



Universidade Federal do ABC



*PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
NANOCIÊNCIAS E MATERIAIS AVANÇADOS*

Erika Tiemi Sato

**MODELO DFT CONSTRUÍDO A PARTIR DO COLÁGENO PARA
ESTUDO DA ÁGUA CONFINADA EM TECIDO DA DERME**

Tese de Doutorado

Santo André
2014

*PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
NANOCIÊNCIAS E MATERIAIS AVANÇADOS*

Erika Tiemi Sato

**MODELO DFT CONSTRUÍDO A PARTIR DO COLÁGENO PARA
ESTUDO DA ÁGUA CONFINADA EM TECIDO DA DERME**

Tese de Doutorado

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Doutor em
Nanociências e Materiais Avançados.

Universidade Federal do ABC – *Campus*
Santo André

Orientador: Prof. Dr. Herculano S. Martinho

Santo André
2014



FOLHA DE ASSINATURAS

Assinaturas dos membros da Banca Examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Erika Tiemi Sato, realizada em 25 de novembro de 2014:

Herculano da Silva Martinho

Prof.(a) Dr.(a) **Herculano da Silva Martinho** (UFABC) – Presidente

Daniele Ribeiro de Araujo

Prof.(a) Dr.(a) **Daniele Ribeiro de Araujo** (UFABC) – Membro Titular

Alexandre Reily Rocha

Prof.(a) Dr.(a) **Alexandre Reily Rocha** (UNESP) – Membro Titular

Margarida Juri Saeki

Prof.(a) Dr.(a) **Margarida Juri Saeki** (UNESP) – Membro Titular

Priscila Pereira Fávero

Prof.(a) Dr.(a) **Priscila Pereira Fávero** (UNIVAP) – Membro Titular

Prof.(a) Dr.(a) **Marcella Pecora Milazzotto** (UFABC) – Membro Suplente

Prof.(a) Dr.(a) **Caetano Rodrigues Miranda** (UFABC) – Membro Suplente

Prof.(a) Dr.(a) **Airton Abrahao Martin** (UNIVAP) – Membro Suplente

Prof.(a) Dr.(a) **Ana Maria do Espírito Santo** (UNIFESP) – Membro Suplente



*A todos aqueles
que participaram efetivamente da minha
formação pessoal e profissional*

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha fortaleza;

Aos meus pais, grandes exemplos na minha vida;

A minha irmã, minha doutora da alegria;

A Dna. Jandira, que me acolheu em Santo André;

Aos meus irmãos em Cristo, que torceram por mim e oraram comigo!

Ao Grupo de Estudos Bíblicos da UFABC, que tanto me apoiou.

Ao Grupo de Pesquisa em Biosistemas e Biofotônica, pela colaboração no trabalho;

Ao prof. Dr. Herculano, meu orientador, por toda paciência e incentivo ao trabalho;

Àqueles que marcaram a minha caminhada, no corpo de Cristo: Gilson, Asaph, Paulo, André, Sheila, Lídia, Amanda, Laiz, Letícia, Jéssica, Luana, Elení, Bia, Rafa, Marcio, Gilberto, Rodrigo, Genesis, Ed, Beto, Edu, Lucas, Raul, Dan, Gui, Victor, Leandro, Nicole, Diná, Fernanda, Lilian, Hellen e todos que fazem parte do corpo de Cristo.

Em especial: Aos meus guardiões oficiais, o "engravatado" e o "à paisana", que atualmente é engravatado também, e ao atirador reservista, por sempre me acompanharem em segurança. (conforme prometido, está aqui o agradecimento...risos).

Ao senhor e a senhora Alva. Taci e Daniel, amigos desde o mestrado e socorro nas disciplinas.

Aos amigos Han Pang e Rodrigo Nagata, com quem eu sempre pude contar nesta caminhada;

Aos professores e funcionários da UFABC, por todo apoio e confiança;

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

A UFABC e a CAPES pelo apoio financeiro.

Um papel não diz tudo. Há muito mais do que se pode ser lido. O que foi vivido, isso sim é um aprendizado para toda a vida. Aprendizado duro, mas cheio de esperança.

RESUMO

SATO, Erika Tiemi. Modelo DFT construído a partir do colágeno para estudo da água confinada em tecido da derme. 2014. 102 f. Tese (Doutorado em Nanociências e Materiais Avançados) – Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados. Universidade Federal do ABC. Santo André, 2014.

A biópsia óptica utilizando espectroscopia vibracional emerge como uma técnica com boa sensibilidade e especificidade no diagnóstico de doenças. Entretanto, para melhor entender como as alterações bioquímicas se traduzem em alterações estruturais que conduzem a estes estados patológicos, são necessários estudos mais aprofundados e a simulação computacional é a ferramenta adequada. Existem diversos estudos que envolvem macromoléculas e tecidos, porém ainda não é conhecido um modelo teórico para sua descrição e comparação aos resultados experimentais de espectroscopia Raman. Neste contexto, buscou-se encontrar um modelo teórico para o tecido, partindo de um peptídeo de colágeno, com diferentes graus de hidratação e a presença de água confinada em sua estrutura, a fim de contribuir para os estudos de biópsia óptica por espectroscopia vibracional. Os modelos foram construídos a partir de um peptídeo de colágeno, proveniente do *Protein Data Bank* e adicionados *clusters* de água confinada em cada modelo. Os modelos foram comparados quanto à energia, mínimo global, momento de dipolo e frequências Raman experimentais. Foi possível perceber que o modelo D1 é preferível para empacotar moléculas de água e é também aquele que menos favorece os processos de transferência eletrônica e, conseqüentemente, o mais próximo de um tecido de mucosa normal. Analisando também os espectros vibracionais observou-se que os modelos C1s e D1 são aqueles que melhor representam o espectro Raman experimental na região estudada. Também foram tabelados os modos vibracionais de cada modelo, o que contribui para entendimento dos picos espectrais. Pôde-se concluir que é possível a aplicação destes modelos a problemas biológicos reais, como estudos de cosmetologia e farmacologia de tecidos.

Palavras-chave: Tecidos biológicos. *Clusters* de água. DFT (*Density Functional Theory*). Espectroscopia Raman.

ABSTRACT

SATO, Erika Tiemi. DFT model built from collagen to study the confined water in dermis tissue. 2014. 102 f. Tese (Doutorado em Nanociências e Materiais Avançados) – Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados. Universidade Federal do ABC. Santo André, 2014.

The optical biopsy using vibrational spectroscopy is emerging as a technique with good sensitivity and specificity in the diagnosis of diseases. However, for better understanding how the biochemical changes translate into structural changes that lead to these pathological conditions, further studies are needed and the computer simulation is the appropriate tool. Several studies involving macromolecules and tissues, but it is not yet known a theoretical model for the description and comparison to experimental results of Raman spectroscopy. In this context, we sought to find a theoretical model for the tissue, leaving a collagen peptide with different degrees of hydration and the presence of confined water in its structure, in order to contribute to the study of optical biopsy by vibrational spectroscopy. The models had been built from a collagen peptide found on the Protein Data Bank and added to confined water clusters in each model. The models were compared with regard to energy, dipole moment, global minimum and experimental Raman frequencies. It was possible to notice that the D1 model is preferable to package water molecules and is also the one that least favours the electronic transfer processes and, consequently, the closest thing to a normal mucosa tissue. Analyzing the Vibrational Spectra also showed that C1s and D1 models are those which best represent the experimental Raman spectrum in the region studied. We also tabulated vibrational modes of each model, which contributes to understanding of the spectral peaks. It might be concluded that it is possible to apply these models to real biological problems, such as cosmetology and pharmacology studies of tissues.

Keywords: Biological tissues. Water clusters. DFT (Density Functional Theory). Raman spectroscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração esquemática da tripla hélice de colágeno. Os aminoácidos estão representados por esferas em amarelo (glicina), laranja (hidroxiprolina) e roxo (prolina).....	19
Figura 2 – Estrutura geral da prolina, glicina e hidroxiprolina.	20
Figura 3 – Ilustração dos sulcos do B-DNA. O B-DNA é a forma mais comum, que o DNA assume quando em solução. Se pensarmos na hélice de B-DNA como uma estrutura cilíndrica, com cerca de 2 nm de diâmetro, notaremos que a superfície da molécula é irregular, formando 2 sulcos ou depressões, de tamanhos diferentes, que giram ao longo de todo o seu comprimento. O sulco menor resulta da depressão entre as duas cadeias complementares, enquanto que o sulco maior resulta da depressão existente entre os giros adjacentes da hélice. Os sulcos são importantes porque deixam superfícies livres para a interação entre o B-DNA e as proteínas.	25
Figura 4 – A polarizabilidade no a) espalhamento Rayleigh não varia com o tempo e b) no espalhamento Raman varia com o tempo.....	36
Figura 5 – Esquema Ilustrativo dos espalhamentos (a) Raileigh, (b) Raman Stokes e (c) Raman Anti-Stokes. Os níveis 0 e 1 representam, respectivamente, os níveis de energia fundamental e o primeiro nível vibracional excitado.	37
Figura 6 – Tipos de vibração: estiramento simétrico (ν_1), estiramento assimétrico (ν_3) e <i>scissoring</i> (ν_2) e librações nos eixos x, y e z [26]. Na figura: em vermelho, o átomo de oxigênio; e em branco, o átomo de hidrogênio.....	39
Figura 7 – Esquema de cálculo do CPMD.	58
Figura 8 - <i>Clusters</i> de água utilizados na simulação: (a) (H ₂ O), (b) (H ₂ O) ₂ , (c) (H ₂ O) ₃ , (d) (H ₂ O) ₄ , (e) (H ₂ O) ₅ -cíclico, (f) (H ₂ O) ₆ -gaiola, (g) (H ₂ O) ₇ -baixo, (h) (H ₂ O) ₈ -S ₄ . Com preenchimento vermelho, o átomo de oxigênio e, em branco, o átomo de hidrogênio. Tais estruturas foram confinadas em colágeno. Adaptado de [107].	62
Figura 9 - Estrutura cristalográfica do colágeno hidratado (perspectiva), obtida do Banco de Dados de Proteínas (Protein Data Bank), PDB ID: 1CGD [142].....	62
Figura 10 - Estrutura do colágeno sem hidratação (vista longitudinal).....	63
Figura 11 – Área de recorte do colágeno para utilização na simulação e os modelos C1 e D1.....	63
Figura 12 – Modelo C1s.....	67
Figura 13 – Modelo DO.	68
Figura 14 – Modelo Bc replicado em cada um dos eixos.	69
Figura 15 – Modelagem dos tecidos biológicos utilizada na simulação.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequências vibracionais (em cm^{-1}) para três modos da molécula de água líquida.	39
Tabela 2 – Frequências vibracionais (em cm^{-1}) para três modos normais de diferentes isótopos da molécula de água gasosa.	39
Tabela 3 – Resultados dos testes estatísticos.....	61
Tabela 4 - Alguns parâmetros da estrutura da célula unitária do colágeno como um modelo bulk, com clusters de água específicos. Os parâmetros de rede foram $a = 13,5 \text{ \AA}$, $b = 11,5 \text{ \AA}$ e $c = 10,5 \text{ \AA}$, com simetria ortorrômbica.	64
Tabela 5 - Comparação entre os modelos C0, D0, Bc e Bv.	75
Tabela 6 - Atribuição das bandas Raman para C0. Frequências em cm^{-1}	81
Tabela 7 - Atribuição das bandas Raman para C1. Frequências em cm^{-1}	81
Tabela 8 - Atribuição das bandas Raman para C2. Frequências em cm^{-1}	82
Tabela 9 - Atribuição das bandas Raman para C3. Frequências em cm^{-1}	83
Tabela 10 - Atribuição das bandas Raman para C4. Frequências em cm^{-1}	83
Tabela 11 - Atribuição das bandas Raman para C5. Frequências em cm^{-1}	84
Tabela 12 - Atribuição das bandas Raman para C6. Frequências em cm^{-1}	85
Tabela 13 - Atribuição das bandas Raman para C7. Frequências em cm^{-1}	85
Tabela 14 - Atribuição das bandas Raman para C8. Frequências em cm^{-1}	86
Tabela 15 - Atribuição das bandas Raman para CCMB (C0, C3, C4, C6, C7). Frequências em cm^{-1} . ..	86
Tabela 16 - Atribuição das bandas Raman para C1s. Frequências em cm^{-1}	87
Tabela 17 - Atribuição das bandas Raman para D0. Frequências em cm^{-1}	88
Tabela 18 - Atribuição das bandas Raman para D1. Frequências em cm^{-1}	88

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Resultados experimentais de espectroscopia Raman. Cada espectro foi deconvoluído em 7 picos, indicados nos gráficos.....	60
Gráfico 2 – Relação entre energia total e corte para uma única molécula de água isolada.....	66
Gráfico 3 - Energia total normalizada por molécula com e sem otimização de geometria por mecânica molecular.....	71
Gráfico 4 – Histograma das coordenadas atômicas de C0 com e sem a otimização de geometria.	72
Gráfico 5 – Energias de ligação (E_B) e acoplamento (E_C) dos modelos C e D, simbolizadas por um círculo e um quadrado, respectivamente.	74
Gráfico 6 – Espectro Raman do modelo C.....	76
Gráfico 7 – Espectro Raman do modelo D e B.	77
Gráfico 8 – Melhores resultados: modelos D1 e C1s.	78
Gráfico 9 - Momento de dipolo total de cada confinamento.....	80

SIGLAS E ABREVIATURAS

- C0* Modelo de tecido utilizando o colágeno SEM água confinada
- C1* Modelo de tecido utilizando o colágeno com uma molécula de água confinada, (H₂O)
- C2* Modelo de tecido utilizando o colágeno com duas moléculas de água confinada, (H₂O)₂
- C3* Modelo de tecido utilizando o colágeno com três moléculas de água confinada, (H₂O)₃
- C4* Modelo de tecido utilizando o colágeno com quatro moléculas de água confinada, (H₂O)₄
- C5* Modelo de tecido utilizando o colágeno com cinco moléculas de água confinada, (H₂O)₅-cíclico
- C6* Modelo de tecido utilizando o colágeno com seis moléculas de água confinada, (H₂O)₆-gaiola
- C7* Modelo de tecido utilizando o colágeno com sete moléculas de água confinada, (H₂O)₇-baixo
- C8* Modelo de tecido utilizando o colágeno com oito moléculas de água confinada, (H₂O)₈-S₄
- C1s* Modelo de tecido utilizando colágeno externamente hidratado e apresentando internamente uma molécula de água confinada
- Caa_cg* Modelo de tecido utilizando apenas três aminoácidos de colágeno, SEM água confinada, com a célula unitária replicada como em uma caixa
- Caa_dg* Modelo de tecido utilizando apenas três aminoácidos de colágeno, SEM água confinada, com a célula unitária não-replicada
- D0* Modelo de tecido utilizando o colágeno SEM água confinada
- D1* Modelo de tecido utilizando o colágeno com uma molécula de água confinada, (H₂O)
- DFT* Teoria do Funcional da Densidade

DM Dinâmica Molecular

FT-Raman Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier

HFI Hiperplasia Fibrosa Inflamatória

IR Infravermelho (Infrared)

MC Monte Carlo

MN Mucosa Normal

RNOS Espécies Reativas de Nitrogênio e Oxigênio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
	A biópsia óptica: importância e desafios	14
2	OBJETIVOS DO TRABALHO	17
3	TECIDOS MOLES	17
3.1	PELE E MUCOSA: ESTRUTURA E CONSTITUIÇÃO	18
3.1.1	O Colágeno	18
3.1.2	A água confinada	20
3.1.2.1	Estrutura da água confinada	21
3.1.2.2	O papel da água em biosistemas	21
3.2	PROCESSOS INFLAMATÓRIOS	26
3.2.1	Mecanismo da Inflamação	26
3.2.2	Espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (RNOS) e a bioquímica da inflamação [30,82]	27
3.2.3	Hiperplasia Fibrosa Inflamatória [83]	29
3.3	IMPORTÂNCIA DA PESQUISA TRANSLACIONAL E A UTILIZAÇÃO DE MODELOS	30
4	TÉCNICAS UTILIZADAS	32
4.1	ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL	32
4.1.1	Teoria de espectroscopia Raman	34
4.1.2	Espectroscopia Raman de amostras hidratadas	38
4.2	SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS	41
4.2.1	Simulações e os sistemas com moléculas de água	42
4.2.2	Teoria	44
4.2.2.1	Equação molecular de Schrödinger e aproximação de Born-Oppenheimer [130]	44
4.2.2.2	Teoria do Funcional da Densidade (DFT)	47
4.2.2.2.1	Teorema de Hohenberg e Kohn	48
4.2.2.2.1.1	Teorema 1	48
4.2.2.2.1.2	Teorema 2	50
4.2.2.2.2	As equações de Kohn-Sham	51
4.2.2.2.3	Os funcionais de correlação e troca	56
4.2.3	Simulações computacionais e o programa CPMD	57
5	METODOLOGIA	59
5.1	ESPECTROSCOPIA RAMAN	59
5.2	SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS	61
5.2.1	Os modelos utilizados	61
5.2.2	O que representam os modelos	69
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
7	CONCLUSÕES	91
8	PUBLICAÇÕES	93
9	REFERÊNCIAS	94

1 INTRODUÇÃO

A biópsia óptica: importância e desafios

Muitas patologias apresentam um estado inflamatório associado. Diferenciá-lo de situações mais graves, como um câncer, ainda requer o olhar subjetivo de imagens histopatológicas, embora, muitas vezes, nem assim isto seja possível. Apesar de toda a tecnologia para detectar e diagnosticar doenças como o câncer, o método padrão para discriminar os tecidos normais e alterados ainda é a análise histopatológica realizada em uma biópsia. Isto está associado com um tempo e um custo considerável e, sobretudo, a perícia de um patologista. Há limitações devido ao fato de que todos os métodos são baseados em interpretações visuais, subjetivas, de anomalias morfológicas. A análise citológica do colo de útero, por exemplo, princípio elementar do teste de Papanicolau e coloscopia para diagnóstico de câncer de colo do útero, tem uma alta taxa de falsos negativos, aproximadamente 50% [1]. Este fato é inerente à classificação histológica subjetiva de patologias. É comum que células atípicas sejam associadas a infiltrados inflamatórios e o corte pode ser mal interpretado pelo patologista como uma simples inflamação, ao invés de uma malignidade ou neoplasia; ou vice-versa. Dados do Relatório Mundial de Câncer 2008 (cap. 4 da ref. [2]), revelam que os testes com o melhor biomarcador sérico total (antígeno prostático específico) apresentou 90% de sensibilidade e 25% de especificidade. O mesmo relatório [2] indica que a sensibilidade do teste de Papanicolau, que detecta o câncer intraepitelial de câncer de colo do útero, é de 47-62% e sua especificidade, 60-95%. A fim de superar estes desafios e alcançar um diagnóstico clínico minimamente invasivo, têm sido desenvolvidas novas ferramentas fundamentadas na tecnologia fotônica, como a biópsia óptica. Isso porque muitas características de interações moleculares, nas células e tecidos, que não podem ser acessadas por histopatologia convencional, podem ser acessadas por técnicas ópticas.

A biópsia óptica se refere às técnicas nas quais a interação luz-tecido é analisada e a informação a respeito do estado do tecido é obtida tanto *in-vivo* quanto *ex-vivo*, destacando-se as técnicas espectroscópicas, como a absorção infravermelha (IR) e a espectroscopia de espalhamento Raman. Esta última é de especial interesse devido à sua alta sensibilidade para detectar variações bioquímicas e moleculares nos tecidos [3]. Além disso, ambas possuem alta especificidade. No diagnóstico do tumor de Wilms, por exemplo, a espectroscopia Raman apresenta 93% de sensibilidade e 100% de especificidade [4]; e a detecção de câncer de mama por espectroscopia no infravermelho, 98% de sensibilidade e 95% de especificidade [5]. No

caso da discriminação de tecidos inflamatórios, utilizando espectroscopia Raman, esse número é de 97% de sensibilidade e de 87% de especificidade [6].

Ainda assim, para melhor entender como as alterações bioquímicas se traduzem em alterações estruturais, que conduzem a estados patológicos, são necessários estudos mais aprofundados e a simulação computacional é uma ferramenta apropriada. Pelos cálculos computacionais é possível obter o espectro vibracional de moléculas e macromoléculas envolvidas nos processos patológicos. Deste modo, podem-se verificar quais átomos ou moléculas contribuem, de fato, para a existência de cada modo vibracional característico, e como as interações entre eles ocorrem. Neste quesito, é importante destacar que, antes da espectroscopia vibracional ser empregada rotineiramente, é essencial entender a natureza da heterogeneidade biológica de uma amostra em estudo e sua relação com a variação espectral, apresentadas por células e tecidos individuais.

Outra restrição para a ampla aplicação da biópsia óptica baseada na espectroscopia Raman diz respeito à diferenciação entre tecidos pré-alterados, pré-malignos, e/ou inflamatórios, que podem apresentar erros de classificação [7,8,9]. O desenvolvimento de um tumor maligno, por exemplo, está relacionado a um processo inflamatório que ocorre em simultâneo e, em geral, em torno do processo neoplásico [7,8,9]. Em específico, a região espectral de 2800 a 3600 cm^{-1} é quase livre de fluorescência e as bandas nesta região têm uma seção de espalhamento Raman maiores do que aquelas da região de IR-médio ou regiões de terahertz. Além disso, no caso de infiltrados inflamatórios, os espectros Raman na região de impressão digital (conhecida como região de *fingerprint*: 500-1800 cm^{-1}), a mais usual na pesquisa de biópsia óptica, pode causar erros na discriminação do tecido normal e patológico [10,11,12]. Neste sentido, a análise das bandas na região de alto número de onda (2800-3600 cm^{-1}) é uma ótima alternativa e descreve muito bem as bandas relacionadas aos lipídios, proteínas e carboidratos, quimicamente relacionadas às vibrações de estiramento de OH, CH, CH₂, CH₃ e NH.

Caminhando dos resultados experimentais ao uso de modelos teóricos, simulações computacionais são amplamente utilizadas para estudar e fazer previsões a respeito de uma ampla variedade de sistemas que vão da farmacologia às áreas de engenharia [13,14,15]. Os modelos atomísticos com base em cálculos de mecânica quântica têm melhor capacidade de previsão das propriedades dos materiais, no entanto, devido à sua inerente complexidade, modelos atomísticos de tecidos biológicos para estudos de espectroscopia estão ausentes na literatura. Estes modelos seriam úteis para entender as propriedades físicas e bioquímicas dos

tecidos. Por exemplo, pouco se sabe sobre os mecanismos subjacentes da migração celular na cicatrização de feridas, especialmente o papel modulador da tensão mecânica num ambiente microescalar [16]. Normalmente, as abordagens clássicas do elemento-finito para modelar tecidos moles têm sido aplicadas para simular características mecânicas de tecidos como a pele [17]. Os modelos de simulação relatados se referem principalmente a modelos clássicos [18,19,20,21] ou híbridos [22]. No entanto, muitas propriedades físicas não têm sido satisfatoriamente simuladas pelos modelos convencionais, sobretudo, quanto aos resultados da interação da luz com a matéria, os espectros e seus modos vibracionais [23,24]. Assim, a dinâmica de elétrons, prótons e hidratação por água tem sido realizada utilizando abordagens de mecânica quântica, a fim de melhorar nosso conhecimento, estudando moléculas isoladas ou solvatadas.

No caso da farmacologia, por exemplo, uma série de variações nas proporções dos elementos presentes nos sistemas transportadores de fármacos através da pele precisa ser testada até que se obtenham as quantidades ideais. Geralmente, testes mais gerais são realizados em membranas artificiais (20-30 combinações diferentes), resultando em aproximadamente 5 combinações para testes em animais. O processo é bastante dispendioso e demora em torno de 6 a 8 meses para obtenção de um único fármaco. Logo, os modelos computacionais podem otimizar muito, tanto o tempo de resposta aos testes, quanto à precisão de quantidades e proporções. A degradação da camada lipídica da pele pode ser visualizada por espectroscopia Raman e comparada aos resultados computacionais. Com isso, pode-se obter um modelo aplicável a via transdérmica, para testes de carreamento de fármacos mais próximo da pele real e maior eficiência no desenvolvimento de formulações.

De fato, existem diversos estudos que envolvem macromoléculas e tecidos, porém ainda não é conhecido um modelo teórico que os descreva e os compare aos resultados experimentais obtidos por espectroscopia Raman. Além disso, estudos que analisem também a presença de água confinada vêm sendo cada vez mais essenciais [25]. A água confinada é, numa definição mais simples, uma ou mais moléculas de água, em pequenas quantidades (aqui no presente trabalho foram utilizadas até oito moléculas de água), presas numa geometria de poro, muito facilmente encontrada na natureza, em materiais porosos e granulares e também dentro e ao redor de macromoléculas, estruturas supramoleculares e géis [26].

