts of Erucasaponin A and the inter-proton distances identified derived from MD simulations.

Saponin	Proton of residue 1	Proton of residue 2	Inter-proton distance from MD (Å)
	Rha ¹ H1 ^a	MeGlcA H3	2.105 ± 0.41
Erucasaponin A	Rha ² H1 ^a	MeGlcA H2	2.203 ± 0.36
	MeGlcA H1	BetA H3	2.361 ± 0.37

^a Rha¹ corresponds to α -Rha-(1→3)-MeGlcA linkage, while Rha² corresponds to α -Rha-(1→2)-MeGlcA linkage.

The conformational profile of the carbohydrates residues is connected to the behavior of its glycosidic linkage. So, in order to evaluate properly the possible conformations adopted by the molecules, a description of the most populated geometries of each glycosidic linkage was performed (Fig. 2) for both compounds and both models (pyridine and water). The aqueous solution provided no

significant differences in their conformation, when compared to the pyridine solvation. On the other hand, Stellatoside B appeared to present a higher flexibility pattern than Erucasaponin A, as variations on their conformational profile, along with larger standard deviations in average glycosidic linkage geometries, could be noticed. Additionally, the pyridine solvent was also capable of allowing a higher flexibility, since the geometries distribution in this solvent demonstrated the existence of additional conformational states, absent in water, as perceived on Phi (ϕ) and Psi (ψ) distributions of β -Xyl-(1 \rightarrow 2)-Glc, β -Glc-(1 \rightarrow 2)-MeGlcA and β -MeGlcA-(1 \rightarrow 3)-BetA and on Phi (ϕ) distribution of β -MeGlcA-(1 \rightarrow 3)-Stln.

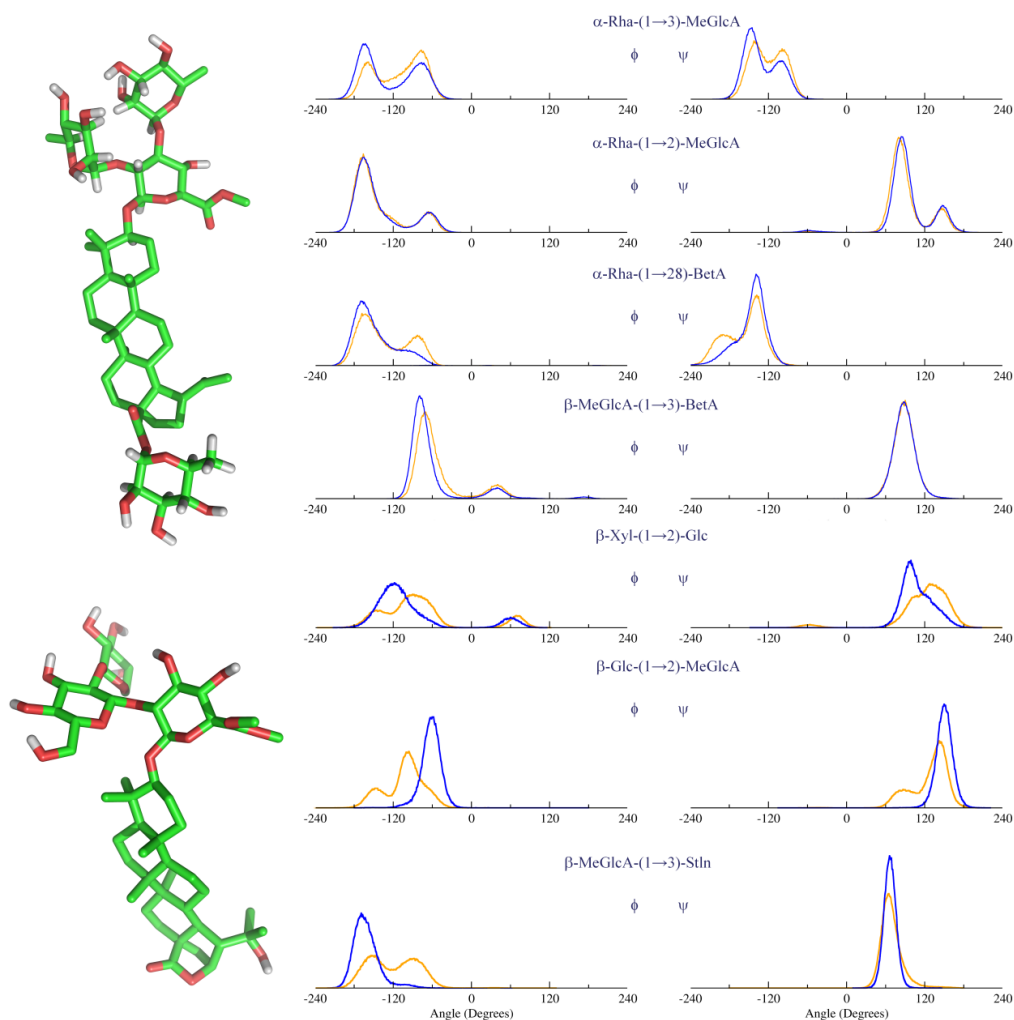


Figure 2. Distribution of the Phi (ϕ) and Psi (ψ) dihedral angles associated with the glycosidic linkages composing Erucasaponin A and Stellatoside B, respectively. The non-aqueous solution (pyridine) is indicated in orange, while the aqueous solution is represented in blue.

The influence of a solvent in different types of compounds is one of the applicabilities of molecular modeling, playing a crucial role in their interactions with target receptors, similarly occurring to the conformation adopted by these molecules. Unfortunately, the characterization of saponins is not a simple process, demanding the use of high field NMR spectroscopy.^{23,24} However, the saccharidic portion always remained as a challenge, due to its high flexibility, among other factors, which is a main difficulty on the crystallization process and may induce the presence of virtual conformations in NMR techniques.⁹ In this context, MD simulations emerge as promising, fast and low-cost tools aiming to describe and predict the conformational ensembles adopted by carbohydrates, as previously described by our group.^{11,15,25-31} The pyridine solvent box showed matching parameters with experimental data, indicating that a non-aqueous solvent, in this case, pyridine, could be developed and may be used in future experiments. Also, the contour plots allowed the identification of minimum-energy conformations for each glycosidic linkage studied, and generated starting structures for proper explicit solvent simulations. The complete compounds could be also evaluated, and the employed methodology was capable of reproducing the NOESY signals observed for them in pyridine solvent. This data suggests that microsecond-long MD simulations, employing GROMOS96 43a1 force field³² added by Löwdin HF/6-31G**, are capable of describing the conformational profile variants of molecules,³³ supporting the construction of their three-dimensional structures and the depiction of their conformational ensembles. Moreover, the present data may indicate that the characterization and prediction of NOE contacts of such compounds may be a possible application in the molecular modeling field. In addition, the models constructed in water for both saponins indicate the possible physiological environment conformation for each molecule. Although no experimental data is available for permitting a detailed comparison, the presented methodology and analysis could give support to the predictive potentiality observed in this work and may be extrapolated, thus supporting future research of more saponins either in aqueous or non-aqueous solvents.

Experimental Section

Nomenclature, topologies and software. The IUPAC recommendations and symbols of nomenclature³⁴ were adopted. The orientation of two contiguous carbohydrate residues, or a monosaccharide and a triterpene, was properly described with their glycosidic linkage torsional angles. For a (1→X) linkage, where “X” is “2”, “3” or “28” for the (1→2), (1→3) or (1→28), respectively, the angles Phi (ϕ) and Psi (ψ) are defined as shown in 1 and 2:

$$\phi = \text{O5-C1-O1-CX} \quad (1)$$

$$\psi = \text{C1-O1-CX-C(X - 1)} \quad (2)$$

For a (1→28) linkage, Omega (ω) is defined as below:

$$\omega = \text{O28A-C28-C17-C16} \quad (3)$$

The topologies for saccharides and triterpene have been generated by PRODRG server.³⁵ Structures were manipulated using VMD,³⁶ PyMOL³⁷ and MOLDEN.³⁸ All MD simulations were performed using GROMACS simulation suite, version 3.3.3,³⁹ and GROMOS96 43a1 force field, as well as the subsequent analyses.

Building blocks and topologies construction

In order to obtain reasonable starting structures for the saponins conformational studies under explicit solvent MD simulations, the building blocks methodology⁴⁰ was applied. Namely, each compound was constructed based on the most prevalent geometries of its minimal components (disaccharides or linkages between a monosaccharide and a triterpene). Accordingly, all of such units were constructed using the MOLDEN software and submitted to PRODRG server to obtain their crude topologies and atomic coordinates. Additional refinements were added on such topologies, including HF/6-31**,-derived Löwdin atomic charges, as obtained from previous works,²⁶ or calculated, in the case of the methyl-ester (C6 = 0.290, O6 = -0.225, O6A = -0.300 and C7 = 0.235) and the (1→28) linkage (C17 = -0.084, C28 = 0.393, O28A = -0.303, O28B = -0.292 and C1 = 0.286) atomic charges, as well as proper and improper dihedrals (torsion angles between four atoms

bonded in sequence and non-bonded, respectively) were added following the methodology previously described in group's work,^{11,15,25-31} whose main focus, for the improper dihedrals, was to maintain the conformational states 1C_4 for all L-rhamnose (Rha) sugars and 4C_1 for D-xylose (Xyl), D-glucose (Glc) and D-glucuronic acid methyl ester (MeGlcA) sugars⁴¹ and, for the proper dihedrals, to support stable simulations. Moreover, the pyridine topology was constructed based on the parameters and charges presented in GROMOS96 43a1 force field for phenylalanine.

Contour Plots.

A conformational description for each minor portion composing the studied saponins was obtained by rotating their glycosidic linkage torsion angles between -180° and 180° , in steps of 30° , thus generating 144 conformers for each. This calculations were performed using a constant force which restricts the ϕ and ψ proper dihedrals in the energy minimization process, allowing the exploration of conformational space associated to the block's given linkage.^{29,30} The minimized output conformations were further submitted to a series of MD simulations for 20 ps at 10 K, with an integration step of 0.5 fs, thus improving the search for minimum-energy conformations. The relative stability of each conformer was used for constructing the relaxed contour plots that described each glycosidic linkage conformation.

MD Simulations.

The geometries identified as the minimum-energy conformations obtained in the energy contour plots, as well as the complete saponin models, were employed as starting conformations for MD simulations in pyridine and aqueous solutions in a solvated cubic box using periodic boundary conditions, together to pyridine solvent, as developed in the present study, or SPC water model,⁴² respectively. Counter ions (Na^+) were used to neutralize the system, if necessary. To constrain covalent bond lengths, the Lincs method⁴³ was applied, therefore allowing an integration step of 1 fs for the pyridine system or 2 fs for the aqueous system after a first energy minimization by using Steepest Descents algorithm. The Particle Mesh Ewald method⁴⁴ was used in the calculation of

electrostatic interactions. Temperature and pressure were kept constant by coupling carbohydrates, triterpenes, saponins, ions and solvent to external temperature and pressure baths with coupling constants of $\tau = 0.1$ and 0.5 ps,⁴⁵ respectively. The dielectric constant used was $\epsilon = 1$. All systems were heated slowly from 50 to 310 K, in steps of 5 ps, increasing the reference temperature by 50 K, being further extended up to $0.1 \mu\text{s}$ under the constant temperature of 310 K.

NOESY signals.

The calculations performed in this work are based on a united-atom force field, which significantly reduces computational costs,⁴⁶ thus allowing faster simulations with longer time scales. Therefore, in order to allow the comparison of previous experimental data (NOE contacts)¹⁶, obtained in pyridine, with the presented findings, non-polar hydrogen atoms were added to frames retrieved from the non-aqueous solvent trajectories, at every 10 ns for each saponin. The expected hybridization and geometries for these atoms were respected and the final models, containing hydrogen atoms, were used to obtain the average inter-atomic distances used for comparison to the available NOESY signals data.

Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq #420015/2005-1 and #472174/2007-0), MCT, by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), MEC, Brasília, DF, Brazil and by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

References

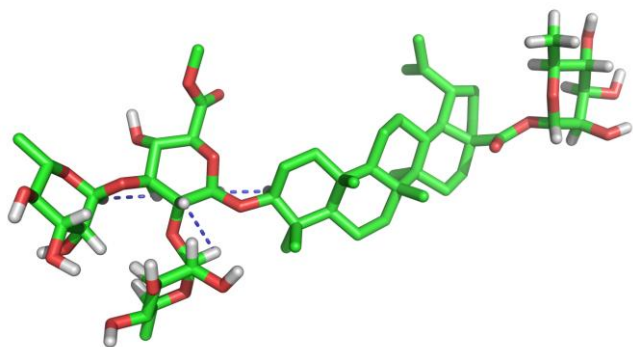
- (1) Mauricio, I.; Francischetti, B.; Monteiro, R. Q.; Guimarães, J. A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *235*, 259-263
- (2) Clark-Tapia, R.; Mandujano, M. C.; Valverde, T.; Mendoza, A.; Molina-Freaner, F. *Bio Con.* **2005**, *124*, 123-132.
- (3) Fujioka, T.; Kashiwada, Y.; Kilkusie R. E.; Cosentino, L. M.; Ballas, L. M.; Jiang, J. B.; Janzen, W. P.; Chen, I. S.; Lee, K. H. *J Nat Prod.* **1994**, *2*, 243-7.
- (4) Cichewicz, R. H.; Kouzi, S. A. *Med. Res. Rev.* **2004**, *24*, 90-114.
- (5) Steele J. C. P.; Warhurst D. C.; Kirby G. C.; Simmonds M. S. J. *Phytother Res.* **1999**, *13*, 115–119.
- (6) Nick A.; Wright A. D.; Rali T.; Sticher O. *Phytochemistry.* **1995**, *40*, 1691–1695.
- (7) Safayhi H.; Sailer E-R.; *Planta Med.* **1997**, *63*, 487–493.
- (8) Humblet, C.; Marshall G. R. *Annu. Rep. Med. Chem.* **1980**, *15*, Chapter 28, 267–276.
- (9) Woods, R. J. *Glycoconjugate J.* **1998**, *15*, 209–216.
- (10) Dwek, R. A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683–720.
- (11) Fernandes, C. L.; Sachett, L. G.; Pol-Fachin, L.; Verli, H. *Carbohydr. Res.* **2010**, *345*, 663-671.
- (12) Cumming, D. A.; Carver, J. P. *Biochemistry.* **1987**, *26*, 6664–6676.
- (13) Wormald, M.; Petrescu, A.-J.; Pao, Y.-L.; Glythero, A.; Elliot, T.; Dwek, R. A. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 371–387.

- (14) Pérez, S.; Mulloy, B. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 517–524.
- (15) Pol-Fachin, L.; Fernandes, C. L.; Verli, H. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 491–500
- (16) Okazaki, S.; Kinoshita, K.; Koyama, K.; Takahashi, K.; Yuasa, H. *J. Nat. Med.*, **2007**, *61*, 24-29.
- (17) Giesel, G.; Lima, L.; Faberbarata, J.; Guimaraes, J.; Verli, H. *FEBS Letters*, **2008**, *582*, 3619-3624.
- (18) Pol-Fachin, L.; Fraga, C.A.M.; Barreiro, E.J.; Verli, H. *J. Mol. Graph. Mod.* **2010**, *28*, 446-454.
- (19) Gattin Z.; Schwartz J.; Mathad R. I.; Jaun B.; van Gunsteren W. F. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 6389–6398.
- (20) Srivastava K. R.; Kumar A.; Goyal B.; Durani S. *J Phys Chem B.* **2011**, *115*, 6700-6708
- (21) Ghatee, M. H.; Zolghadr, A. R.; Moosavi, F.; Pakdel, L. *J. Chem. Phys.* **2011**, *134*, 1-14.
- (22) Lide, D. R. *Handbook of chemistry and physics.* **2003**, C-462 and C-672.
- (23) Gauthier, C; Legault, J; Pichette, A. *MROC*, **2009**, *6*, 321-344
- (24) Sahu, N. P.; Achari, B. *ChemInform.* **2001**, *32*, 298.
- (25) Verli, H.; Guimarães, J. A. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 281–290.
- (26) Becker, C. F.; Guimarães, J. A.; Verli, H. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 1499–1507.
- (27) Verli, H.; Guimarães, J. A. *J. Mol. Graph. Model.* **2005**, *24*, 203–212.
- (28) Becker, C. F.; Guimaraes, J. A.; Mourao, P. A. S.; Verli, H. *J. Mol. Graph. Mod.* **2007**, *26*, 391-399.

- (29) Pol-Fachin, L.; Verli, H. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 1435–1445
- (30) 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. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 18790–18800.
- (31) Pol-Fachin L.; Serrato R. V.; Verli H. *Carbohydr Res.* **2010**, *13*, 1922-1931.
- (32) van Gunsteren, W. F.; Billeter, S. R.; Eising, A. A.; Hünenberger, 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 Zurich: Switzerland, **1996**
- (33) Landström J.; Widmalm G. *Carbohydr Res.* **2010**, *345*, 330-333.
- (34) I.U.P.A.C.-I.U.B. *Commission on Biochemical Nomenclature Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1919–2008.
- (35) Schuettelkopf, A. W.; van Aalten, D. M. F. *Acta Crystallogr., Sect. D.* **2004**, *60*, 1355–1363.
- (36) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. *J. Mol. Graphics* **1996**, *14*, 33–38.
- (37) DeLano, W. L. *The PyMOL Molecular Graphics System*; DeLano Scientific LCC: San Carlos, CA, USA, **2002**.
- (38) Schaftenaar, G.; Noordik, J. H. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2000**, *14*, 123–134.
- (39) van der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A. E.; Berendsen, H. J. C. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1701–1718.
- (40) Sant’anna et al.: *J. Mol. Struct. – Theochem.* **1999**, *490*, 167-180.
- (41) van der Spoel, D.; van Buuren, A. R.; Apol, E.; Meulenhoff, P. J.; Tieleman, D. P.; Sijbers, A. L. T. M.; Hess, B.; Feenstra, K. A.; Lindahl, E.; van Drunen, R.; Berendsen, H. J. C. *GROMACS User Manual Version 3.0*, Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands, **2001**.

- (42) Berendsen, H. J. C.; Grigera, J. R.; Straatsma, T. P. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 6269–6271
- (43) Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 1463–1472.
- (44) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089–10092
- (45) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; DiNola, A.; Haak, J. R. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684–3690.
- (46) Oostenbrink, C.; Villa, A.; Mark, A. E.; van Gunsteren, W. F. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1656–1676.

Table of contents Graphic.



4.2 Parte II: Chikusetsusaponin IVa

A partir da validação da abordagem empregada na parte anterior do trabalho, partimos para a caracterização conformacional da saponina *Chikusetsusaponin IVa*, biomolécula que possui um núcleo triterpênico com algumas atividades já caracterizadas e está sendo utilizada em estudos por *docking* ou ancoramento molecular na trombina.

Assim, a fim de caracterizar a preferência conformacional e dinâmica ao redor das ligações glicosídicas deste composto, inicialmente foram calculados mapas de contorno relaxados para as ligações β -D-GlcA-(1 \rightarrow 3)-OleA e β -D-Glc-(1 \rightarrow 28)-OleA (Fig. 7). A partir destes mapas, os respectivos mínimos de energia ($\phi = -90$ e $\psi = -150$; $\phi = -150$ e $\psi = -150$) foram submetidos a simulações por DM, na presença de moléculas de água como solvente, permitindo-nos refinar os mapas de contorno de forma a caracterizar a preferência conformacional destas ligações em solução. Em outras palavras, esta etapa nos permite identificar os estados conformacionais populados em solução por estas ligações.

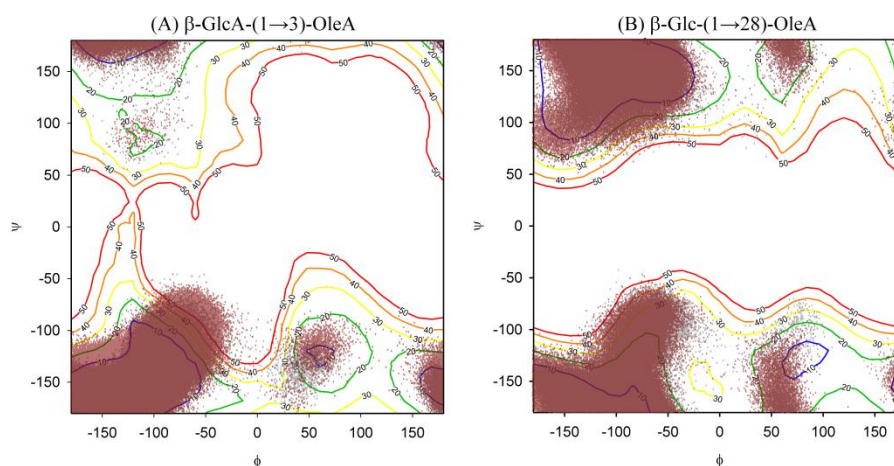


Figura 7. Mapas de contorno dos dissacarídeos que compõem a *Chikusetsusaponin IVa* (A e B). Os mapas de energia mostram as curvas a cada -10 kJ/mol, de -10 a 50 kJ/mol. As geometrias populadas em solução do dissacarídeo isolado (pontos cinza) e dos dissacarídeos na estrutura completa da saponina (pontos vermelhos), retiradas das simulações de DM, estão sobrepostas aos mapas.

De posse dos confôrmeros mais prevalentes em solução ($\phi = -90$ e $\psi = -150$; $\phi = -90$ e $\psi = -180$; Figura 8 e Tabela 2), foi possível a construção da molécula completa.

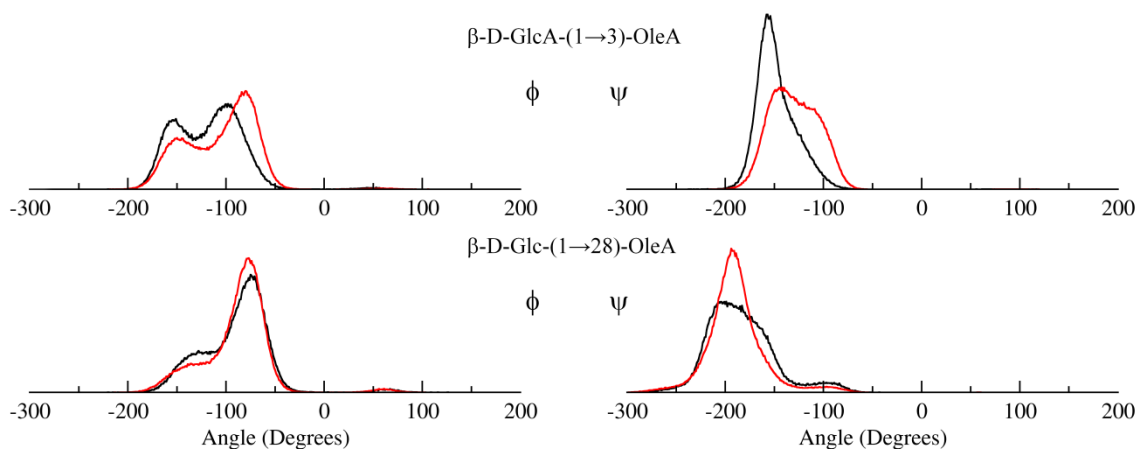


Figura 8. Distribuição dos ângulos ϕ e ψ das ligações glicosídicas presentes na saponina *Chikusetsusaponin IVa*, tanto na forma de dissacarídeo isolado (preto) como na estrutura da saponina completa (vermelho).