Sobretudo, no que diz respeito ao colágeno, presente nos tecidos moles, Bohr e Olsen (2010) sugerem que poderia haver duas camadas de moléculas de água confinadas entre

as hélices e que este fato poderia ser investigado por espectroscopia vibracional [27]. Isso reforça a importância deste trabalho ao construir um modelo teórico para o tecido mole da derme, a partir de um protótipo de colágeno. Com ele é possível obter diferentes graus de hidratação, analisar a presença de água confinada em sua estrutura e os espectros do modelo. Possibilita o estudo de modos vibracionais de biosistemas, contribuindo para o mapeamento e interpretação dos espectros obtidos em estudos de biópsia óptica de infiltrados inflamatórios, e para conectar a pesquisa acadêmica à clínica. É uma ferramenta promissora que possibilita o entendimento de sistemas complexos, com as vantagens do uso de modelos computacionais.

2 OBJETIVOS DO TRABALHO

Construir um modelo computacional capaz de mimetizar o tecido biológico da derme. Para este modelo, partir de um peptídeo de colágeno com diferentes graus de hidratação e a presença de água confinada em sua estrutura, a fim de contribuir para a compreensão e interpretação dos espectros obtidos em estudos de biópsia óptica por espectroscopia vibracional. Comparar os resultados obtidos por simulações computacionais aos espectros Raman experimentais.

3 TECIDOS MOLES

Tecidos moles são tecidos animais com matriz extracelular rica em fibras de colágeno e elastina. Sua função é apoiar, interligar e proteger as demais estruturas e órgãos do corpo humano, como vasos sanguíneos, tendões, músculos e nervos. Fazem parte dos tecidos moles, a pele e a mucosa, objetos de estudo neste trabalho para a construção de um modelo computacional.

3.1 PELE E MUCOSA: ESTRUTURA E CONSTITUIÇÃO

A pele é um dos maiores órgãos do corpo humano com uma área de quase 2m², peso de 3 a 4kg e espessura que varia de 0,5mm em áreas delicadas, como as pálpebras, a 5mm ou mais em regiões de atrito, como as solas dos pés. A camada mais externa da pele, denominada estrato córneo é formada por dois componentes: celular (sobretudo, por várias camadas de células mortas achatadas, que formam uma barreira protetora da pele); e extracelular (matriz rica em lipídeos) [28]. Sob a epiderme está a derme, uma camada mais espessa da pele, composta principalmente de colágeno. Ali também se encontram vasos sanguíneos, terminações nervosas e glândulas. Sob a epiderme há uma camada de tecido adiposo que funciona como um isolante, absorvendo os choques. Assim, a pele mantém protegidos os tecidos que sob ela estão.

Assim como a pele, a mucosa também é constituída por um epitélio de recobrimento, além de um tecido conjuntivo subjacente. Na mucosa bucal, a primeira camada é denominada de epitélio bucal e a segunda, um tecido conjuntivo fibroso, é denominada lâmina própria ou cório. Na maioria das regiões da cavidade bucal, existe uma submucosa, exceto na superfície inferior da língua. Esta, nos lábios e na bochecha, é composta por feixes de colágenos e de fibras elásticas, que ligam a mucosa ao músculo subjacente. Esta composição colabora para os processos de mastigação. De um modo geral, a mucosa bucal tem as funções de proteção, secreção, sensibilidade e regulação térmica. [29]

3.1.1 O Colágeno

Das proteínas presentes no nosso corpo, o colágeno é a mais abundante [30]. Está presente somente em matrizes extracelulares [31], é resistente e não extensível, com grande resistência à tração, e é o principal componente da cartilagem, ligamentos e tendões, ossos e dentes. Na natureza, treze tipos de colágeno são encontrados e o do tipo I é o mais abundante do corpo humano [32].

Uma fibra de colágeno consiste numa tripla hélice com três cadeias polipeptídicas torcidas sobre si mesmas como em uma corda trançada [30], de alta resistência à tração [31] (Figura 1). Estima-se que uma fibra de colágeno de 1 mm de diâmetro seja capaz de suspender um peso de 10kg sem quebrar [31]. O tropocolágeno, como é denominado a tripla

hélice do colágeno, possui aproximadamente 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro. As três fitas são mantidas unidas por ligações de hidrogênio, envolvendo resíduos de hidroxiprolina e hidroxilisina. Cada uma dessas fitas contém cerca de 800 resíduos de aminoácidos [30].

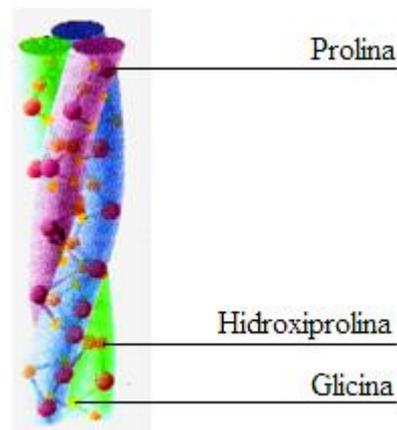


Figura 1 – Ilustração esquemática da tripla hélice de colágeno.

Os aminoácidos estão representados por esferas em amarelo (glicina), laranja (hidroxiprolina) e roxo (prolina).

Fonte: Adaptado de Campbell [30].

Cada cadeia de colágeno possui uma sequência de aminoácidos que pode ser considerada uma repetição do mesmo tripeptídeo, glicina-hidroxiprolina-prolina [30] (Figura 2). Algumas variações são possíveis, mas a glicina deve estar presente em cada terceira posição ao longo da cadeia, e a maioria dos outros resíduos é formada de prolinas ou hidroxiprolinas [30]. Esses aminoácidos possuem cadeias laterais com propriedades únicas [31]. A glicina usualmente está presente nos locais onde dois polipeptídeos estão próximos, sua cadeia lateral consiste em apenas um átomo de hidrogênio e pode adequar-se a um ambiente hidrofílico ou hidrofóbico [31]. Já a prolina, embora tenha a cadeia lateral com caráter hidrofóbico, apresenta a propriedade única de criar dobras na cadeia polipeptídica [31]. O grupo hidroxil da hidroxiprolina auxilia a manter seu anel em uma conformação que estabiliza a tripla hélice [31].

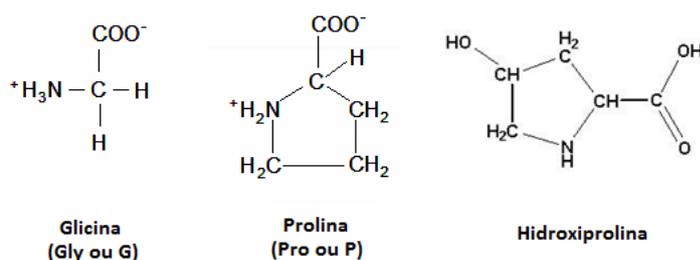


Figura 2 – Estrutura geral da prolina, glicina e hidroxiprolina.

No colágeno ocorrem ligações covalentes, tanto intra como intermoleculares, formadas por reações entre resíduos de lisina e histidina [30]. A quantidade de ligações cruzadas em um tecido aumenta com a idade. É por isso que a carne de animais mais velhos é mais dura do que a de animais mais jovens [30].

Apesar da sua relevância, a estrutura do colágeno é ainda objeto de debate. Recentemente, Bohr e Olsen [27] mostraram que a estrutura do colágeno poderia ser uma variante da bem conhecida tripla hélice de colágeno. A proposta da estrutura em tripla hélice de empacotamento fechado apresenta uma nova característica: a existência de um canal central interno com paredes carregadas negativamente. Este canal central oferece a possibilidade de transporte de íons e pode lançar uma nova luz sobre vários fenômenos biológicos e físicos. Como apontado pelos autores, a largura do canal nesta estrutura é geralmente calculada em aproximadamente 2Å, pequeno demais para a água a ser transportada. Por outro lado, eles argumentaram que a nucleação de minerais tem lugar no grupo OH de hidroxiprolina e poderia envolver duas camadas de espessura da camada de hidratação de água que preenche o espaço entre as hélices de colágeno. Leikin et al. [33] mostraram que os efeitos das forças de hidratação resultantes do custo energético do rearranjo da água, próxima à superfície de colágeno, apresentam características espectrais em Raman. De fato, a espectroscopia vibracional é uma sonda útil para compreender a hidratação de biomoléculas [34] e verificar a presença de água confinada em colágeno.

3.1.2 A água confinada

Milhares de páginas têm sido escritas sobre a água, enquanto pesquisa fundamental [35] e o seu papel primordial em todos os aspectos da nossa vida [36]. Apesar

disso, o papel da água em sistemas biológicos ainda é um enigma [37,38,39]. A água é uma parte integral de muitas biomoléculas. Em particular, as proteínas, objeto do estudo em questão, têm muitas de suas propriedades governadas pelas interações com água [40]. Estas, por exemplo, estabelecem e moldam o panorama de energia livre que governa a atividade, estrutura, estabilidade e dobramento das proteínas [41]. De fato, certa quantidade de água é necessária para a atividade biológica de todas as proteínas. Mesmo enzimas aparentemente secas na presença de substratos gasosos não mostram nenhuma atividade sem a presença de alguma água [42]. Essa evidência tão intrigante depende de como é a água na escala molecular [39]. Por isso, a inclusão explícita da água é essencial ao desvendar muitos problemas bioquímicos e as simulações computacionais são uma estratégia importante ao investigar essas estruturas moleculares. Além disso, a água, entre superfícies moleculares, induz comportamentos diferentes do que aqueles observados na água *bulk* [43,44,45], embora não haja consenso neste aspecto [46].

3.1.2.1 Estrutura da água confinada

A água confinada é encontrada muito facilmente na natureza em materiais porosos e granulares e também dentro e ao redor de macromoléculas, estruturas supramoleculares e géis [26]. O processo de confinamento gera uma competição entre a minimização energética da rede de ligações de hidrogênio formada, das interações com a superfície da cavidade e o ajuste ao espaço disponível para alocar as moléculas [25]. As propriedades físicas e o estado da água confinada podem sofrer grandes variações dependendo das características moleculares da superfície da cavidade, das dimensões do confinamento, da temperatura e da pressão [26,47]. Quando as dimensões de confinamento estão em escalas nanoscópicas estas mudanças são especialmente drásticas [26].

3.1.2.2 O papel da água em biosistemas

Conforme Chaplin [25], um dos principais pesquisadores em estrutura e ciência da água, ainda hoje, muito do material publicado a respeito de moléculas biológicas ignora o papel central da água na máquina da vida. Recentemente, entretanto, tornou-se mais claro o

seu lugar como “jogadora principal” e também “a mais versátil”, em biologia celular e molecular [25]. Em muitos sistemas biológicos a água encontra-se confinada em regiões hidrofílicas e/ou hidrofóbicas específicas. Por esta razão, vários estudos recentes têm se preocupado em estudar o comportamento da água confinada [48,49,50,51,52,53,54,55,56].

A interação da água com sua vizinhança hidrofílica e não-hidrofílica é de fundamental importância. De fato, resultados de espectroscopia no infravermelho e simulações de dinâmica molecular [49] têm dado evidências de que o mecanismo pelo qual a água se acopla aos seus vizinhos via ligações de hidrogênio é bastante complexo, e as configurações ligadas aos átomos diferentes do hidrogênio desempenham um papel fundamental neste mecanismo.

Em sistemas biológicos, a água caracteriza-se pelo hidrogênio ligado a biomoléculas (proteínas) ou intermolecular a outras moléculas da água [7]. Moléculas de água sem ligações de hidrogênio com biomoléculas são normalmente denominadas “água livre”, embora possuam hidrogênios ligados a outras moléculas de água em uma estrutura tetraédrica [7]. Gniadecka e colaboradores [7] observaram por espectroscopia Raman que, em estrato córneo, unhas e toda a pele, a água apresenta-se principalmente na forma ligada. Embora a proporção de água livre e ligada na pele ainda não tenha sido definida conclusivamente, devido à ausência da banda de água livre nas amostras estudadas, eles especulam que mais de 90% do total de moléculas de água em toda a pele, estrato córneo e unhas estão em formas ligadas [7].

A água é uma parte integrante de muitas biomoléculas. Em particular, a água não está presente apenas para preencher o espaço disponível dentro e em torno das proteínas biológicas [40]. As interações proteína-água estabelecem e moldam o panorama de energia livre que governa a atividade, estrutura, estabilidade e dobramento das proteínas [41]. As proteínas se dobram rapidamente para formas tridimensionais bem definidas que dependem da sequência primária de seus aminoácidos. Para que isso seja possível, é necessário um mecanismo que envolva ligações flexíveis, permutáveis e extensíveis. A ligação de hidrogênio mediada pela água é ideal para esta finalidade, de forma que tem sido proposto que o enovelamento de proteínas é mediado e orientado pela solvatação aquosa [57].

Um papel essencial da água está relacionado ao seu efeito hidrofóbico. A interação hidrofóbica é responsável por vários processos biológicos importantes: para a agregação dos lipídios anfílicos em bicamadas, com suas caudas hidrofóbicas “ocultas” à água e suas cabeças hidrofílicas na superfície, para a fixação de resíduos hidrofóbicos em

cadeias polipeptídicas que ajudam as proteínas a dobrar e manter suas formas compactas e para a agregação das subunidades protéicas em várias subunidades das estruturas quaternárias [58]. A explicação convencional é que, a fim de acomodar uma espécie hidrofóbica, a rede de hidrogênio-ligado deve ser interrompida para criar um vazio [58]. Mas isto pode ser feito de tal maneira a evitar alterações entálpicas pela perda das ligações de hidrogênio, se as moléculas de água se auto-organizarem ao redor do hidrófobo de forma relativamente ordenada [58].

As moléculas de água ocupam sítios específicos e formam aglomerados localizados, com estruturas que são determinadas pelas suas capacidades de formarem ligação de hidrogênio e pela estrutura da proteína [25]. Esses aglomerados de água conferem à água líquida um caráter heterogêneo, que pode mudar com as diferentes condições físicas e ambientais [25]. Os átomos de biomoléculas podem substituir uma ou todas as ligações ao redor de cada molécula de água, afetando a estrutura das moléculas de água adjacentes e os grupos biomoleculares, bem como partes distantes desses grupos e moléculas ligadas de modo secundário [25]. A rápida troca de parceiros (1-100 picossegundos) permite que a forma da superfície de uma biomolécula mude, mas não altere significativamente outros efeitos de hidratação, como a direção da rede e a intensidade das ligações de hidrogênio [25].

Na maioria das proteínas globulares, as moléculas de água estão presentes em quantidades similares à quantia de cada um dos aminoácidos presentes, ocupam cavidades e muitas delas são tão essenciais para a função quanto os aminoácidos [41]. Como as moléculas de água e seus aglomerados são extremamente alojáveis em termos de sua orientação e distribuição espacial, eles podem diminuir a barreira de potencial entre os mínimos de energia dos sistemas vizinhos. A água pode, portanto, funcionar como um lubrificante uma vez em que facilita os rearranjos necessários das ligações de hidrogênio com grupos carbonil-amida peptídeo durante as alterações conformacionais, que dão às proteínas a flexibilidade que precisam para suas funções [59]. As ligações de hidrogênio das moléculas de água e seus aglomerados podem também funcionar como "garras mecânicas" que transmitem o movimento relativo entre as subunidades e domínios, dependendo das circunstâncias [25].

Uma quantidade específica de água é necessária para a atividade biológica de todas as proteínas. Mesmo as enzimas aparentemente "secas" na presença de substratos de fase gasosa não mostram atividade sem a presença de um pouco de água [42]. Evidências recentes indicam a necessidade de uma rede de ligações de hidrogênio, cobrindo a maior parte da superfície de uma enzima, para que haja atividade enzimática [60]. Além disso, a rede de

moléculas de água une elementos estruturais secundários na proteína e, deste modo, determina não apenas os pormenores de uma estrutura protéica, mas também quais são as vibrações moleculares preferidas [60].

Normalmente há uma estreita relação entre a perda entálpica e o ganho entrópico das moléculas de água que estão sendo deslocadas. Por outro lado o ganho entálpico e a perda entrópica da interação da proteína ligante que está se formando também estão relacionados. Este balanço energético facilita tanto a formação de ligação quanto sua quebra [61]. No entanto, as moléculas de água podem permanecer no local quando uma nova interação é formada e, juntamente com ligações periféricas causadas pela hidratação, podem afetar a estereoquímica, especificidade e dinâmica do processo de ligação [62].

As moléculas de água ordenadas podem facilitar tanto a transferência de elétrons, como a transferência de prótons. Na transferência de elétrons entre sítios biomoleculares redox, aglomerados de água estruturados próximo a cofatores redox aceleram a transferência de elétrons pela produção de vias de tunelamento acopladas fortemente entre o elétron doador e o elétron aceitador [63]. Na transferência de prótons ocorre um processo denominado mecanismo Grotthuss, em que os prótons podem mover-se rapidamente em meio aquoso [64].

Em biomoléculas, tanto a estrutura do DNA quanto o reconhecimento crucial da sua sequência são dependentes de interações aquosas, com a expansão e contração da hélice do DNA em função de seu *status* de hidratação [65]. A hidratação no sulco menor (como por exemplo, do B-DNA, Figura 3) tem um padrão complexo que inclui águas hexagonais na coluna inicial de hidratação, hidratação secundária, e hidratação externa até a quarta superfície aquosa [66]. Esta sequência de hidratação-dependente pode funcionar como uma “impressão digital de hidratação” para uma determinada sequência de DNA, o que permite o entendimento da sequência de bases do lado de fora dos sulcos pelas proteínas, e a detecção rápida e lubrificada da sequência do DNA [67].

De fato, a água que intervém entre duas proteínas ou duas camadas lipídicas separadas por apenas poucos nanômetros não pode ser esperada para se comportar como na água *bulk* [68]. Na presença da água confinada, por exemplo, a degradação não enzimática das moléculas de DNA é mais rápida que na água *bulk* [69]. Ao contrário de alguns estudos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) [70] e a maior parte dos estudos de dinâmica molecular [71], o estudo de Ruffle et al. [72] indica que a água dentro das células tem um comportamento diferente daquela água do lado de fora. A viscosidade da água intracelular, por exemplo, é mais elevada e sua capacidade de difusão é menor, como foi observado por

RMN [73]. Alguns argumentos propõem que o meio intracelular é um gel [74], um cristal líquido [75] ou é formado por estruturas aquosas extensivamente polarizadas [76]. Muitas moléculas estão presentes nas células e uma alta proporção de água, osmoticamente inativa, está associada às interações biomoleculares [77].

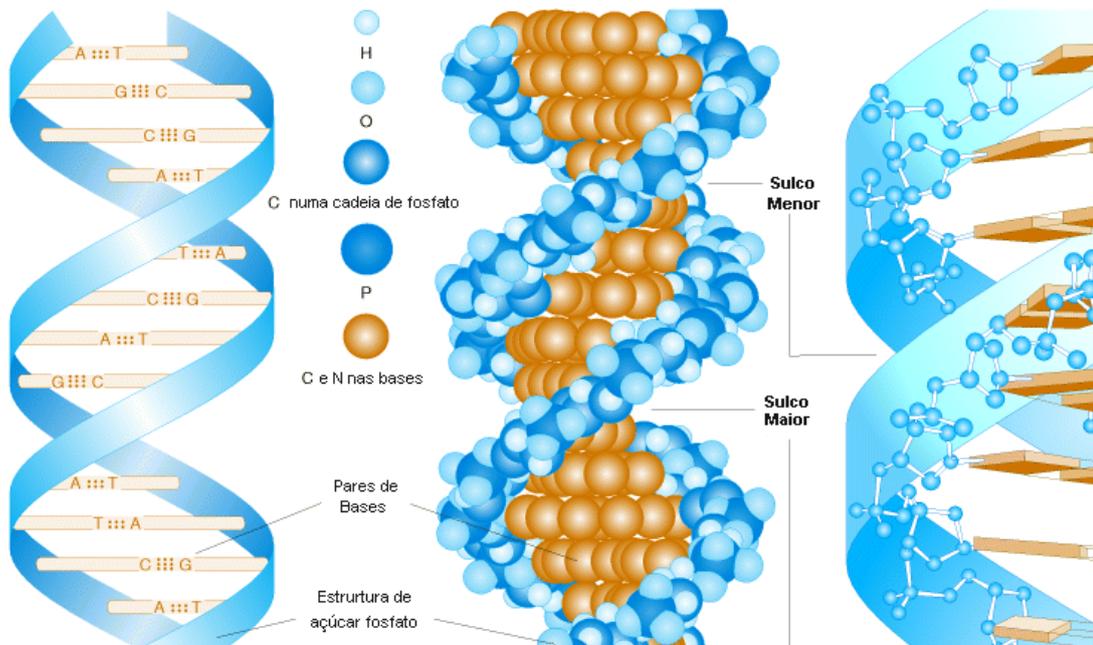


Figura 3 – Ilustração dos sulcos do B-DNA. O B-DNA é a forma mais comum, que o DNA assume quando em solução. Se pensarmos na hélice de B-DNA como uma estrutura cilíndrica, com cerca de 2 nm de diâmetro, notaremos que a superfície da molécula é irregular, formando 2 sulcos ou depressões, de tamanhos diferentes, que giram ao longo de todo o seu comprimento. O sulco menor resulta da depressão entre as duas cadeias complementares, enquanto que o sulco maior resulta da depressão existente entre os giros adjacentes da hélice. Os sulcos são importantes porque deixam superfícies livres para a interação entre o B-DNA e as proteínas.

Fonte: Adaptado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/mga/ch2f3.gif>

Além disso, a hidratação intracelular pode ser um fator primordial na carcinogenesis, uma vez que as células cancerosas contêm água mais livre do que as células normais, e o grau de malignidade aumenta com o grau de hidratação celular [78]. Uma possível explicação para o fato é que o aumento da hidratação facilita a aceleração dos processos intracelulares, incluindo a respiração, o que reforça a vantagem competitiva de uma célula cancerosa para a utilização de nutrientes [25].

3.2 PROCESSOS INFLAMATÓRIOS

3.2.1 Mecanismo da Inflamação

Entende-se como inflamação a reação local dos tecidos vascularizados à agressão. O processo inflamatório é uma resposta tissular, que ocorre basicamente no tecido conjuntivo, logo, é um fenômeno essencialmente mesenquimático [79].

A inflamação é uma das respostas primárias para a infecção [31]. Se uma parte do corpo está para ser contaminada por bactérias, como pode ocorrer após um ferimento por corte na pele, o local da ferida atrairá uma variedade de células brancas do sangue [31]. As células brancas do sangue (leucócitos), que normalmente permanecem na corrente sanguínea, são, em vez disso, estimuladas a atravessar a camada endotelial que reveste as menores veias (vênulas) na região e a entrar no tecido. Uma vez no tecido, os leucócitos se movem em resposta aos sinais químicos em direção aos microorganismos invasores, os quais eles fagocitam [31].

Desde muito tempo a inflamação vem sendo relacionada com o calor, do latim: *inflammatio*, *onis* = incêndio ou do grego *flogose*, *phleg* ou *phlogos* = queimar [79]. O médico romano Aulus Cornelius Celsus (50 a.C) já descrevia a inflamação como: rubor, tumor, calor e dor (como sendo os quatro sinais clássicos da inflamação) [79].

O rubor é resultado da vasodilatação, o tumor é causado principalmente pelo acúmulo de líquido no local [79]. A sensação de calor é resultado do rápido acúmulo de sangue arterial com temperatura mais elevada na região [79]. A dor apresenta mecanismo complexo: a distensão dos tecidos, a estimulação de terminações nervosas livres e a lesão direta tecidual pelo agente agressor [79].

Outro sinal clínico, o aumento da permeabilidade vascular, é observado sob a forma de edema [80]. A passagem de proteínas plasmáticas (albumina, globulinas e fibrinogênio) para o meio extravascular altera a diferença entre as pressões osmóticas intra e extravascular, favorecendo a saída de água e eletrólitos do vaso, que leva ao aparecimento de edema [80].

Várias células e fragmentos de células estão envolvidos no processo inflamatório, dentro das veias e fora delas, no tecido conjuntivo. Além de leucócitos, macrófagos e plaquetas, as fibras também participam deste processo, como é o caso do colágeno.

Num processo inflamatório, uma série de sinais moleculares é enviada em resposta a traumas, lesões, infecções ou toxicidade, a fim de evitar a penetração de microorganismos ou corpos estranhos nos tecidos, enviar células que possam matar invasores ou células hospedeiras infectadas e auxiliar no processo de cicatrização [81]. Se algum procedimento nessa tentativa de defesa do organismo falhar, o processo inflamatório pode executar uma ação padrão, como a infiltração de um tecido com agregados de linfócitos e leucócitos que às vezes são incorporados na proliferação de fibroblastos sinoviais (*pannus*), ou a distorção de um tecido com feixes de colágeno (fibrose) [81].

3.2.2 *Espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (RNOS) e a bioquímica da inflamação [30,82]*

Diversas reações do nosso organismo dependem da presença do oxigênio, que é essencial à vida. As reações de oxidação são usadas na cadeia respiratória para a síntese de adenosina trifosfato (ATP). Os elétrons liberados durante a glicólise e ciclo de Krebs são oxidados na mitocôndria e, a partir da adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (Pi) produzem ATP. Entretanto, fatores externos, como a fumaça de cigarro e radiação, ou reações internas como a fagocitose podem produzir radicais livres. Isso porque o oxigênio pode ir a um estado singlete, altamente reativo, o que pode causar danos às células lipídicas, protéicas e ao DNA. Esses danos contribuem à morte/envelhecimento celular e a presença de patologias.

O termo radical livre se refere a átomo ou molécula que contém um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Este não-emparelhamento de elétrons é responsável pela alta reatividade desses átomos ou moléculas, formando espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS estão sendo formadas constantemente; aproximadamente 3 a 5% do oxigênio que consumimos são convertidos em radicais livres de oxigênio. Alguns são subprodutos acidentais de reações enzimáticas normais que escapam do sítio ativo das enzimas que contêm metais durante reações de oxidação. Outros, como o peróxido de hidrogênio, são produtos fisiológicos de oxidases nos peroxissomas. A produção proposital de radicais livres ocorre em respostas inflamatórias. O uso de medicamentos, a radiação natural, a poluição do ar e outros fatores químicos também podem aumentar a formação de radicais livres nas células.

As ROS formadas pela redução de O_2 são radicais superóxido (O_2^-), o não-radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($OH\cdot$). O radical hidroxil, por exemplo, causa danos oxidativos às proteínas e ao DNA. Também forma peróxidos de lipídio e malondialdeído nas membranas lipídicas contendo ácidos graxos poliinsaturados. Em alguns casos, os danos por radicais livres são a causa direta de doenças (como é o caso dos danos aos tecidos devido à exposição à radiação ionizante). Em doenças neurodegenerativas, como o mal de Parkinson, ROS podem perpetuar os danos celulares causados por outros processos.

Em proteínas, os aminoácidos prolina, histidina, arginina, cisteína e metionina são particularmente suscetíveis ao ataque de radicais hidroxil e danos oxidativos. Como consequência dos danos oxidativos, as proteínas podem fragmentar ou cruzar as ligações dos resíduos com outros resíduos. O ataque dos radicais livres nos resíduos de cisteína das proteínas pode resultar em *cross-linking* e formação de agregados que previnem sua degradação. Entretanto, os danos oxidativos aumentam a suscetibilidade de outras proteínas à digestão proteolítica.

Os radicais de oxigênio estão combinados em seus danos destrutivos aos radicais livres de óxido nítrico (NO) e às espécies reativas de oxigênio de ácido hipocloroso (HOCl). NO combina com O_2 ou superóxido para formar espécies reativas de oxigênio, como o não-radical peroxinitrito ou o radical dióxido de nitrogênio.

O óxido nítrico é um radical livre que contém oxigênio e que também é essencial para a vida. NO possui um elétron singlete e, além disso, se liga a outros compostos que possuem elétrons singletos, como Fe^{3+} . Como um gás, se difunde através do citosol, membranas lipídicas e dentro das células. Fisiologicamente, em baixas concentrações, funciona como um neurotransmissor e um hormônio que ocasiona a vasodilatação. Entretanto, em altas concentrações, ele se combina com O_2 ou com superóxido para formar reativos adicionais e espécies tóxicas que contém nitrogênio e oxigênio (RNOS). RNOS estão envolvidos em doenças neurodegenerativas, como o mal de Parkinson e processos inflamatórios crônicos, como a artrite reumatóide.

Em resposta aos agentes infecciosos e outros estímulos, células fagocíticas do sistema imune (neutrófilos, eosinófilos e monócitos/macrócitos) exibem um rápido consumo de O_2 , denominado explosão respiratória. A explosão respiratória é a maior origem de superóxido, peróxido e hidrogênio, o radical hidroxil, ácido hipocloroso (HOCl) e RNOS. Essa geração de radicais livres é parte da defesa antimicrobiana humana, cujo objetivo é

destruir microorganismos invasores, células tumorais e outras células que devem ser removidas.

A explosão respiratória resulta da atividade da NADPH oxidase, que catalisa a transferência de um elétron do NADPH para o O_2 para formar o superóxido. O superóxido é liberado no espaço intramembranoso do fagolisossomo, onde é geralmente convertido em peróxido de hidrogênio e outras ROS efetivas contra bactérias e fungos patógenos. Quando os neutrófilos do sistema imune são ativados para produzir NO, a NADPH oxidase também é ativada. NO reage rapidamente com o superóxido para gerar peroxinitrito, que forma RNOS adicionais. Em alguns quadros patológicos, os radicais livres liberados pelos neutrófilos e macrófagos durante a inflamação contribuem para a injúria dos tecidos.

RNOS estão presentes no ambiente (como na fumaça do cigarro) e também são gerados nas células. Durante a fagocitose pela invasão de microorganismos, as células do sistema imune produzem O_2^- , HOCl e NO através das ações de NADPH oxidase, mieloperoxidase e óxido nítrico sintetase, respectivamente. Além de matar microorganismos invasores fagocitados, estes metabolismos tóxicos podem danificar componentes do tecido. As células se protegem contra os danos por ROS e outros radicais através de processos de reparo, compartimentalização da produção de radicais livres, enzimas de defesa e antioxidantes endógenos e exógenos. A enzima de defesa superóxido dismutase (SOD) remove o radical superóxido livre. Catalase e glutathione peroxidase removem peróxidos de hidrogênio e peróxidos de lipídio. Vitamina E, vitamina C e flavonóides das plantas agem como antioxidantes. Perturbações nesse equilíbrio redox geram o estresse oxidativo, que ocorre quando a taxa de geração de ROS excede a capacidade das células em removê-las.

3.2.3 Hiperplasia Fibrosa Inflamatória [83]

A hiperplasia é um aumento no número de células de um órgão ou tecido pelo aumento da taxa de divisão celular e diferenciação celular normal, geralmente resultando em um aumento no volume do órgão. A hiperplasia ocorre como resposta fisiológica a algum estímulo.

Especificamente, a hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI) é um processo proliferativo não-neoplásico frequentemente diagnosticado nos tecidos bucais. Ocorre principalmente por traumas crônicos de baixa intensidade, devido a próteses mal adaptadas ou

hábitos parafuncionais. Sua extensão pode variar de 1 cm até lesões maiores, envolvendo a maior parte do comprimento vestibular. As alterações histopatológicas das hiperplasias fibrosas inflamatórias são observadas em epitélio e tecido conjuntivo. No tecido conjuntivo, há aumento na quantidade das fibras colágenas e alteração no padrão de maturação dessas fibras, as quais se apresentam mais espessas e com disposição aleatória. Observa-se que em processos hiperplásicos inflamatórios, o colágeno é a proteína mais alterada.

O diagnóstico clínico é feito pelo exame histopatológico, que consiste em um fragmento do tecido retirado do paciente. Este é montado em fatias em lâminas de vidro e, com o uso de corantes apropriados, são examinados em microscópio. O tratamento e prognóstico da patologia ocorrem pela remoção cirúrgica da lesão com exame microscópico e correção do agente causador, como uma nova prótese, caso esta seja a razão da lesão.

3.3 IMPORTÂNCIA DA PESQUISA TRANSLACIONAL E A UTILIZAÇÃO DE MODELOS

Os fatores descritos até aqui convergem para a pesquisa translacional, que surge como uma ponte capaz de conectar o mundo molecular e celular com o mundo clínico.

Atualmente há um interesse cada vez maior por parte dos centros médicos acadêmicos e institutos de pesquisa, além de esforços para desenvolvimento e pesquisa industrial, a fim de deslocar as descobertas e inovações do laboratório para o leito hospitalar e para clínicas médicas, levando a um melhor diagnóstico, prognóstico e tratamento [84]. Em específico, vem ganhando destaque a “bioinformática translacional”, que entre suas definições pode ser explicada como o desenvolvimento e aplicação de métodos de informática para conectar entidades moleculares em entidades clínicas.

Com o foco de hoje nos genes e proteínas como causas primárias ou biomarcadores de doenças, a relação entre pequenas moléculas e doenças humanas é frequentemente negligenciada. Entretanto, é importante lembrar que 95% de todos os exames de diagnósticos clínicos são planejados para detectar pequenas moléculas, como a glicose no sangue, creatinina sérica, análise de aminoácidos, entre outros [84]. Da mesma forma, aproximadamente 90% de todas as drogas conhecidas são pequenas moléculas, 50% de todas as drogas são derivadas de metabólitos pré-existentes e 30% dos distúrbios genéticos envolvem doenças de metabolismos de pequenas moléculas [84]. Claramente, pequenas

moléculas são importantes e dão rápido crescimento na metabolômica, farmacogenômica e biologia de sistemas; é provável que seu papel no diagnóstico e tratamento de doenças continue crescendo. Dada esta perspectiva de crescimento excitante e a importância das pequenas moléculas na medicina e pesquisa translacional, cientistas estão agora percebendo que há uma necessidade crítica para ligar as informações sobre pequenas moléculas e seus correspondentes alvos de “grandes moléculas” [84]. Isto conduziu ao surgimento de um novo campo da bioinformática, chamado bioinformática química.

Caminhando na direção macromolecular, experimentos biológicos recentes revelam as proteínas como os principais agentes da função biológica [84]. Como tal, as proteínas no final das contas determinam o fenótipo de todos os organismos [84]. As proteínas não funcionam isoladamente; pelo contrário, suas interações com outras moléculas é que intermediam uma série de reações químicas de sinalização e metabolismo, processos celulares e sistemas dos organismos. E, neste caso, é importante encontrar mecanismos e modelos para o estudo dessas relações.

Diante disso, a pesquisa translacional destaca a importância do trabalho interdisciplinar para desenvolver estudos que possam resolver agravos à saúde dos pacientes e das comunidades, tais como de doenças cardiovasculares, câncer, diabetes, obesidade, entre outros, desde o prognóstico ao tratamento e à cura. Entretanto, um dos grandes desafios da ciência atual é a falta de dados estruturados uniformemente em campos relacionados a domínios biomédicos, a saber, a transferência de descobertas em pesquisas médicas e biológicas básicas para aplicação na assistência ao paciente em nível clínico [85]. Neste sentido, embora a biópsia óptica venha ganhando importância significativa, ainda carece de bancos de dados específicos de espectroscopia vibracional. Apesar da existência de bancos de dados como o “*Peptide Atlas*” [86], que é específico de espectrometria de massa, ainda não há bancos de dados específicos para espectroscopia Raman. Isso reforça a importância de pesquisas que contribuam para o conhecimento dos modos vibracionais característicos no diagnóstico de patologias.

Para que essas informações possam ser acessadas, uma forma bastante eficiente é a utilização de modelos em estudos computacionais. Os modelos, por sua vez, têm diferentes naturezas: servem para simplificar, o que significa limitar a análise de um fenômeno que se acredita ser mais importante; servem como ilustrações didáticas de circunstâncias muito complicadas que não são facilmente acessíveis; servem como analogias mecânicas; ou como modelos matemáticos [87]. É importante ressaltar também que as simulações computacionais

são de baixo custo. É possível extrair muita informação com um investimento inicial, porém, não são necessários gastos com insumos e reagentes, como nas análises experimentais. Os *softwares* utilizados apresentam alta confiabilidade. No caso daqueles aqui utilizados, a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) é uma técnica já estabelecida, que resultou, inclusive, em um prêmio Nobel [88]. Além disso, existe a questão bioética, em que é possível obter resultados e testar parâmetros, como ao eleger alguns fármacos, com o mínimo de utilização de testes em animais.

Física e quimicamente, muitas propriedades e o comportamento das moléculas podem ser preditos e entendidos se as estruturas moleculares e eletrônicas dessas espécies forem concebidas e manipuladas em modelos tridimensionais [87]. As relações entre essas estruturas e as propriedades da matéria constituem o domínio de atuação da modelagem molecular. Neste sentido, utilizando o desenho de uma molécula ou parte de uma molécula apropriado ao estudo de uma determinada situação-problema, um sistema pode ser simplificado como a soma das suas partes [87]. No caso deste trabalho, a construção de um modelo utilizando uma pequena molécula de colágeno, para estudos vibracionais desta proteína, pode contribuir, em um sentido mais amplo, para a pesquisa translacional.

4 TÉCNICAS UTILIZADAS

4.1 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL

A energia total de uma molécula é dada pela soma das energias eletrônicas, vibracionais e rotacionais; além das energias cinética, nuclear.

Uma molécula pode absorver ou emitir energia como resultado da transição entre diferentes níveis eletrônicos, vibracionais e/ou rotacionais. O estudo destas emissões ou absorções da radiação eletromagnética denomina-se espectroscopia molecular [89]. Assim, quando um quantum de energia, $h\nu$, incide sobre uma molécula, por exemplo, ela pode passar de um estado energético E_1 para um estado E_2 de maior energia, tal que:

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu = hc\bar{\nu} \quad (4.1.1)$$

sendo ν , a frequência incidente, (dada em s^{-1}); h , a constante de Planck; $\bar{\nu}$, o número de onda (expresso em cm^{-1}); e c , a velocidade da luz [89].

Quando a radiação eletromagnética atinge a molécula A – B, ela pode acoplar-se com o momento dipolar de A – B, induzindo uma vibração a A – B e ser absorvida. A frequência de vibração de estiramento da ligação A – B é dada por:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} = \sqrt{f \frac{(m_A + m_B)}{m_A \cdot m_B}} \quad (4.1.2)$$

onde $\bar{\nu}$ é o número de onda em cm^{-1} , f a força, expressa em dinas.Å , c a velocidade da luz em cm.s^{-1} e m_A e m_B , as massas dos átomos A e B, respectivamente, dadas em gramas [89]. Essa equação mostra que o principal fator que determina a frequência de vibração de um grupo A – B é a sua elasticidade, dada pela constante de força e a massa relativa dos grupos A e B. Desse modo, a frequência de absorção de grupos de átomos com massa e/ou constante de força diferentes devem absorver em frequências que lhes são características [89].

Conforme Siebert e Hildebrandt [90], a espectroscopia vibracional é uma ferramenta analítica que investiga o período de oscilação dos átomos em uma molécula. Essas oscilações não ocorrem aleatoriamente, mas de um modo precisamente definido. Isso pode ser facilmente entendido levando-se em consideração que uma molécula com N átomos tem 3N graus de liberdade, dos quais três se referem a translações e três (dois) correspondem a rotações em casos de estruturas não-lineares (lineares) das moléculas. Os graus de liberdade representam 3N-6 (3N-5) vibrações de moléculas não-lineares (lineares) denominadas de modos normais [90].

Em cada modo normal, cada átomo oscila em fase com a mesma frequência, embora com amplitudes diferentes. No entanto, a frequência, primeira propriedade observável em espectroscopia vibracional, tem uma dependência sensível nas forças que atuam em átomos individuais e suas respectivas massas [90]. Estas forças não resultam apenas das ligações químicas que conectam os átomos individuais, mas também incluem contribuições provenientes de interações de ligação dentro das moléculas e com o ambiente molecular [90]. Portanto, as frequências dos modos normais constituem uma assinatura característica da constituição química, da estrutura e da distribuição de densidade eletrônica da molécula em um dado ambiente químico. [90]

Uma das técnicas para a obtenção de espectros vibracionais é a espectroscopia Raman, que tem por base o espalhamento inelástico da luz [91]. Esse fenômeno foi previsto por Smekal em 1923 [92] e observado experimentalmente em 1928, por Raman [93].

A espectroscopia Raman é uma técnica fotônica de alta resolução que proporciona, em poucos segundos, informação química e estrutural de um composto orgânico

e/ou inorgânico, permitindo assim sua identificação [90]. Tal análise fundamenta-se no exame da luz dispersa por um material incidido por um feixe de luz monocromático. Uma pequena porção da luz é dispersa inelasticamente experimentando ligeiras mudanças de frequência que são características do material analisado e independentes da frequência da luz incidente [90]. Trata-se de um método analítico não destrutivo para determinar a estrutura e a conformação dos componentes moleculares; não exige preparação da amostra ou tratamento prévio; pode ser usado por amostras muito complexas não-purificadas; exige apenas quantidades muito pequenas do composto e é aplicável a biomoléculas em qualquer estado de agregação [90,7]. Os tecidos podem ser examinados *in vitro* ou *in vivo* em segundos e, se há uma biblioteca dos perfis espectrais dos vários tecidos, a comparação e interpretação podem ser feitas em tempo real [94]. Por estas razões, a técnica é especialmente adequada para as investigações de materiais biológicos [90,7]. Pode ainda oferecer um método menos subjetivo, com rapidez nas análises e como complemento aos métodos histológicos correntes [95].

A espectroscopia Raman do infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR), que foi recentemente introduzida na pesquisa biomédica, permite o estudo da conformação molecular dos compostos em seu microambiente natural [7]. Ela explora um efeito em que uma pequena porção de luz monocromática, espalhada por uma substância que tenha uma frequência diferente do feixe de luz incidente, chega numa quantia igual à frequência de vibração da ligação química [7]. Mudanças estruturais detectadas pela espectroscopia Raman, causadas por alterações nas ligações de hidrogênio, são de provável importância biológica [96,97]. Alterações da estrutura molecular das proteínas e lipídios em tumores cutâneos benignos e malignos, por exemplo, foram descritos por espectroscopia Raman [12].

4.1.1 Teoria de espectroscopia Raman

O espalhamento de luz pode ser entendido por um modelo clássico que parte do princípio de que um sólido é considerado como um conjunto de átomos sofrendo vibrações harmônicas simples devido à ação do campo elétrico da onda de luz incidente sobre o material.

Quando a radiação de campo elétrico \vec{E} , representada pela função de ondas planas

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = E_0 e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)} \hat{e} \quad (4.1.3)$$

onde E_0 é a amplitude da onda, ω é a frequência, \vec{k} é o vetor de onda e \hat{e} define a polarização da luz incidente, incide sobre o meio, ou seja, quando o material é colocado no campo elétrico \vec{E} , a nuvem eletrônica se desloca em sentido oposto ao deslocamento nuclear, o que ocasiona um momento de dipolo \vec{P} no material, dado por

$$\vec{P} = \chi \vec{E}(\vec{r}, t) \quad (4.1.4),$$

em que χ é a susceptibilidade elétrica ou polarizabilidade do meio, que indica a facilidade com que a nuvem eletrônica pode deformar-se, sendo uma característica intrínseca de cada material.

Pode-se ainda definir um deslocamento atômico $\vec{u}(\vec{r}, t)$ oscilante com o tempo t , porém com frequência diferente daquela associada ao campo elétrico \vec{E} . Isso porque o campo elétrico é oscilante no tempo, distorcendo a nuvem eletrônica de um lado para outro em cada intervalo de tempo t . Assim, o deslocamento atômico $\vec{u}(\vec{r}, t)$ é igualmente oscilante com o tempo t , porém com frequência diferente daquela associada ao campo elétrico \vec{E} , já que agora trata-se da frequência de vibração da rede cristalina, sendo escrito como

$$\vec{u}(\vec{r}, t) = u_0 e^{\pm i(qr + \Omega t)} \quad (4.1.5)$$

sendo u_0 a amplitude do deslocamento, \vec{q} o vetor de onda e Ω a frequência de vibração da rede.

Assumindo que a frequência espalhada Ω é muito menor que a frequência da luz incidente ($\Omega \ll \omega$), o tensor polarizabilidade pode ser expandido como uma série de Taylor em $u(r, t)$, ou seja, o deslocamento do átomo em relação ao eixo de vibração:

$$\chi(u, \omega) = \chi_0(\omega) + \left(\frac{d\chi}{du}\right)u + \frac{1}{2}\left(\frac{d^2\chi}{du^2}\right)u^2 + \dots \quad (4.1.6)$$

Na equação 4.1.6, χ_0 representa a polarizabilidade estática do sistema e o segundo termo representa a polarizabilidade oscilante induzida pela onda da rede $u(r, t)$. Das equações 4.1.3, 4.1.4 e 4.1.6 pode-se reescrever a expressão para o momento de dipolo \vec{P} :

$$\vec{P} = \chi_0(\omega)E_0 e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)} + \left(\frac{d\chi}{du}\right)u_0 E_0 e^{i[(\vec{k} \pm \vec{q}) \cdot \vec{r} - (\omega \pm \Omega)t]} \hat{e} + \dots \quad (4.1.7)$$

Na equação 4.1.7, o primeiro termo refere-se ao espalhamento Rayleigh, em que a polarização oscilante tem a mesma frequência que a radiação incidente; o segundo termo descreve o espalhamento Raman de primeira ordem, no qual a frequência do sistema oscilante ω é diminuída ou aumentada de Ω , correspondendo aos espalhamentos Stokes (-) ou anti-Stokes (+); os termos seguintes possuem intensidades muito fracas em comparação ao

espalhamento Raman de primeira ordem e não são considerados. Essa equação também mostra que se não houver variação na polarizabilidade, não há espalhamento Raman, ou seja, $\frac{d\chi}{du} \neq 0$. Se durante a vibração da rede a polarizabilidade χ variar, então tal vibração é ativa no Raman, como pode ser visto esquematicamente na Figura 4.

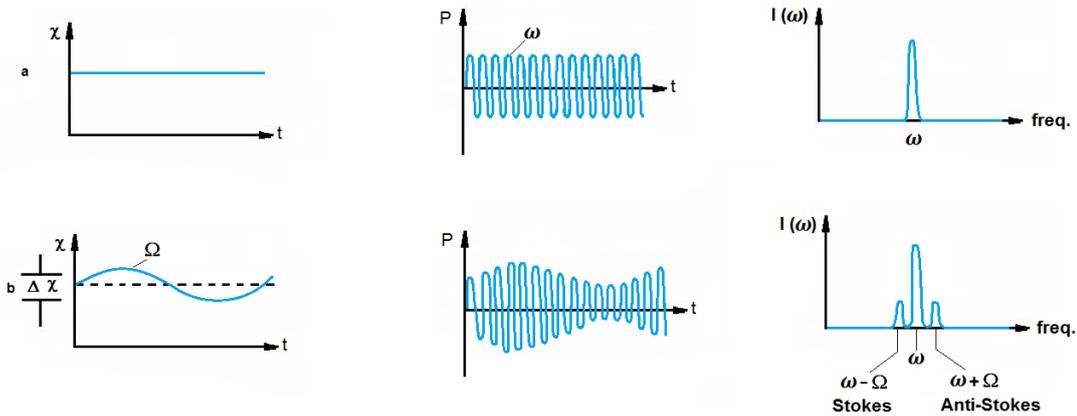


Figura 4 – A polarizabilidade no a) espalhamento Rayleigh não varia com o tempo e b) no espalhamento Raman varia com o tempo.

Além disso, havendo um dipolo elétrico oscilando com frequência ω será emitida luz de mesma frequência, com velocidade c , e cuja intensidade é dada por:

$$I = \frac{4\omega^4}{3c^3} |\vec{P}|^2 \quad (4.1.8)$$

Quatro parâmetros caracterizam o feixe de luz incidente e espalhado. São eles: vetor de onda \vec{k} , intensidade I , polarização \hat{e} e frequência ω . A partir disso, podem-se estruturar correlações entre esses vários parâmetros e as propriedades do material e, com isso, descrever e interpretar os experimentos de espectroscopia Raman.

Na descrição quântica do sistema, um quantum de radiação incidente interage com o material e é aniquilado. Este processo transfere energia para a molécula que vai para um estado intermediário (virtual) e, ao relaxar para o estado fundamental, gera outro fóton. Portanto, o espalhamento de luz se dá pela aniquilação de um quantum de luz incidente e posterior criação de um quantum de luz espalhada.

No espalhamento inelástico o resultado desse processo é a mudança da energia vibracional do material. Para isso, uma excitação cristalina (fônon) deve ser criada (processo Stokes) ou aniquilada (processo anti-Stokes).

Para que o efeito Raman ocorra, a energia total do sistema deve ser conservada:

$$\Delta E_m = h\nu_0 - h\nu_\nu = h\nu_m \quad (4.1.9)$$

sendo ν_0 a frequência do fóton incidente, ν_ν a frequência do fóton espalhado e ν_m a frequência de vibração do material.

Um espalhamento pode ser dividido em dois tipos: Rayleigh (elástico) ou Raman (inelástico), conforme a Figura 5. No espalhamento Rayleigh, após a interação do fóton com o material no estado fundamental ($\nu = 0$), a energia do fóton é absorvida pela molécula, que alcança um nível de energia mais alto e pouco estável. Por isso, imediatamente retorna ao estado fundamental, perdendo energia, mas emitindo um fóton com frequência e energia idênticas às do fóton incidente.