Table 2. Comparação dos diedros da *Chikusetsusaponin IVa* na forma de unidades isoladas e na forma completa, obtidas em simulações por DM.

Ligação glicosídica	Ângulos diedrais (°)			
	Isolado		Completo	
	ϕ	ψ	ϕ	ψ
β -D-GlcA-(1→3)-OleA	-118 (\pm 34)	-148(\pm 21)	-106(\pm 36)	-130(\pm 25)
β -D-Glc-(1→28)-OleA	-90(\pm 35)	184(\pm 36)	-90(\pm 34)	-190(\pm 29)

Esse modelo foi ainda submetido a uma nova simulação de DM por 0,1 μ s, em um refinamento final da estrutura construída (Fig. 9).

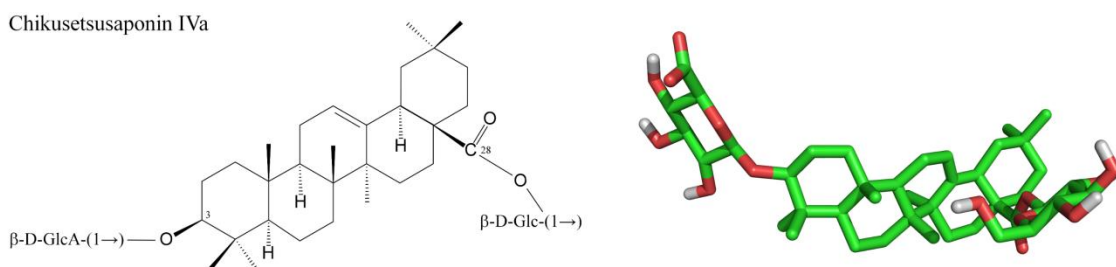


Figura 9. Estado conformacional mais abundante da saponina *Chikusetsusaponin IVa*.

4.3 *Parte III: QS-21*

A etapa final do presente trabalho envolveu a busca por um modelo para as micelas formadas em solução aquosa pela QS-21. Para tanto, inicialmente realizamos a construção de um modelo 3D para esta saponina, de acordo com a estratégia delineada anteriormente. Assim, cada ligação glicosídica da QS-21 teve sua conformação e dinâmica caracterizadas, conforme apresentado nos mapas de contorno abaixo (Fig. 10A-G). No caso dessa saponina em particular, a região da cadeia acila, somada a resíduos de Ara e a Fuc, exigiu uma abordagem diferenciada. Esta porção foi submetida a uma simulação de DM por 0,1 μ s de forma a permitir a caracterização de seu espectro conformacional em solução (Figura 10H). A partir destas informações, os estados conformacionais mais prevalentes em solução foram identificados (Figura 11 e Tabela 3) e utilizados na construção da molécula como um todo (Figura 10I).

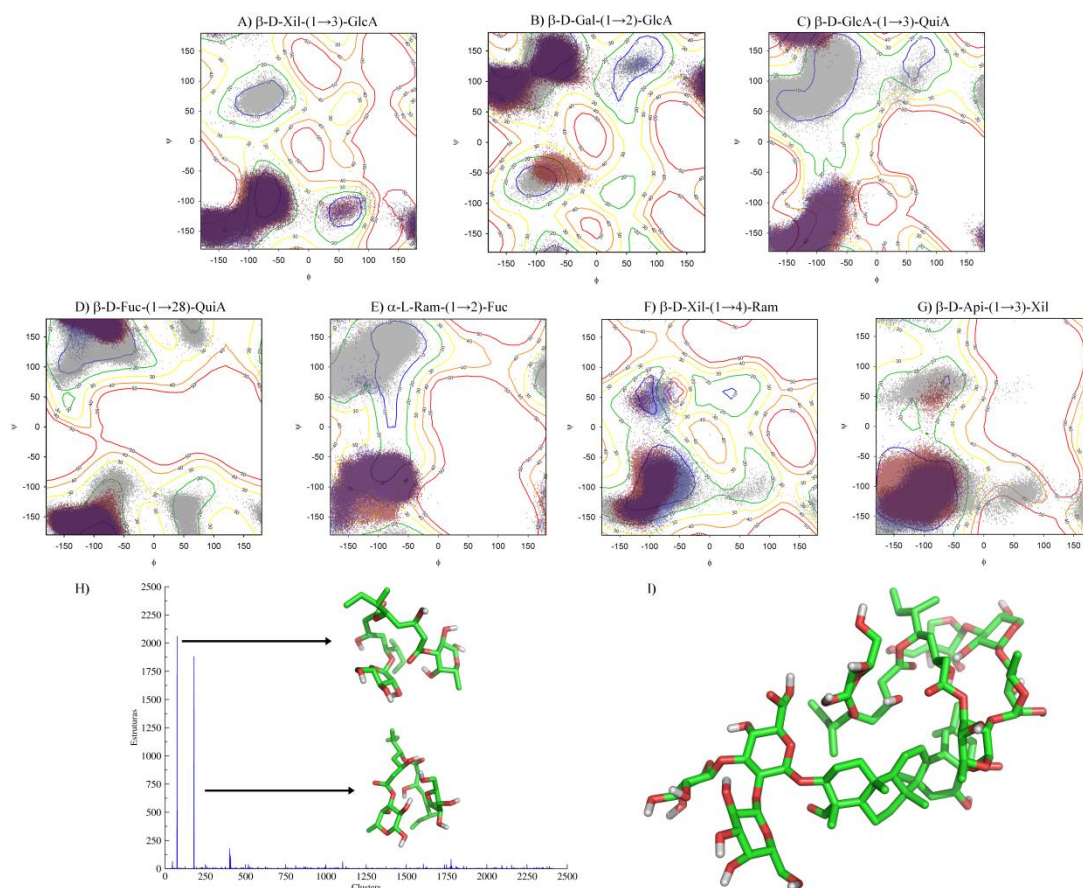


Figura 10. A-G) Mapas de contorno dos dissacarídeos que compõem a saponina QS-21. Os mapas de energia mostram as curvas a cada -10 kJ/mol, de -10 a 50 kJ/mol. As geometrias populadas em solução, retiradas das simulações de DM, estão sobrepostas aos mapas, de forma que os pontos cinza representam o dissacarídeo na forma isolada, enquanto os pontos vermelhos representam o dissacarídeo na molécula completa a 298K e com o GlcA protonado (pH = 2) e os pontos azuis representam a molécula em 310K e com o GlcA não protonado; H) Representação das estruturas mais prevalentes em solução (Cluster nº 75 e 180) para a unidade Fuc-Acila-Ara; I) Representação da estrutura da QS-21 na sua conformação mais prevalente em solução.

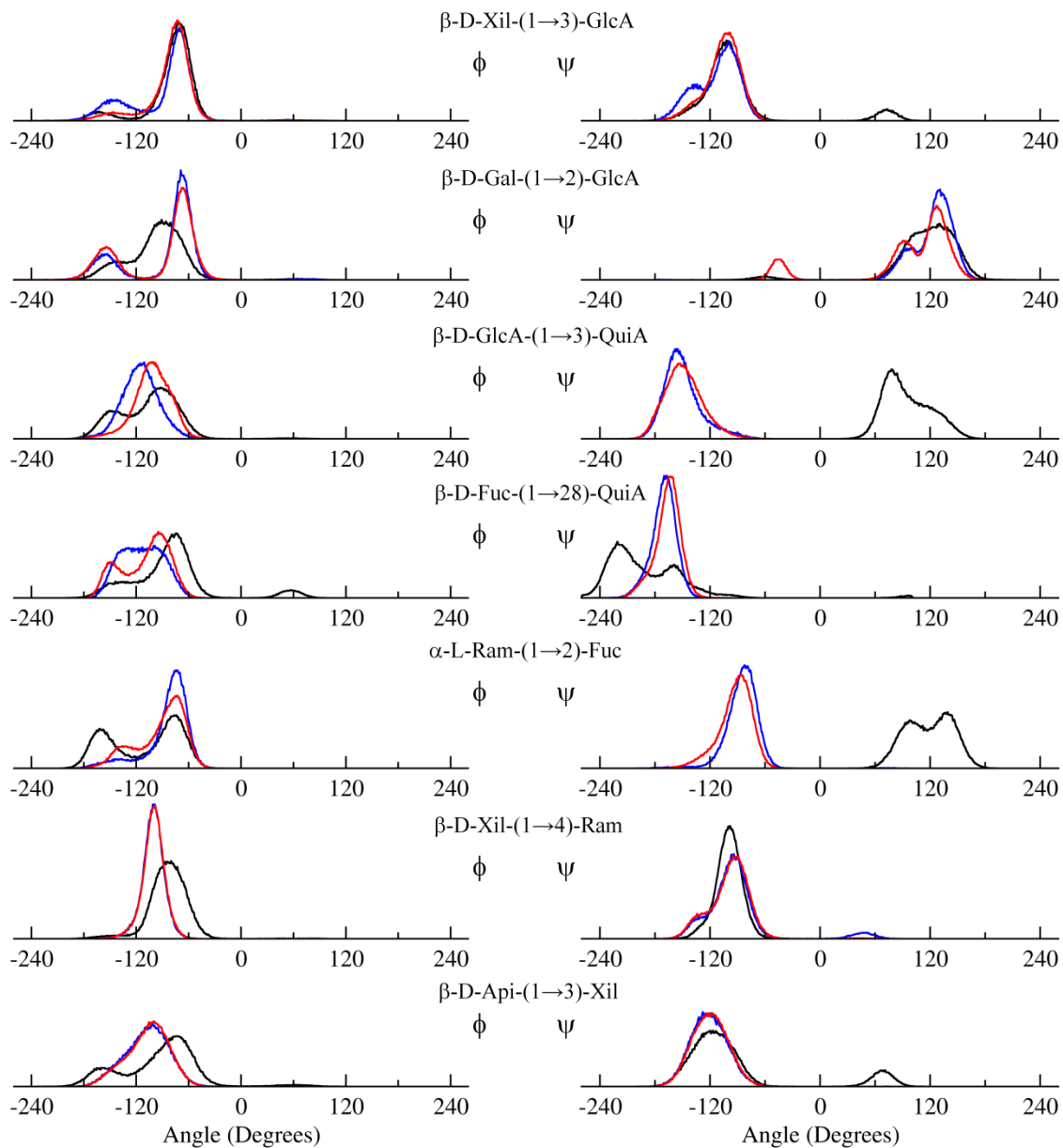


Figura 11. Distribuição dos ângulos ϕ e ψ das ligações glicosídicas presentes na saponina QS-21, tanto na forma de dissacarídeo isolado (preto) como na estrutura da saponina completa não-protonada (azul) e protonada (vermelho).

Tabela 3. Comparação dos diedros da QS-21 na forma de unidades isoladas e na forma completa, protonada e não-protonada, obtidas em simulações por DM.

Ligação glicosídica	Ângulos diedrais (°)					
	Isolado		Não-protonada		Protonada	
	ϕ	ψ	ϕ	ψ	ϕ	ψ
β -D-Xil-(1 \rightarrow 3)-GlcA	-110(\pm 47)	-113(\pm 37)	-116(\pm 50)	-120(\pm 36)	-109(\pm 48)	-115(\pm 36)
β -D-Gal-(1 \rightarrow 2)-GlcA	-97(\pm 33)	116(\pm 37)	-88(\pm 43)	123(\pm 21)	94(\pm 43)	97(\pm 56)
β -D-GlcA-(1 \rightarrow 3)-QuiA	-106(\pm 35)	95(\pm 26)	-115(\pm 21)	-150 (\pm 21)	-101(\pm 21)	-148 (\pm 21)
β -D-Fuc-(1 \rightarrow 28)-QuiA	-82(\pm 47)	-190(\pm 45)	-113(\pm 47)	-170 (\pm 13)	-110 (\pm 27)	-166 (\pm 14)
α -L-Ram-(1 \rightarrow 2)-Fuc	-111 (\pm 41)	-118 (\pm 25)	-84(\pm 25)	-84 (\pm 19)	-92 (\pm 28)	-92 (\pm 28)
β -D-Xil-(1 \rightarrow 4)-Ram	-83(\pm 23)	-100(\pm 15)	-100(\pm 13)	-92(\pm 38)	-100(\pm 13)	-99 (\pm 23)
β -D-Api-(1 \rightarrow 3)-Xil	-94(\pm 44)	-93(\pm 65)	-108(\pm 25)	-121(\pm 20)	-107(\pm 24)	-120(\pm 20)

A partir do modelo completo da QS-21, partimos para a construção de suas micelas em solução aquosa. Isto foi realizado preparando-se duas caixas: uma contendo uma solução de QS-21 com 10 moléculas e outra uma solução com 20 moléculas da mesma saponina. Foram respeitadas as proporções de 3 wt%, de acordo com dados experimentais prévios (Teixeira *et al*, 2010) ou seja 3% de massa da solução corresponde a massa de saponinas, enquanto 97% corresponde a solvente. Além disso, o GlcA teve sua carboxila, ligada em C5, protonada, devido ao pH experimental ser 2 e a temperatura da dinâmica foi mantida constante a 298 K. Na caixa de 10 moléculas, foram adicionadas 35.937 moléculas de água, enquanto na de 20 moléculas, foram adicionadas 72.076 moléculas de água. Adicionalmente, para efeitos de comparação de dados, foram realizadas simulações por DM para observar a formação da micela gradativamente, começando por uma saponina isolada até quatro saponinas, sempre seguindo os parâmetros experimentais já mencionados.

Submetendo esses sistemas a simulação por DM de 0,1 μ s, foi possível observar a formação micelar (Figura 12), onde as moléculas gradativamente aproximam-se e interagem ao longo da simulação. Uma possível forma de interação e disposição das

unidades componentes das saponinas presentes na micela (Figura 13) indica que os triterpenos e cadeias acila (hidrofóbicos) tendem a formar um interior hidrofóbico localizado mais ao centro da micela elipsoidal.

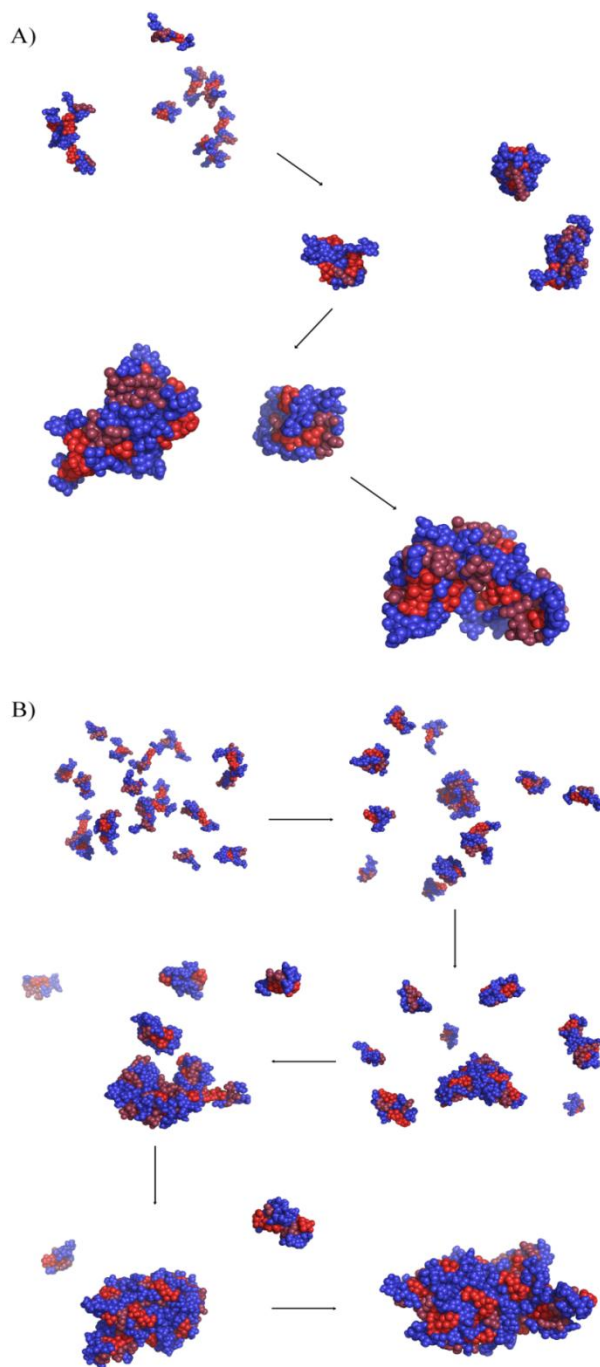


Figura 12. Formação de uma micela de 10 moléculas e uma de 20 moléculas de QS-21. A) Início da simulação; formação das primeiras três micelas (10 ns); formação de duas micelas (20 ns); formação da micela final (40ns). B) Início da simulação; micelas iniciais (10 ns); Micelas maiores (20 ns); formação da micela maior (30ns); micela quase formada (45ns) e formação final (70 ns). Os carboidratos estão representados em azul, enquanto os triterpenos e acilas estão em vermelho e marrom, respectivamente.

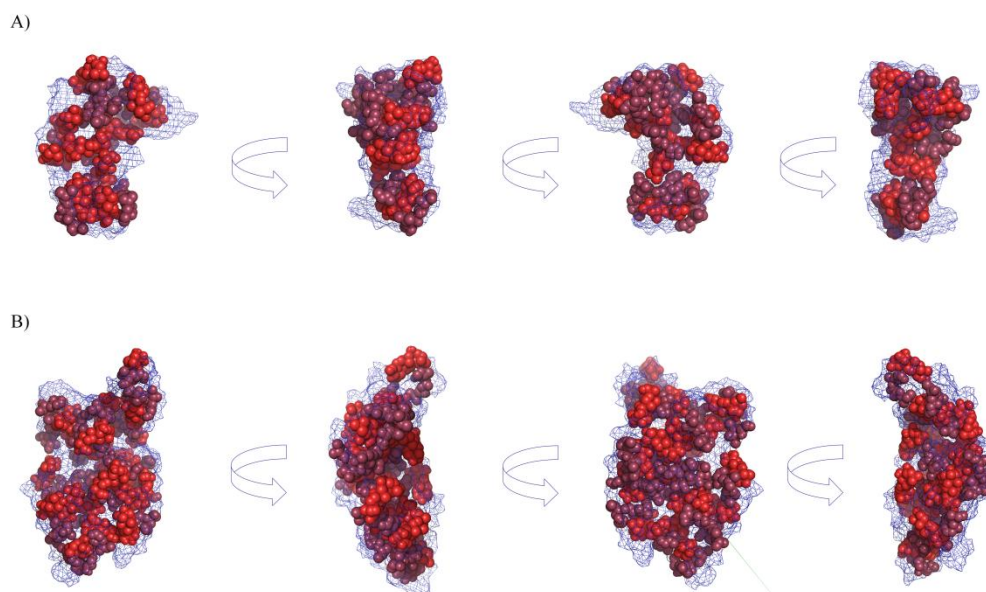


Figura 13. Representação da disposição na micela das unidades componentes da saponina QS-21. Os triterpenos (esferas vermelhas) e as Acilas (esferas marrons) são mais hidrofóbicos, enquanto os carboidratos (linhas azuis) são mais hidrofílicos. A) Micela de 10 moléculas; B) Micela de 20 moléculas.

Com o intuito de avaliar o grau de solvatação da ligação éster entre a Acila e o resíduo Fuc, foram realizados também cálculos de função de distribuição radial (RDF) (Figura. 14), usados para caracterizar as camadas de solvatação ao redor de grupamentos funcionais. Assim, pode-se evidenciar a contribuição da formação micelar para a proteção das saponinas contra a hidrólise da sua cadeia acila, pois é possível observar que ao passo que aumenta o número de moléculas, e, por conseqüência, a formação micelar, ocorre uma diminuição na solvatação da ligação em questão, em grande parte das saponinas.

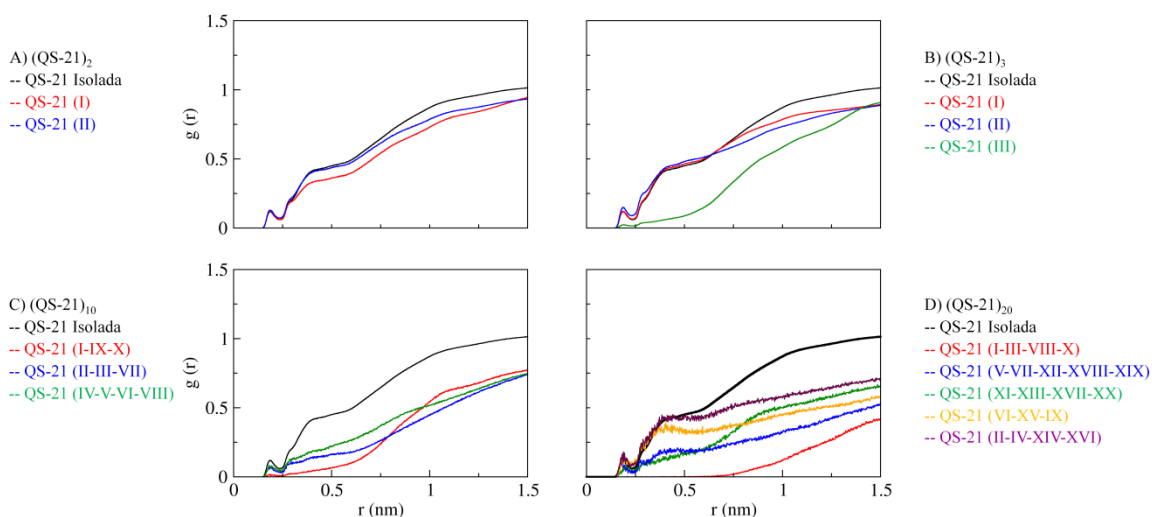
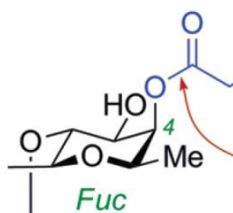


Figura 14. RDF da ligação éster entre o resíduo Fuc e cadeia acila. A) Simulação por DM de duas moléculas (QS-21)₂; B) Simulação por DM de três moléculas (QS-21)₃; C) Simulação por DM de 10 moléculas (QS-21)₁₀; D) Simulação por DM de 20 moléculas (QS-21)₂₀. Em todos os gráficos, uma comparação com a saponina isolada em solução foi realizada. Nos gráficos C e D, uma aproximação para as saponinas que apresentaram resultados similares foi realizada, de maneira que os algarismos romanos entre parênteses correspondem a qual(is) saponina(s) estão representadas em cada uma das linhas. Os átomos em azul na estrutura 2D foram os utilizados no cálculo de RDF.

5 Discussão geral

A caracterização conformacional de glicoconjugados possui diversos desafios. O principal deles, como já foi enfatizado, é a alta flexibilidade dos carboidratos, gerando uma dificuldade particular na determinação da geometria das ligações interglicosídicas pelas técnicas atuais (Woods *et al.*, 1998). Nesse contexto, com as saponinas Erucasaponina A e Estelatosídeo B (item 3.1), uma primeira abordagem foi delineada, com um maior foco na validação de uma abordagem de elucidação estrutural e no solvente não-aquoso envolvido no sistema. Com as técnicas de modelagem molecular empregadas foi possível realizar a derivação das distâncias entre prótons e comparar com os dados experimentais previamente descritos na literatura.

O solvente piridina foi caracterizado utilizando o campo de força GROMOS96, estando com os parâmetros físico-químicos bastante próximos dos valores experimentais (Lide, 2003). Adicionalmente, foi realizada a construção de um modelo 3D em ambiente aquoso para as mesmas saponinas, como fator de comparação, onde foi possível observar a manutenção dos sinais de NOE previamente encontrados na simulação em solvente piridina.

Os mapas de contorno e o refinamento posterior por DM são ferramentas importantes para a descrição conformacional das estruturas dos glicoconjugados estudados. Tanto nas saponinas avaliadas em piridina, como na Chikusetsusaponin IVa e na QS-21, essa metodologia permitiu a identificação de regiões de mínimo de energia que possibilitaram a posterior observação de múltiplos estados conformacionais e a caracterização de vários modelos tridimensionais para cada saponina.

No que diz respeito à QS-21, foram realizadas diversas simulações para suportar a observação da agregação em solução destas moléculas. Assim, foi possível identificar a formação de diversas formas de micelas, com variados tamanhos (a partir de seus raios de giro) (Figura 15). Nestas micelas, a maior parte das cadeias acilas possui redução de graus variados na solvatação da ligação éster que envolve Fuc e Acila, fato que possivelmente contribui na manutenção da estabilidade química daquele ponto da molécula, validado por dados experimentais que já indicaram maior estabilidade em concentrações acima da concentração micelar crítica (Cleland *et al.*, 1995), consistindo na primeira evidência atômica para este fenômeno.

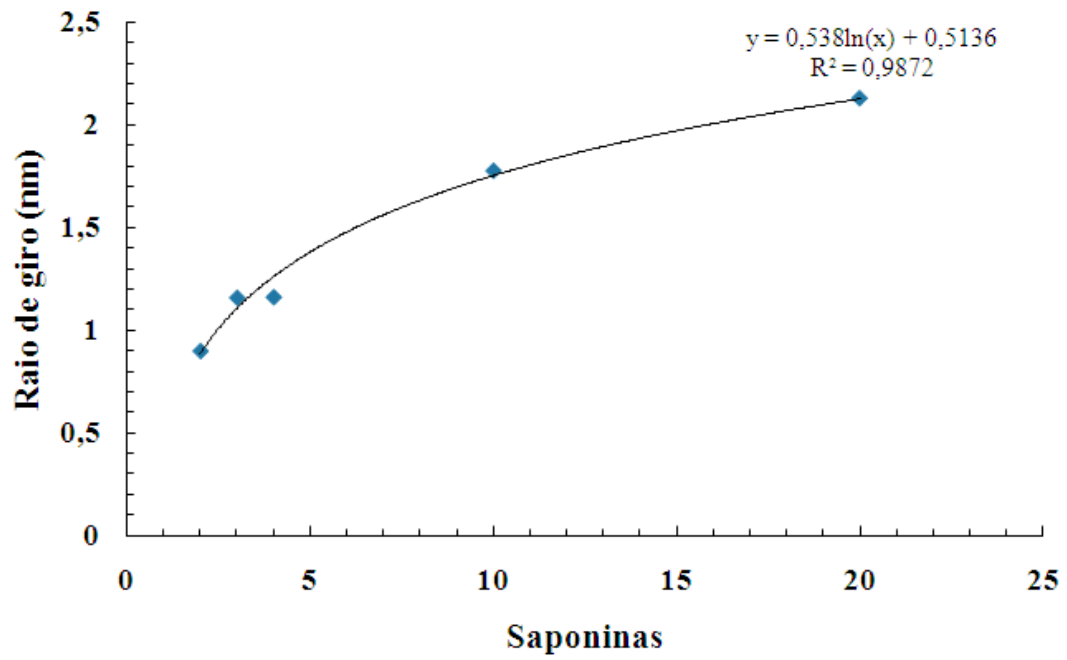


Figura 15. Representação do aumento do raio de giro das micelas conforme aumentam as moléculas de saponinas presentes em solução e, conseqüentemente, agregadas.

6 Conclusões

A partir da metodologia empregada foram construídos um total de seis modelos 3D, em nível atômico, para quatro saponinas, tanto em ambiente aquoso como não-aquoso. Para tanto, mapas de contorno foram utilizados para a obtenção da descrição conformacional das ligações glicosídicas pertencentes às mínimas unidades componentes de cada saponina. Assim, as regiões de mínimo de energia foram identificadas e esses confôrmeros submetidos a simulações por DM, tornando possível a obtenção dos estados conformacionais mais populados em solução. Esses, por sua vez, foram utilizados na construção das saponinas completas que também receberam refinamento por DM.

No caso das saponinas Erucasaponina A e Estelatosídeo B, em decorrência de seus dados experimentais terem sido obtidos em piridina, tornou-se necessário inicialmente validar uma solução de piridina em condições normais de temperatura e pressão. A partir deste meio não-aquoso, tornou-se possível caracterizar o papel do solvente na dinâmica das saponinas Erucasaponina A e Estelatosídeo B e, a partir dos dados obtidos, validação frente a dados experimentais de NOE.

As saponinas *Chikusetsusaponin* IVa e QS-21 foram caracterizadas em ambiente aquoso, tendo em vista que seus núcleos triterpênicos possuem atividades como antitumoral e imunoadjuvante, respectivamente, observados na presença de água como solvente. Particularmente no caso da saponina *Chikusetsusaponin* IVa, o estado conformacional majoritário obtido será utilizado em estudos de ancoramento molecular, ou *docking*, com a trombina humana em estudos posteriores.

Por fim, a partir de evidências experimentais apontando para a capacidade da QS-21 em formar micelas, soluções desta saponina em água foram submetidas à simulações de DM. Tais simulações permitiram a observação da formação, espontânea, de micelas em solução. Estes cálculos ainda estão em andamento e, quando finalizados, serão comparados a dados de espalhamento de raios X a baixos ângulos (*small-angle X-ray scattering* – SAXS) para validação.

7 Agradecimentos

Pesquisa desenvolvida junto ao Centro Nacional de Supercomputação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Esta pesquisa recebeu auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq #472174/2007-0), MCT e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), MEC, Brasília, DF, Brasil.

À Professora Cilaine Verônica Teixeira, pelos dados experimentais utilizados nas simulações da saponina QS-21.

8 Bibliografia

- Adams, M. M. *et al.*: Design and Synthesis of Potent Quillaja Saponin Vaccine Adjuvants. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1939-1945.
- Augustin, J. M. *et al.*: Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*. **2011**, *72*, pp 435-457.
- 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*, pp 1499–1507.
- Becker, C. F. *et al.*: Conformation of sulfated galactan and sulfated fucan in aqueous solutions: Implications to their anticoagulant activities. *J. Mol. Graph. Model.* **2007**, *26*, pp 391-399.
- Chichewicz, R. H.; Kouzi, S. A.: Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Med. Res. Rev.* **2004**, *24* (1), pp 90-114.
- Cleland, J.L. *et al.*: Isomerization and formulation stability of the vaccine adjuvant QS-21. *J Pharm Sci.* **1996**, *85* (1), pp 22-28.
- Dinda, B. *et al.*: Naturally occurring triterpenoid saponins. *Chem. Biodivers.* **2010**, *10*, pp 2327-2580.
- Djerassi, C. *et al.*: Terpenoids. XI. Investigation of nine cactus species. Isolation of two new triterpenes, stellatogenin and machaeric acid. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77* (5), pp 1200-1203.
- Evans, T. G. *et al.*: QS-21 promotes an adjuvant effect allowing for reduced antigen dose during HIV-1 envelope subunit immunization in humans. *Vaccine.* **2001**, *19*, pp 2080–2091.
- Farina, C.; Pinza, M.; Pifferi, G.: Synthesis and anti-ulcer activity of new derivatives of glycyrrhetic, oleanolic and ursolic acids. *Il Farmaco.* **1998**, *53*, pp 22-32.
- Francis, G. *et al.*: The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br. J. Nutr.* **2002**, *88*, pp 587-605.
- Fernandes, C. L. *et al.*: GROMOS96 43a1 performance in predicting oligosaccharide conformational ensembles within glycoproteins. *Carbohydr. Res.* **2010**, *345*, pp 663–671.

- Garcon, N.; Chomez, P.; Van Mechelen, M.: GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives. *Exp. Rev. Vaccines*. **2007**, *6*, pp 723–739.
- Gilewski, T. *et al.*: Immunization of metastatic breast cancer patients with a fully synthetic globo H conjugate: a phase I trial. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, pp 3270–3275.
- Haralampidis, K.; Trojanowska, M.; Osbourn, A. E.: Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2002**, *75*, pp 31-49.
- Imberty, A. e Pérez, S.: *Chem. Rev.* **2000**, *100*, pp 4567–4588.
- Kennedy, J. S. *et al.*: The safety and tolerability of an HIV-1 DNA prime-protein boost vaccine (DP6-001) in healthy adult volunteers. *Vaccine*. **2008**, *26*, pp 4420–4424.
- Kester, K. E. *et al.*: A phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy bridging randomized study of a two-dose regimen of liquid and lyophilized formulations of the candidate malaria vaccine RTS,S/AS02A in malaria-naïve adults. *Vaccine*. **2007**, *25*, pp 5359–5366.
- Krug, L. M. *et al.*: Vaccination of small cell lung cancer patients with polysialic acid or N-propionylated polysialic acid conjugated to keyhole limpet hemocyanin. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, pp 916–923.
- Leach, A. R.: *Molecular Modelling Principles and Applications*. 2nd Ed., **2001**, Longman, Cingapura.
- Liby, K. T.; Yore M. M.; Sporn, M. B.: Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. *Nat. Rev. Cancer*. **2007**, *7* (5), pp 357-369.
- Lide, D. R.: *Handbook of chemistry and physics*, **2003**, C-462 e C-672.
- Liu, J.: Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* **1995**, *49*, pp 57-68.
- Liu, J.: Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100* (1-2), pp 92-94.
- Liu, H.-W. *et al.*: Two new steroidal compounds from starfish *Asterias amurensis* Lutken. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2008**, *10*, pp 521–529.
- Jacobsen, N. E. *et al.*: Structure of the saponin adjuvant QS-21 and its base-catalyzed isomerization product by 1H and natural abundance 13C NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **1996**, *280*, pp 1-14.

- Mahato, S.B.; Nandy, A.K.; Roy G.: Triterpenoids. *Phytochemistry*. **1992**, *31* (7), pp 2199-2249.
- Man, S. *et al.*: Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia*. **2010**, *81*, pp 703-714.
- Newman, M. J. *et al.*: Saponin adjuvant induction of ovalbumin-specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Immunol.* **1992**, *148* (8), pp 2357-2362.
- Oleszek, W. *et al.*: Zanic acid tridesmoside and other dominant saponins from Alfafa (*Medicago sativa* L.) aerial parts. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, pp 191-196.
- Petronelli, A.; Pannitteri, G.; Testa, U.: Triterpenoids as new promising anticancer drugs. *Anticancer drugs*. **2009**, *20* (10), pp 880-892.
- Pol-Fachin, L.; Verli, H.: Depiction of the forces participating in the 2-O-sulfo-a-L-iduronic acid conformational preference in heparin sequences in aqueous solutions. *Carbohydr Res.* **2008**, *343*, pp 1435–1445.
- Pol-Fachin, L.; Serrato, R. V.; Verli, H.: Solution conformation and dynamics of exopolysaccharides from *Burkholderia* species. *Carbohydr Res.* **2010**, *345*, pp 1922–1931,
- Ragupathi, G. *et al.*: Induction of antibodies against GD3 ganglioside in melanoma patients by vaccination with GD3-lactone-KLH conjugate plus immunological adjuvant QS-21. *Int. J. Cancer*. **2000**, *85*, pp 659–666.
- Ragupathi, G. *et al.*: Consistent antibody response against ganglioside GD2 induced in patients with melanoma by a GD2 lactone-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine plus immunological adjuvant QS-21. *Int. J. Cancer*. **2003**, *9*, pp 5214–5220.
- Ragupathi, G. *et al.*: *Angew. Chem., Int. Ed.* 1999, *38*, 563–566.
- Rattanathongkom, A. *et al.*: Evaluation of Chikusetsusaponin IVa isolated from *Alternanthera philoxeroides* for its potency against viral replication. *Planta Med.* **2009**, *75* (8), pp 829-835.
- Ross, J. *et al.*: Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biol.* **2001**, *2* (2), pp 3004.1-3004.6.
- Scott, W. R. P. *et al.*: The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package. *J. Phys. Chem. A.*, **1999**, *103*, 3596-3607.
- Simões, C.M.O. *et al.*: Saponinas. Em Farmacognosia: da planta ao medicamento, 2^a Ed; Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, **2000**, pp 597-622.

- Suh, N. *et al.*: Novel Triterpenoids Suppress Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) and Inducible Cyclooxygenase (COX-2) in Mouse Macrophages. *Cancer Res.* **1998**, *58*, pp 717-723.
- Teixeira, C. V. *et al.*: The conformation of Quillaja Bark saponin in micelles. **2010**.
- Van Dyck, S. *et al.*: Localization of secondary metabolites in marine invertebrates: contribution of MALDI MSI for the study of saponins in cuvierian tubules of *H. forskali*. *PLoS One.* **2010**, *5*(11), e13923.
- 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.
- Vandepapeliere, P. *et al.*: Vaccine. Vaccine adjuvant systems containing monophosphoryl lipid A and QS21 induce strong and persistent humoral and T cell responses against hepatitis B surface antigen in healthy adult volunteers. *Vaccine.* **2008**, *26*, pp 1375–1386.
- Verli, H.; Guimarães, J. A.: Molecular dynamics simulation of a decasaccharide fragment of heparin in aqueous solution. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, pp 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*, pp 203-212.
- Vincken J. P. *et al.*: Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry.* **2007**, *68*, pp 275-297.
- Woods, R. J.: Computational carbohydrate chemistry: what theoretical methods can tell us. *Glycoconj J.* **1998**, *15*, 209-216.

9 Apêndice

9.1 Topologia da molécula de piridina

```
; This is your topology file
; Piridina
;
; Include forcefield parameters
#include "ffG43a1.itp"

[ moleculetype ]
; Name          nrexcl
Piridina              3

[ atoms ]
; nr      type  resnr  residue  atom  cgnr  charge  mass  typeB
chargeB   massB
  1      NR    1     PIR     NL    1     -0.26   14.006
  2      CR1   1     PIR     CD1   1      0.26   12.011
  3      HC    1     PIR     HD1   1     -0.13   1.008
  4      CR1   1     PIR     CD2   1      0.26   12.011
  5      HC    1     PIR     HD2   1     -0.13   1.008
  6      C     1     PIR     CE1   2     -0.1    12.011
  7      HC    1     PIR     HE1   2      0.1    1.008
  8      C     1     PIR     CE2   3     -0.1    12.011
  9      HC    1     PIR     HE2   3      0.1    1.008
 10     C     1     PIR     CZ    4     -0.1    12.011
 11     HC    1     PIR     HZ    4      0.1    1.008

[ bonds ]
; ai      aj  funct          c0          c1          c2
c3
  1      2    2      gb_11
  1      4    2      gb_11
  2      3    2      gb_3
  2      6    2      gb_15
  4      5    2      gb_3
  4      8    2      gb_15
  6      7    2      gb_3
  6     10    2      gb_15
  8      9    2      gb_3
  8     10    2      gb_15
 10     11    2      gb_3

[ pairs ]
; ai      aj  funct          c0          c1          c2
c3
  1      7    1
  1      9    1
  1     10    1
  2      5    1
  2      8    1
  2     11    1
  3      4    1
  3      7    1
  3     10    1
  4      6    1
  4     11    1
  5      9    1
  5     10    1
```

```

6      9      1
7      8      1
7      11     1
9      11     1

[ angles ]
; ai    aj    ak funct      c0      c1      c2
c3
  2     1     4  2   ga_26
  1     2     3  2   ga_24
  3     2     6  2   ga_24
  1     2     6  2   ga_26
  1     4     5  2   ga_24
  5     4     8  2   ga_24
  1     4     8  2   ga_26
  2     6     7  2   ga_24
  7     6    10  2   ga_24
  2     6    10  2   ga_26
  4     8     9  2   ga_24
  9     8    10  2   ga_24
  4     8    10  2   ga_26
  6    10    11  2   ga_24
  8    10    11  2   ga_24
  6    10     8  2   ga_26

[ dihedrals ]
; ai    aj    ak    al funct      c0      c1
c2      c3
  4     1     2     6  2   gi_1
  2     1     4     8  2   gi_1
  1     2     6    10  2   gi_1
  1     4     8    10  2   gi_1
  2     6    10     8  2   gi_1
  4     8    10     6  2   gi_1
  2     1     6     3  2   gi_1
  4     1     8     5  2   gi_1
  6    10     2     7  2   gi_1
  8    10     4     9  2   gi_1
 10     6     8    11  2   gi_1

[ system ]
; Name
Piridina

[ molecules ]
; Compound      #mols
Piridina        201

```

C3 C2 O3 C4 gi_2

9.2 Erucasaponina A

```
[ 2RHA ]
[ atoms ]
C6 CH3 0.00000 0
C5 CH1 0.24200 1
O5 OA -0.24200 1
C1 CH1 0.25400 2
C2 CH1 0.16000 3
O2 OA -0.40000 3
H22 H 0.24000 3
C3 CH1 0.16000 4
O3 OA -0.40000 4
H32 H 0.24000 4
C4 CH1 0.16000 5
O4 OA -0.40000 5
H42 H 0.24000 5

[ bonds ]
C5 C6 gb_25
C5 O5 gb_19
C5 C4 gb_25
C1 O5 gb_19
C1 C2 gb_25
C2 O2 gb_19
O2 H22 gb_1
C2 C3 gb_25
C3 O3 gb_19
C3 C4 gb_25
O3 H32 gb_1
C4 O4 gb_19
O4 H42 gb_1

[ angles ]
; ai aj ak gromos type
C6 C5 O5 ga_8
C6 C5 C4 ga_7
O5 C5 C4 ga_8
C5 O5 C1 ga_9
O5 C1 C2 ga_8
C1 C2 O2 ga_8
C1 C2 C3 ga_7
O5 C1 +O2 ga_8
C2 C1 +O2 ga_8
O2 C2 C3 ga_8
C2 C3 O3 ga_8
C2 O2 H22 ga_11
C2 C3 C4 ga_7
C4 O4 H42 ga_11
O3 C3 C4 ga_8
C3 O3 H32 ga_11
C5 C4 C3 ga_7
C5 C4 O4 ga_8
C3 C4 O4 ga_8

[ impropers ]
; ai aj ak al gromos
type
C5 C6 O5 C4 gi_2
C1 +O2 O5 C2 gi_2
C2 C1 O2 C3 gi_2
```



```

[ GAME ]
[ atoms ]
C6A CH3 0.23500 0
O6A OM -0.22500 0
C6 C 0.29000 0
O6B OM -0.30000 0
C5 CH1 0.24200 1
O5 OA -0.24200 1
C1 CH1 0.25400 2
C2 CH1 0.14200 3
O2 OA -0.39600 3
C3 CH1 0.14200 4
O3 OA -0.39600 4
C4 CH1 0.16000 5
O4 OA -0.40000 5
H4 H 0.24000 5

[ bonds ]
O6A C6A gb_19
C6 O6A gb_5
C6 O6B gb_5
C5 C6 gb_25
C5 O5 gb_19
C5 C4 gb_25
C1 O5 gb_19
C1 C2 gb_25
C2 O2 gb_19
C2 C3 gb_25
O2 -C1 gb_19
C3 O3 gb_19
C3 C4 gb_25
C4 O4 gb_19
O4 H4 gb_1

[ angles ]
; ai aj ak gromos type
C6A O6A C6 ga_9
O6A C6 O6B ga_37
O6A C6 C5 ga_21
O6B C6 C5 ga_21
C6 C5 O5 ga_8
C6 C5 C4 ga_7
O5 C5 C4 ga_8
C5 O5 C1 ga_9
O5 C1 C2 ga_8
C1 C2 O2 ga_8
C1 C2 C3 ga_7
+O3 C1 C2 ga_8
+O3 C1 O5 ga_8
O2 C2 C3 ga_8

C2 O2 -C1 ga_7
C2 C3 O3 ga_8
C2 C3 C4 ga_7
O3 C3 C4 ga_8
C5 C4 C3 ga_7
C5 C4 O4 ga_8
C3 C4 O4 ga_8
C4 O4 H4 ga_11

[ impropers ]
; ai aj ak al gromos
type
C6 O6A O6B C5 gi_1
C5 C6 C4 O5 gi_2
C1 +O3 O5 C2 gi_2
C2 C1 O2 C3 gi_2
C3 C2 C4 O3 gi_2
C4 O4 C5 C3 gi_2
C5 C2 C4 C1 gi_7
C5 C2 C3 C1 gi_8
C5 C2 C3 O5 gi_9

[ dihedrals ]
; ai aj ak al gromos
type
C5 C6 O6A C6A gd_14
C4 C5 C6 O6A gd_20
C4 C5 C6 O6B gd_20
O4 C4 C5 C6 gd_7
C2 C1 O5 C5 gd_14
C3 C2 C1 O5 gd_7
C1 C2 O2 -C1 gd_14
C4 C3 C2 C1 gd_17
O4 C4 C3 C2 gd_7
C2 C1 +O3 +C3 gd_14
C3 C2 C1 +O3 gd_17
C3 C2 C1 +O3 gd_7
O2 C2 C1 +O3 gd_8
C5 C4 O4 H4 gd_12
C2 C3 C4 C5 gd_17
C1 O5 C5 C4 gd_14
O5 C5 C4 C3 gd_7
C6 C5 C4 C3 gd_17
O5 C1 C2 O2 gd_8
O2 C2 C3 C4 gd_7
O2 C2 C3 O3 gd_8
C1 C2 C3 O3 gd_7
O3 C3 C4 C5 gd_7
O3 C3 C4 O4 gd_8
O5 C5 C4 O4 gd_8