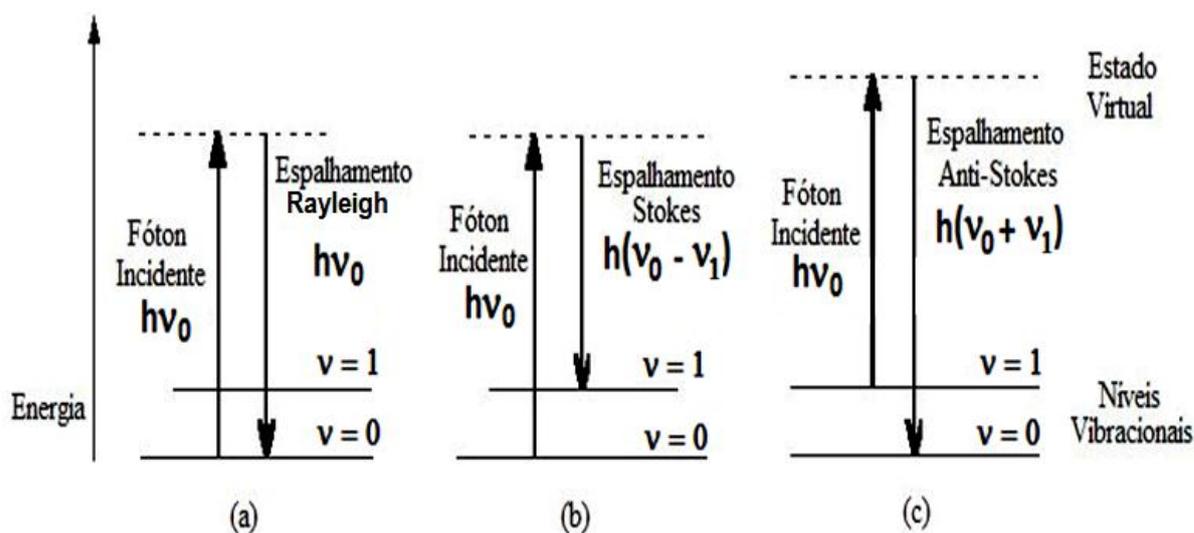


Figura 5 – Esquema Ilustrativo dos espalhamentos (a) Raileigh, (b) Raman Stokes e (c) Raman Anti-Stokes. Os níveis 0 e 1 representam, respectivamente, os níveis de energia fundamental e o primeiro nível vibracional excitado.

Já no espalhamento Raman, a indução de uma transição de energia, devido a um quantum de frequência ν_0 , modifica os níveis de energia rotacional e vibracional, tal que a frequência da radiação emergente é $\nu_0 - \nu_1$ (linha de Stokes) [91]. Esse fenômeno ocorre porque, ao perder energia, a molécula não retorna ao estado fundamental e passa para um estado vibracional excitado ($\nu = 1$). Neste estado, o fóton espalhado tem menor energia do que aquela do fóton incidente e um fônon (vibração da rede) é gerado, portanto, $\Delta E_m > 0$ e $\nu_\nu < \nu_0$.

Outra possibilidade é que o quantum de luz colida com uma molécula já excitada, fazendo-a retornar ao estado fundamental, de modo que a frequência da luz espalhada seja $\nu_0 + \nu_1$ (linha anti-Stokes) [91]. Neste caso, a transição de energia ocorre entre o primeiro estado

vibracional excitado da molécula e um nível de energia mais alto. Ao decair, a molécula volta ao estado fundamental, emitindo um fóton para conservar a energia do sistema e um fônon é aniquilado, portanto, $\Delta E_m < 0$ e $\nu_\nu < \nu_0$.

4.1.2 Espectroscopia Raman de amostras hidratadas

Para estudos de estrutura da água, a espectroscopia Raman é uma técnica preferencialmente utilizada porque as proporções das intensidades dos principais modos de estiramento OH refletem uma rede de ligações de hidrogênio "intermonômeros", bem como a sua perturbação pela presença de alguns solutos [98,99]. Enquanto que na região do infravermelho, a absorção de radiação ocorre quando há variação no momento dipolar; em Raman esta absorção acontece quando há uma variação na polarizabilidade das moléculas, ou seja, se houver indução de momento dipolar nestas moléculas [91].

A resolução da espectroscopia Raman é de $\approx 10^{-2}$ s, por isso é uma técnica capaz de detectar diretamente as vibrações das ligações de hidrogênio, principais responsáveis pela estrutura intermolecular e propriedades de muitos compostos. Quando há formação de uma ligação de hidrogênio podem ocorrer pequenas variações na polarizabilidade das moléculas e estas variações podem ser detectadas com auxílio de um *laser* e convertidas em um espectro vibracional [89]. Isso possibilita a avaliação direta da estrutura da água, proteínas e lipídios [100,101,102,96,97]; e é ideal para estudos da água supercrítica devido à sua seletividade química e ao sinal Raman, intrinsecamente fraco para água [103].

Geralmente os perfis espectrais observados são amplos e sensíveis à temperatura e pressão [104]. Como as ligações de hidrogênio podem, em princípio, fazer da água um líquido único, com perfis espectrais particulares, o estudo do espectro Raman da água prossegue independentemente dos estudos de espalhamento da luz para líquidos moleculares mais simples [104]. Decomposições dos perfis espectrais em gaussianas e lorentzianas têm sido utilizadas a fim de estimar o tempo de vida das ligações de hidrogênio, bem como caracterizar o ambiente molecular local na água líquida [104].

Conforme a intensidade de absorção das ligações covalentes, as moléculas podem ter vibrações que envolvem combinações de estiramento simétrico (ν_1), estiramento assimétrico (ν_3) e *scissoring* (ν_2) (Figura 6). Por estes fatores a água líquida a 25°C, por exemplo, possui os modos vibracionais: ν_2 (em $1643,5\text{cm}^{-1}$); uma combinação de ν_2 e libração

(em $2127,5\text{cm}^{-1}$); e ν_1 , ν_3 , harmônico e ν_2 (em $3404,0\text{cm}^{-1}$) (Tabela 1) [26]. As Tabela 1 e Tabela 2 mostram as principais vibrações para a água líquida e gasosa [26].



Figura 6 – Tipos de vibração: estiramento simétrico (ν_1), estiramento assimétrico (ν_3) e *scissoring* (ν_2) e librações nos eixos x, y e z [26]. Na figura: em vermelho, o átomo de oxigênio; e em branco, o átomo de hidrogênio.

Tabela 1 - Frequências vibracionais (em cm^{-1}) para três modos da molécula de água líquida.

Vibração(es)	Líquido H ₂ O (25 °C)
	ν , cm^{-1}
ν_2	1643,5
Combinação de ν_2 + libração	2127,5
ν_1 , ν_3 , harmônico de ν_2	3404,0

Fonte: Adaptado de Chaplin [26].

Tabela 2 – Frequências vibracionais (em cm^{-1}) para três modos normais de diferentes isótopos da molécula de água gasosa.

Gás	ν_1 , cm^{-1}	ν_2 , cm^{-1}	ν_3 , cm^{-1}
H ₂ O ¹⁶	3657,05	1594,75	3755,93
H ₂ O ¹⁷	3653,15	1591,32	3748,32
H ₂ O ¹⁸	3649,69	1588,26	3741,57
HD ¹⁶ O	2723,68	1403,48	3707,47
D ₂ ¹⁶ O	2669,40	1178,38	2787,92

Fonte: Adaptado de Chaplin [26].

Em suma, o espalhamento Raman da água líquida consiste na banda de vibração de estiramento (2800 a 3400cm^{-1}), a banda de *scissoring* ν_2 , próximo a 1645cm^{-1} , a

combinação das bandas de libração e dobramento ($\nu_L + \nu_2$) próximo a 2100cm^{-1} e as bandas de flutuação intermolecular nas regiões de baixa frequência, que ocorrem devido a interações entre moléculas de água através de ligações de hidrogênio [98]. Em regiões de baixa frequência do espectro Raman da água, existem bandas de flutuação intermolecular devido às interações entre as moléculas de água através das ligações de hidrogênio. As bandas de libração ou rotacional restrita da água ocorrem na região de $200\text{-}1100\text{cm}^{-1}$. Os movimentos translacionais limitados da água envolvidos nas interações com as ligações de hidrogênio são equivalentes ao dobramento e movimentos de estiramento do O-H... H [98].

A interpretação do espectro Raman e IR da água líquida têm sido objeto de considerável discussão; seu espectro vibracional tem sido atribuído a efeitos combinados das ligações de hidrogênio e acoplamentos intermoleculares dos modos vibracionais em moléculas vizinhas, conhecido como troca de energia de ressonância [105]. A molécula de água tem um momento de inércia muito pequeno. Isso dá origem a uma rica combinação de espectros vibracionais-rotacionais, gerando milhares de linhas de absorção [26]. No líquido, as rotações tendem a ser limitadas por ligações de hidrogênio, gerando librações [26]. Além disso, linhas espectrais causam a sobreposição de muitos dos picos de absorção [26].

Diferenças nos tipos de aglomerados refletem em picos característicos, cujas decomposições dos espectros em gaussianas e componentes de Lorentz, permitem conclusões a respeito das ligações de hidrogênio e o ambiente molecular local na água líquida [104]. Mudanças de frequência da luz espalhada podem ser analisadas e apresentadas como espectros. Por sua vez, as bandas espectrais representam vibrações características das ligações químicas das moléculas da amostra analisada [7].

As propriedades da água líquida pura são determinadas pela natureza de sua rede de ligações de hidrogênio [106]. O tempo de relaxação da água pura (2,6 ps) também é atribuído ao rearranjo da ligação de hidrogênio associada com sua reorientação [106]. Em soluções aquosas de sal, a estrutura da água é modificada nas proximidades dos íons: oxigênio-água preferencialmente solubiliza os cátions e hidroxila-água solubiliza os ânions [106]. Consequentemente, as interações íon-dipolo influenciam a estrutura e a dinâmica da água nas proximidades de íons [106].

Assim, de modo geral, a espectroscopia Raman fornece um método eficiente de investigação da água, já que os modos locais OH e OD estendem-se praticamente dissociados de outros modos [107]. A forma da banda Raman de estiramento OH no intervalo $2900\text{-}3700\text{cm}^{-1}$ reflete bem a dinâmica da microestrutura da água, bem como suas interações com

solutos, polímeros ou moléculas biológicas [99]. Geralmente, o modo em 3200 cm^{-1} é visto como relacionado às ligações fortes de hidrogênio nas moléculas da água e o modo em 3400 cm^{-1} como ligações mais livres [99].

4.2 SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS

Os métodos computacionais permitem o estudo da geometria molecular de um sistema - a forma da molécula, comprimento de ligação, ângulos de rotação, etc.; e o estudo da parte energética do sistema - se exotérmico, endotérmico, quais os estados de transição, a velocidade da reação, a reatividade química, o espectro vibracional, interações com outros substratos e outras propriedades físicas, como a densidade, o ponto de fusão. Para isso, existem modelos teóricos que, de um modo geral, podem ser obtidos pelos seguintes métodos: métodos clássicos ou de mecânica molecular, métodos de primeiros princípios (*ab initio*) e a dinâmica molecular. [108,109,110]

Na mecânica molecular é utilizado o método clássico. Nela, os potenciais são simulados como um oscilador harmônico, ou seja, o sistema a ser estudado é considerado do tipo massa-mola e as massas dos átomos são fatores importantes para a descrição do sistema. Já o método *ab initio* resolve, em tese, a equação de Schrödinger para descrever os átomos e as moléculas. Por fim, a dinâmica molecular resolve equações de movimento para a descrição do sistema, podendo ser realizada por métodos clássicos ou métodos *ab initio*. A questão principal na escolha de um método computacional diz respeito a qual pergunta se pretende responder; dependendo da pergunta, pode ser mais adequado um ou outro método. Para um sistema pequeno, por exemplo: quanto menor o sistema, mais importante se tornam suas interações eletrônicas e mais preciso será a descrição por métodos de primeiros princípios. [108,109,110]

Em específico, os métodos de primeiros princípios se relacionam a modelos computacionais derivados de princípios teóricos e sem a inclusão de dados experimentais (sem parametrização). O método lembra a mecânica quântica porque, neste caso, estamos interessados em estudar as interações atômicas, na qual os métodos clássicos não são válidos. Ele envolve aproximações matemáticas (formas funcionais aproximadas) e soluções numéricas, as quais estão descritas no tópico “Teoria”, a seguir. [111]

O presente trabalho utilizou técnicas *ab initio* para encontrar os modos vibracionais do modelo de tecido, que apresenta, em sua estrutura, a presença de água confinada. Isso é relevante porque em métodos clássicos, todos os parâmetros do sistema para uma molécula precisam ser ajustados, podendo utilizar, para isso, parâmetros quase prontos de uma biblioteca. No entanto, um sistema criado para uma determinada situação, por métodos clássicos, será um problema se o sistema a ser estudado for água confinada. Isso porque em sistemas com água confinada, a descrição da estrutura eletrônica com precisão é de grande importância, o que significa que os métodos clássicos não apresentam uma descrição tão boa quanto os chamados métodos de primeiros princípios (*ab initio*). Mesmo gastando um tempo considerável para “*fitar*” todos os parâmetros de uma molécula de água por métodos clássicos, eles não serão bons descritores ao utilizá-los em um outro conjunto de parâmetros do mesmo tipo de molécula, apresentando um poder preditivo praticamente nulo. [111]

Nesse sentido, o método da Teoria do Funcional da Densidade (DFT) [112,113], um método *ab initio*, embora muito mais pesado, permite, mesmo dentro das aproximações feitas por Kohn-Sham, a obtenção de excelentes espectros vibracionais e, ainda que as polarizabilidades não sejam bem calculadas, as frequências são muito bem calculadas. A DFT [112,113] permite que sistemas complexos, com centenas de átomos, sejam estudados com uma precisão significativa e, atualmente, é um dos métodos mais utilizados para a descrição da estrutura eletrônica da matéria. A DFT utiliza o funcional de densidade eletrônica como um descritor básico do sistema eletrônico [114]. Em geral, esse método oferece uma boa combinação de acurácia e requerimentos computacionais, especialmente para grandes sistemas [114].

4.2.1 Simulações e os sistemas com moléculas de água

Nos últimos anos houve um grande avanço nas simulações de primeiros princípios para a água líquida, utilizando a técnica de Dinâmica Molecular (DM) em conjunto com DFT [115,116,117]. Por outro lado, alguns trabalhos recentes [118,119] questionaram tais resultados, argumentando que as simulações não tinham sido longas o suficiente para a obtenção de médias convergidas.

Portanto, ainda existem alguns aspectos relacionados à descrição *ab initio* que devem ser melhor investigados, como a qualidade da aproximação utilizada para o funcional

da energia de troca e correlação na DFT e sua influência nos resultados. Outro aspecto diz respeito à não inclusão dos efeitos dos prótons como um pacote de ondas (calculando apenas Born-Oppenheimer e a função de onda dos elétrons, conforme o tópico a seguir) no tratamento de dinâmica molecular; embora simulações considerando tais efeitos ainda sejam inviáveis computacionalmente e a influência quantitativa dessa inclusão nas simulações *ab initio* permaneça indeterminada [120].

Dos potenciais empíricos para a água nas simulações clássicas, nenhum ainda é capaz de fornecer de forma acurada propriedades dinâmicas, estruturais e termodinâmicas para a água líquida em toda a faixa de extensão de pressão e temperatura [120]. Além disso, não apresentam flexibilidade e transferibilidade suficiente na descrição de problemas em que sistemas com íons e outras moléculas interagem com a água [120]. Assim, os cálculos de primeiros princípios são de extrema importância, pois podem ser usados em princípio para qualquer sistema. Sendo o hidrogênio um átomo muito leve, tratá-lo classicamente pode não ser adequado. Por outro lado, o tratamento de todos os graus de liberdade quanticamente ainda é inviável na maioria dos casos, devido ao tempo computacional elevado [120].

Desse modo, apesar da construção de centenas de campos de força-modelo para uso em simulações e de grandes avanços na tecnologia computacional, bem como do desenvolvimento de poderosos métodos *ab initio* de dinâmica molecular, permanecemos incapazes de calcular com precisão as propriedades da água líquida (como a capacidade de calor, densidade, constante dielétrica e compressibilidade, por exemplo) sobre escalas significativas [121]. Os potenciais utilizados em simulações são ajustados para descrever com precisão o sistema próximo a certas configurações e não há nenhuma garantia de que a descrição será igualmente apropriada em situações distintas dessas [122]. Ainda não há uma descrição molecular satisfatória de como um próton se move no líquido, não se entende completamente a natureza molecular das superfícies de qualquer água no estado sólido ou líquido [123], nem a origem das intrigantes anomalias e singularidades encontradas na região de supercongelamento [124]. Embora seja claro que a rede de ligação de hidrogênio, suas flutuações e sua reorganização determinam as propriedades do líquido, os estudos experimentais investigam a dinâmica da ligação de hidrogênio indiretamente e podem ser interpretados apenas em formas qualitativas [125]. Mais do que isso, a confiabilidade dos modelos da água para fenômenos de solvatação e processos biológicos permanece relativamente não-testada [38].

No caso da água, uma descrição acurada de sua estrutura molecular líquida pode ser obtida por meio de experimentos de espalhamento, como a espectroscopia Raman [126]. Simulações computacionais das contribuições relevantes da água no espectro Raman têm sido relatadas recentemente e comparadas aos valores dos dados experimentais [104]. Em suma, diversos aglomerados de água podem ser calculados pelo uso de métodos de simulação computacional. Tais aglomerados, $(\text{H}_2\text{O})_n$, com $n=1, 2, 3, \dots$, são objetos de numerosos estudos moleculares e utilizam diferentes simulações [47,127,128,94,129,107].

Neste trabalho foram utilizados cálculos vibracionais com matrizes hessianas pré-calculadas e o método DFT. A função de onda foi otimizada (*single point calculation*) e foram feitas as análises vibracionais, com respostas em Raman. O intuito foi obter os modos vibracionais de um protótipo de colágeno com água confinada.

4.2.2 Teoria

4.2.2.1 Equação molecular de Schrödinger e aproximação de Born-Oppenheimer [130]

Em um tratamento mecânico-quântico de sistemas microscópicos, o que precisamos basicamente é resolver a equação de Schrödinger para estados estacionários:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (4.2.1)$$

onde \hat{H} é o operador hamiltoniano para o sistema molecular com energia total E e Ψ é a função de onda molecular. A solução desta equação fornece as informações necessárias para o estudo das propriedades microscópicas de sistemas de moléculas. Porém, para sistemas multi-elétrônicos, a resolução desta equação é uma tarefa difícil de ser executada. Por isso, há a necessidade do uso de aproximações que tornem viável a resolução da equação 4.2.1.

Daquelas utilizadas na resolução da equação de Schrödinger para sistemas moleculares, a mais comum é a aproximação de Born-Oppenheimer [131]. A inspiração para a aproximação de Born-Oppenheimer vem do fato de que os espectros eletrônico e nuclear de um sistema molecular geralmente são distintos. Devido a essa distinção espectroscópica, muitas vezes traduzida como diferenças entre as massas dos elétrons e dos núcleos, pode-se fazer a separação de Born-Oppenheimer, que consiste no tratamento em separado dos

movimentos eletrônico e nuclear. Assim, a equação 4.2.1 é reescrita de maneira mais específica, em função das coordenadas dos núcleos e elétrons do sistema:

$$H(r, R) \Psi(r, R) = \varepsilon(r, R) \Psi(r, R) \quad (4.2.2)$$

Nessa equação, tanto o operador H quanto a função de onda Ψ dependem das coordenadas de todos os núcleos (R) e de todos os elétrons (r) presentes no sistema. Na prática, para de fato ser resolvida a equação 4.2.2 para um sistema multi-eletrônico qualquer, é necessário reescrever esta equação de modo a deixar explícitos os termos de $H(r, R)$ e $\Psi(r, R)$. Para o hamiltoniano, despreza-se todos os termos relativísticos, devido às pequenas massas dos núcleos, e assim:

$$H(r, R) = \sum_A T_A + \sum_{A < B} \frac{Z_A Z_B e^2}{R_{AB}} + \sum_i T_i + \sum_{i < j} \frac{e^2}{r_{ij}} - \sum_i \sum_A \frac{Z_A e^2}{r_{iA}} \quad (4.2.3)$$

Os termos de $H(r, R)$, na ordem em que aparecem na equação 4.2.3, são a energia cinética dos núcleos, a repulsão eletrostática referente aos núcleos, a energia cinética dos elétrons, a repulsão eletrônica e a energia de atração elétron-núcleo. Ou ainda, de forma mais simplificada:

$$H\psi(r, R) = -\frac{\hbar^2}{2m} (T_N + T_e) + V \quad (4.2.4)$$

onde os termos T_e , T_N e V são, respectivamente, a energia cinética eletrônica, energia cinética dos núcleos e energia potencial.

Visando a resolução da equação 4.2.2, aproximamos $\psi(r, R)$ por um produto tal que um dos fatores tenha uma dependência paramétrica das coordenadas nucleares, ou seja,

$$\psi(r, R) = \Psi(r; R) \phi(R) \quad (4.2.5)$$

onde ψ depende parametricamente das coordenadas dos núcleos, R , e representa a função de onda eletrônica do sistema e ϕ representa a função de onda nuclear.

Substituindo 4.2.5 em 4.2.4 e resolvendo a equação, tem-se:

$$H\psi(r, R) = \left[-\frac{\hbar^2}{2m} (T_N + T_e) + V \right] \Psi(r; R) \phi(R)$$

$$H\psi(r, R) = -\frac{\hbar^2}{2m} \left[T_N (\Psi_{(r;R)} \phi_{(R)}) + T_e (\Psi_{(r;R)} \phi_{(R)}) \right] + V (\Psi_{(r;R)} \phi_{(R)})$$

$$H\psi(r, R) = -\frac{\hbar^2}{2m} \left[\frac{\partial}{\partial R} \cdot \frac{\partial}{\partial R} (\Psi_{(r;R)} \phi_{(R)}) + T_e (\Psi_{(r;R)} \phi_{(R)}) \right] + V (\Psi_{(r;R)} \phi_{(R)})$$

$$H\psi(r, R) = -\frac{\hbar^2}{2m} \left[\frac{\partial}{\partial R} \left(\Psi_{(r;R)} \frac{\partial}{\partial R} \phi_{(R)} + \left(\frac{\partial}{\partial R} \Psi_{(r;R)} \right) \phi_{(R)} \right) + T_e (\Psi_{(r;R)} \phi_{(R)}) \right] + V (\Psi_{(r;R)} \phi_{(R)})$$

$$H\psi(r, R) = -\frac{\hbar^2}{2m} \left[\left(\Psi \frac{\partial^2}{\partial R^2} \phi + \frac{\partial \Psi}{\partial R} \frac{\partial}{\partial R} \phi + \left(\frac{\partial^2}{\partial R^2} \Psi \right) \phi + \frac{\partial}{\partial R} \Psi \frac{\partial \phi}{\partial R} \right) + T_e(\Psi_{(r;R)} \phi_{(R)}) \right] + V(\Psi_{(r;R)} \phi_{(R)})$$

$$H\psi(r, R) = -\frac{\hbar^2}{2m} \left[\Psi_{(r;R)} T_N \phi_{(R)} + \phi_{(R)} T_e \Psi_{(r;R)} \right] + V \Psi_{(r;R)} + \phi_{(R)} + W \quad (4.2.6)$$

Onde,

$$W = \left[2 \frac{\partial \Psi}{\partial R} \frac{\partial}{\partial R} \phi + \left(\frac{\partial^2}{\partial R^2} \Psi \right) \phi \right] \left(-\frac{\hbar^2}{2m_i} \right) \quad (4.2.7)$$

Entretanto, conforme Atkins e Friedman [132], como m_i é a massa dos núcleos e esta ocorre no denominador, podemos supor que W é pequeno a ponto de ser considerado desprezível. Assim:

$$H_{el}(r, R) \Psi_{el}(r, R) = E_{el}(r, R) \Psi_{el}(r, R) \quad (4.2.8)$$

$$H_n(R) \phi_n(R) = E \phi_n(R)$$

Onde,

$$H_{el}(r, R) = \sum_i T_i + \sum_{i < j} \frac{e^2}{r_{ij}} \sum_A T_A - \sum_i \sum_A \frac{Z_A e^2}{r_{iA}} + \sum_{A < B} \frac{Z_A Z_B e^2}{R_{AB}} \quad (4.2.9)$$

$$H_n(r, R) = \sum_A T_A + E_{el}(R)$$

Esta separação do hamiltoniano em duas partes distintas, uma eletrônica e outra nuclear, é conhecida como aproximação de Born-Oppenheimer [131]. A possibilidade de separação dos movimentos eletrônico e nuclear se deve ao fato de que os elétrons têm menor inércia e podem ajustar seus movimentos quase que instantaneamente, a qualquer rearranjo das posições dos núcleos.

Tomando a função de onda eletrônica $\Psi_{el}(r; R)$, e sabendo que esta é dependente das coordenadas de todos os elétrons, se for possível obtermos um conjunto completo ortonormal de funções de onda de muitos elétrons Ψ_i , pode-se expandir $\Psi_{el}(r; R)$ em termos deste conjunto. Deste modo,

$$\Psi_{el}(r; R) = \sum_i \Psi_i c_i, \quad \langle \Psi_i | \Psi_j \rangle = \delta_{ij} \quad (4.2.10)$$

Pelo princípio de exclusão de Pauli [80], $\Psi_{el}(r; R)$ é antissimétrica com respeito a qualquer troca de coordenadas dos elétrons, isto é,

$$\Psi_{el}(r_1, r_2, \dots, r_i, \dots, r_k, \dots; R) = -\Psi_{el}(r_1, r_2, \dots, r_k, \dots, r_i, \dots; R) \quad (4.2.11)$$

Desta forma, para um sistema molecular de camada fechada, um conjunto de funções multi-eletrônicas mais simples é um conjunto de determinantes de Slater.