```

```

[ BETA ]
[ atoms ]
CAW  CH3      0.00000      0
CAR  CH1      0.00000      0
CAX  CH3      0.00000      0
CAO  CH1      0.00000      0
CAP  CH1      0.00000      1
CAQ  CH1      0.00000      1
CAJ  CH1      0.00000      1
CAZ  CH3      0.00000      1
CAH  CH1      0.00000      2
CBA  CH3      0.00000      2
CAG  CH1      0.00000      2
CAF  CH1      0.00000      2
CAB  CH1     -0.08400      3
CBB   C       0.39300      3
OBF  OM     -0.30300      3
OBC  OM     -0.29200      3
CAA  CH1      0.00000      4
CAE  CH1      0.00000      4
CAD  CH1      0.00000      4
CBD   C       0.00000      4
CBE  CH3      0.00000      5
CBG   C       0.00000      5
CAC  CH1      0.00000      5
CAI  CH1      0.00000      5
CAM  CH1      0.00000      6
CAL  CH1      0.00000      6
CAK  CH1      0.00000      6
CAN  CH1      0.00000      6
CAV  CH3      0.00000      7
CAU  CH1      0.00000      7
CAT  CH1      0.00000      7
CAS  CH1      0.14200      8
OAY  OA     -0.39600      8

[ bonds ]
CAR  CAW      gb_26
CAR  CAX      gb_26
CAR  CAO      gb_25
CAR  CAS      gb_25
CAO  CAP      gb_25
CAN  CAO      gb_25
CAP  CAQ      gb_25
CAJ  CAQ      gb_25
CAJ  CAZ      gb_26
CAJ  CAH      gb_25
CAJ  CAK      gb_25
CAH  CBA      gb_26
CAH  CAG      gb_25
CAH  CAI      gb_25
CAG  CAF      gb_25
CAB  CAF      gb_25
CAB  CBB      gb_26
CAB  CAA      gb_25
CAB  CAC      gb_25
CBB  OBF      gb_5
CBB  OBC      gb_5
CAA  CAE      gb_25
CAD  CAE      gb_25
CAD  CBD      gb_26
CAD  CAC      gb_25

CBD  CBE      gb_26
CBD  CBG      gb_26
CAC  CAI      gb_25
CAI  CAM      gb_25
CAM  CAL      gb_25
CAK  CAL      gb_25
CAN  CAK      gb_25
CAN  CAV      gb_26
CAN  CAU      gb_25
CAU  CAT      gb_25
CAS  CAT      gb_25
CAS  OAY      gb_19
OAY  -C1      gb_19

[ angles ]
; ai aj ak gromos type
CAW  CAR  CAX      ga_12
CAW  CAR  CAO      ga_12
CAW  CAR  CAS      ga_12
CAX  CAR  CAO      ga_12
CAX  CAR  CAS      ga_12
CAO  CAR  CAS      ga_12
CAR  CAO  CAP      ga_12
CAR  CAO  CAN      ga_12
CAP  CAO  CAN      ga_12
CAO  CAP  CAQ      ga_12
CAP  CAQ  CAJ      ga_12
CAQ  CAJ  CAZ      ga_12
CAQ  CAJ  CAH      ga_12
CAQ  CAJ  CAK      ga_12
CAZ  CAJ  CAH      ga_12
CAZ  CAJ  CAK      ga_12
CAH  CAJ  CAK      ga_12
CAJ  CAH  CBA      ga_12
CAJ  CAH  CAG      ga_12
CAJ  CAH  CAI      ga_12
CBA  CAH  CAG      ga_12
CBA  CAH  CAI      ga_12
CAG  CAH  CAI      ga_12
CAH  CAG  CAF      ga_12
CAG  CAF  CAB      ga_12
CAF  CAB  CBB      ga_12
CAF  CAB  CAA      ga_12
CAF  CAB  CAC      ga_12
CBB  CAB  CAA      ga_12
CBB  CAB  CAC      ga_12
CAA  CAB  CAC      ga_5
CAB  CBB  OBF      ga_21
CAB  CBB  OBC      ga_21
OBF  CBB  OBC      ga_37
CAB  CAA  CAE      ga_5
CAA  CAE  CAD      ga_5
CAE  CAD  CBD      ga_12
CAE  CAD  CAC      ga_5
CBD  CAD  CAC      ga_12
CAD  CBD  CBE      ga_18
CAD  CBD  CBG      ga_18
CBE  CBD  CBG      ga_18
CAB  CAC  CAD      ga_5
CAB  CAC  CAI      ga_12
CAD  CAC  CAI      ga_12
CAH  CAI  CAC      ga_12

```

```

CAH CAI CAM ga_12 CAN CAO CAK CAV gi_2
CAC CAI CAM ga_12 CAS OAY CAR CAT gi_2
CAI CAM CAL ga_12 [ dihedrals ]
CAM CAL CAK ga_12 ; ai aj ak al gromos
CAJ CAK CAL ga_12 type
CAJ CAK CAN ga_12 CAN CAO CAR CAW gd_17
CAL CAK CAN ga_12 OAY CAS CAR CAW gd_17
CAO CAN CAK ga_12 CAQ CAP CAO CAR gd_17
CAO CAN CAV ga_12 CAU CAN CAO CAR gd_17
CAO CAN CAU ga_12 CAJ CAQ CAP CAO gd_17
CAK CAN CAV ga_12 CAK CAJ CAQ CAP gd_17
CAK CAN CAU ga_12 CAI CAH CAJ CAQ gd_17
CAV CAN CAU ga_12 CAN CAK CAJ CAQ gd_17
CAN CAU CAT ga_12 CAF CAG CAH CAJ gd_17
CAU CAT CAS ga_12 CAM CAI CAH CAJ gd_17
CAR CAS CAT ga_12 CAB CAF CAG CAH gd_17
CAR CAS OAY ga_12 CAC CAB CAF CAG gd_17
CAT CAS OAY ga_12 CAF CAB CBB OBC gd_20
CAS OAY -C1 ga_7 CAE CAA CAB CAF gd_17
[ impropers ] CAI CAC CAB CAF gd_17
; ai aj ak al gromos CAD CAE CAA CAB gd_17
type CAC CAD CAE CAA gd_17
CAR CAW CAO CAX gi_2 CAE CAD CBD CBG gd_20
CAO CAR CAP CAN gi_2 CAI CAC CAD CAE gd_17
CAJ CAQ CAH CAZ gi_2 CAM CAI CAC CAB gd_17
CAH CAJ CBA CAG gi_2 CAL CAM CAI CAH gd_17
CAB CAF CAA CBB gi_2 CAK CAL CAM CAI gd_17
CBB CAB OBF OBC gi_1 CAN CAK CAL CAM gd_17
CAD CAE CAC CBD gi_2 CAU CAN CAK CAJ gd_17
CBD CAD CBE CBG gi_1 CAT CAU CAN CAO gd_17
CAC CAI CAB CAD gi_2 CAS CAT CAU CAN gd_17
CAI CAM CAC CAH gi_2 OAY CAS CAT CAU gd_17
CAK CAN CAJ CAL gi_2 CAT CAS OAY -C1 gd_14

```

```

[ 3RHA ]
[ atoms ]
  C6  CH3    0.00000    0
  C5  CH1    0.24200    1
  O5  OA    -0.24200    1
  C1  CH1    0.28600    2
  C2  CH1    0.16000    3
  O2  OA    -0.40000    3
  H22 H      0.24000    3
  C3  CH1    0.16000    4
  O3  OA    -0.40000    4
  H32 H      0.24000    4
  C4  CH1    0.16000    5
  O4  OA    -0.40000    5
  H42 H      0.24000    5
[ bonds ]
  C5  C6      gb_25
  C5  O5      gb_19
  C5  C4      gb_25
  C1  O5      gb_19
  C1  C2      gb_25
  C1 -OBF     gb_19
  C2  O2      gb_19
  O2  H22     gb_1
  C2  C3      gb_25
  C3  O3      gb_19
  C3  C4      gb_25
  O3  H32     gb_1
  C4  O4      gb_19
  O4  H42     gb_1
[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
  C6  C5  O5      ga_8
  C6  C5  C4      ga_7
  O5  C5  C4      ga_8
  C5  O5  C1      ga_9
  O5  C1  C2      ga_8
  C1  C2  O2      ga_8
  C1  C2  C3      ga_7
  O5  C1 -OBF     ga_8
  C2  C1 -OBF     ga_8
  O2  C2  C3      ga_8
  C2  C3  O3      ga_8
  C2  O2  H22     ga_11
  C2  C3  C4      ga_7
  C4  O4  H42     ga_11
  O3  C3  C4      ga_8
  C3  O3  H32     ga_11
  C5  C4  C3      ga_7
  C5  C4  O4      ga_8
  C3  C4  O4      ga_8
[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos
type
  C5  C6  O5  C4  gi_2
  C1 -OBF O5  C2  gi_2
  C2  C1  O2  C3  gi_2
  C3  C2  O3  C4  gi_2
  C4  O4  C3  C5  gi_2
  C5  C2  C4  C1  gi_4
  C5  C2  C3  C1  gi_5
  C5  C2  C3  O5  gi_6
[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos
type
  O4  C4  C5  C6  gd_7
  C2  C1  O5  C5  gd_14
  C3  C2  C1  O5  gd_7
  C4  C3  C2  C1  gd_17
  C2  C3  O3  H32  gd_12
  C1  C2  O2  H22  gd_12
  C3  C4  O4  H42  gd_12
  O4  C4  C3  C2  gd_7
  C2  C3  C4  C5  gd_17
  C1  O5  C5  C4  gd_14
  O5  C5  C4  C3  gd_7
  C6  C5  C4  C3  gd_17
  O5  C1  C2  O2  gd_8
  O2  C2  C3  C4  gd_7
  O2  C2  C3  O3  gd_8
  C1  C2  C3  O3  gd_7
  C2  C1 -OBF -CBG  gd_14
  C3  C2  C1 -OBF  gd_17
  C3  C2  C1 -OBF  gd_7
  O2  C2  C1 -OBF  gd_8
  O3  C3  C4  C5  gd_7
  O3  C3  C4  O4  gd_8
  O5  C5  C4  O4  gd_8

```

```

[ 1RHA ]
[ atoms ]
C6  CH3      0.00000    0
C5  CH1      0.24200    1
O5  OA      -0.24200    1
C1  CH1      0.25400    2
C2  CH1      0.16000    3
O2  OA      -0.40000    3
H22  H       0.24000    3
C3  CH1      0.16000    4
O3  OA      -0.40000    4
H32  H       0.24000    4
C4  CH1      0.16000    5
O4  OA      -0.40000    5
H42  H       0.24000    5
[ bonds ]
C5  C6      gb_25
C5  O5      gb_19
C5  C4      gb_25
C1  O5      gb_19
C1  C2      gb_25
C2  O2      gb_19
O2  H22     gb_1
C2  C3      gb_25
C3  O3      gb_19
C3  C4      gb_25
O3  H32     gb_1
C4  O4      gb_19
O4  H42     gb_1
[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
C6  C5  O5   ga_8
C6  C5  C4   ga_7
O5  C5  C4   ga_8
C5  O5  C1   ga_9
O5  C1  C2   ga_8
C1  C2  O2   ga_8
C1  C2  C3   ga_7
O2  C2  C3   ga_8
C2  C3  O3   ga_8
C2  O2  H22  ga_11
C2  C3  C4   ga_7
C4  O4  H42  ga_11
O3  C3  C4   ga_8
C3  O3  H32  ga_11
C5  C4  C3   ga_7
C5  C4  O4   ga_8
C3  C4  O4   ga_8
[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos
type
C5  C6  O5  C4  gi_2
C2  C1  O2  C3  gi_2
C3  C2  O3  C4  gi_2
C4  O4  C3  C5  gi_2
C5  C2  C4  C1  gi_4
C5  C2  C3  C1  gi_5
C5  C2  C3  O5  gi_6
; C1  +O3  O5  C2  gi_2
[ dihedrals ]

```

9.3 Estelatosídeo B

```

[ XYL1 ]
[ atoms ]
O4  OA  -0.40000  0
H4  H   0.24000  0
C4  CH1 0.16000  0
C3  CH1 0.16000  1
O3  OA  -0.40000  1
H3  H   0.24000  1
C2  CH1 0.16000  2
O2  OA  -0.40000  2
H2  H   0.24000  2
C1  CH1 0.25400  3
O5  OA  -0.24200  4
C5  CH2 0.24200  4

[ bonds ]
O4  H4  gb_1
C4  O4  gb_19
C4  C3  gb_25
C4  C5  gb_25
C3  O3  gb_19
C3  C2  gb_25
O3  H3  gb_1
C2  O2  gb_19
C2  C1  gb_25
O2  H2  gb_1
C1  O5  gb_19
C5  O5  gb_19

[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos  type
H4  O4  C4  ga_11
O4  C4  C3  ga_8
O4  C4  C5  ga_8
C3  C4  C5  ga_7
C4  C3  O3  ga_8
C4  C3  C2  ga_7
O3  C3  C2  ga_8
C3  O3  H3  ga_11
C3  C2  O2  ga_8
C3  C2  C1  ga_7

O2  C2  C1  ga_8
+O2  C1  C2  ga_8
+O2  C1  O5  ga_8
C2  O2  H2  ga_11
C2  C1  O5  ga_8
C4  C5  O5  ga_9

[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos
type
C4  O4  C5  C3  gi_2
C3  C4  O3  C2  gi_2
C2  C3  C1  O2  gi_2
C1  +O2  O5  C2  gi_2
C5  C2  C4  C1  gi_7
C5  C2  C3  C1  gi_8
C5  C2  C3  O5  gi_9

[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos
type
C5  C4  O4  H4  gd_12
C2  C3  C4  O4  gd_7
C4  C3  O3  H3  gd_12
C1  C2  C3  C4  gd_17
C3  C2  O2  H2  gd_12
O5  C1  C2  C3  gd_7
C2  C1  O5  C5  gd_14
C2  C1  +O2  +C2  gd_14
C3  C2  C1  +O2  gd_17
C3  C2  C1  +O2  gd_7
O2  C2  C1  +O2  gd_8
C2  C3  C4  C5  gd_17
C1  O5  C5  C4  gd_14
O5  C5  C4  C3  gd_7
O5  C1  C2  O2  gd_8
O2  C2  C3  C4  gd_7
O2  C2  C3  O3  gd_8
C1  C2  C3  O3  gd_7
O3  C3  C4  C5  gd_7
O3  C3  C4  O4  gd_8
O5  C5  C4  O4  gd_8

```

```

[ GLC1 ]
[ atoms ]
O4 OA -0.40000 0
H4 H 0.24000 0
C4 CH1 0.16000 0
C3 CH1 0.16000 1
O3 OA -0.40000 1
H3 H 0.24000 1
C2 CH1 0.14200 2
O2 OA -0.39600 2
C1 CH1 0.25400 3
O5 OA -0.24200 4
C5 CH1 0.24200 4
C6 CH2 0.16000 5
O6 OA -0.40000 5
H6 H 0.24000 5

[ bonds ]
O4 H4 gb_1
C4 O4 gb_19
C4 C3 gb_25
C4 C5 gb_25
C3 O3 gb_19
C3 C2 gb_25
O3 H3 gb_1
C2 O2 gb_19
C2 C1 gb_25
O2 -C1 gb_19
C1 O5 gb_19
C5 O5 gb_19
C5 C6 gb_25
C6 O6 gb_19
O6 H6 gb_1

[ angles ]
; ai aj ak gromos type
H4 O4 C4 ga_11
O4 C4 C3 ga_8
O4 C4 C5 ga_8
C3 C4 C5 ga_7
C4 C3 O3 ga_8
C4 C3 C2 ga_7
O3 C3 C2 ga_8
C3 O3 H3 ga_11
C3 C2 O2 ga_8
C3 C2 C1 ga_7
O2 C2 C1 ga_8
+O2 C1 C2 ga_8
+O2 C1 O5 ga_8
C2 O2 -C1 ga_7

C2 C1 O5 ga_8
C1 O5 C5 ga_9
C4 C5 O5 ga_8
C4 C5 C6 ga_7
O5 C5 C6 ga_8
C5 C6 O6 ga_8
C6 O6 H6 ga_11

[ impropers ]
; ai aj ak al gromos
type
C4 O4 C5 C3 gi_2
C3 C4 O3 C2 gi_2
C2 C3 C1 O2 gi_2
C1 +O2 O5 C2 gi_2
C5 C6 C4 O5 gi_2
C5 C2 C4 C1 gi_7
C5 C2 C3 C1 gi_8
C5 C2 C3 O5 gi_9

[ dihedrals ]
; ai aj ak al gromos
type
C5 C4 O4 H4 gd_12
C2 C3 C4 O4 gd_7
C6 C5 C4 O4 gd_7
C4 C3 O3 H3 gd_12
C1 C2 C3 C4 gd_17
C3 C2 O2 -C1 gd_14
O5 C1 C2 C3 gd_7
C2 C1 O5 C5 gd_14
C2 C1 +O2 +C2 gd_14
C3 C2 C1 +O2 gd_17
C3 C2 C1 +O2 gd_7
O2 C2 C1 +O2 gd_8
O6 C6 C5 C4 gd_7
O6 C6 C5 C4 gd_17
C5 C6 O6 H6 gd_12
C2 C3 C4 C5 gd_17
C1 O5 C5 C4 gd_14
O5 C5 C4 C3 gd_7
C6 C5 C4 C3 gd_17
O5 C1 C2 O2 gd_8
O2 C2 C3 C4 gd_7
O2 C2 C3 O3 gd_8
C1 C2 C3 O3 gd_7
O3 C3 C4 C5 gd_7
O3 C3 C4 O4 gd_8
O5 C5 C4 O4 gd_8
O5 C5 C6 O6 gd_8

```

```

[ GLCA ]
[ atoms ]
C6A  CH3      0.23500      0
O6A  OM       -0.22500      0
C6    C        0.29000      0
O6B  OM       -0.30000      0
C5    CH1     0.24200      1
O5    OA      -0.24200      1
C1    CH1     0.25400      2
C2    CH1     0.14200      3
O2    OA      -0.39600      3
C3    CH1     0.16000      4
O3    OA      -0.40000      4
H3    H        0.24000      4
C4    CH1     0.16000      5
O4    OA      -0.40000      5
H4    H        0.24000      5

[ bonds ]
O6A  C6A      gb_19
C6   O6A      gb_5
C6   O6B      gb_5
C5   C6       gb_25
C5   O5       gb_19
C5   C4       gb_25
C1   O5       gb_19
C1   C2       gb_25
C2   O2       gb_19
C2   C3       gb_25
O2   -C1      gb_19
C3   O3       gb_19
C3   C4       gb_25
O3   H3       gb_1
C4   O4       gb_19
O4   H4       gb_1

[ angles ]
; ai aj ak gromos type
C6A O6A C6 ga_9
O6A C6 O6B ga_37
O6A C6 C5 ga_21
O6B C6 C5 ga_21
C6 C5 O5 ga_8
C6 C5 C4 ga_7
O5 C5 C4 ga_8
C5 O5 C1 ga_9
O5 C1 C2 ga_8
C1 C2 O2 ga_8
C1 C2 C3 ga_7
+O3 C1 C2 ga_8
+O3 C1 O5 ga_8
O2 C2 C3 ga_8

C2 O2 -C1 ga_7
C2 C3 O3 ga_8
C2 C3 C4 ga_7
O3 C3 C4 ga_8
C3 O3 H3 ga_11
C5 C4 C3 ga_7
C5 C4 O4 ga_8
C3 C4 O4 ga_8
C4 O4 H4 ga_11

[ impropers ]
; ai aj ak al gromos
type
C6 O6A O6B C5 gi_1
C5 C6 C4 O5 gi_2
C1 +O3 O5 C2 gi_2
C2 C1 O2 C3 gi_2
C3 C2 C4 O3 gi_2
C4 O4 C5 C3 gi_2
C5 C2 C4 C1 gi_7
C5 C2 C3 C1 gi_8
C5 C2 C3 O5 gi_9

[ dihedrals ]
; ai aj ak al gromos
type
C5 C6 O6A C6A gd_14
C4 C5 C6 O6A gd_20
C4 C5 C6 O6B gd_20
O4 C4 C5 C6 gd_7
C2 C1 O5 C5 gd_14
C3 C2 C1 O5 gd_7
C1 C2 O2 -C1 gd_14
C4 C3 C2 C1 gd_17
C2 C3 O3 H3 gd_12
O4 C4 C3 C2 gd_7
C2 C1 +O3 +C3 gd_14
C3 C2 C1 +O3 gd_17
C3 C2 C1 +O3 gd_7
O2 C2 C1 +O3 gd_8
C5 C4 O4 H4 gd_12
C2 C3 C4 C5 gd_17
C1 O5 C5 C4 gd_14
O5 C5 C4 C3 gd_7
C6 C5 C4 C3 gd_17
O5 C1 C2 O2 gd_8
O2 C2 C3 C4 gd_7
O2 C2 C3 O3 gd_8
C1 C2 C3 O3 gd_7
O3 C3 C4 C5 gd_7
O3 C3 C4 O4 gd_8
O5 C5 C4 O4 gd_8

```



```

[ STEL ]
[ atoms ]
CAY  CH3      0.00000      0
CAV  CH1      0.00000      0
CAZ  CH3      0.00000      0
CAP  CH1      0.00000      0
CAQ  CH1      0.00000      1
CAR  CH1      0.00000      1
CAK  CH1      0.00000      1
CBB  CH3      0.00000      1
CAI  CH1      0.00000      2
CBC  CH3      0.00000      2
CAH  CH1      0.00000      2
CAG  CH1      0.00000      2
CAB  CH2     -0.02500      3
CAW  CH1      0.03500      3
CAA  C         0.28500      3
OBF  O        -0.30000      3
OAF  OA      -0.23000      3
CAE  CH1      0.21000      3
CAD  CH1      0.02500      3
CBD  CCL4     0.16000      4
CBE  CH3      0.00000      5
CBH  CH3      0.00000      5
OBG  OA      -0.40000      4
H5N  H         0.24000      4
CAC  CH1      0.00000      5
CAJ  CH1      0.00000      5
CAN  CH1      0.00000      6
CAM  CH1      0.00000      6
CAL  CH1      0.00000      6
CAO  CH1      0.00000      6
CBA  CH3      0.00000      7
CAS  CH1      0.00000      7
CAT  CH1      0.00000      7
C3   CH1      0.14200      8
O3   OA      -0.39600      8

[ bonds ]
CAV  CAY      gb_25
CAV  CAZ      gb_25
CAV  CAP      gb_25
CAV  C3       gb_25
CAP  CAQ      gb_25
CAO  CAP      gb_25
CAQ  CAR      gb_25
CAK  CAR      gb_25
CAK  CBB      gb_25
CAK  CAI      gb_25
O3   -C1      gb_19
CAK  CAL      gb_25
CAI  CBC      gb_25
CAI  CAH      gb_25
CAI  CAJ      gb_25
CAH  CAG      gb_25
CAB  CAG      gb_25
CAB  CAW      gb_25
CAB  CAA      gb_14
CAB  CAC      gb_25
CAE  CAW      gb_25
CAA  OBF      gb_4
CAA  OAF      gb_12

CAE  OAF      gb_19
CAE  CAD      gb_25
CAD  CBD      gb_25
CAD  CAC      gb_26
CBD  CBE      gb_26
CBD  CBH      gb_26
CBD  OBG      gb_17
OBG  H5N      gb_1
CAC  CAJ      gb_25
CAJ  CAN      gb_25
CAN  CAM      gb_25
CAL  CAM      gb_25
CAO  CAL      gb_25
CAO  CBA      gb_25
CAO  CAS      gb_25
CAS  CAT      gb_25
C3   CAT      gb_25
C3   O3       gb_19

[ angles ]
; ai aj ak gromos type
CAY  CAV  CAZ      ga_12
CAY  CAV  CAP      ga_12
CAY  CAV  C3       ga_12
CAZ  CAV  CAP      ga_12
CAZ  CAV  C3       ga_12
CAP  CAV  C3       ga_12
CAV  CAP  CAQ      ga_12
CAV  CAP  CAO      ga_12
CAQ  CAP  CAO      ga_12
CAP  CAQ  CAR      ga_12
CAQ  CAR  CAK      ga_12
CAR  CAK  CBB      ga_12
CAR  CAK  CAI      ga_2
CAR  CAK  CAL      ga_12
CBB  CAK  CAI      ga_12
CBB  CAK  CAL      ga_12
CAI  CAK  CAL      ga_12
CAK  CAI  CBC      ga_12
CAK  CAI  CAH      ga_12
CAK  CAI  CAJ      ga_12
CBC  CAI  CAH      ga_12
CBC  CAI  CAJ      ga_12
CAH  CAI  CAJ      ga_12
CAI  CAH  CAG      ga_12
CAH  CAG  CAB      ga_12
CAG  CAB  CAW      ga_12
CAG  CAB  CAA      ga_12
CAG  CAB  CAC      ga_12
CAW  CAB  CAA      ga_47
CAW  CAB  CAC      ga_47
CAA  CAB  CAC      ga_12
CAB  CAW  CAE      ga_47
CAB  CAA  OBF      ga_29
CAB  CAA  OAF      ga_18
OBF  CAA  OAF      ga_32
CAA  OAF  CAE      ga_47
CAW  CAE  OAF      ga_47
CAW  CAE  CAD      ga_47
OAF  CAE  CAD      ga_12
C3   O3   -C1      ga_7
CAE  CAD  CBD      ga_7

```

CAE	CAD	CAC	ga_47	CAJ	CAI	CAK	CAR	gd_17
CBD	CAD	CAC	ga_7	CAO	CAL	CAK	CAR	gd_17
CAD	CBD	CBE	ga_12	CAG	CAH	CAI	CAK	gd_17
CAD	CBD	CBH	ga_12	CAN	CAJ	CAI	CAK	gd_17
CAD	CBD	OBG	ga_12	CAB	CAG	CAH	CAI	gd_17
CBE	CBD	CBH	ga_12	CAC	CAB	CAG	CAH	gd_17
CBE	CBD	OBG	ga_12	CAE	CAW	CAB	CAG	gd_17
CBH	CBD	OBG	ga_12	CAG	CAB	CAA	OAF	gd_20
CBD	OBG	H5N	ga_11	CAJ	CAC	CAB	CAG	gd_17
CAB	CAC	CAD	ga_47	CAD	CAE	CAW	CAB	gd_17
CAB	CAC	CAJ	ga_12	CAB	CAA	OAF	CAE	gd_3
CAD	CAC	CAJ	ga_12	CAD	CAE	OAF	CAA	gd_14
CAI	CAJ	CAC	ga_12	CAC	CAD	CAE	CAW	gd_17
CAI	CAJ	CAN	ga_12	CAE	CAD	CBD	OBG	gd_7
CAC	CAJ	CAN	ga_12	CAJ	CAC	CAD	CAE	gd_17
CAJ	CAN	CAM	ga_12	CAD	CBD	OBG	H5N	gd_12
CAN	CAM	CAL	ga_12	CAN	CAJ	CAC	CAB	gd_17
CAK	CAL	CAM	ga_12	CAM	CAN	CAJ	CAI	gd_17
CAK	CAL	CAO	ga_12	CAL	CAM	CAN	CAJ	gd_17
CAM	CAL	CAO	ga_12	CAO	CAL	CAM	CAN	gd_17
CAP	CAO	CAL	ga_12	CAS	CAO	CAL	CAK	gd_17
CAP	CAO	CBA	ga_12	CAT	CAS	CAO	CAP	gd_17
CAP	CAO	CAS	ga_12	C3	CAT	CAS	CAO	gd_17
CAL	CAO	CBA	ga_12	O3	C3	CAT	CAS	gd_17
CAL	CAO	CAS	ga_12					
CBA	CAO	CAS	ga_12					
CAO	CAS	CAT	ga_12					
CAS	CAT	C3	ga_12					
CAV	C3	CAT	ga_12					
CAV	C3	O3	ga_12					
CAT	C3	O3	ga_12					

```
[ impropers ]
; ai    aj    ak    al    gromos
type
CAV    CAY    CAP    CAZ    gi_2
CAP    CAV    CAQ    CAO    gi_2
CAK    CAR    CAI    CBB    gi_2
CAI    CAK    CBC    CAH    gi_2
CAB    CAG    CAW    CAA    gi_2
CAA    CAB    OBF    OAF    gi_1
CAE    CAD    CAW    OAF    gi_2
CAD    CAE    CAC    CBD    gi_2
CBD    CAD    CBE    CBH    gi_2
CAC    CAJ    CAB    CAD    gi_2
CAJ    CAN    CAC    CAI    gi_2
CAL    CAO    CAK    CAM    gi_2
CAO    CAP    CAL    CBA    gi_2
C3     O3     CAV    CAT    gi_2
```

```
[ dihedrals ]
; ai    aj    ak    al    gromos
type
CAO    CAP    CAV    CAY    gd_17
O3     C3     CAV    CAY    gd_17
CAR    CAQ    CAP    CAV    gd_17
CAV    C3     O3    -C1    gd_14
CAT    C3     O3    -C1    gd_14
CAS    CAO    CAP    CAV    gd_17
CAK    CAR    CAQ    CAP    gd_17
CAL    CAK    CAR    CAQ    gd_17
```

9.4 Chikusetsusaponin IVa

```

[ 1GLC ]
[ atoms ]
O4  OA  -0.40000  0      +O1  C1  O5      ga_8
H4  H    0.24000  0      C2  O2  H2      ga_11
C4  CH1  0.16000  0      C2  C1  O5      ga_8
C3  CH1  0.16000  1      C1  O5  C5      ga_9
O3  OA  -0.40000  1      C4  C5  O5      ga_8
H3  H    0.24000  1      C4  C5  C6      ga_7
C2  CH1  0.16000  2      O5  C5  C6      ga_8
O2  OA  -0.40000  2      C5  C6  O6      ga_8
H2  H    0.24000  2      C6  O6  H6      ga_11
C1  CH1  0.28600  3
O5  OA  -0.24200  4      [ impropers ]
C5  CH1  0.24200  4      ; ai  aj  ak  al  gromos
C6  CH2  0.16000  5      type
O6  OA  -0.40000  5      C4  O4  C5  C3  gi_2
H6  H    0.24000  5      C3  C4  O3  C2  gi_2
C2  C3  C1  O2  gi_2
C1  +O1  O5  C2  gi_2
C5  C6  C4  O5  gi_2
C4  C2  C4  C1  gi_7
C4  C5  gb_25  C5  C2  C3  C1  gi_8
C3  O3  gb_19  C5  C2  C3  O5  gi_9
C3  C2  gb_25
O3  H3  gb_1
C2  O2  gb_19
C2  C1  gb_25
O2  H2  gb_1
C1  O5  gb_19
C1  +O1  gb_19
C5  O5  gb_19
C5  C6  gb_25
C6  O6  gb_19
O6  H6  gb_1
[ bonds ]
O4  H4  gb_1
C4  O4  gb_19
C4  C3  gb_25
C4  C5  gb_25
C3  O3  gb_19
C3  C2  gb_25
O3  H3  gb_1
C2  O2  gb_19
C2  C1  gb_25
O2  H2  gb_1
C1  O5  gb_19
C1  +O1  gb_19
C5  O5  gb_19
C5  C6  gb_25
C6  O6  gb_19
O6  H6  gb_1
[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos
type
C5  C4  O4  H4  gd_12
C2  C3  C4  O4  gd_7
C6  C5  C4  O4  gd_7
C4  C3  O3  H3  gd_12
C1  C2  C3  C4  gd_17
C3  C2  O2  H2  gd_12
O5  C1  C2  C3  gd_7
C2  C1  O5  C5  gd_14
C2  C1  +O1  +C1  gd_14
C3  C2  C1  +O1  gd_17
C3  C2  C1  +O1  gd_7
O2  C2  C1  +O1  gd_8
O6  C6  C5  C4  gd_7
O6  C6  C5  C4  gd_17
C5  C6  O6  H6  gd_12
C2  C3  C4  C5  gd_17
C1  O5  C5  C4  gd_14
O5  C5  C4  C3  gd_7
C6  C5  C4  C3  gd_17
O5  C1  C2  O2  gd_8
C3  C2  C1  C4  gd_7
O2  C2  C3  C4  gd_7
O2  C2  C3  O3  gd_8
O2  C2  C3  O3  gd_7
O3  C3  C4  C5  gd_7
O3  C3  C4  O4  gd_8
O5  C5  C4  O4  gd_8
O5  C5  C6  O6  gd_8
[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos  type
H4  O4  C4  ga_11
O4  C4  C3  ga_8
O4  C4  C5  ga_8
C3  C4  C5  ga_7
C4  C3  O3  ga_8
C4  C3  C2  ga_7
O3  C3  C2  ga_8
C3  O3  H3  ga_11
C3  C2  O2  ga_8
C3  C2  C1  ga_7
O2  C2  C1  ga_8
+O1  C1  C2  ga_8

```

```

[ OLEA ]
[ atoms ]
CAG CH1 0.00000 1
CAH CH1 0.00000 1
CAI CH2 0.00000 2
CAW CH3 0.00000 2
CAK CH1 0.00000 2
CAX CH3 0.00000 2
CAR CH1 0.00000 2
CAQ CH1 0.00000 2
CAP CH1 0.00000 2
CAV CH1 0.00000 3
CAZ CH3 0.00000 3
CBA CH3 0.00000 4
CAU CH1 0.14200 5
O3 OA -0.39600 5
CAT CH1 0.00000 4
CAS CH1 0.00000 4
CAO CH1 0.00000 4
CAY CH3 0.00000 6
CAL CH1 0.00000 6
CAM CH2 0.00000 6
CAN CR1 0.00000 7
CAJ C 0.00000 7
CAC CH2 0.00000 7
CAB CH1 0.00000 7
CAA CH1 0.00000 7
CBE CH3 0.00000 8
CBF CH3 0.00000 8
CAF CH1 0.00000 8
CAE CH1 0.00000 9
CAD CH1 -0.08400 9
CBC C 0.39300 9
OBD O -0.30300 9
O1 OA -0.29200 9

[ bonds ]
CAG CAH gb_25
CAD CAG gb_25
CAI CAH gb_25
CAI CAW gb_26
CAI CAK gb_25
CAI CAJ gb_14
CAK CAX gb_26
CAK CAR gb_25
CAK CAL gb_25
CAR CAQ gb_25
CAP CAQ gb_25
CAV CAP gb_25
CAO CAP gb_25
CAV CAZ gb_26
CAV CBA gb_26
CAV CAU gb_25
CAU O3 gb_19
CAU CAT gb_25
O3 H63 gb_1
CAT CAS gb_25
CAO CAS gb_25
CAO CAY gb_26
CAO CAL gb_25
CAL CAM gb_25

CAM CAN gb_14
CAJ CAN gb_13
CAC CAJ gb_14
CAC CAB gb_25
CAD CAC gb_25
CAA CAB gb_25
CAA CBE gb_26
CAA CBF gb_26
CAA CAF gb_25
CAF CAE gb_25
CAD CAE gb_25
CAD CBC gb_26
CBC OBD gb_4
CBC O1 gb_12

[ angles ]
; ai aj ak gromos type
CAH CAG CAD ga_12
CAG CAH CAI ga_12
CAH CAI CAW ga_12
CAH CAI CAK ga_12
CAH CAI CAJ ga_12
CAW CAI CAK ga_12
CAW CAI CAJ ga_12
CAK CAI CAJ ga_12
CAI CAK CAX ga_12
CAI CAK CAR ga_12
CAI CAK CAL ga_12
CAX CAK CAR ga_12
CAX CAK CAL ga_12
CAR CAK CAL ga_12
CAK CAR CAQ ga_12
CAR CAQ CAP ga_12
CAQ CAP CAV ga_12
CAQ CAP CAO ga_12
CAV CAP CAO ga_12
CAP CAV CAZ ga_12
CAP CAV CBA ga_12
CAP CAV CAU ga_12
CAZ CAV CBA ga_12
CAZ CAV CAU ga_12
CBA CAV CAU ga_12
CAV CAU O3 ga_12
CAV CAU CAT ga_12
O3 CAU CAT ga_12
CAU CAT CAS ga_12
CAT CAS CAO ga_12
CAP CAO CAS ga_12
CAP CAO CAY ga_12
CAP CAO CAL ga_12
CAS CAO CAY ga_12
CAS CAO CAL ga_12
CAY CAO CAL ga_12
CAK CAL CAO ga_12
CAK CAL CAM ga_12
CAO CAL CAM ga_12
CAL CAM CAN ga_11
CAM CAN CAJ ga_24
CAI CAJ CAN ga_26
CAI CAJ CAC ga_26
CAN CAJ CAC ga_26

```

```

CAJ CAC CAB      ga_12      CAA CAB CBE CBF      gi_2
CAJ CAC CAD      ga_12      CAD CAG CAC CAE      gi_2
CAB CAC CAD      ga_12      CBC CAD OBD  O1      gi_1
CAC CAB CAA      ga_12      [ dihedrals ]
CAB CAA CBE      ga_12      ; ai  aj  ak  al  gromos
CAB CAA CBF      ga_12      type
CAB CAA CAF      ga_12      CAI CAH CAG CAD      gd_1
CBE CAA CBF      ga_12      CBC CAD CAG CAH      gd_1
CBE CAA CAF      ga_12      CAJ CAI CAH CAG      gd_1
CBF CAA CAF      ga_12      CAL CAK CAI CAH      gd_1
CAA CAF CAE      ga_12      CAH CAI CAJ CAC      gd_20
CAF CAE CAD      ga_12      CAQ CAR CAK CAI      gd_1
CAG CAD CAC      ga_12      CAM CAL CAK CAI      gd_1
CAG CAD CAE      ga_12      CAP CAQ CAR CAK      gd_1
CAG CAD CBC      ga_12      CAO CAP CAQ CAR      gd_1
CAC CAD CAE      ga_12      CAU CAV CAP CAQ      gd_1
CAC CAD CBC      ga_12      CAL CAO CAP CAQ      gd_1
CAE CAD CBC      ga_12      CAT CAU CAV CAP      gd_1
CAD CBC OBD      ga_29      CAS CAT CAU CAV      gd_1
CAD CBC O1      ga_18      CAO CAS CAT CAU      gd_1
OBD CBC O1      ga_32      CAL CAO CAS CAT      gd_1
[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos
type
CAI CAH CAK CAW      gi_2
CAK CAI CAX CAR      gi_2
CAP CAQ CAO CAV      gi_2
CAV CAP CAZ CBA      gi_2
CAU CAV CAT O3      gi_2
CAO CAP CAY CAS      gi_2
CAL CAM CAO CAK      gi_2
CAJ CAI CAC CAN      gi_1
CAC CAJ CAD CAB      gi_2
      CAA CAB CBE CBF      gi_2
      CAD CAG CAC CAE      gi_2
      CBC CAD OBD  O1      gi_1
      [ dihedrals ]
      ; ai  aj  ak  al  gromos
      type
      CAI CAH CAG CAD      gd_1
      CBC CAD CAG CAH      gd_1
      CAJ CAI CAH CAG      gd_1
      CAL CAK CAI CAH      gd_1
      CAH CAI CAJ CAC      gd_20
      CAQ CAR CAK CAI      gd_1
      CAM CAL CAK CAI      gd_1
      CAP CAQ CAR CAK      gd_1
      CAO CAP CAQ CAR      gd_1
      CAU CAV CAP CAQ      gd_1
      CAL CAO CAP CAQ      gd_1
      CAT CAU CAV CAP      gd_1
      CAS CAT CAU CAV      gd_1
      CAO CAS CAT CAU      gd_1
      CAL CAO CAS CAT      gd_1
      CAM CAL CAO CAP      gd_1
      CAN CAM CAL CAK      gd_1
      CAL CAM CAN CAJ      gd_20
      CAC CAJ CAN CAM      gd_5
      CAD CAC CAJ CAI      gd_20
      CAA CAB CAC CAJ      gd_1
      CBC CAD CAC CAJ      gd_1
      CAF CAA CAB CAC      gd_1
      CAE CAF CAA CAB      gd_1
      CAD CAE CAF CAA      gd_1
      CBC CAD CAE CAF      gd_1
      CAG CAD CBC O1      gd_20

```

```

[ 1AGL ]
[ atoms ]
O6A OM -0.58600 0
C6 C 0.17200 0
O6B OM -0.58600 0
C5 CH1 0.24200 1
O5 OA -0.24200 1
C1 CH1 0.25400 2
C2 CH1 0.16000 3
O2 OA -0.40000 3
H2 H 0.24000 3
C3 CH1 0.16000 4
O3 OA -0.40000 4
H3 H 0.24000 4
C4 CH1 0.16000 5
O4 OA -0.40000 5
H4 H 0.24000 5

[ bonds ]
C6 O6A gb_5
C6 O6B gb_5
C5 C6 gb_25
C5 O5 gb_19
C5 C4 gb_25
C1 O5 gb_19
-O3 C1 gb_19
C1 C2 gb_25
C2 O2 gb_19
C2 C3 gb_25
O2 H2 gb_1
C3 O3 gb_19
C3 C4 gb_25
O3 H3 gb_1
C4 O4 gb_19
O4 H4 gb_1

[ angles ]
; ai aj ak gromos type
O6A C6 O6B ga_37
O6A C6 C5 ga_21
O6B C6 C5 ga_21
C6 C5 O5 ga_8
C6 C5 C4 ga_7
O5 C5 C4 ga_8
C5 O5 C1 ga_9
O5 C1 C2 ga_8
C1 C2 O2 ga_8
C1 C2 C3 ga_7
-O3 C1 C2 ga_8
-O3 C1 O5 ga_8
O2 C2 C3 ga_8

C2 O2 H2 ga_11
C2 C3 O3 ga_8
C2 C3 C4 ga_7
O3 C3 C4 ga_8
C3 O3 H3 ga_11
C5 C4 C3 ga_7
C5 C4 O4 ga_8
C3 C4 O4 ga_8
C4 O4 H4 ga_11

[ impropers ]
; ai aj ak al gromos
type
C6 O6A O6B C5 gi_1
C5 C6 C4 O5 gi_2
C1 -O3 O5 C2 gi_2
C2 C1 O2 C3 gi_2
C3 C2 C4 O3 gi_2
C4 O4 C5 C3 gi_2
C5 C2 C4 C1 gi_7
C5 C2 C3 C1 gi_8
C5 C2 C3 O5 gi_9

[ dihedrals ]
; ai aj ak al gromos
type
C4 C5 C6 O6A gd_20
C4 C5 C6 O6B gd_20
O4 C4 C5 C6 gd_7
C2 C1 O5 C5 gd_14
C3 C2 C1 O5 gd_7
C1 C2 O2 H2 gd_14
C4 C3 C2 C1 gd_17
C2 C3 O3 H3 gd_12
O4 C4 C3 C2 gd_7
C2 C1 -O3 -C3 gd_14
C3 C2 C1 -O3 gd_17
C3 C2 C1 -O3 gd_7
O2 C2 C1 -O3 gd_8
C5 C4 O4 H4 gd_12
C2 C3 C4 C5 gd_17
C1 O5 C5 C4 gd_14
O5 C5 C4 C3 gd_7
C6 C5 C4 C3 gd_17
O5 C1 C2 O2 gd_8
O2 C2 C3 C4 gd_7
O2 C2 C3 O3 gd_8
C1 C2 C3 O3 gd_7
O3 C3 C4 C5 gd_7
O3 C3 C4 O4 gd_8
O5 C5 C4 O4 gd_8

```

C5 C2 C3 O5 gi_9

9.5 QS-21

```

[ XYLA ]
[ atoms ]
  O4  OA  -0.40000  0
  H4   H   0.24000  0
  C4  CH1  0.16000  0
  C3  CH1  0.16000  1
  O3   OA  -0.40000  1
  H3   H   0.24000  1
  C2  CH1  0.16000  2
  O2   OA  -0.40000  2
  H2   H   0.24000  2
  C1  CH1  0.25400  3
  O5   OA  -0.24200  4
  C5  CH2  0.24200  4
[ bonds ]
  O4  H4      gb_1
  C4  O4      gb_19
  C4  C3      gb_25
  C4  C5      gb_25
  C3  O3      gb_19
  C3  C2      gb_25
  O3  H3      gb_1
  C2  O2      gb_19
  C2  C1      gb_25
  C1  +O3     gb_19
  O2  H2      gb_1
  C1  O5      gb_19
  C5  O5      gb_19
[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
  H4  O4  C4  ga_11
  O4  C4  C3  ga_8
  O4  C4  C5  ga_8
  C3  C4  C5  ga_7
  C4  C3  O3  ga_8
  C4  C3  C2  ga_7
  O3  C3  C2  ga_8
  C3  O3  H3  ga_11
  C3  C2  O2  ga_8
  C3  C2  C1  ga_7
  O2  C2  C1  ga_8
+O3  C1  C2  ga_8
+O3  C1  O5  ga_8
  C2  O2  H2  ga_11
  C2  C1  O5  ga_8
  C1  O5  C5  ga_9
  C4  C5  O5  ga_8
[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos
type
  C4  O4  C5  C3  gi_2
  C3  C4  O3  C2  gi_2
  C2  C3  C1  O2  gi_2
  C1  +O3  O5  C2  gi_2
  C5  C2  C4  C1  gi_7
  C5  C2  C3  C1  gi_8
[ dihedrals ]; ai  aj  ak
al  gromos type
  C5  C4  O4  H4  gd_12
  C2  C3  C4  O4  gd_7
  C4  C3  O3  H3  gd_12
  C1  C2  C3  C4  gd_17
  C3  C2  O2  H2  gd_12
  O5  C1  C2  C3  gd_7
  C2  C1  O5  C5  gd_14
  C2  C1  +O3  +C3  gd_14
  C3  C2  C1  +O3  gd_17
  C3  C2  C1  +O3  gd_7
  O2  C2  C1  +O3  gd_8
  C2  C3  C4  C5  gd_17
  C1  O5  C5  C4  gd_14
  O5  C5  C4  C3  gd_7
  O5  C1  C2  O2  gd_8
  O2  C2  C3  C4  gd_7
  O2  C2  C3  O3  gd_8
  C1  C2  C3  O3  gd_7
  O3  C3  C4  C5  gd_7
  O3  C3  C4  O4  gd_8
  O5  C5  C4  O4  gd_8