Estes determinantes são formados por um conjunto de spins-orbitais $\varphi_i(j;R)$ e podem ser expressos por

$$\Psi_{el}(1, 2, \dots, N; R) = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \varphi_a(1;R) & \varphi_b(1;R) & \cdots & \varphi_n(1;R) \\ \varphi_a(2;R) & \varphi_b(2;R) & \cdots & \varphi_n(2;R) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \varphi_a(N;R) & \varphi_b(N;R) & \cdots & \varphi_n(N;R) \end{vmatrix} \quad (4.2.12),$$

onde N é o número de elétrons do sistema e $\varphi_i(j;R)$ é o spin orbital do elétron j .

Até aqui temos $3n$ coordenadas, mas uma outra maneira de pensar o problema é utilizar a Teoria do Funcional da Densidade.

4.2.2.2 Teoria do Funcional da Densidade (DFT)

As Simulações Computacionais Atomísticas fornecem informações em situações nas quais os resultados analíticos são difíceis de serem obtidos, em que experimentos não são viáveis (ou os dados são escassos) e para auxiliar a interpretação dos resultados experimentais.

O conjunto de átomos e suas combinações formam os mais diversos materiais. Por sua vez, átomos são sistemas bem definidos pelos seus núcleos e elétrons. Assim, a equação bem definida para descrevê-los é dada por: $H \Psi(\{r_i, R_\alpha\}) = E_{TOT} \Psi(\{r_i, R_\alpha\})$, em que r_i refere-se as coordenadas eletrônicas e R_α as coordenadas nucleares. Entretanto, não há solução analítica da equação (exceto em alguns poucos casos). Por isso, são necessárias aproximações e modelos para a resolução dos problemas. A mais conhecida delas é a aproximação de Born-Oppenheimer, que tem por base a grande diferença de massa entre os prótons e os elétrons. Neste sentido, os núcleos não acompanham a rápida mudança dos elétrons e permanecem, momentaneamente, fixos. Assim, pode-se separar o problema eletrônico do nuclear.

Pela equação de Schroedinger, todas as propriedades, incluindo a energia, são unicamente observadas pela função de onda Ψ . Hohenberg e Kohn [112] mostraram que todas as propriedades de um sistema podem ainda ser unicamente observadas pela sua densidade

eletrônica (ρ). Neste caso, a energia eletrônica total pode ser expressa como um funcional da densidade:

$$E(\rho) = T(\rho) + V_{ee}(\rho) + \int v\rho \quad (4.2.13)$$

em que o último termo da equação consiste na interação entre os elétrons e o núcleo, decorrentes do potencial nuclear v e, de uma forma mais geral, de qualquer potencial externo; e as energias cinética total (T) e de repulsão elétron-elétron (V_{ee}), em princípio, são funcionais da densidade, cuja dependência do funcional explícito, não é exatamente conhecida. Além disso, há um princípio variacional em que a densidade eletrônica do estado fundamental é a aquela que minimiza a energia da equação [112].

No DFT a densidade eletrônica é expressa como uma combinação linear de funções matemáticas cujas formas são similares aos orbitais de Hartree-Fock (HF). A forma exata da densidade não é conhecida, porém existe uma grande lista de funcionais da densidade que possuem vantagens e desvantagens. Alguns deles foram obtidos a partir da mecânica quântica e outros através de parametrização de funções, para melhor reproduzir os resultados experimentais.

A vantagem de utilizar a densidade eletrônica é que as integrais de repulsão de Coulomb são feitas sobre a densidade eletrônica, que depende apenas das três coordenadas da posição. Além disso, o DFT considera um termo chamado correlação, escrevendo a energia de maneira mais completa que Hartree-Fock.

4.2.2.2.1 Teorema de Hohenberg e Kohn

4.2.2.2.1.1 Teorema 1

O primeiro teorema de Hohenberg e Kohn prova que em um sistema de partículas interagentes o potencial externo, $V_{\text{ext}}(r)$, que age sobre elas é determinado unicamente, a menos de uma constante, pela densidade do estado fundamental $\rho(r)$. Assim, se o hamiltoniano é completamente determinado (a menos de uma constante) todas as propriedades do sistema são completamente determinadas dado somente a densidade do estado fundamental. A prova disso é dada por redução ao absurdo (*reductio ad absurdum*).

Considerando dois potenciais externos V_{ext} e V'_{ext} que diferem entre si por mais do que uma constante (uma vez que a função de onda e, conseqüentemente, a densidade de carga é inalterada se uma constante é adicionada ao potencial) e que ambos dão origem a

mesma densidade de elétrons ρ , associada com o estado fundamental de N partículas não degenerado correspondente, estes dois potenciais externos fazem parte de dois hamiltonianos que só diferem apenas no potencial externo.

$$\begin{aligned}\hat{H} &= \hat{T} + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{ext} \\ \hat{H}' &= \hat{T} + \hat{V}_{ee} + \hat{V}'_{ext}\end{aligned}\quad (4.2.14)$$

Os hamiltonianos H e H' resultam em diferentes autofunções, Ψ e Ψ' , respectivamente, e correspondem a diferentes energias, E e E', respectivamente, com $E \neq E'$. Entretanto, ambas as funções de onda tem a mesma densidade eletrônica. Portanto V_{ext} conduz a um H, que permite a determinação de Ψ e outras propriedades como a sua densidade eletrônica ρ , sendo que o mesmo ocorre com Ψ' .

$$V_{ext} \Rightarrow H \Rightarrow \Psi \Rightarrow \rho \leftarrow \Psi' \leftarrow H' \leftarrow V'_{ext} \quad (4.2.15)$$

Embora Ψ e Ψ' sejam diferentes, podemos usar Ψ' como função tentativa para H. Assim, em virtude do princípio variacional, tem-se:

$$E < \langle \Psi' | \hat{H} | \Psi' \rangle = \langle \Psi' | \hat{H}' | \Psi' \rangle + \langle \Psi' | \hat{H} - \hat{H}' | \Psi' \rangle \quad (4.2.16)$$

E como os dois operadores hamiltonianos diferem apenas no potencial externo:

$$E < E' + \langle \Psi' | \hat{T} + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{ext} - \hat{T} - \hat{V}_{ee} - \hat{V}'_{ext} | \Psi' \rangle, \quad (4.2.17)$$

que resulta em

$$E < E' + \int \rho(\vec{r}) \{ \hat{V}_{ext} - \hat{V}'_{ext} \} d\vec{r} \quad (4.2.18)$$

Seguindo o mesmo processo para $E' < \langle \Psi' | \hat{H}' | \Psi' \rangle$, obtém-se:

$$E' < E - \int \rho(\vec{r}) \{ \hat{V}_{ext} - \hat{V}'_{ext} \} d\vec{r} \quad (4.2.19)$$

Somando estas duas expressões:

$$E + E' < E' + E \quad (4.2.20)$$

Isso seria o mesmo que dizer que $0 < 0$, o que é contraditório, provando que não podem existir dois potenciais distintos que forneçam a mesma densidade no estado fundamental. Assim, ρ representa a propriedade que contem as informações sobre o número de elétrons do sistema (N), o número atômico (Z_A) e o raio atômico (R_A) e pode ser representado como:

$$\rho_0 \Rightarrow \{N, Z_A, R_A\} \Rightarrow H \Rightarrow \Psi_0 \Rightarrow E_0 \text{ (e outras propriedades)} \quad (4.2.21)$$

Como a energia do estado fundamental é um funcional da densidade eletrônica, então

$$E_0[\rho_0] = T[\rho_0] + E_{ee}[\rho_0] + E_{Ne}[\rho_0] \quad (4.2.22)$$

onde ‘Ne’ especifica o tipo de potencial externo presente, que, neste caso, é definido pela atração devido ao núcleo.

4.2.2.2.1.2 Teorema 2

A densidade do estado fundamental é, em princípio, suficiente para obter todas as propriedades de interesse. Entretanto, como é possível ter certeza de que uma certa densidade é realmente a densidade do estado fundamental que se está procurando? A resolução formal para este problema foi abordada no segundo teorema provado por Hohenberg e Kohn. Em palavras simples, este teorema afirma que o funcional que proporciona a energia do estado fundamental do sistema, proporciona a energia mais baixa, o mínimo global, se e somente se a densidade do *input* for a densidade real do estado fundamental, ρ_0 . Isso nada mais é do que o princípio variacional, expresso como:

$$E \leq E[\tilde{\rho}] = T[\tilde{\rho}] + E_{Ne}[\tilde{\rho}] + E_{ee}[\tilde{\rho}] \quad (4.2.23)$$

Em outras palavras, isso significa que, para qualquer densidade tentativa $\tilde{\rho}(\vec{r})$ que satisfaça as condições de contorno $[\tilde{\rho}] \geq 0$, $\int \tilde{\rho}(\vec{r}) d\vec{r} = N$ e que seja associado com um potencial externo \tilde{V}_{ext} , a energia obtida para o funcional dada na equação 4.2.22 representa um limite superior para a energia do estado fundamental verdadeira, E_0 .

Separando a expressão da equação 4.2.22 em partes: aquela que é dependente do sistema atual, ou seja, a energia devido à atração elétron-núcleo; e aquela que é universal no sentido que sua forma é independente de N, R_A e Z_A .

$$E_0[\rho_0] = \underbrace{\int \rho_0(\vec{r}) V_{Ne} d\vec{r}}_{\text{sistema dependente}} + \underbrace{T[\rho_0] + E_{ee}[\rho_0]}_{\text{universalmente válido}} \quad (4.2.24)$$

Chamando a parte independente de funcional de Hohenberg-Kohn $F_{HK}[\rho_0]$:

$$E_0[\rho_0] = \int \rho_0(\vec{r}) V_{Ne} d\vec{r} + F_{HK}[\rho_0], \quad (4.2.25)$$

em que o funcional de Hohenberg-Kohn devido a densidade arbitrária $\rho(\vec{r})$ produz o valor esperado $\langle \Psi | \hat{T} + \hat{V}_{ee} | \Psi \rangle$

$$F_{HK}[\rho] = T[\rho] + E_{ee}[\rho] = \langle \Psi | \hat{T} + \hat{V}_{ee} | \Psi \rangle \quad (4.2.26)$$

Portanto, para o estado fundamental, a energia é dada por:

$$E[\rho_0] = F_{HK}[\rho_0] + \langle \Psi_0 | \hat{V}_{ext} | \Psi_0 \rangle \quad (4.2.27)$$

Aplicando o teorema variacional, tendo E como funcional de Ψ ,

$$E[\Psi_0] < E[\Psi]$$

$$\begin{aligned}
\langle \Psi_0 | \hat{T} + \hat{V}_{ee} | \Psi_0 \rangle + \langle \Psi_0 | \hat{V}_{ext} | \Psi_0 \rangle &< \langle \Psi | \hat{T} + \hat{V}_{ee} | \Psi \rangle + \langle \Psi | \hat{V}_{ext} | \Psi \rangle \\
F_{HK}[\rho_0] + \langle \Psi_0 | \hat{V}_{ext} | \Psi_0 \rangle &< F_{HK}[\rho] + \langle \Psi | \hat{V}_{ext} | \Psi \rangle \\
E[\rho_0] &< E[\rho]
\end{aligned} \tag{4.2.28}$$

Dessa forma, tendo um funcional $F_{HK}[\rho]$ conhecido, pode-se minimizar a energia total do sistema em relação à densidade $\rho(\vec{r})$ e encontrar a energia e a densidade do estado fundamental.

Em suma, os teoremas de Hohenberg-Kohn determinam as propriedades do sistema desde que se conheça a densidade do estado fundamental.

Os teoremas de Hohenberg-Kohn são a base da teoria moderna do funcional de densidade. Entretanto estes teoremas apenas são provas da sua existência. Eles não fornecem qualquer direção de como o funcional que proporciona a energia do estado fundamental deve ser construído. Primeiro, em qualquer aplicação real da teoria do funcional da densidade se é forçado a usar uma aproximação para o funcional $F[\rho]$, uma vez que o verdadeiro funcional não é conhecido. O princípio variacional como provado anteriormente se aplica apenas ao funcional exato. Muitas teorias baseadas em funções de onda convencionais, como Hartree-Fock, por exemplo, são estritamente variacionais e o valor esperado $E = \langle \tilde{\Psi} | \hat{H} | \tilde{\Psi} \rangle$ é um indicador da qualidade da função de onda tentativa: a melhor aproximação é de $\tilde{\Psi}$ a Ψ_0 , que apresenta o menor valor de E. Entretanto, no mundo da densidade funcional, o valor que o funcional tentativa retorna não tem nenhum significado nesse sentido. Segundo, pode acontecer que a energia obtida da aproximação da teoria do funcional da densidade seja menor que a energia exata.

A razão para estes primeiros resultados inesperados é que, na teoria do funcional da densidade, como se utiliza uma aproximação para o funcional universal, é usada uma aproximação ao invés do hamiltoniano exato, enquanto não se atenta à função de onda. Ao trocar H por algo que é apenas uma aproximação a ele, o problema a ser resolvido torna-se outro.

4.2.2.2.2 As equações de Kohn-Sham

Para encontrar a densidade do estado fundamental, Kohn-Sham utilizaram um sistema não-interagente. Kohn e Sham introduziram o conceito de um sistema de referência

não interagente construído a partir de um conjunto de orbitais (ou seja, uma função de elétrons) de tal modo que a maior parte da energia cinética possa ser computada com uma boa precisão. O restante é mesclado com as contribuições não-clássicas da repulsão elétron-elétron, que também são desconhecidas, mas geralmente não são fortemente correlacionadas. Por este método, tanta informação quanto possível é calculada exatamente, deixando apenas uma pequena parte da energia total para ser determinada por um funcional aproximado.

A ideia central de Kohn-Sham foi perceber que não se é capaz de determinar a energia cinética por um funcional explícito, deve-se ser um pouco menos ambicioso e concentrar-se em como a computação pode obter a energia cinética exatamente. Assim, eles sugeriram uma abordagem para obter a energia cinética exata do sistema de referência não-interagente com a mesma densidade do real, que é interagente.

A ideia de Kohn-Sham foi construir a densidade eletrônica a partir de funções φ_i

$$\rho(\vec{r}) = \sum_{i=1}^N |\varphi_i(\vec{r})|^2 \quad (4.2.29)$$

e considerar um sistema de referência não-interagente, que no estado fundamental teria a função de onda representada pelo determinante de Slater na equação:

$$\varphi_S = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \varphi_1(r_1) & \varphi_2(r_1) & \dots & \varphi_N(r_1) \\ \varphi_1(r_2) & \varphi_2(r_2) & \dots & \varphi_N(r_2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \varphi_1(r_N) & \varphi_2(r_N) & \dots & \varphi_N(r_N) \end{vmatrix} \quad (4.2.30)$$

obtendo com isso a energia cinética do sistema, conforme a equação 4.2.32.

$$T_S[\rho(\vec{r})] = - \int \sum_i^N \varphi_i^*(\vec{r}) \frac{\nabla^2}{2} \varphi_i(\vec{r}) d\vec{r} \quad (4.2.31)$$

$$T_S = -\frac{1}{2} \sum_i^N \langle \varphi_i | \nabla^2 | \varphi_i \rangle \quad (4.2.32)$$

Utilizando um sistema de referência não-interagente, pode-se mapear o problema de muitos corpos em N problemas de um corpo sujeito a um potencial efetivo, V_S , que produza a mesma densidade do estado fundamental de um problema de um sistema com partículas interagentes; e, assim, procurar um potencial externo V_S cuja a densidade do estado fundamental seja a mesma que no sistema real.

O potencial efetivo depende da densidade eletrônica. Por isso, nos cálculos, utiliza-se uma densidade inicial tentativa. Deste modo, obtém-se uma nova função tentativa, que fornece um novo V_S . O processo se repete até alcançar a auto-consistência, ou seja, até que o valor da densidade antes e depois de uma interação coincidam dentro de uma precisão pré-estabelecida.

Considerando um sistema de N elétrons não-interagentes em um potencial efetivo V_S , o hamiltoniano pode ser escrito como:

$$\hat{H}_S = \hat{T}_S + \hat{V}_S \quad (4.2.33)$$

Aplicando os teoremas de HK, o funcional de energia é

$$E_S[\rho] = T_S[\rho] + \int d\vec{r} v_S(\vec{r})\rho_S(\vec{r}) \quad (4.2.34)$$

A densidade eletrônica do sistema em termos dos orbitais φ_i é dada por

$$\rho(\vec{r}) = \sum_{i=1}^N |\varphi_i(\vec{r})|^2 \quad (4.2.35)$$

E cada orbital φ_i satisfaz a equação de Schroedinger

$$\left[\frac{-\hbar^2}{2m} \nabla^2 + \hat{V}_S \right] \varphi_i(\vec{r}) = \varepsilon_i \varphi_i(\vec{r}), \quad \varepsilon_1 \leq \varepsilon_2 \leq \dots \leq \varepsilon_N \quad (4.2.36)$$

Embora Ψ_i sejam autofunções de elétrons não interagentes individuais, o sistema de interesse é o sistema de partículas interagentes sujeitas a um potencial V_{ext} . Para fazer o mapeamento do potencial efetivo de um sistema não-interagente, com o qual se obtém a mesma densidade eletrônica do estado fundamental de um sistema de partículas interagentes sujeitas a um potencial externo V_{ext} , soma-se e subtrai-se o funcional da energia cinética do sistema não interagente e o potencial de Hartree (coulombiana clássica).

$$E = T_{el} + V_{ee} + V_{ext} + T_S - T_S + U_H - U_H \quad (4.2.37)$$

e

$$U_H = \frac{e^2}{2} \iint \frac{\rho(\vec{r})\rho(\vec{r}')}{|\vec{r}-\vec{r}'|} d\vec{r} d\vec{r}' \quad (4.2.38)$$

$$V_H = \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\vec{r})\rho(\vec{r}')}{|\vec{r}-\vec{r}'|} d\vec{r} d\vec{r}' \quad (4.2.39)$$

Rearranjando a equação 4.2.37, obtém-se naturalmente a energia de correlação e troca,

$$E = T_S + V_{ext} + U_H + \underbrace{\overbrace{[T_{el} + V_{ee} - T_S - U_H]}^{F_{HK}}}_{E_{XC}} \quad (4.2.40)$$

Ou seja,

$$E_{XC}[\rho] \equiv F_{HK}[\rho] - T_S[\rho] - U_H[\rho] \quad (4.2.41)$$

onde E_{XC} é o funcional F_{HK} , universal, menos a energia cinética de um gás de elétrons livres e o potencial de Hartree.

Em outras palavras, a energia de correlação e troca E_{XC} é o funcional que contém tudo o que é desconhecido, uma espécie de “ferro-velho”, onde fica guardado tudo aquilo que

não se sabe como lidar exatamente. É importante destacar também que apesar de seu nome, E_{XC} contém não só os efeitos não-clássicos de correção de auto-interação, troca e correlação, que são contribuições para a energia potencial do sistema, mas também uma porção pertencente à energia cinética. A expressão de energia do sistema não-interagente contém apenas duas componentes: a energia cinética e a energia devido à interação com o potencial externo. Pelo teorema de Hohenberg-Kohn, a energia total deve ser um funcional da densidade. Do mesmo modo, a interação com o potencial externo é um funcional explícito de ρ . Assim, T_S também é necessariamente um funcional da densidade de carga. Como não há uma simples expressão de T_S , onde a densidade entre explicitamente - os orbitais de Kohn-Sham, e não a densidade ρ , aparecem na equação 4.2.32.

Precisa-se encontrar uma prescrição de como se podem determinar exclusivamente os orbitais em nosso sistema de referência não-interagente. Em outras palavras, como se pode definir V_S tal que realmente nos forneça um determinante de Slater, que é caracterizado exatamente pela mesma densidade que a do sistema real? Para resolver este problema, a expressão para a energia de nossa interação do sistema real, é obtida destacando a dependência nos orbitais, como indicado na equação 4.2.32.

$$\begin{aligned}
E[\rho(\vec{r})] &= T_S[\rho] + J[\rho] + E_{XC}[\rho] + E_{Ne}[\rho] \\
&= T_S[\rho] + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\vec{r}_1)\rho(\vec{r}_2)}{r_{12}} d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 + E_{XC}[\rho] + \int V_{Ne}\rho(\vec{r})d\vec{r} \\
&= -\frac{1}{2}\sum_i^N \langle \varphi_i | \nabla^2 | \varphi_i \rangle + \frac{1}{2}\sum_i^N \sum_j^N \iint |\varphi_i(\vec{r}_1)|^2 \frac{1}{r_{12}} |\varphi_j(\vec{r}_2)|^2 d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 + E_{XC}[\rho(\vec{r})] - \sum_i^N \int \sum_A^M \frac{Z_A}{r_{1A}} |\varphi_i(\vec{r}_1)|^2 d\vec{r}_1
\end{aligned} \tag{4.2.42}$$

O único termo que não está na forma explícita, E_{XC} , pode ser dado. Agora, aplicando o princípio variacional e perguntando quais condições os orbitais $\{\varphi_i\}$ devem ter a fim de minimizar essa expressão de energia abaixo do valor usual de $\langle \varphi_i | \varphi_j \rangle = \delta_{ij}$, os resultados das equações são:

$$\begin{aligned}
&\left(-\frac{1}{2}\nabla^2 + \left[\int \frac{\rho(\vec{r}_2)}{r_{12}} d\vec{r}_2 + V_{XC}(\vec{r}_1) - \sum_A^M \frac{Z_A}{r_{1A}} \right] \right) \varphi_i \\
&= \left(-\frac{1}{2}\nabla^2 + V_{eff}(\vec{r}_1) \right) \varphi_i = \varepsilon_i \varphi_i
\end{aligned} \tag{4.2.43}$$

Ao comparar esta equação com as equações de uma única partícula de um sistema de referência não-interagente, observa-se que V_{eff} é idêntico a V_S .

$$V_S(\vec{r}) \equiv V_{eff}(\vec{r}) = \int \frac{\rho(\vec{r}_2)}{r_{12}} d\vec{r}_2 + V_{XC}(\vec{r}_1) - \sum_A^M \frac{Z_A}{r_{1A}} \tag{4.2.44}$$

$$V_S(\vec{r}) = V_{ext}(\vec{r}) + e^2 \int d\vec{r}' \frac{\rho(\vec{r}')}{|\vec{r}-\vec{r}'|} + V_{XC}(\vec{r}) \quad (4.2.45)$$

Portanto, com as várias contribuições desta equação é possível obter V_S , que inserido nas equações de uma única partícula, conseqüentemente, determina os orbitais e, assim, a densidade do estado fundamental e a energia do estado fundamental ao empregar a expressão 4.2.42. Pode-se notar que V_{eff} já depende da densidade e, portanto, dos orbitais, através do termo de Coulomb da equação 4.2.42. Portanto, assim como as equações de Hartree-Fock, as equações de Kohn-Sham de um elétron (equação 4.2.43) também têm de ser resolvidas repetidamente (iterativamente).

Não se sabe como escrever E_{XC} de forma exata. Assim, todas as aproximações são feitas para esse termo. Nos teoremas de HK foi visto que a densidade eletrônica ρ que minimiza o funcional $E[\rho]$ é a densidade do estado fundamental ρ_0 . A condição de mínimo para o funcional de energia ($\delta E[\rho(\vec{r})] = 0$) é tal que há um vínculo para que o número de elétrons do sistema seja dado corretamente (condição restrita)

$$\int d\vec{r} \rho(\vec{r}) - N = 0 \quad (4.2.46)$$

Utilizando um multiplicador de Lagrange μ , que neste caso é o potencial químico, inclui-se o vínculo na equação e o funcional a ser minimizado será

$$E[\rho(\vec{r})] - \mu \left[\int d\vec{r} \rho(\vec{r}) - N \right] \quad (4.2.47)$$

Derivando e igualando a zero,

$$\delta \left\{ E[\rho(\vec{r})] - \mu \left[\int d\vec{r} \rho(\vec{r}) - N \right] \right\} = 0$$

$$\delta \{ E[\rho(\vec{r})] - \mu \left[\int d\vec{r} \rho(\vec{r}) \right] \} = 0 \quad (4.2.48)$$

E fazendo a derivada funcional em relação à densidade eletrônica

$$\frac{\delta E[\rho]}{\delta \rho(\vec{r})} - \mu = \frac{\delta T_S}{\delta \rho(\vec{r})} + e^2 \int d\vec{r}' \frac{\rho(\vec{r}')}{|\vec{r}-\vec{r}'|} V_{ext} + V_{XC}[\rho(\vec{r})] = 0 \quad (4.2.49)$$

Assim,

$$\mu = \frac{\delta E[\rho]}{\delta \rho(\vec{r})} = \frac{\delta T_S}{\delta \rho(\vec{r})} + V_S[\rho(\vec{r})] \quad (4.2.50)$$

Onde $V_{XC}[\rho(\vec{r})]$ é o potencial de correlação e troca

$$V_{XC}[\rho(\vec{r})] \equiv \frac{\delta E_{XC}[\rho]}{\delta \rho(\vec{r})} \quad (4.2.51)$$

As equações 4.2.36 e 4.2.45 são conhecidas como equações de Kohn Sham. Implementando a auto-consistência para estas equações, tem-se que:

1. Escolher uma densidade tentativa inicial e a substituí-la na equação 4.2.45.
2. Ao resolver a equação de Schroedinger para N partículas independentes, obtêm-se os φ_i e, conforme 4.2.35, a próxima densidade, $\rho(\vec{r})$, é encontrada.
3. O processo se repete até atingir um critério pré-estabelecido.