```

```

[ 1AGL ]
[ atoms ]
O6A OM -0.58600 0
C6 C 0.17200 0
O6B OM -0.58600 0
C5 CH1 0.24200 1
O5 OA -0.24200 1
C1 CH1 0.25400 2
C2 CH1 0.14200 3
O2 OA -0.39600 3
C3 CH1 0.14200 4
O3 OA -0.39600 4
C4 CH1 0.16000 5
O4 OA -0.40000 5
H4 H 0.24000 5

[ bonds ]
C6 O6A gb_5
C6 O6B gb_5
C5 C6 gb_25
C5 O5 gb_19
C5 C4 gb_25
C1 O5 gb_19
C1 +O1 gb_19
C1 C2 gb_25
C2 O2 gb_19
C2 C3 gb_25
C3 O3 gb_19
C3 C4 gb_25
C4 O4 gb_19
O4 H4 gb_1

[ angles ]
; ai aj ak gromos type
O6A C6 O6B ga_37
O6A C6 C5 ga_21
O6B C6 C5 ga_21
C6 C5 O5 ga_8
C6 C5 C4 ga_7
O5 C5 C4 ga_8
C5 O5 C1 ga_9
O5 C1 C2 ga_8
C1 C2 O2 ga_8
C1 C2 C3 ga_7
+O1 C1 C2 ga_14
+O1 C1 O5 ga_8
O2 C2 C3 ga_8
C2 C3 O3 ga_8

C2 C3 C4 ga_7
O3 C3 C4 ga_8
C5 C4 C3 ga_7
C5 C4 O4 ga_8
C3 C4 O4 ga_11

[ impropers ]
; ai aj ak al gromos
type
C6 O6A O6B C5 gi_1
C5 C6 C4 O5 gi_2
C1 +O1 O5 C2 gi_2
C2 C1 O2 C3 gi_2
C3 C2 C4 O3 gi_2
C4 O4 C5 C3 gi_2
C5 C2 C4 C1 gi_7
C5 C2 C3 C1 gi_8
C5 C2 C3 O5 gi_9

[ dihedrals ]
; ai aj ak al gromos
type
C4 C5 C6 O6A gd_20
C4 C5 C6 O6B gd_20
O4 C4 C5 C6 gd_7
C2 C1 O5 C5 gd_14
C3 C2 C1 O5 gd_7
C4 C3 C2 C1 gd_17
C2 C3 O3 -C1 gd_14
O4 C4 C3 C2 gd_7
C2 C1 +O1 +C1 gd_14
C3 C2 C1 +O1 gd_17
C3 C2 C1 +O1 gd_7
O2 C2 C1 +O1 gd_8
C5 C4 O4 H4 gd_12
C2 C3 C4 C5 gd_17
C1 O5 C5 C4 gd_14
O5 C5 C4 C3 gd_7
C6 C5 C4 C3 gd_17
O5 C1 C2 O2 gd_8
O2 C2 C3 C4 gd_7
O2 C2 C3 O3 gd_8
C1 C2 C3 O3 gd_7
O3 C3 C4 C5 gd_7
O3 C3 C4 O4 gd_8
O5 C5 C4 O4 gd_8

```



```

[ AQUI ]
[ atoms ]
  OB      O      -0.280      1      CX      OX      gb_5
  CBB     C       0.280      1      OX     +C1     gb_19
  CAS     CH1     0.000      1      CX     OBF      gb_5
  CBA     CH3     0.000      1      CAD    CAE      gb_25
  CAQ     CH1     0.000      1      CAF    CAE      gb_25
  CAP     CH1     0.000      1      CAF    CBG      gb_26
  CAO     CH1     0.000      1      CAF    CBH      gb_26
  CAN     CH1     0.000      2      CAF    CAA      gb_25
  CAW     CH3     0.000      2      CAB    CAA      gb_14
  CAH     CH2     0.000      2      CAB    CAG      gb_15
  CAX     CH3     0.000      2      CAG    CAK      gb_15
  CAI     CH1     0.000      2      CAK    CAL      gb_15
  CAJ     CH1     0.164      2      CAM    CAL      gb_14
  OBD     OA      -0.353      2      CAR    CAM      gb_25
  H5L     H       0.189      2      CAR    CAY      gb_26
  CAC     CH2     -0.084      3      CAR    CAV      gb_25
  CX      C       0.393      3      CAV    CAU      gb_25
  OX      OM      -0.292      3      C1     CAU      gb_25
  OBF     OM      -0.303      3      C1     O1      gb_19
  CAD     CH1     -0.020      3
  CAE     CH1     0.000      3
  CAF     CH1     0.000      3
  CBG     CH3     0.000      4
  CBH     CH3     0.000      5
  CAA     CH2     0.000      5
  CAB     C       -0.025      6
  CAG     C       0.000      6
  CAK     CR1     0.000      6
  CAL     CR1     0.000      6
  CAM     CH2     0.000      6
  CAR     CH1     0.000      6
  CAY     CH3     0.000      6
  CAV     CH1     0.000      7
  CAU     CH1     0.000      7
  C1      CH1     0.142      7
  O1      OA      -0.396      7
[ bonds ]
  CBB     OB      gb_4
  CAS     CBB     gb_26
  CAS     CBA     gb_26
  CAS     CAQ     gb_25
  CAS     C1      gb_25
  CAQ     CAP     gb_25
  CAR     CAQ     gb_25
  CAP     CAO     gb_25
  CAN     CAO     gb_25
  CAN     CAW     gb_26
  CAN     CAH     gb_25
  CAN     CAM     gb_25
  CAH     CAX     gb_26
  CAH     CAI     gb_25
  CAH     CAG     gb_14
  CAJ     CAI     gb_25
  CAJ     OBD     gb_19
  CAC     CAJ     gb_25
  OBD     H5L     gb_1
  CAC     CX      gb_14
  CAC     CAD     gb_25
  CAC     CAB     gb_14
  CX      OX      gb_5
  OX     +C1     gb_19
  CX     OBF     gb_5
  CAD    CAE     gb_25
  CAF    CAE     gb_25
  CAF    CBG     gb_26
  CAF    CBH     gb_26
  CAF    CAA     gb_25
  CAB    CAA     gb_14
  CAB    CAG     gb_15
  CAG    CAK     gb_15
  CAK    CAL     gb_15
  CAM    CAL     gb_14
  CAR    CAM     gb_25
  CAR    CAY     gb_26
  CAR    CAV     gb_25
  CAV    CAU     gb_25
  C1     CAU     gb_25
  C1     O1      gb_19
[ angles ]
; ai      aj      ak      gromos type
  OB      CBB     CAS      ga_29
  CBB     CAS     CBA      ga_12
  CBB     CAS     CAQ      ga_12
  CBB     CAS     C1       ga_12
  CBA     CAS     CAQ      ga_12
  CBA     CAS     C1       ga_12
  CAQ     CAS     C1       ga_12
  CAS     CAQ     CAP      ga_12
  CAS     CAQ     CAR      ga_12
  CAP     CAQ     CAR      ga_12
  CAQ     CAP     CAO      ga_12
  CAP     CAO     CAN      ga_12
  CAO     CAN     CAW      ga_12
  CAO     CAN     CAH      ga_12
  CAO     CAN     CAM      ga_12
  CAW     CAN     CAH      ga_12
  CAW     CAN     CAM      ga_12
  CAH     CAN     CAM      ga_12
  CAN     CAH     CAX      ga_12
  CAN     CAH     CAI      ga_12
  CAN     CAH     CAG      ga_12
  CAX     CAH     CAI      ga_12
  CAX     CAH     CAG      ga_12
  CAI     CAH     CAG      ga_12
  CAH     CAI     CAJ      ga_12
  CAI     CAJ     OBD      ga_12
  CAI     CAJ     CAC      ga_12
  OBD     CAJ     CAC      ga_12
  CAJ     OBD     H5L      ga_11
  CAJ     CAC     CX       ga_12
  CAJ     CAC     CAD      ga_12
  CAJ     CAC     CAB      ga_12
  CX      CAC     CAD      ga_12
  CX      CAC     CAB      ga_12
  CAD     CAC     CAB      ga_12
  CAC     CX      OX       ga_21
  CX      OX     +C1     ga_9
  CAC     CX      OBF     ga_21

```

OX	CX	OBF	ga_37	CAN	CAH	CAG	CAK	gd_20
CAC	CAD	CAE	ga_12	CAC	CAJ	CAI	CAH	gd_17
CAD	CAE	CAF	ga_12	CAI	CAJ	OBD	H5L	gd_12
CAE	CAF	CBG	ga_12	CAB	CAC	CAJ	CAI	gd_17
CAE	CAF	CBH	ga_12	CAC	CX	OX	+C1	gd_14
CAE	CAF	CAA	ga_12	CAJ	CAC	CX	OBF	gd_20
CBG	CAF	CBH	ga_12	CAE	CAD	CAC	CAJ	gd_17
CBG	CAF	CAA	ga_12	CAJ	CAC	CAB	CAG	gd_20
CBH	CAF	CAA	ga_12	CAF	CAE	CAD	CAC	gd_17
CAF	CAA	CAB	ga_12	CAA	CAF	CAE	CAD	gd_17
CAC	CAB	CAA	ga_26	CAB	CAA	CAF	CAE	gd_17
CAC	CAB	CAG	ga_26	CAF	CAA	CAB	CAG	gd_20
CAA	CAB	CAG	ga_26	CAK	CAG	CAB	CAC	gd_1
CAH	CAG	CAB	ga_26	CAH	CAG	CAK	CAL	gd_5
CAH	CAG	CAK	ga_26	CAG	CAK	CAL	CAM	gd_5
CAB	CAG	CAK	ga_26	CAR	CAM	CAL	CAK	gd_20
CAG	CAK	CAL	ga_24	CAV	CAR	CAM	CAN	gd_17
CAK	CAL	CAM	ga_24	CAU	CAV	CAR	CAQ	gd_17
CAN	CAM	CAL	ga_11	C1	CAU	CAV	CAR	gd_17
CAN	CAM	CAR	ga_12	O1	C1	CAU	CAV	gd_17
CAL	CAM	CAR	ga_11					
CAQ	CAR	CAM	ga_12					
CAQ	CAR	CAY	ga_12					
CAQ	CAR	CAV	ga_12					
CAM	CAR	CAY	ga_12					
CAM	CAR	CAV	ga_12					
CAY	CAR	CAV	ga_12					
CAR	CAV	CAU	ga_12					
CAV	CAU	C1	ga_12					
CAS	C1	CAU	ga_12					
CAS	C1	O1	ga_12					
CAU	C1	O1	ga_12					

[impropers]

;	ai	aj	ak	al	gromos
type					
CAS	CBB	CAQ	CBA	gi_2	
CAQ	CAS	CAP	CAR	gi_2	
CAN	CAO	CAH	CAW	gi_2	
CAH	CAN	CAX	CAI	gi_2	
CAJ	CAI	CAC	OBD	gi_2	
CAC	CAJ	CAD	CX	gi_2	
CX	CAC	OX	OBF	gi_1	
CAF	CAE	CBH	CBG	gi_2	
CAB	CAC	CAA	CAG	gi_1	
CAG	CAH	CAK	CAB	gi_1	
CAM	CAR	CAN	CAL	gi_2	
CAR	CAQ	CAM	CAY	gi_2	
C1	O1	CAS	CAU	gi_2	

[dihedrals]

;	ai	aj	ak	al	gromos
type					
C1	CAS	CBB	OB	gd_20	
CAR	CAQ	CAS	CBB	gd_17	
O1	C1	CAS	CBB	gd_17	
CAO	CAP	CAQ	CAS	gd_17	
CAV	CAR	CAQ	CAS	gd_17	
CAN	CAO	CAP	CAQ	gd_17	
CAM	CAN	CAO	CAP	gd_17	
CAG	CAH	CAN	CAO	gd_17	
CAR	CAM	CAN	CAO	gd_17	
CAJ	CAI	CAH	CAN	gd_17	

```

[ FUCO ]
[ atoms ]
C6  CH3    0.00000    0
C5  CH1    0.24200    1
O5  OA     -0.24200    1
C1  CH1    0.28600    2
C2  CH1    0.14200    3
O2  OA     -0.39600    3
C3  CH1    0.17700    4
O3  OA     -0.33300    4
C4  CH1    0.16000    5
O4  OA     -0.40000    5
H4   H      0.24000    5

[ bonds ]
C6  C5      gb_25
C5  O5      gb_19
C5  C4      gb_25
O5  C1      gb_19
C1  C2      gb_25
C2  O2      gb_19
C2  C3      gb_25
C3  O3      gb_19
C3  C4      gb_25
O3  +C1     gb_19
C4  O4      gb_19
O4  H4      gb_1

[ angles ]
; ai    aj    ak    gromos type
C6  C5    O5      ga_8
C6  C5    C4      ga_7
O5  C5    C4      ga_8
C5  O5    C1      ga_9
O5  C1    C2      ga_8
C1  C2    O2      ga_8
C1  C2    C3      ga_7
-OX C1     O5      ga_8
-OX C1     C2      ga_14
O2  C2    C3      ga_8
C2  C3    O3      ga_8
C2  C3    C4      ga_7
O3  C3    C4      ga_8
C3  O3    +C1     ga_9
C5  C4    C3      ga_7
C5  C4    O4      ga_8
C3  C4    O4      ga_8
C4  O4    H4      ga_11

[ impropers ]
; ai    aj    ak    al    gromos
type
C1  -OX    O5    C2    gi_2
C5  C6     O5    C4    gi_2
C2  C1     C3    O2    gi_2
C3  C2     O3    C4    gi_2
C4  O4     C5    C3    gi_2
C5  C2     C4    C1    gi_4
C5  C2     C3    C1    gi_5
C5  C2     C3    O5    gi_6

[ dihedrals ]
; ai    aj    ak    al    gromos
type
-CX  -OX    C1    C2    gd_14
-OX  C1     C2    C3    gd_17
-OX  C1     C2    C3    gd_7
-OX  C1     C2    O2    gd_8
O4   C4     C5    C6    gd_7
C2   C1     O5    C5    gd_14
C3   C2     C1    O5    gd_7
C4   C3     C2    C1    gd_17
C2   C3     O3    +C1   gd_14
O4   C4     C3    C2    gd_7
C5   C4     O4    H4    gd_12
C2   C3     C4    C5    gd_17
C1   O5     C5    C4    gd_14
O5   C5     C4    C3    gd_7
C6   C5     C4    C3    gd_17
O5   C1     C2    O2    gd_8
O2   C2     C3    C4    gd_7
O2   C2     C3    O3    gd_8
C1   C2     C3    O3    gd_7
O3   C3     C4    C5    gd_7
O3   C3     C4    O4    gd_8
O5   C5     C4    O4    gd_8

```

```

[ ACIL ]
[ atoms ]
  C1      C      0.300      1      -O3      C1      OBH      ga_8
  OBH     O      -0.363     1      -O3      C1      CAQ      ga_14
  CAQ     CH2     0.035      2      CAQ      CAP      CAO      ga_12
  CAP     CH1     0.180      2      OBG      CAP      CAO      ga_12
  OBG     OA      -0.397     2      CAP      OBG      HBG      ga_11
  HBG     H       0.213     2      CAP      CAO      CAN      ga_12
  CAO     CH2     0.045      2      CAO      CAN      CBC      ga_12
  CAN     CH1     0.200      3      CAO      CAN      OAM      ga_12
  CBC     CH1     0.011      4      CBC      CAN      OAM      ga_12
  CBF     CH3     0.091      4      CAN      CBC      CBF      ga_12
  CBD     CH2     0.016      4      CAN      CBC      CBD      ga_12
  CBE     CH3     -0.010     4      CBF      CBC      CBD      ga_12
  OAM     OA      -0.286     4      CBC      CBD      CBE      ga_12
  CAL     C       0.300      4      CAN      OAM      CAL      ga_9
  OBB     O      -0.334     4      OAM      CAL      OBB      ga_32
  CAK     CH2     0.035      5      OAM      CAL      CAK      ga_18
  CAJ     CH1     0.177      5      OBB      CAL      CAK      ga_29
  OBA     OA      -0.401     5      CAL      CAK      CAJ      ga_12
  HBA     H       0.225     5      CAK      CAJ      OBA      ga_12
  CAI     CH2     0.005      5      CAK      CAJ      CAI      ga_12
  CX      CH1     0.160      6      OBA      CAJ      CAI      ga_12
  OX      OA      -0.340     6      CAJ      OBA      HBA      ga_11
  CAW     CH1     0.011      6      CAJ      CAI      CX       ga_12
  CAZ     CH3     -0.001     7      CAI      CX      CAW      ga_12
  CAX     CH2     0.013      7      CAI      CX      OX       ga_12
  CAY     CH3     -0.006     8      CAW      CX      OX       ga_12
[ bonds ]
  C1      OBH      gb_4
  C1      CAQ      gb_26
  CAP     CAQ      gb_26
  CAP     OBG      gb_17
  CAP     CAO      gb_26
  OBG     HBG      gb_1
  CAN     CAO      gb_26
  CAN     CBC      gb_26
  CAN     OAM      gb_17
  CBC     CBF      gb_26
  CBC     CBD      gb_26
  CBD     CBE      gb_26
  CAL     OAM      gb_12
  CAL     OBB      gb_4
  CAL     CAK      gb_26
  CAJ     CAK      gb_26
  CAJ     OBA      gb_17
  CAJ     CAI      gb_26
  OBA     HBA      gb_1
  CX      CAI      gb_26
  CX      CAW      gb_26
  CX      OX       gb_19
  OX      +C1     gb_19
  CAW     CAZ      gb_26
  CAW     CAX      gb_26
  CAX     CAY      gb_26
  CX      OX      +C1     ga_9
  CX      CAW      CAZ     ga_12
  CX      CAW      CAX     ga_12
  CAZ     CAW      CAX     ga_12
  CAW     CAX      CAY     ga_12
[ impropers ]
; ai      aj      ak      al      gromos
type
  C1      -O3     OBH     CAQ     gi_1
  CAP     CAQ     OBG     CAO     gi_2
  CAN     CAO     CBC     OAM     gi_2
  CBC     CAN     CBD     CBF     gi_2
  CX      CAI     OX     CAW     gi_2
  CAL     OAM     OBB     CAK     gi_1
  CAJ     CAK     CAI     OBA     gi_2
  CAW     CX      CAZ     CAX     gi_2
[ dihedrals ]
; ai      aj      ak      al      gromos
type
  CAO     CAP     CAQ     C1      gd_17
  -C3     -O3     C1      CAQ     gd_14
  -O3     C1      CAQ     CAP     gd_17
  -O3     C1      CAQ     CAP     gd_7
  CAQ     CAP     OBG     HBG     gd_12
  CAN     CAO     CAP     CAQ     gd_17
  OAM     CAN     CAO     CAP     gd_17
  CBD     CBC     CAN     CAO     gd_17
  CAO     CAN     OAM     CAL     gd_14
  CBE     CBD     CBC     CAN     gd_17
  CAK     CAL     OAM     CAN     gd_14
  CAJ     CAK     CAL     OAM     gd_20
  CAI     CAJ     CAK     CAL     gd_17

```

CAK	CAJ	OBA	HBA	gd_12
OX	CX	CAI	CAJ	gd_17
CAI	CX	OX	+C1	gd_14
CX	CAI	CAJ	CAK	gd_17
CAX	CAW	CX	CAI	gd_17
CAY	CAX	CAW	CX	gd_17

```

[ CARA ]
[ atoms ]
O3 OA -0.40000 0 C4 C3 O3 H3 gd_12
H3 H 0.24000 0 C1 C2 C3 O3 gd_17
C3 CH1 0.16000 0 C5 C4 C3 O3 gd_17
C2 CH1 0.16000 1 C3 C2 O2 H2 gd_12
O2 OA -0.40000 1 O4 C1 C2 C3 gd_17
H2 H 0.24000 1 C2 C1 O4 C4 gd_14
C1 CH1 0.27700 2 C5 C4 O4 C1 gd_14
O4 OA -0.24200 3 O5 C5 C4 C3 gd_17
C4 CH1 0.24200 3 C4 C5 O5 H5 gd_12
C5 CH2 0.16000 4 C1 C2 C3 C4 gd_17
O5 OA -0.40000 4 C2 C3 C4 O4 gd_17
H5 H 0.24000 4 C3 C4 O4 C1 gd_7
[ bonds ]
O3 H3 gb_1 -CX -OX C1 C2 gd_14
C3 O3 gb_19 -OX C1 C2 C3 gd_17
C3 C2 gb_25 -OX C1 C2 O2 gd_8
C3 C4 gb_25 C5 C4 C3 C2 gd_17
C2 O2 gb_19 C5 C4 C3 O3 gd_7
C2 C1 gb_25 O4 C1 C2 O2 gd_8
O2 H2 gb_1 O2 C2 C3 C4 gd_7
C1 O4 gb_19 O2 C2 C3 O3 gd_8
C4 O4 gb_19 O3 C3 C4 O4 gd_8
C4 C5 gb_26 C3 C4 C5 O5 gd_17
C5 O5 gb_17 O4 C4 C5 O5 gd_8
O5 H5 gb_1
[ angles ]
; ai aj ak gromos type
H3 O3 C3 ga_11
O3 C3 C2 ga_12
O3 C3 C4 ga_12
C2 C3 C4 ga_47
C3 C2 O2 ga_12
C3 C2 C1 ga_47
O2 C2 C1 ga_12
-OX C1 C2 ga_14
-OX C1 O5 ga_8
C2 O2 H2 ga_11
C2 C1 O4 ga_47
C1 O4 C4 ga_47
C3 C4 O4 ga_47
C3 C4 C5 ga_12
O4 C4 C5 ga_8
C4 C5 O5 ga_12
C5 O5 H5 ga_11
[ impropers ]
; ai aj ak al gromos
type
C3 O3 C2 C4 gi_2
C2 C3 C1 O2 gi_2
C4 C5 O4 C3 gi_2
C1 -OX O4 C2 gi_2
C4 C2 C3 O4 gi_18
C4 C2 C3 C1 gi_19
C4 C1 C3 O4 gi_20
C3 C1 C2 O4 gi_21
[ dihedrals ]
; ai aj ak al gromos
type

```

```

[ BGAL ]
[ atoms ]
C6  CH2    0.16000    0          C2  C3  C1  O2    gi_2
O6  OA     -0.40000    0          C3  C4  O3  C2    gi_2
H6  H       0.24000    0          C4  O4  C3  C5    gi_2
C5  CH1    0.24200    1          C5  C2  C4  C1    gi_7
O5  OA     -0.24200    1          C5  C2  C3  C1    gi_8
C1  CH1    0.25400    2          C5  C2  C3  O5    gi_9
C2  CH1    0.16000    3
O2  OA     -0.40000    3
H2  H       0.24000    3
C3  CH1    0.16000    4
O3  OA     -0.40000    4
H3  H       0.24000    4
C4  CH1    0.16000    5
O4  OA     -0.40000    5
H4  H       0.24000    5
[ bonds ]
C6  C5      gb_25
C5  O5      gb_19
C5  C4      gb_25
O5  C1      gb_19
C1  C2      gb_25
C2  O2      gb_19
C2  C3      gb_25
O2  H2      gb_1
C3  O3      gb_19
O3  H3      gb_1
C3  C4      gb_25
C4  O4      gb_19
O4  H4      gb_1
C6  O6      gb_19
O6  H6      gb_1
[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
C6  C5  O5    ga_8
C6  C5  C4    ga_7
O5  C5  C4    ga_8
C5  O5  C1    ga_9
O5  C1  C2    ga_8
C1  C2  O2    ga_8
C1  C2  C3    ga_7
O2  C2  C3    ga_8
C2  O2  H2    ga_11
C2  C3  O3    ga_8
C2  C3  C4    ga_7
O3  C3  C4    ga_8
C3  O3  H3    ga_11
C5  C4  C3    ga_7
C5  C4  O4    ga_8
C3  C4  O4    ga_8
C4  O4  H4    ga_11
C5  C6  O6    ga_8
C6  O6  H6    ga_11
[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos
type
C5  C6  C4  O5    gi_2

```

```

[ 1RHA ]
[ atoms ]
  C6  CH3    0.00000    0
  C5  CH1    0.24200    1
  O5  OA    -0.24200    1
  C1  CH1    0.25400    2
  C2  CH1    0.16000    3
  O2  OA    -0.40000    3
  H2   H     0.24000    3
  C3  CH1    0.16000    4
  O3  OA    -0.40000    4
  H3   H     0.24000    4
  C4  CH1    0.14200    5
  O4  OA    -0.39600    5
[ bonds ]
  C5  C6    gb_25
  C5  O5    gb_19
  C5  C4    gb_25
  C1  O5    gb_19
  C1  C2    gb_25
  C2  O2    gb_19
  O2  H2    gb_1
  C2  C3    gb_25
  C3  O3    gb_19
  C3  C4    gb_25
  O3  H3    gb_1
  C4  O4    gb_19
  O4  +C1   gb_1
[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
  C6  C5  O5    ga_8
  C6  C5  C4    ga_7
  O5  C5  C4    ga_8
  C5  O5  C1    ga_9
  O5  C1  C2    ga_8
  C1  C2  O2    ga_8
  C1  C2  C3    ga_7
  O2  C2  C3    ga_8
  C2  C3  O3    ga_8
  C2  O2  H2    ga_11
  C2  C3  C4    ga_7
  C4  O4  +C1   ga_11
  O3  C3  C4    ga_8
  C3  O3  H3    ga_11
  C5  C4  C3    ga_7
  C5  C4  O4    ga_8
  C3  C4  O4    ga_8
[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos
type
  C5  C6  O5  C4  gi_2
  C2  C1  O2  C3  gi_2
  C3  C2  O3  C4  gi_2
  C4  O4  C3  C5  gi_2
  C5  C2  C4  C1  gi_4
  C5  C2  C3  C1  gi_5
  C5  C2  C3  O5  gi_6

[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos
type
  O4  C4  C5  C6  gd_7
  C2  C1  O5  C5  gd_14
  C3  C2  C1  O5  gd_7
  C4  C3  C2  C1  gd_17
  C2  C3  O3  H3  gd_12
  C1  C2  O2  H2  gd_12
  O4  C4  C3  C2  gd_7
  C2  C3  C4  C5  gd_17
  C1  O5  C5  C4  gd_14
  O5  C5  C4  C3  gd_7
  C6  C5  C4  C3  gd_17
  O5  C1  C2  O2  gd_8
  O2  C2  C3  C4  gd_7
  C3  C4  O4  +C1  gd_14
  O2  C2  C3  O3  gd_8
  C1  C2  C3  O3  gd_7
  O3  C3  C4  C5  gd_7
  O3  C3  C4  O4  gd_8
  O5  C5  C4  O4  gd_8

```



```

[ XYLB ]
[ atoms ]
O4 OA -0.40000 0 C1 C2 C3 C4 gd_17
H4 H 0.24000 0 C3 C2 O2 H2 gd_12
C4 CH1 0.16000 0 O5 C1 C2 C3 gd_7
C3 CH1 0.14200 1 C2 C1 O5 C5 gd_14
O3 OA -0.39600 1 C2 C1 -O4 -C4 gd_14
C2 CH1 0.16000 2 C3 C2 C1 -O4 gd_17
O2 OA -0.40000 2 C3 C2 C1 -O4 gd_7
H2 H 0.24000 2 O2 C2 C1 -O4 gd_8
C1 CH1 0.25400 3 C2 C3 C4 C5 gd_17
O5 OA -0.24200 4 C1 O5 C5 C4 gd_14
C5 CH2 0.24200 4 O5 C5 C4 C3 gd_7
[ bonds ]
O4 H4 gbj_1 O2 C2 C3 C4 gd_7
C4 O4 gbj_19 O2 C2 C3 O3 gd_8
C4 C3 gbj_25 C1 C2 C3 O3 gd_7
C4 C5 gbj_25 O3 C3 C4 C5 gd_7
C3 O3 gbj_19 O3 C3 C4 O4 gd_8
C3 C2 gbj_25 O5 C5 C4 O4 gd_8
O3 +C1 gbj_1
C2 O2 gbj_19
C2 C1 gbj_25
O2 H2 gbj_1
C1 O5 gbj_19
C5 O5 gbj_19
[ angles ]
; ai aj ak gromos type
H4 O4 C4 ga_11
O4 C4 C3 ga_8
O4 C4 C5 ga_8
C3 C4 C5 ga_7
C4 C3 O3 ga_8
C4 C3 C2 ga_7
O3 C3 C2 ga_8
C3 O3 +C1 ga_11
C3 C2 O2 ga_8
C3 C2 C1 ga_7
O2 C2 C1 ga_8
-O4 C1 C2 ga_8
-O4 C1 O5 ga_8
C2 O2 H2 ga_11
C2 C1 O5 ga_8
C1 O5 C5 ga_9
C4 C5 O5 ga_8
[ impropers ]
; ai aj ak al gromos
type
C4 O4 C5 C3 gi_2
C3 C4 O3 C2 gi_2
C2 C3 C1 O2 gi_2
C1 -O4 O5 C2 gi_2
C5 C2 C4 C1 gi_7
C5 C2 C3 C1 gi_8
C5 C2 C3 O5 gi_9
[ dihedrals ]
; ai aj ak al gromos
type
C5 C4 O4 H4 gd_12
C2 C3 C4 O4 gd_7
C4 C3 O3 +C1 gd_14

```

```

[ APIO ]
[ atoms ]
OAF OA -0.400 1
HAS H 0.240 1
CAB CH1 0.160 1
CAA CH1 0.160 2
OAH OA -0.400 2
HAH H 0.240 2
CAI CH2 0.160 3
OAJ OA -0.400 3
HAT H 0.240 3
CAE CH1 0.242 4
OAD OA -0.242 4
C1 CH1 0.254 5
[ bonds ]
OAF HAS gb_1
CAB OAF gb_19
CAA CAB gb_25
CAB C1 gb_25
CAA CAI gb_26
CAA OAH gb_19
CAA CAE gb_25
CAI OAJ gb_19
OAJ HAT gb_1
OAH HAH gb_1
CAE OAD gb_19
C1 OAD gb_19
-O3 C1 gb_1
[ angles ]
; ai aj ak gromos type
HAS OAF CAB ga_11
OAF CAB CAA ga_12
OAF CAB C1 ga_12
CAA CAB C1 ga_47
-O3 C1 CAB ga_14
-O3 C1 OAD ga_8
CAB CAA CAI ga_12
CAB CAA OAH ga_12
CAB CAA CAE ga_47

CAI CAA OAH ga_12
CAI CAA CAE ga_12
OAH CAA CAE ga_12
CAA CAI OAJ ga_12
CAI OAJ HAT ga_11
CAA OAH HAH ga_11
CAA CAE OAD ga_47
CAE OAD C1 ga_47
CAB C1 OAD ga_47
[ impropers ]
; ai aj ak al gromos
type
CAB OAF CAA C1 gi_2
CAA CAB CAI OAH gi_2
C1 -O3 OAD CAB gi_2
CAA C1 CAB OAD gi_2
CAE C1 CAA OAD gi_2
CAE CAB CAA C1 gi_2

```

10 Anexos

- “Guia para Autores” – Normas para publicação na revista *Journal of Natural Products*, em inglês.
- Normas para apresentação oral e escrita do trabalho experimental do estágio em pesquisa e monografia.
- Orientações aos examinadores das bancas de TCC.

Preparation and Submission of Manuscripts

(Revised September 2010)

Contents (click on the topic)

Preparation and Submission of Manuscripts – Title Page – Abstract – Introduction – Results and Discussion – Experimental Section – Acknowledgment – References and Notes – Nomenclature – Abbreviations – Graphics – Chemical Structures – Tables – Figures – Table of Contents Graphic

Recommendations for Crystal Structure Papers – Published Manuscript – Reviewer's Material

| **Supporting Information** | **Journal Publishing Agreement** | **Manuscript Submission** – Web Submission – General File Preparation – Currently Acceptable Word Processing Packages | **ACS Policies for E-prints and Reprints** | **Galley Proofs** | **Corrections**

Title Page

The title should appear on a separate page and should be followed by the author names and the institution name and address. The title, author name(s), and affiliations should all appear on their own respective line of text. Place an asterisk after the name of the author to whom enquiries regarding the paper should be directed and include that author's telephone and fax numbers and

e-mail address. Author affiliations must be footnoted using the following symbols in order (which should be used as superscripts): †, ‡, §, †, †, ∇, °. In article titles, it is not necessary to use words like “new” or “novel” (with the latter referring specifically to a compound based on an unprecedented carbon skeleton) or to specify the number of new substances obtained.

Abstract

The abstract, detailing, in one paragraph, the problem, experimental approach, major findings, and conclusions, should appear on the second page. It should be double spaced and should not exceed 200 words for Full Papers and Reviews or 100 words for Notes and Rapid Communications. Compounds mentioned in the abstract, and given as specific Arabic numerals in the text, should also be accompanied in the abstract by that same numeral. The abstract should be on a separate page and should be untitled.

Introduction

The manuscript should include an untitled introduction stating the purpose of the investigation and relating the manuscript to similar research.

Results and Discussion

The results should be presented concisely. Tables and figures should be designed to maximize the presentation and comprehension of the experimental data. The discussion should interpret the results and relate them to existing knowledge in the field in as clear and brief a fashion as possible. Authors submitting a manuscript as a Note should omit the heading “Results and

Discussion". For Full Papers of unusual length, subheadings may be included within the Results and Discussion section.

Bolded structural code numbers should only be used for new compounds and for those known compounds for which new biological data or spectroscopic values are being reported. Other known compounds should be referred to in the text by name, wherever necessary. Sugar units in glycosides should not be inferred as *D* or *L* based solely on NMR data analysis, but should be determined by supporting experimental work such as measurement of their optical rotations following acid hydrolysis or by the preparation of chiral derivatives and comparison with standards using a chromatographic analytical method. Authors are advised to use correctly the terms "configuration" (the three-dimensional arrangement of substituents of a stereocenter) and "stereochemistry" (used for describing three-dimensional events during stereoselective/stereospecific bond formation processes). In a carbocyclic compound only a stereogenic carbon or a stereogenic element, e.g., an axis, possesses configuration. Substituents such as methyl groups are either alpha or beta oriented and are not alpha or beta configured. Care should be taken not to make erroneous configurational conclusions via NMR NOE associations from ring to side-chain protons of, for example, sterols and tetracyclic triterpenoids. The term "spectral" should be avoided in a structure elucidation discussion, when "spectroscopic" or "spectrometric" are meant instead.

In manuscripts that present results of biological studies with tumor cell lines or animal-based tumor models, authors should pay special attention to the U.S. National Cancer Institute (NIH) guidelines for cancer drug discovery studies. Compounds that suppress the growth of, or kill, isolated tumor cell lines grown in culture should be referred to as either "cytostatic" or "cytotoxic", as appropriate. Only compounds that inhibit the growth of tumors in animal-based models should be called "antitumor". The term "anticancer" should be reserved for compounds that show specific activity in human-based clinical studies (see Suffness, M.; Douros, J. *J. Nat. Prod.* **1982**, *45*, 1–14). Some flexibility in this system is afforded in the description of compounds that show activity in molecular-targeted antitumor assays.

Experimental Section

The presentation of specific details about instruments used, sources of specialized chemicals, and related experimental details should be incorporated into the text of the Experimental Section as a paragraph headed General Experimental Procedures. The general order for inclusion should be as follows: melting points; optical rotations; UV spectra; CD spectra; IR spectra; NMR spectra; mass spectra; and chromatographic and other techniques.

In a separate paragraph, experimental biological material should be reported as authenticated if cultivated or from a natural habitat, and the herbarium deposit site and voucher number should be recorded. All microorganisms used experimentally should bear a strain designation number and the culture collection in which they are deposited. The scientific name (genus, species, authority citation, and family) should be presented when first mentioned in the body of the manuscript. Thereafter, the authority should be eliminated, and the generic name should be reduced (except in tables and figure legends) to the first capital letter of the name (but avoid ambiguity, if two or more generic names have the same first letter).

If the biological material has not been identified as to species, the manuscript will not be considered for publication unless a special protocol has been followed. Thus, a voucher specimen of the organism should be deposited with a recognized taxonomist for the particular group of organisms in question. The taxonomist should then assign to the specimen an identifying number unique to the organism so that any additional collections of the same organism would bear this same number. The number will be retained until the organism is completely identified. The taxonomist should write a brief taxonomic description to be included in the manuscript, which should state how the organism in question relates morphologically to known species. Contributors are encouraged to use DNA sequence analysis to assist with the taxonomic identification of unknown microorganisms, and to deposit these data in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Photographs of incompletely identified organisms may be included as Supporting Information. Authors should be aware of the fact that large-scale collection of marine or terrestrial organisms may have ecological effects. Manuscript authors describing an investigation derived from large-scale collections should thus include a statement in their manuscript (in the “Biological Material” paragraph of the Experimental Section) explaining why the collection had no significant adverse ecological effect or justifying such effect in terms of the benefit from the resulting work.

Authors who purchase dried “herbal remedies” or other materials from companies must make provision for their proper deposit in a herbarium, for access by future workers. When a commercially available extract is obtained, the extraction procedure from the organism of origin must be specified. The identification of the extract should be supported by an HPLC trace of known secondary metabolite constituents of the organism, which should be included in the manuscript as Supporting Information.

When physical and spectroscopic data are presented in the body of the manuscript, the following general style must be used (with the various commonly used techniques presented in this same order):

Romucosine (1): colorless needles (CHCl₃); mp 152–153 °C; [α]_D²⁵ –110 (*c* 0.4, CHCl₃); UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 235 (4.23), 275 (4.18), 292 (sh) (3.52), 325 (3.41) nm; IR (Nujol) ν_{\max} 1680, 1040, 920 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.11 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-11), 7.54–7.28 (2H, m, H-9, H-10), 7.27 (1H, m, H-8), 6.59 (1H, s, H-3), 6.10, 5.97 (each 1H, d, *J* = 1.5 Hz, OCH₂O), 4.86 (1H, dd, *J* = 13.7, 4.4 Hz, H-6a), 4.44 (1H, m, H-5a), 3.77 (3H, s, NCOOCH₃), 3.06 (1H, m, H-7a), 2.99 (1H, m, H-5b), 2.91 (1H, m, H-7b), 2.82 (1H, m, H-4a), 2.61 (1H, m, H-4b); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 155.8 (C, NCOOCH₃), 146.8 (C, C-2), 143.0 (C, C-1), 135.8 (C, C-7a), 130.7 (C, C-11a), 128.7 (CH, C-8), 127.79 (C, C-3a), 127.78 (CH, C-9), 127.2 (CH, C-10), 127.0 (CH, C-11), 125.6 (C, C-3b), 117.3 (C, C-1a), 107.6 (CH, C-3), 100.9 (CH₂, OCH₂O), 52.7 (CH₃, NCOOCH₃), 51.7 (CH, C-6a), 39.2 (CH₂, C-5), 34.5 (CH₂, C-7), 30.4 (CH₂, C-4); EIMS *m/z* 323 [M]⁺ (98), 308 (28), 292 (5), 262 (20), 248 (21), 236 (81), 235 (100), 206 (17), 178 (27), 88 (17); HREIMS *m/z* 323.1152 (calcd for C₁₉H₁₇O₄N, 323.1158).

The correct presentation of NMR spectroscopic data is shown in the table below.

Table 1. NMR Spectroscopic Data (400 MHz, C₆D₆) for Aurilides B (1) and C (2)

position	aurilide B (1)			aurilide C (2)	
	δ_c , mult.	δ_H (<i>J</i> in Hz)	HMBC ^a	δ_c	δ_H (<i>J</i> in Hz)
1	170.0, C			170.2	
2	58.9, CH	3.23, m	1, 3, 4, 5	59.6	3.08, m
3	13.8, CH ₃	1.21, d (7.1)	1, 2	14.0	1.25, d (7.1)
4	36.1, CH ₃	2.63, s	2, 5	36.8	2.55, s
5	172.1, C			172.1	
6	54.3, CH	5.12, dd (9.0, 7.4)	5, 7, 9	54.4	5.15, dd (9.0, 5.0)
7	31.0, CH	1.97, m		32.0	1.98, m
8	20.1, CH ₃	1.15, d (7.0)	6, 7, 9	20.4	1.17, d (7.0)
9	17.3, CH ₃	1.25, d (7.0)	6, 7, 8	17.5	1.28, d (7.0)
10	169.9, C			170.11	
11	51.8, CH ₂	4.40, d (18.0)	10, 12, 13	51.9	4.39, d (18.0)
12	36.8, CH ₃	3.23, s	11, 13	37.1	3.22, s
13	170.0, C			170.14	
14	58.6, CH	5.24, d (10.0)	13, 18, 19, 20	58.7	5.26, d (10.0)
15	33.9, CH	2.48, m	14, 16, 18	34.1	2.49, m
16	27.4, CH ₃	1.86, 1.30, m	14, 15, 17	27.6	1.89, 1.30, m
17	12.1, CH ₃	1.03, t (7.1)		12.2	1.03, t (6.9)
18	14.8, CH ₃	0.85, d (7.0)	15, 16	15.1	0.86, d (7.0)
19	30.7, CH ₃	2.88, s	20	30.6	2.85, s
20	173.1, C			173.2	
21	54.7, CH	4.78, dd (8.8, 8.8)	20, 22	54.9	4.75, dd (8.6, 7.5)
22	31.7, CH	1.98, m		31.0	1.95, m
23	18.1, CH ₃	0.89, d (6.0)	21, 22, 24	18.9	0.88, d (6.0)
24	20.2, CH ₃	0.90, d (6.0)	23	20.3	0.90, d (6.0)
25	170.3, C			170.3	
26	78.5, CH	4.90, d (6.1)	25, 27, 31	80.4	4.54, d (7.5)
27	37.2, CH	2.17, m	26, 30	30.5	2.36, m
28	26.1, CH ₂	1.50, 1.14, m	29	18.7	1.00, d (7.0)
29	11.8, CH ₃	0.83, t (7.7)	27, 28	18.4	0.88, d (7.0)
30	14.9, CH ₃	1.03, d (6.0)	26, 27, 28	169.7	
31	169.3, C			128.3	
32	128.0, C			146.0	7.75, t (9.0)
33	145.3, CH	7.74, t (9.0)	31, 42	30.9	2.14, m
34	30.9, CH ₂	2.19, m	32, 33, 42	71.2	3.98, m
35	71.0, CH	3.97, m	34	41.2	2.02, m
36	41.1, CH	2.07, m	43	82.6	5.17, d (11.2)
37	82.5, CH	5.18, d (11.2)	1, 36, 38, 44	132.1	
38	131.4, C			134.6	5.62, t (7.7)
39	134.2, CH	5.61, t (7.7)	37, 44	21.4	1.95, 1.92, m
40	21.4, CH ₂	1.95, 1.92, m	38, 39, 41	14.3	0.89, t ^b
41	14.1, CH ₃	0.89, t ^b	39, 40	12.8	1.95, s
42	12.7, CH ₃	1.95, s	31, 32, 33	10.1	0.66, (7.0)
43	10.2, CH ₃	0.64, d (7.0)	35, 36, 37	11.4	1.54, s
44	11.3, CH ₃	1.54, s	37, 38, 39		
NH (1)		7.69 br, d (9.1)	10		7.66 br, d (9.1)
NH (2)		6.75 br, d (8.8)	25		6.70 br, d (8.8)

^aHMBC correlations, optimized for 6 Hz, are from proton(s) stated to the indicated carbon.
^bSignal partially obscured.

The correct format to present elemental analysis data is: anal. C 72.87, H 11.13%, calcd for C₃₇H₆₈O₆, C 73.02, H 11.18%. The structures of compounds are expected to be supported by high-resolution mass spectrometry or elemental analysis. Melting point determinations should not be provided for compounds described as “amorphous solids”. The unit of concentration to be used for optical rotation measurements is grams per 100 mL. UV extinction coefficient data

should be provided as log ϵ values, to two places of decimals. In reporting ^1H NMR data of diastereotopic methylene protons, the one at lower field should be listed as the “a” proton and that at the higher field as the “b” proton, as in “H-10a” and “H-10b”, respectively. If two proton or carbon signals in an NMR spectrum appear at the same chemical shift but are still distinguishable, an additional decimal place (three for ^1H NMR data and two for ^{13}C NMR data) may be used to designate the resonance in question. Carbon-13 NMR data should be reported to the nearest 0.1 ppm with the number of attached protons designated using the C, CH, CH₂, and CH₃ notation.

Acknowledgment

The Acknowledgment section should include credits [initial(s) and last name] for technical assistance, financial support, and other appropriate recognition.

References and Notes

References to the literature and all notes, regardless of their nature, should be numbered in order of appearance in the manuscript and cited in the text with superscript numbers. Each reference may have its own citation number, or alternatively, references referring to the same topic may be grouped under a common number using alphabetical subdesignations (e.g., 1a, 1b, 1c, etc.). Each note should be assigned its own number. References and notes should follow the format shown:

- (1) Dumdei, E.; Andersen, R. J. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 792–794.
- (2) Cordell, G. A. *Introduction to Alkaloids: A Biogenetic Approach*; John Wiley & Sons: New York, 1981; p 43.
- (3) Pelletier, S. W.; Mody, N. V. In *The Alkaloids*; Rodrigo, R. G. A., Ed.; Academic Press: New York, 1981; Vol. 18, Chapter 2, pp 100–216.
- (4) Zheng, G.; Kakisawa, H. *Chin. Sci. Bull.* **1990**, *35*, 1406–1407; *Chem. Abstr.* **1991**, *114*, 43213m.
- (5) Meyer, B. N. Brine Shrimp Toxicity: Certain Components of *Stapelia*, *Coryphantha*, *Lupinus*, and *Quinoa*. Ph.D. Thesis, Purdue University, West Lafayette, IN, 1983, p 35.
- (6) Davis, R. U.S. Patent 5,708,591, 1998.
- (7) The biogeographic zone comprising Madiera, the Canary Islands, the Cape Verde Islands, and the Azores.

For additional information on the reference and note format to use, see *The ACS Style Guide*, 3rd ed. (2006) (<http://pubs.acs.org/books>), available from Oxford University Press, Order Department, 2001 Evans Road, Cary, NC 27513 (<http://www.oup.com>).

The author is responsible for the accuracy and completeness of all references. In particular, authors must cite all of the references from their own work on a particular topic, such as all papers published or submitted on the constituents of a given organism under consideration. Because subscribers to the Web edition are now able to click on the “CAS” tag following each reference to retrieve the corresponding CAS abstract, reference accuracy is critical. Journal abbreviations should be those used by *Chemical Abstracts* [see *Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1907–2004*].

The author should supply the Editor with copies of related manuscripts that are cited as “in press” or “submitted” for use by the editors and the reviewers in evaluating the manuscript under consideration.

Nomenclature

It is the responsibility of the authors to provide correct nomenclature. All nomenclature must be consistent and unambiguous and should conform with current American usage. Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstracts Service, the International Union of Pure and Applied Chemistry, and the International Union of Biochemistry and Molecular Biology.

Chemical Abstracts (CA) nomenclature rules are described in Appendix IV of the *Chemical Abstracts Index Guide*. A list of ring systems, including names and numbering systems, is found in the *Ring Systems Handbook*, American Chemical Society, Columbus, OH, 2003, and its latest cumulative supplement. For CA nomenclature advice, consult the Manager of Nomenclature Services, Chemical Abstracts Service, P.O. Box 3012, Columbus, OH 43210-0012. A name generation service is available for a fee through CAS Client Services, 2540 Olentangy River Road, P.O. Box 3343, Columbus, OH 43210-0334; tel: (614) 447-3870; fax: (614) 447-3747; or e-mail: answers@cas.org.