É importante perceber que se as formas exatas de E_{XC} e V_{XC} fossem conhecidas (o que, infelizmente, não é o caso), a estratégia de Kohn-Sham levaria à energia exata, ou seja, ao autovalor correto do operador hamiltoniano \hat{H} da equação de Schrödinger. A abordagem de Kohn-Sham é, em princípio exata. A aproximação só entra quando se tem que decidir sobre uma forma explícita do funcional desconhecido para a energia de correlação e troca E_{XC} e o potencial correspondente V_{XC} . O objetivo central da teoria do funcional da densidade moderna é, portanto, encontrar aproximações cada vez melhores para estas duas grandezas.

4.2.2.2.3 Os funcionais de correlação e troca

Lembrando que E_{XC} e V_{XC} não são conhecidas, precisa-se, “*a priori*”, escolher uma aproximação ao funcional de correlação e troca a fim de resolver as equações de Kohn-Sham. Entre as aproximações utilizadas, estão: a Aproximação da Densidade local (LDA - *Local Density Approximation*) e a Aproximação Generalizada em termos de Gradientes (GGA - *Generalized Gradient Approximation*).

A LDA foi a primeira proposta para o termo de correlação e troca. Nesta aproximação, a energia de correlação e troca E_{XC} de um sistema eletrônico é igual a energia de troca e correlação de um gás de elétrons homogêneo com densidade eletrônica $\rho(\vec{r})$ igual no ponto \vec{r} e $\rho(\vec{r})$ varia suavemente nas proximidades de \vec{r} . Deste modo, pode-se escrever:

$$E_{XC}^{LDA}[\rho] = \int \rho(\vec{r}) \varepsilon_{XC}^{LDA} d\vec{r} \quad (4.2.52)$$

sendo ε_{XC}^{LDA} a energia de correlação e troca por elétron de um gás de elétrons homogêneo de densidade ρ . A LDA é uma boa aproximação para sistemas que apresentam características de um gás de elétrons livres, como os metais. Entretanto, se a densidade for fortemente não-uniforme, como no caso de compostos orgânicos, a aproximação LDA não apresenta bons resultados. Neste caso, a fim de corrigir a LDA para sistemas não-homogêneos, existe uma aproximação que leva em consideração também o gradiente da densidade eletrônica, denominada GGA, a qual possui a expressão:

$$E_{XC}^{GGA}[\rho] = \int f(\rho(\vec{r}), \nabla\rho(\vec{r})) d\vec{r} \quad (4.2.53)$$

Dentro da aproximação GGA foram propostos diversos funcionais, cujos mais utilizados tem por base os trabalhos de Perdew-Burke-Erzenhof (PBE), de Lee-Yang-Parr-Becke (BLYP), entre outros. Neste trabalho foi utilizado o funcional BLYP, ampliado com correções de dispersão para a descrição adequada das forças de van der Waals [133,134].

4.2.3 Simulações computacionais e o programa CPMD

Ao realizar as simulações no programa CPMD [135], são colocados no *input* a geometria inicial e a especificação da simetria da molécula, bem como a especificação do tipo de cálculo e o conjunto de base. Pela resolução de $H\Psi=E\Psi$, o programa procura o mínimo global utilizando o método DFT. Com isso, obtém-se a superfície de energia potencial, PES (do inglês *Potential Energy Surface*), que é $\left(\frac{dE}{dq}\right)_i = \frac{d^2E}{dq^2}(q - q_0)$. O primeiro termo $\left(\frac{dE}{dq}\right)_i$ se refere ao gradiente da PES, que é a matriz da primeira derivada das energias, enquanto $\frac{d^2E}{dq^2}$ se refere a curvatura, cujo valor varia conforme as minimizações até chegar ao mínimo global. Logo, uma molécula com 3 átomos, por exemplo, terá, em tese, 9 graus de liberdade (x,y,z para cada átomo), portanto:

$$grad_i = \begin{matrix} \partial E/\partial q_1 \\ \partial E/\partial q_2 \\ \partial E/\partial q_3 \\ \vdots \\ \partial E/\partial q_i \end{matrix} \quad \text{e a matriz da segunda derivada ou matriz hessiana será:}$$

$$Matriz\ Hessiana = \begin{matrix} \frac{\partial^2 E}{\partial q_1 \partial q_1} & \frac{\partial^2 E}{\partial q_1 \partial q_2} & \cdots & \frac{\partial^2 E}{\partial q_1 \partial q_9} \\ \frac{\partial^2 E}{\partial q_2 \partial q_1} & \frac{\partial^2 E}{\partial q_2 \partial q_2} & \cdots & \frac{\partial^2 E}{\partial q_2 \partial q_9} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \frac{\partial^2 E}{\partial q_9 \partial q_1} & \frac{\partial^2 E}{\partial q_9 \partial q_2} & \cdots & \frac{\partial^2 E}{\partial q_9 \partial q_9} \end{matrix}$$

A matriz da segunda derivada da PES é a hessiana, cuja diagonalização resulta nos autovetores e autovalores. Esta matriz é uma pequena oscilação harmônica das forças, assim, obtemos as frequências vibracionais do sistema. A matriz diagonal das massas atômicas da PES com a matriz diagonal com os $3n$ possíveis valores das frequências e os

autovalores fornecem os modos vibracionais; já os autovetores, em conjunto com o tensor atômico polar fornecem as informações necessárias para a regra de seleção de IR.

Um esquema com este processo pode ser observado na Figura 7.

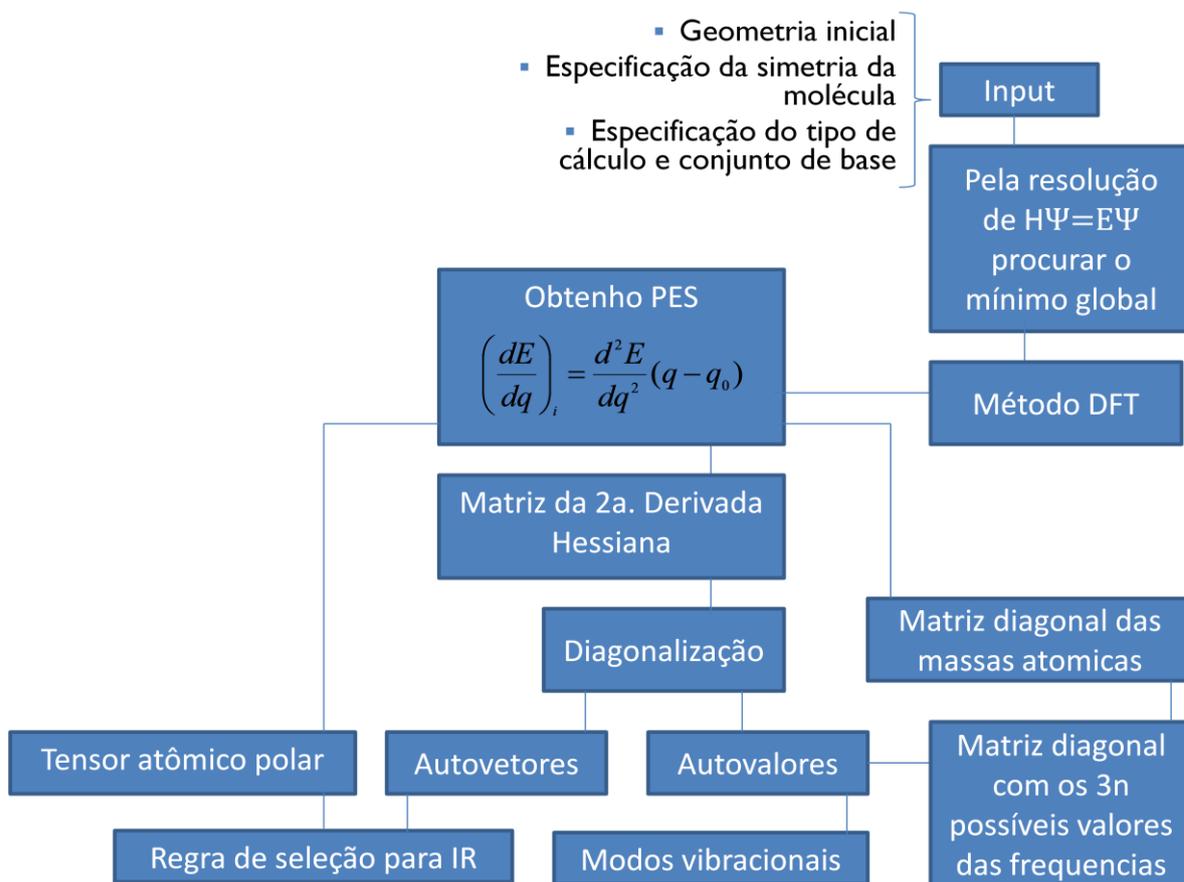


Figura 7 – Esquema de cálculo do CPMD.

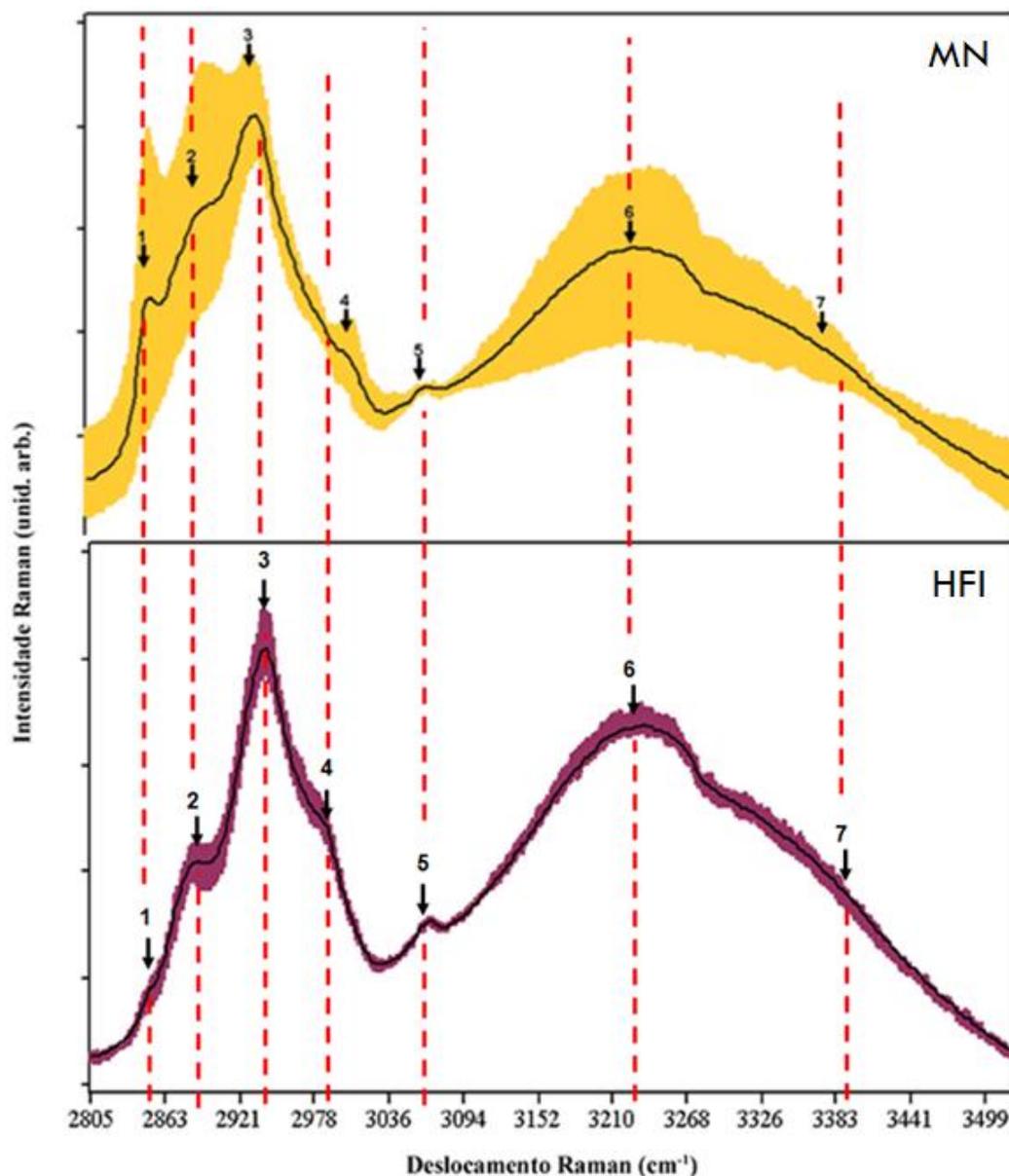
5 METODOLOGIA

5.1 ESPECTROSCOPIA RAMAN

Em trabalho anterior [136] foram estudadas amostras de hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI) e mucosa oral normal (MN). Neste estudo, verificou-se que os espectros Raman da região de alto número de onda podem ser usados para discriminar o tecido com HFI, do tecido de MN. Foi observado que as regiões espectrais de $2800 - 3050 \text{ cm}^{-1}$ referem-se a vibrações de CH_2 , CH_3 , lipídios e proteínas; e, de $3050 - 3600 \text{ cm}^{-1}$, referem-se a CH , OH , NH , proteínas e água. Pelas análises dos modos vibracionais comparados aos resultados apresentados na literatura [137,107], foi observado que as principais alterações destes processos inflamatórios foram relacionadas ao colágeno e a água confinada na região de alto número de onda.

Para isso, foram utilizadas amostras de tecidos provenientes de mucosa bucal normal (MN – 6 pacientes) e com hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI – 6 pacientes), obtidas a partir de biopsias realizadas no Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal - UNESP / BRASIL. Elas foram identificadas e imediatamente congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido (77K) em frascos criogênicos antes da gravação técnica dos espectros FT-Raman. Os espectros Raman foram medidos em 5 pontos diferentes (A1-A5), resultando em 30 espectros de HFI e 30 espectros de MN. Logo após o procedimento, todas as amostras foram fixadas em formol a 10% para análise histopatológica posterior. Foi usado um espectrômetro Bruker RFS 100/S FT-Raman, da Universidade Vale do Paraíba, tendo como fonte de luz um laser Nd:YAG, em 1.064 nm. A potência do laser na amostra foi mantida a 230 mW e a resolução do espectrômetro foi de 4 cm^{-1} . Cada espectro foi gravado com 300 varreduras. Para a coleta de dados FT-Raman, todas as amostras foram levadas à temperatura ambiente e mantidas umedecidas em solução fisiológica 0,9%, para preservar as suas características estruturais e um suporte de alumínio foi colocado nas janelas para a coleta de espectros Raman. As substâncias químicas presentes na solução fisiológica (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- e água) não têm sinais mensuráveis em Raman, logo sua presença não afeta o sinal espectral dos tecidos. No caso da referência [6], a região de alto número de onda foi deconvoluída em 7 picos, conforme o Gráfico 1. Estes resultados foram utilizados para comparação com os resultados computacionais.

Gráfico 1 – Resultados experimentais de espectroscopia Raman. Cada espectro foi deconvoluído em 7 picos, indicados nos gráficos.



No Gráfico 1, foram construídos Box-plots [138] de MN e HFI. As linhas pretas correspondem à mediana do espectro e as regiões coloridas são aquelas entre o primeiro e terceiro quartil. Essa diferença entre os gráficos, o desvio entre o primeiro e o terceiro quartil, refere-se à degeneração hidrópica. Esta é o resultado da dispersão nos diferentes níveis de hidratação. Assim, o tecido normal apresenta regiões mais hidratadas e menos hidratadas, o que explica a maior variação nos espectros experimentais. Já em HFI, há excesso de água, portanto maior quantidade de clusters de água e elementos hidratados no seu global, logo, seu espectro fornece um padrão único, específico de modelo descritivo.

Com base nesses gráficos, também foram realizados os testes estatísticos t-Student e o teste ANOVA [138] no Microsoft Excel (Tabela 3), assumindo variâncias iguais entre as amostras NM e HFI, ao nível de 0,05, observou-se que os picos 2 e 6 não apresentaram diferença estatística significativa entre MN e HFI. Já para os picos 1, 3, 4, 5 e 7, as amostras de MN e HFI são diferentes ao nível de 0,05 e, portanto, representam picos característicos de diagnóstico.

Tabela 3 – Resultados dos testes estatísticos.

<i>Testes/Picos</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>
t-student P(T<=t)	<0.05	0.055	<0.05	<0.05	<0.05	0.372	<0.05
ANOVA p-value	<0.05	0.109	<0.05	<0.05	<0.05	0.744	<0.05

5.2 SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS

5.2.1 Os modelos utilizados

Tendo em vista a criação de um modelo hidratado, tanto internamente quanto externamente, foram selecionados os clusters de água a serem utilizados: (H₂O), (H₂O)₂, (H₂O)₃, (H₂O)₄, (H₂O)₅-cyclic, (H₂O)₆-cage, (H₂O)₇-low, (H₂O)₈-S₄, usando o modelo TIP4P [139], proveniente do Cambridge Cluster Database [140] (Figura 8). Estes foram otimizados quanto à função de onda (*single point calculation*) para posterior análise vibracional, com respostas em Raman, utilizando o hessiano (*vibrational analysis IN Gauss*). Os modelos foram implementados no programa CPMD [135] usando a Teoria do Funcional de Densidade (DFT) [112,113] e o funcional BLYP [141], ampliado com correções de dispersão para a descrição adequada das interações de van der Waals [133,134], com os parâmetros presentes na estrutura original [139].

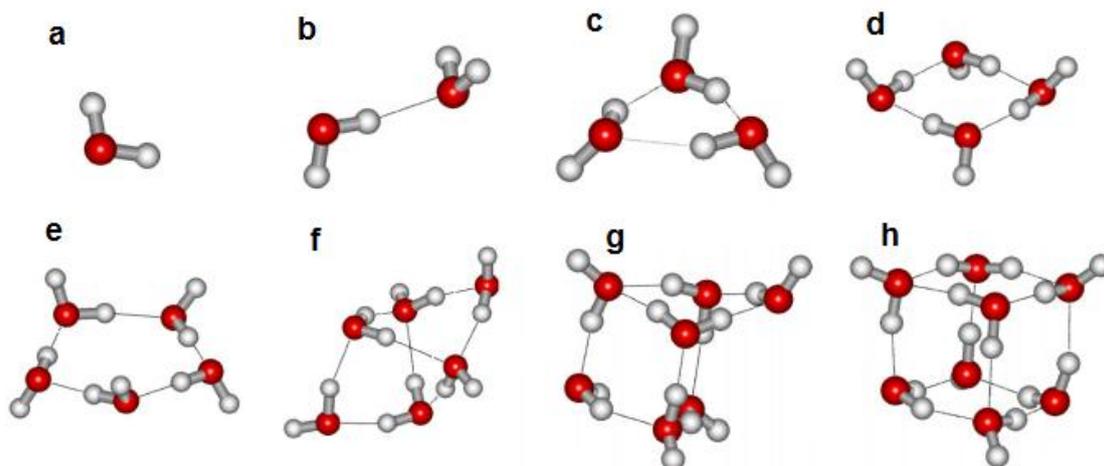


Figura 8 - Clusters de água utilizados na simulação: (a) (H_2O) , (b) $(\text{H}_2\text{O})_2$, (c) $(\text{H}_2\text{O})_3$, (d) $(\text{H}_2\text{O})_4$, (e) $(\text{H}_2\text{O})_5$ -cíclico, (f) $(\text{H}_2\text{O})_6$ -gaiola, (g) $(\text{H}_2\text{O})_7$ -baixo, (h) $(\text{H}_2\text{O})_8$ -S₄. Com preenchimento vermelho, o átomo de oxigênio e, em branco, o átomo de hidrogênio. Tais estruturas foram confinadas em colágeno. Adaptado de [107].

Para a construção de um modelo de colágeno para estudos de espectroscopia, partiu-se de um peptídeo hidratado de colágeno tipo I, obtido do Banco de Dados de Proteínas (*Protein Data Bank*), PDB ID: 1CGD [142] (Figura 9).

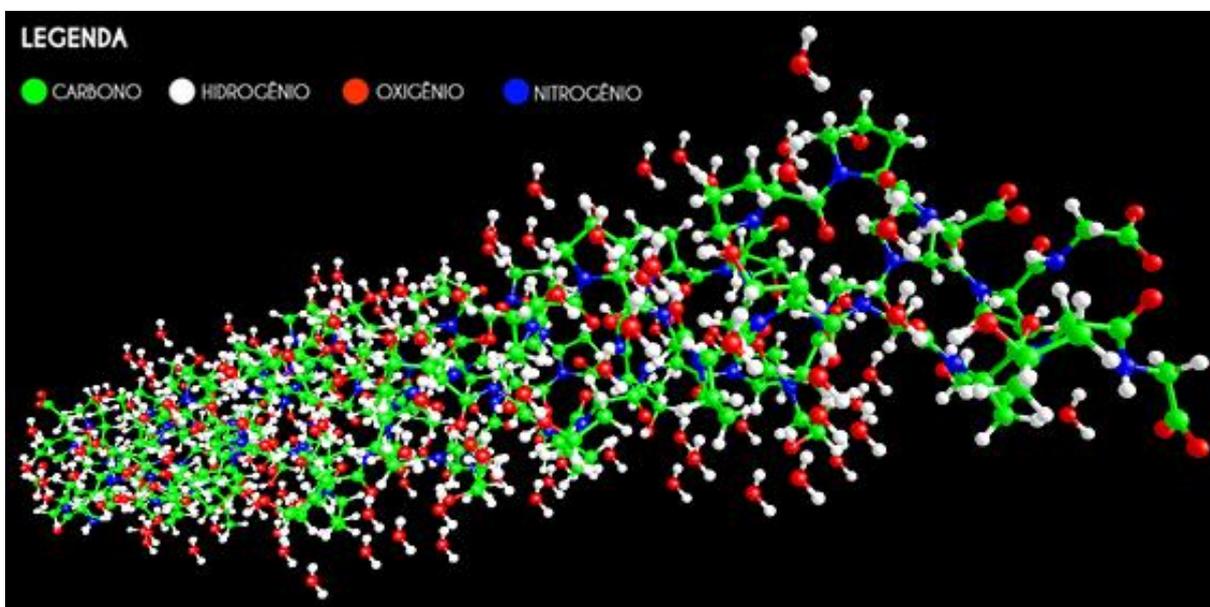


Figura 9 - Estrutura cristalográfica do colágeno hidratado (perspectiva), obtida do Banco de Dados de Proteínas (*Protein Data Bank*), PDB ID: 1CGD [142].

As moléculas de água da estrutura original foram removidas (Figura 10), porém, a estrutura do peptídeo de colágeno, com 1570 átomos, ainda apresentava-se extremamente

grande para a simulação. Por isso, foi feito um recorte na molécula de colágeno em um modelo minimalista, na região ilustrada na Figura 11, de modo a prosseguir apenas com uma pequena parte do colágeno.

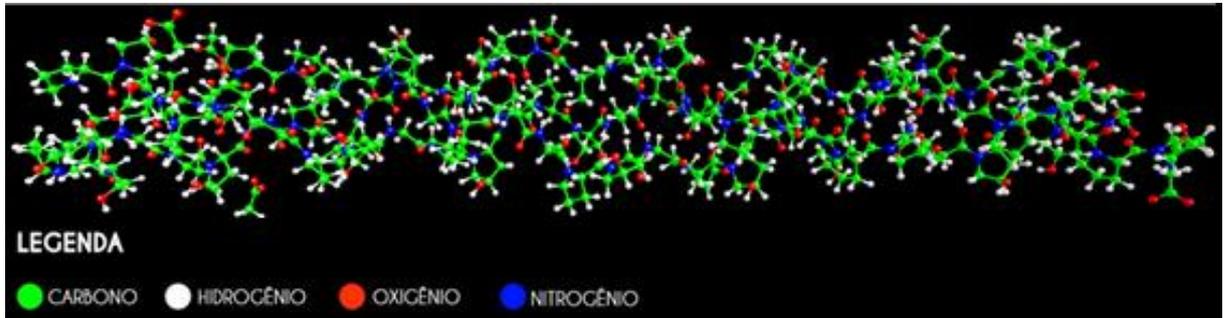


Figura 10 - Estrutura do colágeno sem hidratação (vista longitudinal).