For IUPAC rules, see:

- *Nomenclature of Inorganic Chemistry, Recommendations, 1990*; Blackwell Scientific Publications: Oxford, England, 1990.
- *A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds, Recommendations, 1993*; Blackwell Scientific Publications: Oxford, England, 1993.
- *Nomenclature of Organic Chemistry, Sections A–F and H*; Pergamon Press: Elmsford, NY, 1979.
- *Compendium of Macromolecular Nomenclature*; Blackwell Scientific Publications: Oxford, England, 1991.
- *Biochemical Nomenclature and Related Documents*, 2nd ed.; Portland Press, Ltd.: London, England, 1992.
- Selected IUPAC recommendations can be found on the Web at <http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac/iupac.html>.
- The ACS Web site has links to nomenclature recommendations: <http://chemistry.org>.

Abbreviations

Abbreviations are used without periods. Standard abbreviations should be used throughout the manuscript. All nonstandard abbreviations should be kept to a minimum and must be defined in the text following their first use. The preferred forms of some of the more commonly used abbreviations are mp, bp, °C, K, s, min, h, mL, μ L, kg, g, mg, μ g, cm, mm, nm, mol, mmol, μ mol, ppm, TLC, GC, NMR, MS, UV, and IR. For further information, refer to *The ACS Style Guide* (2006).

Graphics

The quality of the illustrations depends on the quality of the originals provided. Figures cannot be modified or enhanced by the journal production staff. The graphics must be submitted as part of the manuscript file and are used in the production of the Journal (material deposited as Supporting Information will not be published in the print edition). Contrast is important.

Remove all color from graphics, except for those graphics that you would like to have considered for publication in color (see Color section below for details).

(1) Layout. In preparing structures for publication, layout is critical. Equations, schemes, and blocks of structures are presented in the Journal either in one-column or two-column format.

For efficient use of journal space, single-column illustrations are preferred.

	single (preferred)	double
width		
minimum		10.5 cm (4.13 in.)
maximum	8.25 cm (3.25 in.)	17.78 cm (7 in.)
maximum depth	24 cm (9.5 in.)	24 cm (9.5 in.)

Authors are advised that structural material labeled as a “Figure” is placed at the top or bottom of a page, as is all two-column material. All structural material that should immediately follow certain text must be designed to fit the one-column format, and its location in the text must be indicated on the manuscript. Structures, arrows, and compound designators should be arranged so as to make maximum use of the width afforded by the one-column or two-column format.

(2) Content. Abbreviations such as Me for CH₃, Et for C₂H₅, and Ph (but not ϕ) for C₆H₅ are acceptable. Make liberal use of “R and X groups” in equations, schemes, and structure blocks to avoid the repetition of similar structures. Do not repeat a structure; the number alone of an earlier structure can be used if a compound occurs several times. Schemes are numbered with Arabic numerals. Within schemes, structures should be numbered with boldface Arabic numerals, consecutively from left to right, top to bottom, regardless of the order in which the compounds are discussed in the text. Schemes should be footnoted in the manner described below for Tables. It is not necessary to give reagents and conditions in complete detail, since this detail is contained in the Experimental Section. Where needed, numbers such as NMR chemical shifts may be included directly on structural formulas.

(3) Dimensions. For best results, illustrations should be submitted in the actual size at which they should appear in the Journal. Original illustrations that do not need to be reduced to fit a single or double column will yield the best quality. Lettering should be no smaller than 4.5 points. (Helvetica or Arial type works well for lettering.) Lines should be no thinner than 0.5 point. Lettering and lines should be of uniform density.

If artwork that should be reduced must be submitted, larger lettering and thicker lines should be used so that, when reduced, the artwork meets the above-mentioned parameters.

Complex textures and shading to achieve a three-dimensional effect should be avoided. To show a pattern, a simple cross-hatch design should be used.

Digital graphics should be submitted as TIFF images with the following minimum resolution requirements:

Black and white line art	1200 dpi
Grayscale art	600 dpi
Color art	300 dpi

Chemical Structures

Structures should be produced with the use of a drawing program such as ChemDraw. Structure drawing preferences (preset in the ACS Stylesheet in ChemDraw) are as follows:

1. As drawing settings select:

chain angle	120°
bond spacing	18% of width
fixed length	14.4 pt (0.508 cm, 0.2 in.)
bold width	2.0 pt (0.071 cm, 0.0278 in.)
line width	0.6 pt (0.021 cm, 0.0084 in.)
margin width	1.6 pt (0.056 cm, 0.0222 in.)
hash spacing	2.5 pt (0.088 cm, 0.0347 in.)

2. As text settings select:

font	Arial/Helvetica
size	10 pt

3. Under the preferences choose:

units	points
tolerances	5 pixels

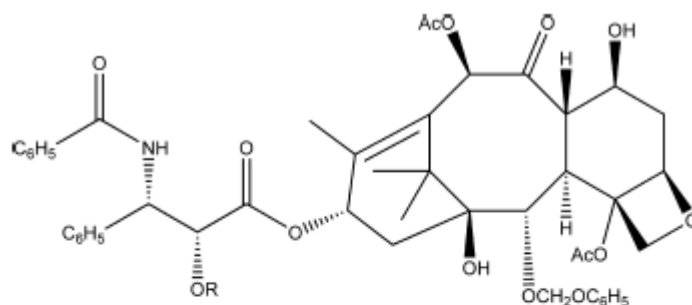
4. Under page setup choose:

Paper	US Letter
Scale	100%

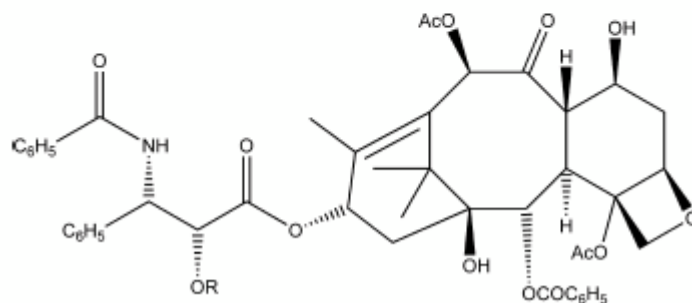
5. Using the ChemDraw ruler or appropriate margin settings, create structure blocks, schemes, and equations having maximum widths of 11.3 cm (one-column format) or 23.6 cm (two-column format). Note: if the foregoing preferences are selected as cm values, the ChemDraw ruler is calibrated in cm. ChemDraw graphics will be reduced to 75% during production.

6. Embolden compound numbers, but not atom labels or captions.

7. Authors are urged to use only a single configurational descriptor (heavy line or dashed line, but not both) when defining a stereocenter in a chemical structure. Atoms should be kept outside of rings wherever possible. Rather than rectangular solid and dashed lines, authors should use solid and dashed wedges to indicate configurations, as shown below. Dots at ring junctions intended to represent hydrogen atoms should not be used. Structures should be drawn in a neat manner ready for direct reproduction, and should not be cluttered or overlapping. Any arrows and numbering used for atoms in figures should not come into contact with bonds or ring systems. See examples of prepared structures using ChemDraw with the specified preferences below.



Preferred



Acceptable

Authors using other drawing packages should, in as far as possible, modify their program's parameters so that they reflect the above guidelines.

Tables

These should be numbered consecutively with Arabic numerals and should be placed as they should appear in the paper. Footnotes in tables should be given lowercase letter designations and be cited in the table by italic superscript letters. The sequence of letters should proceed by line rather than by column. If a footnote is cited both in the text and in a table, insert a lettered footnote in the table to refer to the numbered footnote in the text. Each table should be provided with a descriptive heading, which, together with the individual column headings, should make the table, as nearly as possible, self-explanatory. In setting up tabulations, authors are requested to keep in mind the type area of the journal page (17.8 × 25.4 cm) and the column width (8.5 cm), and to make tables conform to the limitations of these dimensions. Arrangements that leave many columns partially filled or that contain much blank space should be avoided.

Figures

Figures should be constructed in keeping with the column width, line width, and font size specified above (see Structural Drawings). All illustrations should be numbered as "Figures",

with Arabic numerals. Blocks of chemical structures should not be designated as “Figures”. Each figure must be identified outside the frame of the figure.

(1) Photographs. Digital photographs are accepted. Photographs that are single or double column width so that they will not have to be reduced work best.

(2) Color. Color reproduction, if approved by the Editor, will be provided at no cost to the author. Color illustrations should be submitted only if essential for clarity of communication. The inclusion of a color photograph is particularly recommended for manuscripts based on the constituents of organisms that are not identified beyond the genus level. A surcharge of \$100 per 100 reprints will be added to the standard cost of reprints. If color is not intended, do not submit color images.

Table of Contents Graphic (called “synopsis graphic” in the manuscript template instructions)

A graphic must be included with each manuscript for the Table of Contents (TOC) of the Web edition of the Journal issue in which the Communication, Review, Full Paper, or Note will appear. This graphic should capture the reader’s attention and, in conjunction with the manuscript’s title, should give the reader a quick visual impression of the type of chemistry described and/or the biological results obtained. Structures in the TOC graphic should be constructed as specified in the ‘Chemical Structures’ section above. The TOC graphic may be up to 4.7 in. (12.0 cm) wide and 1.8 in. (4.6 cm) tall. (See detailed instructions at the Paragon Plus Web site.) Text should be limited to labels for compounds, reaction arrows, and figures. The use of color to enhance the scientific value is acceptable. The TOC graphic should be inserted on a separate page at the end of the manuscript file. The title and author list will be added during production.

Recommendations for Crystal Structure Papers

Although the results of crystal structure determinations are frequently of interest to readers of the Journal, details of crystal structure experiments are generally not. Results appropriate for the Journal are not, however, sufficient to allow referees to assess the quality of an X-ray structure determination. Thus, it is recommended that manuscripts involving such determinations be accompanied by material provided for the benefit of the reviewers only. Authors should submit the following minimum materials, in tabular form where possible, for each compound for which X-ray crystallographic supplementary data are available.

Published Manuscript:

- (1) Crystal data, including chemical formula, formula weight, crystal system and space group, cell dimensions (with uncertainties), number of formulas per unit cell, calculated density, radiation used, and wavelength.
- (2) Final fractional atomic coordinates. Hydrogen atom coordinates should be included only if they have been experimentally determined or refined. Calculated coordinates should be provided as reviewer’s material.
- (3) A *brief* outline of procedures used for data collection and refinement, including the method used for intensity measurement, θ limits, portion of the full sphere collected, handling of absorption (if applicable), method of refinement, number of reflections used in the refinement and criteria for their choice, treatment of hydrogen atoms, and final *R* factor.

- (4) A perspective diagram (perhaps prepared by ORTEP, PLUTO, or similar programs) that gives the atom-numbering scheme if it is not unambiguous from the remainder of the paper. If the figure is a stereoview, it should be provided reduced to correct size, about 55–60 mm between images.

Besides a description of the structure, other information (i.e., important distances, torsion angles, results of best plane calculations, etc.) may be included if appropriate. A note should be cited at an appropriate place in the manuscript and included in the References and Notes Section:

“Crystallographic data for the structure(s) reported in this paper have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre. Copies of the data can be obtained, free of charge, on application to the Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK (fax: +44-(0)1223-336033 or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).”

Reviewer’s Material:

- (1) Any calculated coordinate (e.g., hydrogen atoms).
- (2) A full list of bond distances (and their uncertainties).
- (3) A full list of bond angles (and their uncertainties).

All tables should be clearly legible, the contents nonredundant, and their interpretation immediately obvious. It is recommended that authors provide this information in the form of a Crystallographic Information File (CIF) for each compound for which X-ray crystallographic data are determined, with each CIF being separated from any other Supporting Information files.

Authors will deposit the tables of final fractional atomic coordinates and the full list of bond lengths and angles at the Cambridge Crystallographic Data Centre on notification of the acceptance of their paper. A checklist of data items for deposition is available at <http://www.ccdc.cam.ac.uk>.

Supporting Information

Authors are encouraged to provide Supporting Information in order to keep their manuscripts to a reasonable length. The Web edition of this journal can accommodate almost any type of supplementary data (e.g., reproductions of spectra, experimental procedures, tabulated spectroscopic/spectrometric data, expanded discussion of peripheral findings, calculational data). Supporting Information must be submitted at the same time as the manuscript and uploaded separately to the ACS Paragon Plus environment. A list of acceptable file types is available on the Web. All Supporting Information files of the same type should be prepared as a single file (rather than submitting a series of files containing individual images or structures). For example, all Supporting Information available as PDF files should be contained in one PDF file. The title page information (title, authors, institutions) should be presented in the same manner as on the title (face) page of the manuscript. It is a mandatory requirement for authors to deposit copies of NMR spectra for all new compounds in the Supporting Information. A typical caption for a spectrum would be: “S1. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of the new compound **xx**”. A short “Supporting Information Available” paragraph that describes the material must be placed at the end of the manuscript text. Captions or legends for figures, spectra, etc., must appear *directly on the figure*. Supporting Information pages should be consecutively numbered.

DO NOT UPLOAD FIGURES AND TABLES THAT ARE TO BE PUBLISHED IN THE ARTICLE.

Relevant compounds reported in Supporting Information are indexed for *Chemical Abstracts* and assigned Registry Numbers, even if they are not mentioned in the published paper. The Supporting Information is available free of charge at <http://pubs.acs.org>.

Journal Publishing Agreement

A properly completed Journal Publishing Agreement form must be provided for each submitted manuscript. A completed, signed, and dated form must be uploaded as a TIF or PDF file to ACS Paragon Plus or e-mailed, faxed, or mailed to the assigned Editor. Manuscripts without a valid Journal Publishing Agreement will not be published. The form is available on the Web at <http://pubs.acs.org/page/copyright/journals/index.html>).

Manuscript Submission

Web Submission

Manuscripts must be submitted via the Web using the ACS Paragon Plus environment (<http://paragonplus.acs.org/login>). Complete instructions and an overview of the electronic online (Web) submission process are available through the secure ACS Paragon Plus Web site. Authors must also submit all revisions of manuscripts via the ACS Paragon Plus environment. The web submission site employs state-of-the-art security mechanisms to ensure that all electronically submitted papers are secure. These same security mechanisms are also utilized throughout the peer-review process, permitting access only to editors and reviewers who are assigned to a particular paper. Hard copy manuscript submission is no longer applicable for the *Journal of Natural Products*.

Use of the word-processing template is strongly encouraged, but not required. It is essential that only the fonts specified in the ACS manuscript templates be used. If you choose not to use an ACS template, Times and Symbol fonts should be used. Use of other fonts may cause problems during peer review and Journal production.

Authors may now choose to submit their own manuscript PDF file along with a word processing or zipped archive file of their manuscript documents for use during the peer review process, or allow ACS Paragon Plus to generate a PDF automatically.

General File Preparation

When preparing a manuscript, use the document mode or its equivalent in the word-processing program; i.e., do not save files in "Text Only" (ASCII) mode. If a non-Western version of the word-processing software was used to prepare the manuscript, save the file in rich-text format (RTF). Do not include any page-layout instructions such as placement information for graphics in the file. The text should be left justified, and automatic end-of-line hyphenation should be turned off. Use carriage returns only to end headings and paragraphs, not to break lines of text. Do not insert spaces before punctuation. References must conform to the format printed in the Journal. Ensure that all characters are correctly represented throughout the manuscript: for example, 1 (one) and l (ell), 0 (zero) and O (oh), x (ex) and × (times sign). Check the final copy carefully for consistent notation and correct spelling.

The manuscript should be assembled in the following order and should consist of *one* file: Title page; abstract; all sections of the body of the paper, including figures, schemes, charts, and tables; acknowledgments; Supporting Information paragraph (if needed); references; TOC graphic. Supporting information should be provided in a separate file. It is best to use the fonts "Times" and "Symbol". Other fonts, particularly those that do not come bundled with the system

software, may not translate properly. Ensure that all special characters (e.g., Greek characters, math symbols, etc.) are present in the body of the text as characters and not as graphic representations. Consult the documentation for the specific software package being used on how to detect the presence of graphics in the files, and replace them with the appropriate text characters. Tables may be created using a word processor's text mode or table format feature. The table format feature is preferred. Ensure each data entry is in its own table cell. If the text mode is used, separate columns with a single tab and use a line feed (return) at the end of each row.

Currently Acceptable Word Processing Packages

Macintosh: WordPerfect 3.5, Microsoft Word, 98 and higher.

IBM and compatibles: WordPerfect, up to version 9.0, Microsoft Word, 97 and higher.

LaTeX users should follow the guidelines given at the Author & Reviewer Resource Center (<http://pubs.acs.org/4authors>).

ACS Policies for E-prints and Reprints

Under the ACS Articles on Request policy, the Society will provide (free of charge) to all contributing authors a unique URL within the ACS Web site that they may e-mail to colleagues or post on external Web sites. These author-directed links are designed to facilitate distribution of an author's published work to interested colleagues in lieu of direct distribution of the PDF file by the author. The ACS Articles on Request policy allows 50 downloads within the first year after Web publication and unlimited access via the same author-directed links 12 months after Web publication.

The ACS AuthorChoice option establishes a fee-based mechanism for authors or their research funding agencies to sponsor the open availability of their articles on the Web at the time of online publication. Under this policy, the ACS as copyright holder will enable unrestricted Web access to a contributing author's publication from the Society's Web site in exchange for a fixed payment from the sponsoring author. ACS AuthorChoice will also enable participating authors to post electronic copies of published articles on their own personal Web sites and institutional repositories for noncommercial scholarly purposes and allow immediate open access to an article as soon as it is published on the ACS Web site. For more details on ACS AuthorChoice, please visit <http://pubs.acs.org/page/policy/authorchoice/index.html>.

For paper reprints, the reprint order form (provided with the proof) and purchase order or check should be sent prior to the publication date to Cadmus Reprints, P.O. Box 751903, Charlotte, NC, USA 28275-1903. Reprints will be shipped within two weeks after the printed issue date. Neither the Editors nor the Washington ACS Office keeps a supply of reprints; requests for single copies of papers should be addressed to the corresponding author of the paper concerned.

Galley Proofs

The corresponding author of an accepted manuscript will receive e-mail notification and complete instructions when page proofs are available for review via a secure Web site. Routine rephrasing of sentences or additions are not permitted at the page proof stage. Alterations should be restricted to serious changes in interpretation or corrections of data. Extensive or important changes on page proofs, including changes to the title or list of authors, are subject to Editorial review.

It is the responsibility of the corresponding author to ensure that all authors listed on the

manuscript agree with the changes made on the proofs. Galley proofs should be returned within 48 hours of receipt in order to ensure timely publication of the manuscript.

Corrections

If errors of consequence are detected in a published paper, the author should send a correction to the Editor for publication as an “Addition and Correction”.

NORMAS PARA APRESENTAÇÃO ORAL E ESCRITA DO TRABALHO EXPERIMENTAL DO ESTÁGIO EM PESQUISA E MONOGRAFIA

1. O trabalho experimental do aluno, realizado obrigatoriamente durante a atividade Estágio em Pesquisa e Monografia, deverá ser apresentado na forma escrita e oral ao final dos seis meses da atividade.
2. Aquele aluno que optar por realizar o Estágio Curricular Supervisionado em Biomedicina em atividade de pesquisa, sob a orientação do mesmo Professor/Pesquisador e na mesma linha de pesquisa do Estágio em Pesquisa e Monografia, poderá apresentar o seu trabalho ao final dos seis meses deste segundo estágio.

Do trabalho escrito:

1. O trabalho escrito deverá ser organizado da seguinte forma:
 - a. Folha de rosto com título, nome do aluno, nome do orientador, nome do co-orientador quando existente, curso e ano;
 - b. Agradecimentos e dedicatória (quando existentes);
 - c. Índice geral;
 - d. Resumo;
 - e. Introdução compreensiva;
 - f. Trabalho experimental na forma de artigo científico, seguindo a formatação exigida pelo periódico onde seria submetido, ainda que os resultados obtidos sejam apenas preliminares;
 - g. Conclusões e Perspectivas;
 - h. Bibliografia adicional que não esteja presente no artigo científico;
 - i. Anexos.
2. O aluno poderá optar por escrever o artigo científico, referido no item f acima, na língua inglesa.
3. O trabalho deverá ser impresso em folha A4, com tipo de letra tamanho 12, páginas numeradas a partir da folha de rosto e respeitando as seguintes margens:
 - a. Margem esquerda: 4,0 cm;
 - b. Margem direita: 2,5 cm;
 - c. Margem superior: 2,5 cm;
 - d. Margem inferior: 2,5 cm.
4. O aluno deverá entregar uma cópia impressa do trabalho escrito para cada membro da Banca Examinadora pelo menos 15 dias antes da apresentação oral.
5. O aluno deverá entregar à Comissão de Graduação uma cópia impressa e uma na forma eletrônica, em CD, do trabalho escrito, após terem sido efetuadas as correções solicitadas pela Banca Examinadora.

Da apresentação oral:

1. O aluno deverá apresentar oralmente o seu trabalho no dia e horário determinados pela Comissão de Graduação para este fim.
2. Será alocado a cada aluno 20 minutos para a apresentação oral e 10 minutos adicionais para argüição dos membros da Banca Examinadora.

Da Banca Examinadora:

1. A Banca Examinadora será constituída de dois professores, pesquisadores ou doutorandos indicados pelo orientador do aluno.
2. Não será exigida a presença dos integrantes da Banca Examinadora no dia da apresentação oral.

Do conceito final:

1. O conceito final do aluno será calculado a partir dos conceitos emitidos pelos integrantes da Banca Examinadora e do orientador do aluno.
2. O orientador também deverá emitir um conceito pelo Estágio de Pesquisa.



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO
BIOMEDICINA

**ORIENTAÇÕES AOS COMPONENTES DA BANCAS
EXAMINADORAS**

Solicitamos aos Examinadores que analisem as monografias, observando a sua qualidade científica e metodológica, a clareza da apresentação e a adequação da discussão em relação aos objetivos propostos e os resultados obtidos. É importante, também, observar se a seção da monografia referente ao artigo científico está em conformidade com as normas do periódico científico escolhido pelo aluno e orientador. Cabe lembrar que o nível de exigência deve ser adequado a um trabalho de conclusão de curso de graduação e não de um pós-graduação. Adicionalmente, devem ser levadas em consideração as normas estabelecidas pela Comissão de Graduação para a redação da monografia, que também devem ser fornecidas aos Examinadores aos alunos no momento da entrega da monografia.

A Comissão de Graduação do Curso de Biomedicina agradece a participação dos Examinadores nesta atividade tão importante do curso, encorajando-os a estarem presentes no dia da apresentação, ainda que a presença não seja de caráter obrigatório. Solicitamos que cada membro da Banca Examinadora emita um parecer acompanhado de um conceito (A, B, C ou D), conforme as definições para os conceitos da UFRGS, e o envie ao orientador do aluno até, no máximo, um dia após a apresentação oral. O parecer poderá, ainda, ser entregue ao representante da Comissão de Graduação presente no momento da apresentação do Trabalho de Conclusão de Curso.

Atenciosamente,

Comissão de Graduação do curso de
Biomedicina

Rua Sarmiento Leite, 500 – 1º andar – Sala
153
Campus Centro – 90050-170 – Porto Alegre –
RS. biomedicina@ufrgs.br
Fone: (51) 33083287 Fax: (51)
3308.3155