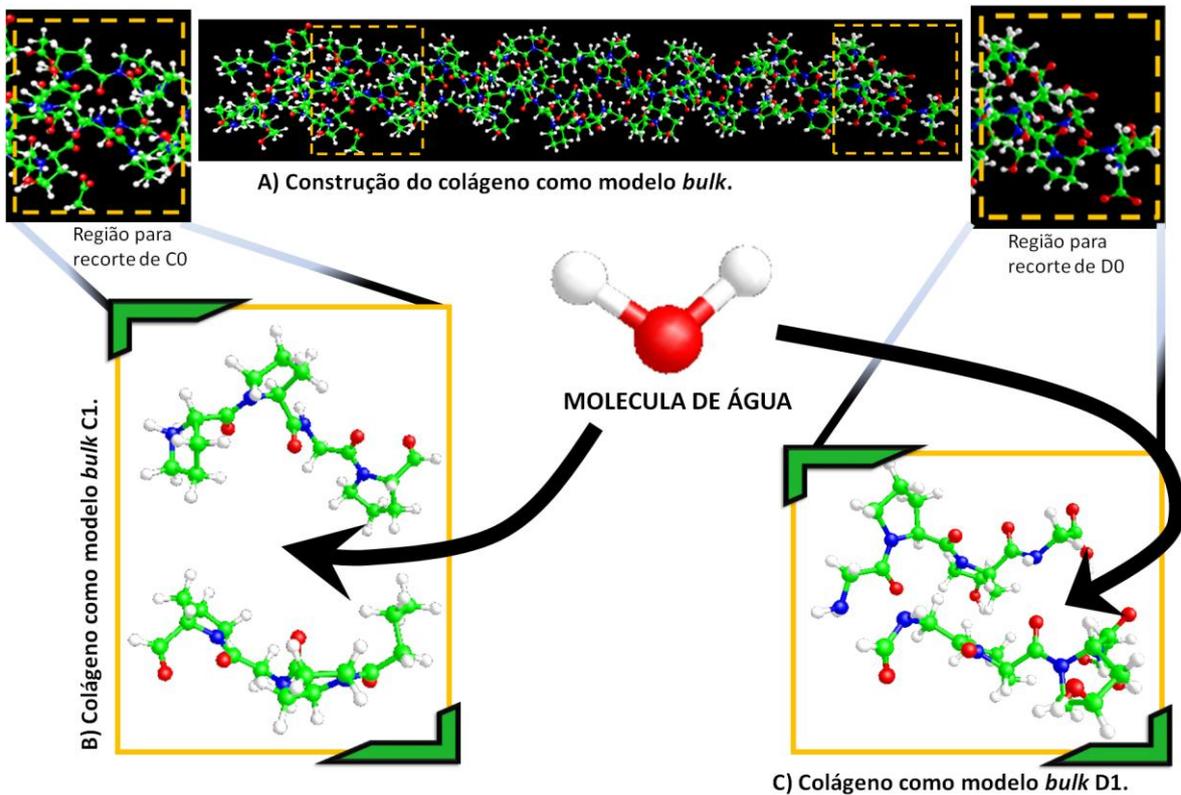


Figura 11 – Área de recorte do colágeno para utilização na simulação e os modelos C1 e D1.

Os critérios utilizados na escolha da sequência peptídica específica tem por base:

- i) a presença de moléculas de água confinada na estrutura original;
- ii) a presença de resíduos de aminoácidos do colágeno;
- iii) o maior conjunto de aminoácidos que permitam um tempo viável de cálculo.

Com base nestes critérios, uma estrutura com 100 átomos foi escolhida. Nesta estrutura, foram inseridas, confinadas próximas à região interior central, estruturas específicas de *clusters* de água, conforme mostrado na Figura 11, B e C. A célula unitária artificial resultante foi denominada CCMB, colágeno como um modelo *bulk*, e foi representada por uma gaiola de aminoácidos com ou sem um *cluster* de água ali inserido. Foram utilizados os clusters de água do modelo TIP4P [139], citados anteriormente. A estrutura sem água foi denominada C0; aquela com uma molécula de água, C1; e assim por diante. A distância entre a gaiola de aminoácidos e o cluster de água foi estimada pela distância entre a gaiola e o átomo vizinho mais próximo. Os dados estruturais para estas configurações são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Alguns parâmetros da estrutura da célula unitária do colágeno como um modelo bulk, com clusters de água específicos. Os parâmetros de rede foram $a = 13,5 \text{ \AA}$, $b = 11,5 \text{ \AA}$ e $c = 10,5 \text{ \AA}$, com simetria ortorrômbica.

<i>Modelo</i>	<i>Quantidade de moléculas de água</i>	<i>Estrutura da água</i>	<i>Átomo vizinho mais próximo da estrutura da água</i>	<i>Distancia até o átomo vizinho mais próximo(Å)</i>
C0	0	-	-	-
C1	1	(H ₂ O)	O	3,27
C2	2	(H ₂ O) ₂	H	2,63
C3	3	(H ₂ O) ₃	H	2,62
C4	4	(H ₂ O) ₄	H	1,76
C5	5	(H ₂ O) ₅ -cyclic	H	2,14
C6	6	(H ₂ O) ₆ -cage	H	1,51
C7	7	(H ₂ O) ₇ -low	H	1,95
C8	8	(H ₂ O) ₈ -S ₄	H	1,08

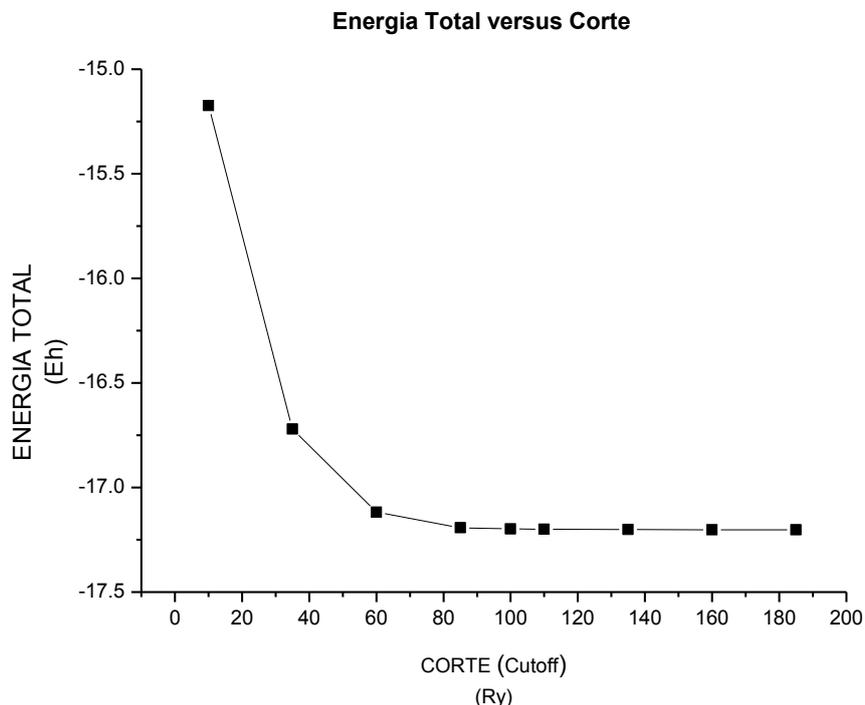
As estruturas foram otimizadas em uma primeira etapa usando a mecânica molecular com o campo de força MMFF94s [143] implementado no programa Avogadro [144]. O campo de força MMFF94s usa o termo de van der Waals e inclui termos cúbicos e quadráticos no estiramento da ligação e termos cúbicos na energia potencial do ângulo de ligação. É bem conhecido que o MMFF94 produz dinamicamente estruturas médias relativamente planas [145]. Assim, as estruturas planares dos modelos C_n são esperadas para ser bem reproduzidas por este campo de força. Além disso, a presença de *clusters* de água maiores faz com que as interações iônicas sejam mais relevantes, com a estrutura

correspondente sendo bem descrita por métodos clássicos como a empregada nos cálculos do modelo Cn.

A partir deste resultado, com base na geometria otimizada, foi definido o tamanho da célula unitária de modo a representar o *bulk*. Em seguida, a Teoria do Funcional de Densidade (DFT) [112,113] foi utilizada para obter as geometrias de equilíbrio e as frequências harmônicas para cada CCMB. Os confinamentos foram implementados no programa CPMD [135] usando o funcional BLYP [141], ampliado com correções de dispersão para a descrição adequada das interações de van der Waals [133,134]. O CPMD é um programa para cálculos de estrutura eletrônica *ab initio*, que utiliza ondas planas/ implementação de um pseudopotential de DFT. No caso específico dos modelos aqui construídos, o CPMD foi o programa que melhor se adequou às otimizações das moléculas e conservação das estruturas de ligação entre os átomos. Em outros programas testados, como o Gaussian, não foi possível estabilizar a molécula após as otimizações, visto que a estrutura dos modelos perdia a ligação entre os átomos. Nos cálculos de CPMD, primeiro, foram calculadas as estruturas eletrônicas (estado fundamental) do sistema como ponto de partida para os outros cálculos. Foram feitas as otimizações das funções de onda (*single point calculation*) para cada confinamento (C0 a C8), utilizando o hessiano (*vibrational analysis IN Gauss*) e, depois, foram feitas as análises vibracionais, com respostas em Raman. Por fim, foram calculadas as respostas lineares (*linear response*) dos sistemas para se obter os valores da polarização e dos tensores polares de cada átomo do sistema. Estes últimos dados foram utilizados para avaliar a vibração dos átomos com auxílio do programa Molekel [146], em cada deslocamento Raman equivalente ao experimental. Embora o conjunto (colágeno+água) não seja uma estrutura cristalina, ele foi aproximado para os parâmetros cristalográficos $a=13,5\text{\AA}$, $b=11,5\text{\AA}$ e $c=10,5\text{\AA}$, considerando simetria ortorrômbica (Tabela 4).

Em cálculos que utilizam ondas planas com funções de base, como os realizados pelo programa CPMD [135], além da simetria e dos parâmetros de cela, o sistema é caracterizado pela energia de corte (*cutoff*). Neste caso, a energia de corte é o valor mínimo de energia, de modo que valores maiores que ele são ignorados. Por isso, foram testados várias energias de corte para a simulação de uma única molécula de água isolada (Gráfico 2). Com base nestes resultados adotou-se 60Ry, como padrão para a energia de corte em todas as simulações.

Gráfico 2 – Relação entre energia total e corte para uma única molécula de água isolada.



Nota: O programa CPMD adota como padrão as unidades para corte do plano de onda, Ry ($1 \text{ Ry} = 1/2 \text{ Eh} = 13.60569193 \text{ eV}$) e para energia, Eh ($1 \text{ Eh} = 27.21138386 \text{ eV} = 627.5094706 \text{ kcal/mol} = 2625.4996251 \text{ kJ/mol}$).

Também foram colocadas algumas moléculas de água externas a região do recorte de C0, e criado um modelo de CCMB em solução, com a presença de água tanto externamente (10 moléculas de água) como internamente (1 molécula de água), denominado C1s. O modelo pode ser visto na Figura 12. Adotou-se o mesmo procedimento das moléculas anteriores com os parâmetros cristalográficos $a=15,0\text{Å}$, $b=12,5\text{Å}$ e $c=20,0\text{Å}$, considerando simetria ortorrômbica e energia de corte de 60 Ry.

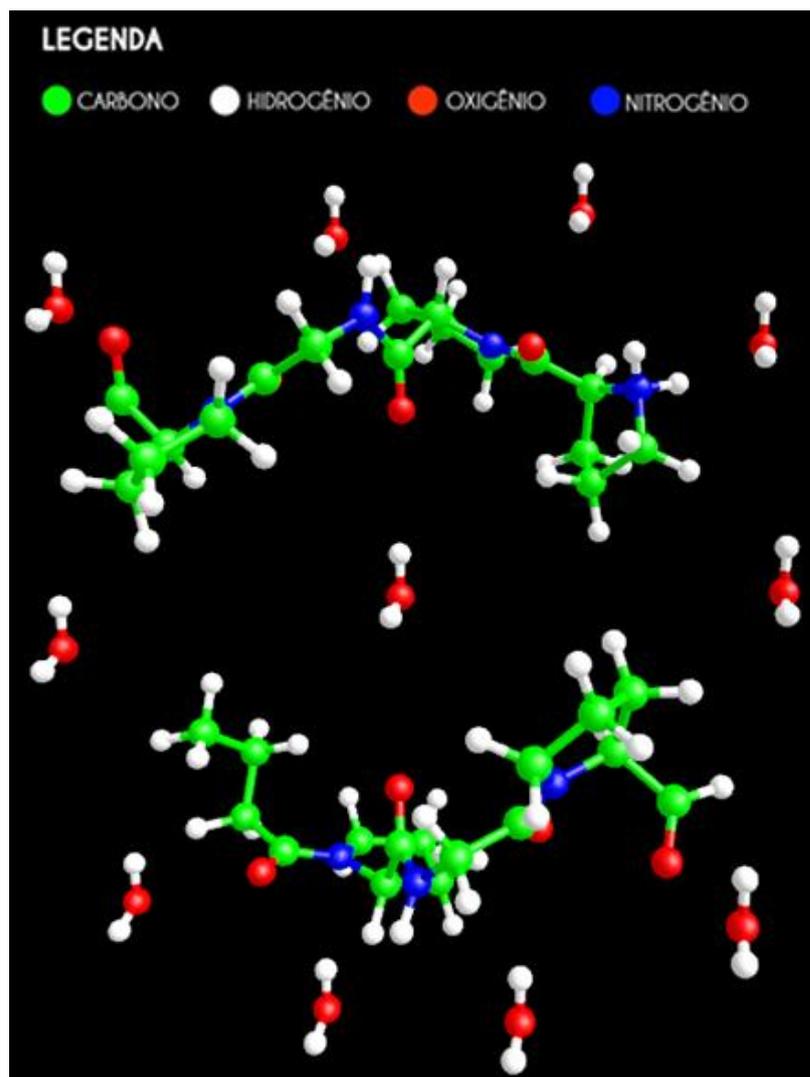


Figura 12 – Modelo C1s.

A fim de verificar os resultados, foi ainda criado outro recorte partindo-se do mesmo peptídeo de colágeno, conforme a Figura 13. Tal recorte foi denominado D0 e, tendo ele um espaço interno bem menor, apenas uma molécula de água foi inserida em sua estrutura, cujo modelo foi denominado D1. Neste caso, a otimização de geometria foi feita utilizando o método Hartree Fock e o programa Gaussian [147]. Ao contrário do modelo C, as estruturas D não são planares e são quase secas. As correlações eletrônicas são mais importantes neste caso e a estrutura será mais bem descrita por métodos quânticos. O Hartree Fock é um método quântico de menor consumo computacional menos e foi usado para obter uma estimativa inicial para a otimização da estrutura. Com base nas posições dos átomos obtidas, procedeu-se os cálculos DFT [112,113] implementados no programa CPMD [135], usando o funcional BLYP [141], ampliado com correções de dispersão para a descrição adequada das interações de van der Waals [133,134]. Foram calculadas as estruturas eletrônicas (estado fundamental)

do sistema com as otimizações das funções de onda (*single point calculation*); depois foram feitas as análises vibracionais, utilizando o hessiano (*vibrational analysis IN Gauss*) e obtidas as frequências em Raman; em um último passo, foram calculadas as respostas lineares (*linear response*) dos sistemas a fim de avaliar a vibração dos átomos de cada confinamento, com auxílio do programa Molekel [146], comparando os valores teóricos e experimentais. Especificamente nestes modelos, foi utilizada a energia de corte de 100 Ry e os parâmetros cristalográficos: $a=18,906\text{\AA}$, $b=14,766\text{\AA}$ e $c=11,265\text{\AA}$, para D0; e $a=17,406\text{\AA}$, $b=13,284\text{\AA}$ e $c=9,757\text{\AA}$, para D1.

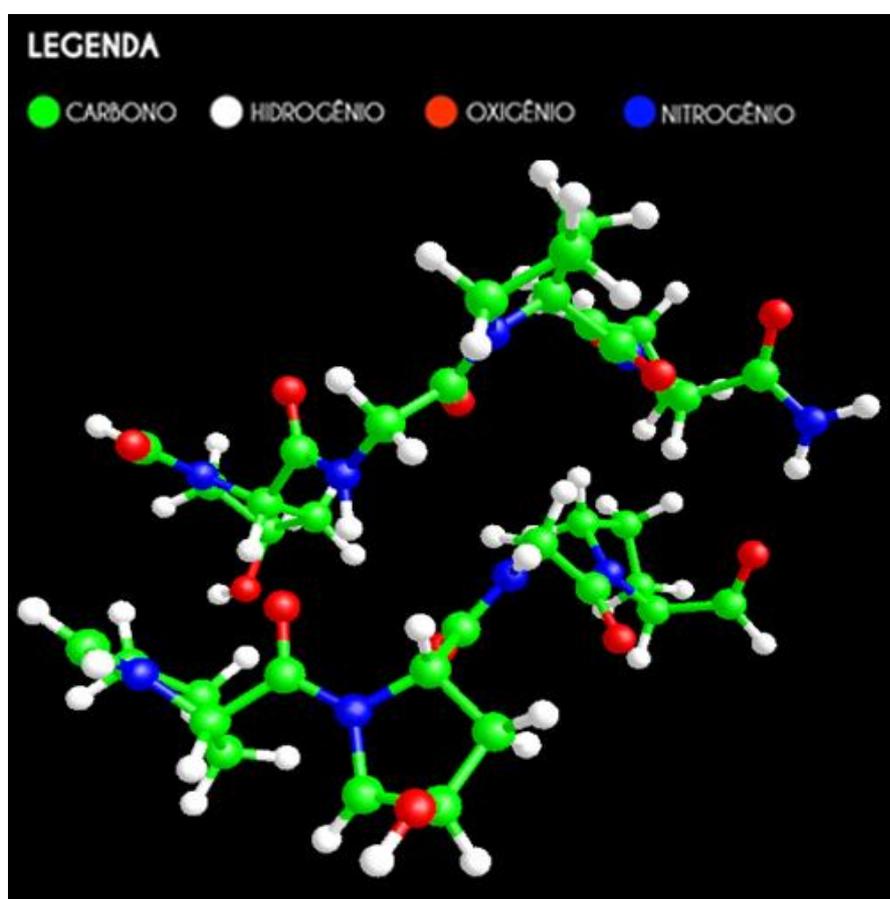


Figura 13 – Modelo DO.

E, buscando se aproximar do mínimo global foram criados mais dois modelos, cada um com a presença de tres aminoácidos em cada hélice da estrutura, na sequencia Glicina-Prolina-Prolina. As estruturas foram otimizadas em uma primeira etapa usando a mecânica molecular com o campo de força MMFF94s [143] implementado no programa Avogadro [144]. Ao primeiro, denominado Bc (Figura 14) foi utilizada uma célula unitária replicada como em uma caixa. Já no segundo modelo, denominado Bv, foram utilizados os

mesmos aminoácidos, sem a replicação deles, em vácuo. Em seguida, a Teoria do Funcional de Densidade (DFT) [112,113] foi utilizada para obter as geometrias de equilíbrio, no programa CPMD [135] usando o funcional BLYP [141], ampliado com correções de dispersão para a descrição adequada das interações de van der Waals [133,134]. Prosseguiu-se o cálculo como descrito nos modelos C e D. Os parâmetros cristalográficos utilizados foram: $a=15,000\text{\AA}$, $b=16,000\text{\AA}$ e $c=13,000\text{\AA}$, para Bc; e $a=10,585\text{\AA}$, $b=10,398\text{\AA}$ e $c=10,202\text{\AA}$, para Bv. A ambos também foi aplicada a energia de corte de 60 Ry.

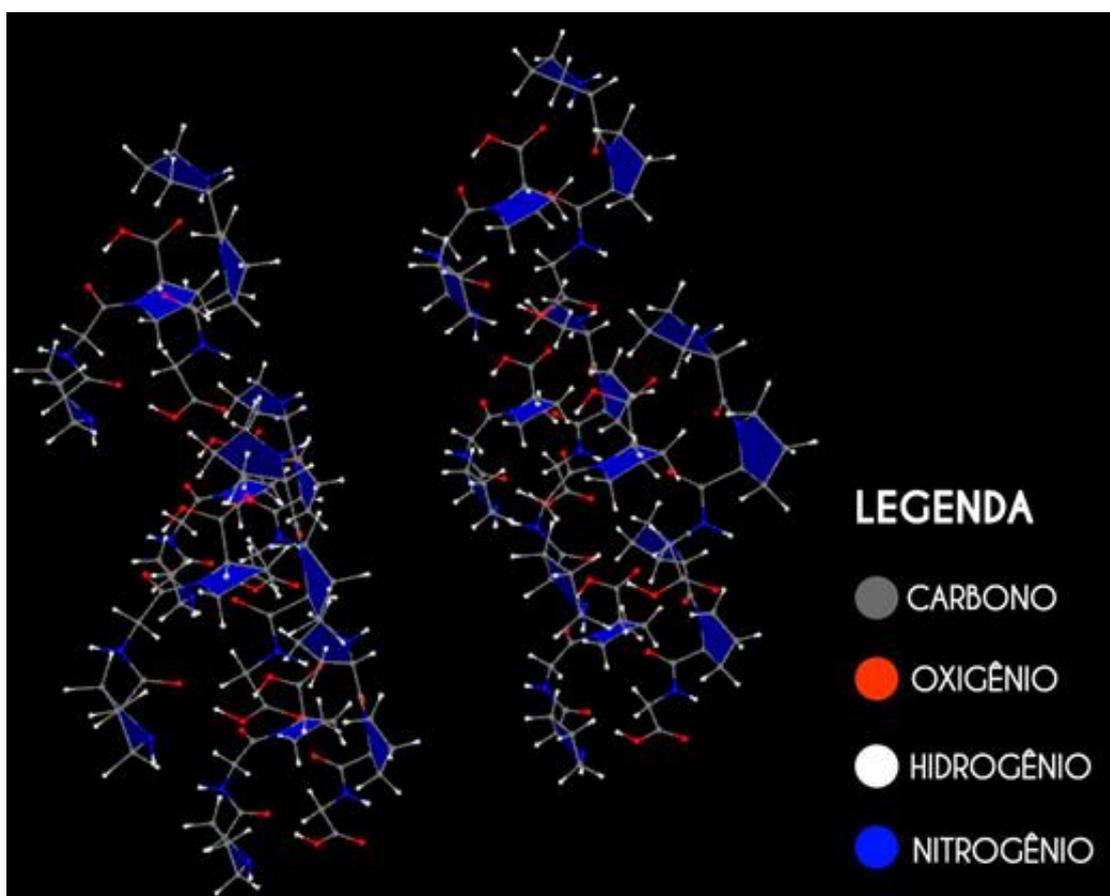


Figura 14 – Modelo Bc replicado em cada um dos eixos.

5.2.2 O que representam os modelos.

Apesar da simplicidade dos modelos, em condições periódicas de contorno, cada um deles representa a estrutura complexa dos tecidos da mucosa oral, no caso. O principal constituinte deste tecido é o colágeno, que é formado por um conjunto de fibras, cada uma delas formada por um conjunto de fibrilas, conforme a ilustração do item a, da Figura 15. Em

essência, as fibrilas colágenas são agregados semi-cristalinos de moléculas de colágeno formadas por peptídeos torcidos, com mais de 1000 aminoácidos em cada um e a presença de água entre as estruturas. Assim, em condições periódicas de contorno, o modelo simula o tecido, representando as fibrilas e a presença de água entre elas (item b). Na escala de dimensão onde o modelo foi construído, associamos as fibrilas colágenas como um conjunto reticulado de células unitárias cuja constituição interna é escolhida pelas moléculas de água ali presentes. O recorte do colágeno (item c), replicado ao longo das três dimensões (item d) representa, portanto, uma parte importante do tecido da derme.

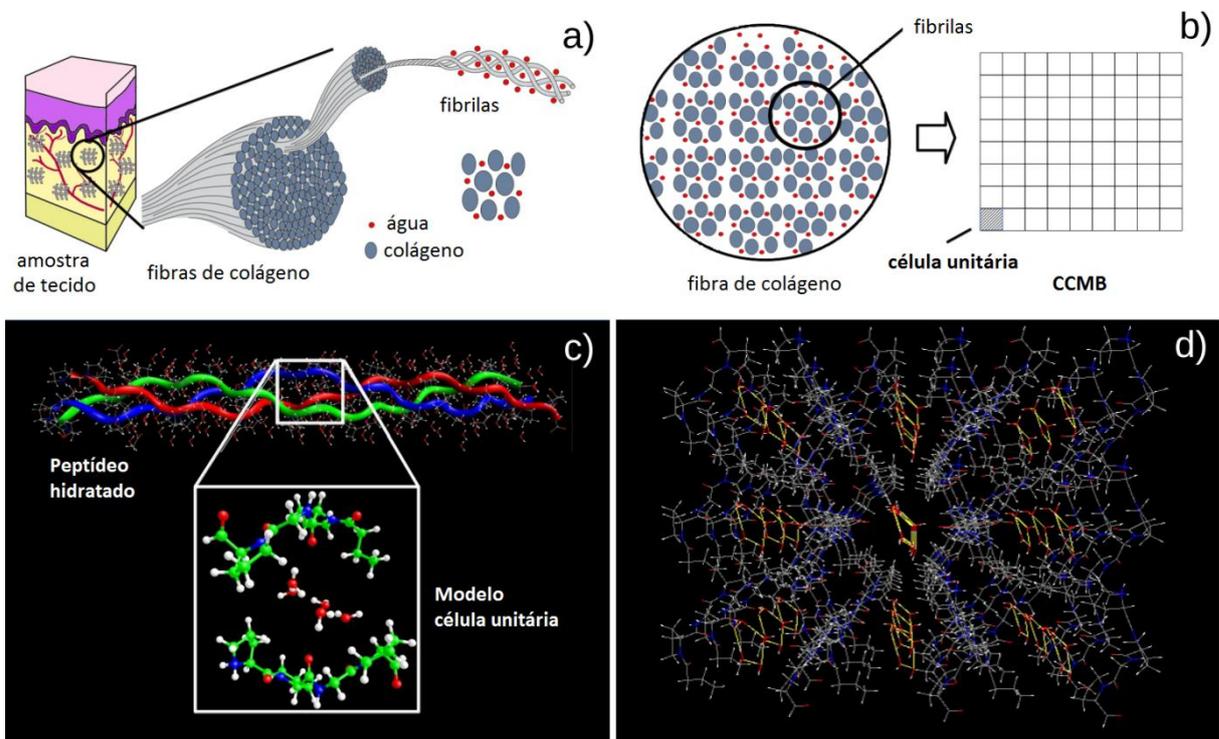


Figura 15 – Modelagem dos tecidos biológicos utilizada na simulação.

(a) Esquema estrutural do tecido conjuntivo mostrando as fibras de colágeno e as fibrilas. Estes são constituídos por moléculas de água e moléculas de colágeno. (b) Construção da célula unitária do CCMB comparadas à estrutura da fibra de colágeno original. (c) Célula unitária escolhida a partir de uma estrutura peptídica hidratada resolvida experimentalmente. Hidrogenio, carbono, nitrogenio e oxigenio são mostrados em branco, verde, azul e vermelho, respectivamente. (d) Estrutura de CCMB com quatro moléculas de água confinadas, replicada em três dimensões. As ligações de hidrogênio são mostradas em amarelo.

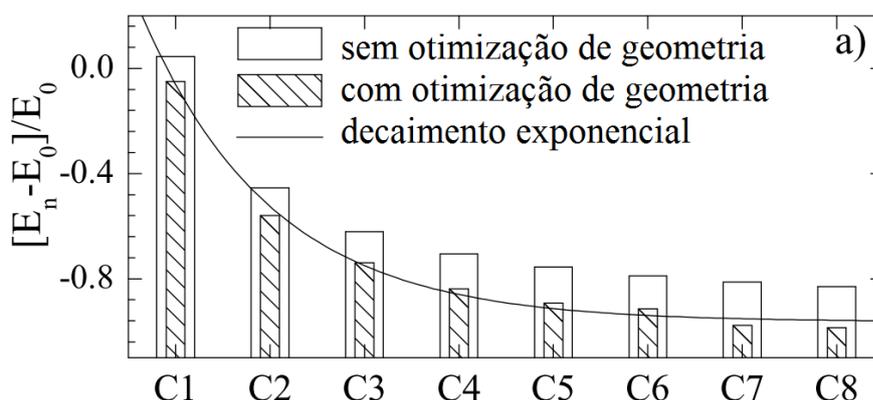
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram calculadas as energias totais para cada estrutura. Para que os diferentes resultados fossem melhor comparados, a energia da estrutura C_n foi normalizada pela estrutura seca, C₀, obtendo uma dependência exponencial com a quantidade de água, n moléculas presentes, conforme:

$$E_{norm} = \frac{E_{Cn} - E_{C0}}{E_{C0}} = -0.964 + 1.86e\left(-\frac{n}{1.388}\right)$$

Foi importante comparar as energias com e sem otimização da geometria, uma vez que as estruturas não-otimizadas retêm os parâmetros estruturais experimentais originais. Os melhores resultados podem ser observados no Gráfico 3.

Gráfico 3 - Energia total normalizada por molécula com e sem otimização de geometria por mecânica molecular.

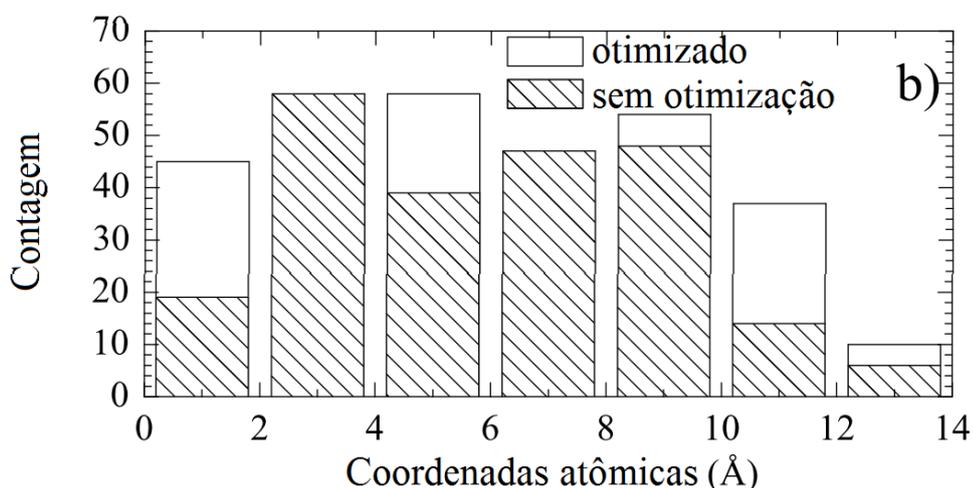


Park et al. [148] analisaram as estruturas e as energias do dímero ao heptâmero de água e perceberam que as estruturas cíclicas dos clusters de água, em geral, são mais favoráveis do que as estruturas abertas, com exceção ao heptâmero. Eles também perceberam que, quanto mais ligações de hidrogênio um cluster tem, maior é a sua estabilidade. Assim, a estabilidade da cadeia de aglomerados aumenta adicionando-se uma molécula de água ao aglomerado, embora um aglomerado com cadeia infinitamente longa possa não existir. Neste contexto, um aglomerado somente será formado se este for mais estável e tiver menor energia que seus átomos individuais. Assim, em ordem crescente de estabilidade temos: C₀, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇ e C₈, o mais estável.

A fim de comparar também os efeitos da otimização nas posições atômicas originais, as distâncias atômicas do modelo C₀ com e sem a otimização de geometria foram

comparadas. Os resultados podem ser vistos no histograma do Gráfico 4. Foi observado que as distâncias atômicas relativas menores (em torno de 2Å), geralmente associadas aos átomos de hidrogênio, e maiores (em torno de 10Å), relacionadas às ligações entre carbonos, são as que apresentam as maiores variações. Ao escolher parte da estrutura original e recortá-la, há uma tendência para que as estruturas sejam estáveis após da otimização de geometria. A fim de manter as hélices trançadas, as estruturas sofrem leves torções entre os carbonos, o que explica as maiores alterações de distância justamente nestes átomos. A tendência observada foi que estes átomos se deslocaram pouco (< 5%) das suas posições originais. Entretanto, é importante destacar que a conectividade e simetria atômica original foi alterada.

Gráfico 4 – Histograma das coordenadas atômicas de C0 com e sem a otimização de geometria.



Também foram analisadas as estruturas dos modelos D0 e D1. Até este ponto uma série de otimizações foram feitas a fim de se obter os melhores parâmetros de energia, tanto modificando a energia de corte, quanto os parâmetros de rede. Encontrar o valor mais próximo do mínimo global, analisando também a quantidade de frequências negativas e a coerência com os resultados experimentais foi um grande desafio. Apenas para o modelo D0, por exemplo, foram testados cerca de 90 cálculos diferentes, e a partir destes, ainda outros foram testados até se obter os parâmetros para o modelo D1. Nestes casos, as otimizações de geometria feitas por Hartree Fock foram as que apresentaram os melhores resultados, sendo, portanto, utilizadas nas demais análises.

Além disso, definidos os modelos C0 a C8, D0 e D1, foi verificada a possibilidade de existência destes confinamentos na natureza. Para isso, foram comparadas as energias dos

confinamentos hidratados, tanto internamente quanto externamente, com as energias dos modelos sem água, C0 e D0, somados à energia dos clusters de água isolados. Para caracterizar as interações entre as moléculas de água e os clusters de colágeno foi calculada a energia de ligação (E_B) e a energia de acoplamento (E_C) conforme a referencia [149]. E_B é definido como:

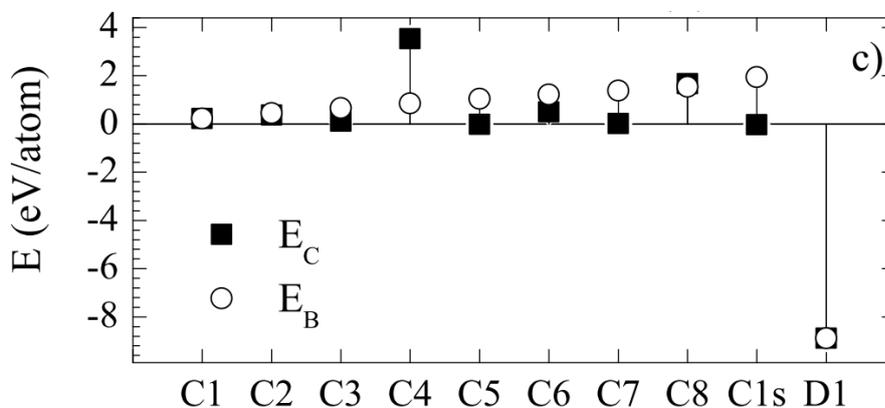
$$E_B = E_{Tmod} - (E_0 + nE_{H_2O})$$

e refere-se a interação média entre as moléculas de água livre e o seu ambiente. E_{Tmod} , E_0 , e E_{H_2O} são a energia da célula unitária do modelo de tecido, a energia de C0 ou D0 e as energias das moléculas de água, respectivamente. A energia de interação entre os *clusters* de aminoácidos e os *clusters* de água com a célula unitária do modelo de tecido podem ser estimadas como:

$$E_C = E_{Tmod} - (E_0 + E_{nH_2O})$$

Onde E_{nH_2O} é a energia do *cluster* composto por n moléculas de água. Esta definição se difere da referencia [149] pelo sinal de menos e a normalização para n. Os resultados podem ser vistos Gráfico 5. Observa-se que E_B aumenta monotonamente com n, para a estrutura C_n , o que está de acordo com a literatura [149]. Isso significa que um trabalho externo é necessário para introduzir os *clusters* de água dentro das gaiolas de aminoácidos, visto que $E_B > 0$. Logo, proteínas com simetrias similares às estruturas C_n não são locais viáveis para catalisar a criação de *clusters* de água. Mesmo assim, essas gaiolas são locais possíveis para inserção de *clusters* de água. A solvatação da estrutura C1 para C1s não contribui para o decaimento de E_B . Por outro lado, a estrutura D₁, com apenas uma molécula de água apresenta o menor valor de E_B . Isso significa que esta estrutura mais compacta é a que viabiliza o aprisionamento de moléculas de água.

Gráfico 5 – Energias de ligação (E_B) e acoplamento (E_C) dos modelos C e D, simbolizadas por um círculo e um quadrado, respectivamente.



Analisando a energia de acoplamento E_C , os valores encontrados foram próximos de zero, independente do conteúdo de água, exceto para $n=4$ e $n=8$ (Gráfico 5). O modelo D1 também se difere dos demais, apresentando como a estrutura de cluster preferida para empacotar as moléculas de água. Já os modelos C4 e C8 aparecem como aqueles com maior valor de E_C positivo. Logo, sob condições normais estes modelos irão interagir fracamente com a gaiola de C0, o que implica em alta mobilidade. As demais energias para as outras estruturas C_n foram da ordem de 1 meV caindo na escala de energia das vibrações moleculares.

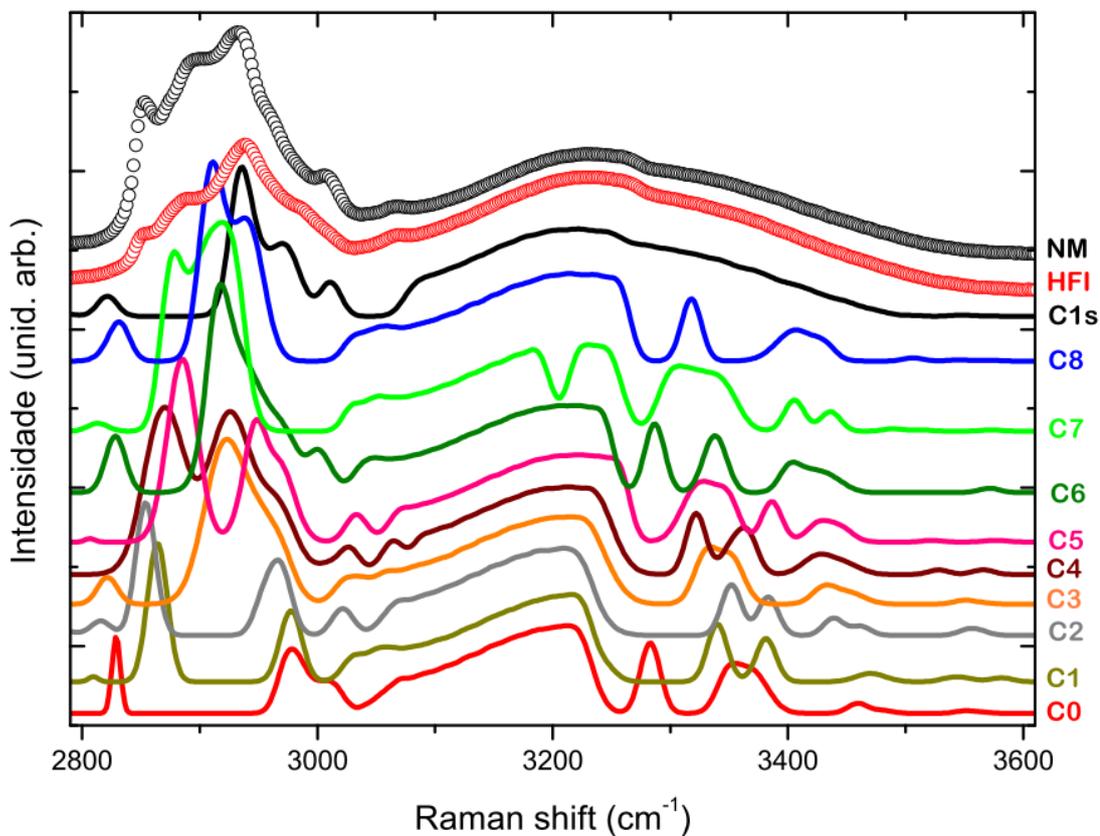
Ainda no quesito energia e quantidade de frequência negativas, os modelos C0, D0, Bc e Bv, todos sem a presença de água confinada, foram comparados conforme a Tabela 5. É possível perceber que os modelos com menor quantidade de frequências negativas não necessariamente são aqueles com menor energia. Isso porque a energia por si só, sem a normalização com outras energias não representa um valor comparável. A quantidade de frequências negativas é um parâmetro para verificar se a superfície de energia potencial (PES) está mais próxima do mínimo global. Neste sentido, é possível perceber que, embora existam frequências negativas em todos os modelos, nenhuma delas se refere àquelas que representam a espectroscopia Raman. O modelo Bc é aquele com maior representatividade, apresentando menor quantidade de frequências, mas, proporcionalmente, o maior número delas em Raman, inclusive na região estudada (2800 a 3600 cm^{-1}). Já o modelo Bv, apesar da menor quantidade de frequências negativas apresenta somente quatro frequências em Raman, das quais apenas duas se encontram na região estudada. O modelo D0 também apresenta boa representatividade na região estudada, comparado ao total de frequências Raman.

Tabela 5 - Comparação entre os modelos C0, D0, Bc e Bv.

	C0	D0	Bc	Bv
Energia Total (A.U.)	-379.93	-445.07	-319.78	-317.36
Frequências	300	285	231	231
Frequências negativas	11	10	4	4
Frequências em Raman	71	31	39	4
Frequências negativas em Raman	0	0	0	0
Frequências Raman na região estudada (2800 a 3600 cm^{-1})	39	22	26	2

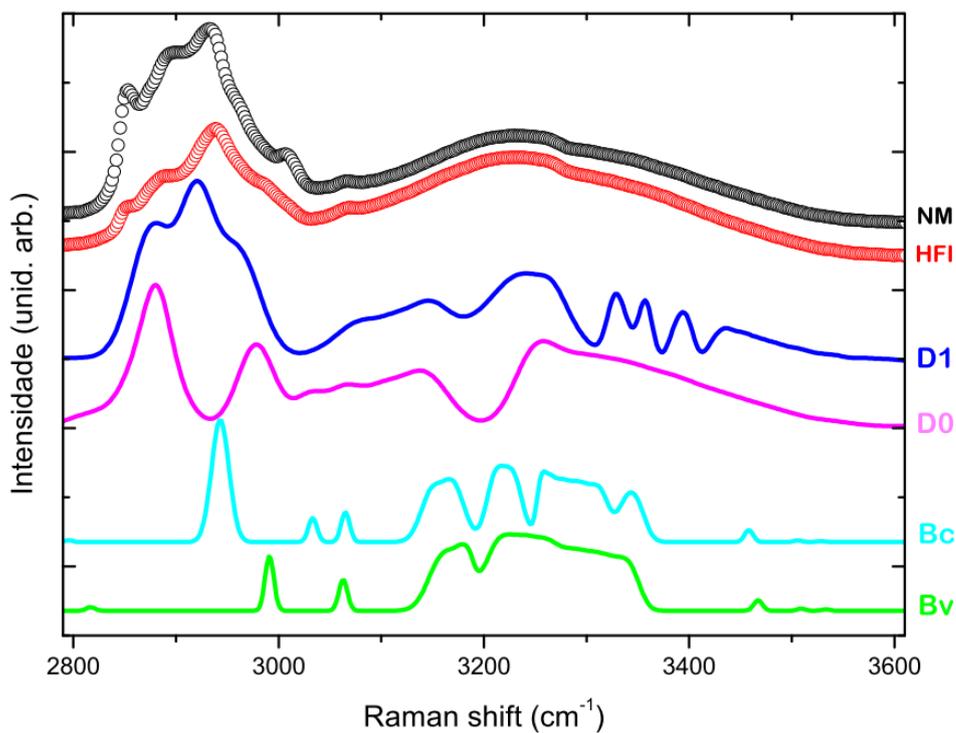
Os modos ativos em Raman foram obtidos a partir dos tensores polares atômicos para cada átomo no sistema e dos autovetores correspondentes a Hessiana [150]. No entanto, as frequências características de cada confinamento, foram obtidas sem as suas intensidades. Assim, para facilitar a análise dos resultados, foram construídas gaussianas no programa Fityk [151] para cada modo de vibração calculado, de modo que o espectro total é um somatório de gaussianas. Cada modelo, possui $3n$ frequências, em que n é o número de átomos. Logo, o modelo C, com 100 átomos, por exemplo, possui 300 frequências. Cada uma delas consiste em uma gaussiana, cuja largura foi fixa com uma largura a meia altura de 20cm^{-1} e altura ajustada ao espectro experimental de MN do trabalho da referência [6]. O somatório dessas gaussianas retrata os sete picos experimentais descritos no tópico 5.1. Comparando os espectros teóricos com os espectros experimentais de MN e HFI pode-se perceber que, de fato, o colágeno e a água são de grande importância para entendimento do que ocorre nos picos característicos. Do modelo C (Gráfico 1), C4 e C6 são aqueles que representam melhor a região de 2800 a 3090 cm^{-1} e C1s aquele que melhor representa a região de 3090 a 3600 cm^{-1} , embora o pico 5 pareça mais claro nos modelos C1, C7 e C8.

Gráfico 6 – Espectro Raman do modelo C.



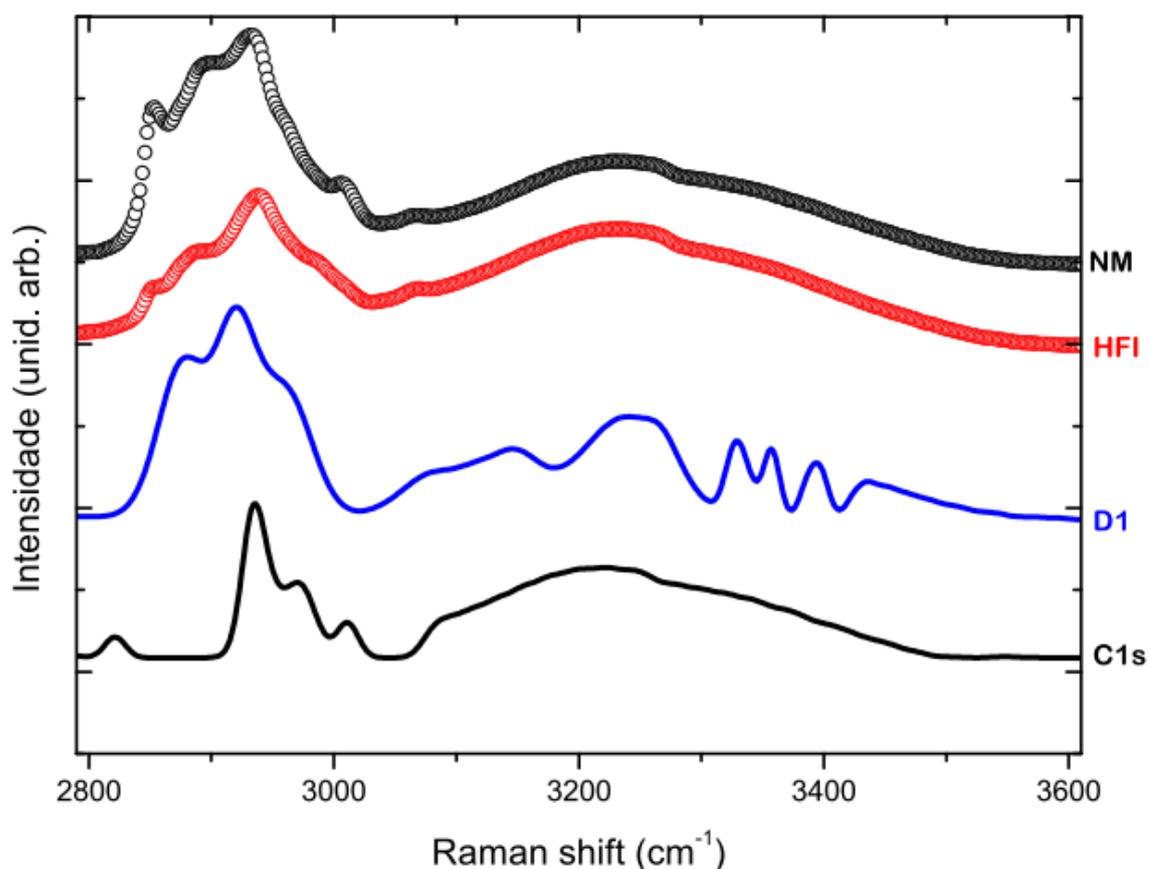
Já o modelo D, Gráfico 7, descreve bem, principalmente, a região de 2800 a 3090 cm^{-1} , sobretudo, no modelo D1. O modelo B, por outro lado, não descreve tão bem à região de alto número de onda e foi descartado quanto às análises dos modos vibracionais.

Gráfico 7 – Espectro Raman do modelo D e B.



Conforme o gráfico, analisando todos os confinamentos, é possível perceber que a região de 3000 a 3400 cm⁻¹, típica da água, apresenta uma soma de várias gaussianas, fato que fica mais claro observando-se a curva de C1s nesta região. Por outro lado, a região de 2800 a 3000 cm⁻¹, típica de amidas, é melhor representada pelo modelo D1. Assim, pode-se observar que o melhor resultado, dentre os modelos obtidos até o momento, seria a soma dos modelos hidratados D1 e C1s. Os melhores resultados podem ser vistos juntos, em um único gráfico (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Melhores resultados: modelos D1 e C1s.



As propriedades dos clusters de água são fundamentais para a compreensão da água em sistemas biológicos [152]. Shoulders and Raines [153], por exemplo, apresentam uma explicação simples para a hiperestabilidade da tripla hélice através de interações dipolo-dipolo. Interações proteína-água são conhecidas por desempenhar um papel fundamental na função de vários sistemas biomacromoleculares, incluindo os tecidos de colágeno [154]. Sabe-se que pequenas mudanças no comportamento dinâmico e estrutural de moléculas de água na interface peptídeo-água podem mudar efetivamente a função da proteína [155,156]. Condizente com a literatura [155,156,154], pôde-se observar, neste trabalho, que a presença de diferentes *clusters* de água desempenha um papel importante nos picos característicos de colágeno e define uma maior afinidade a espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (RNOS).

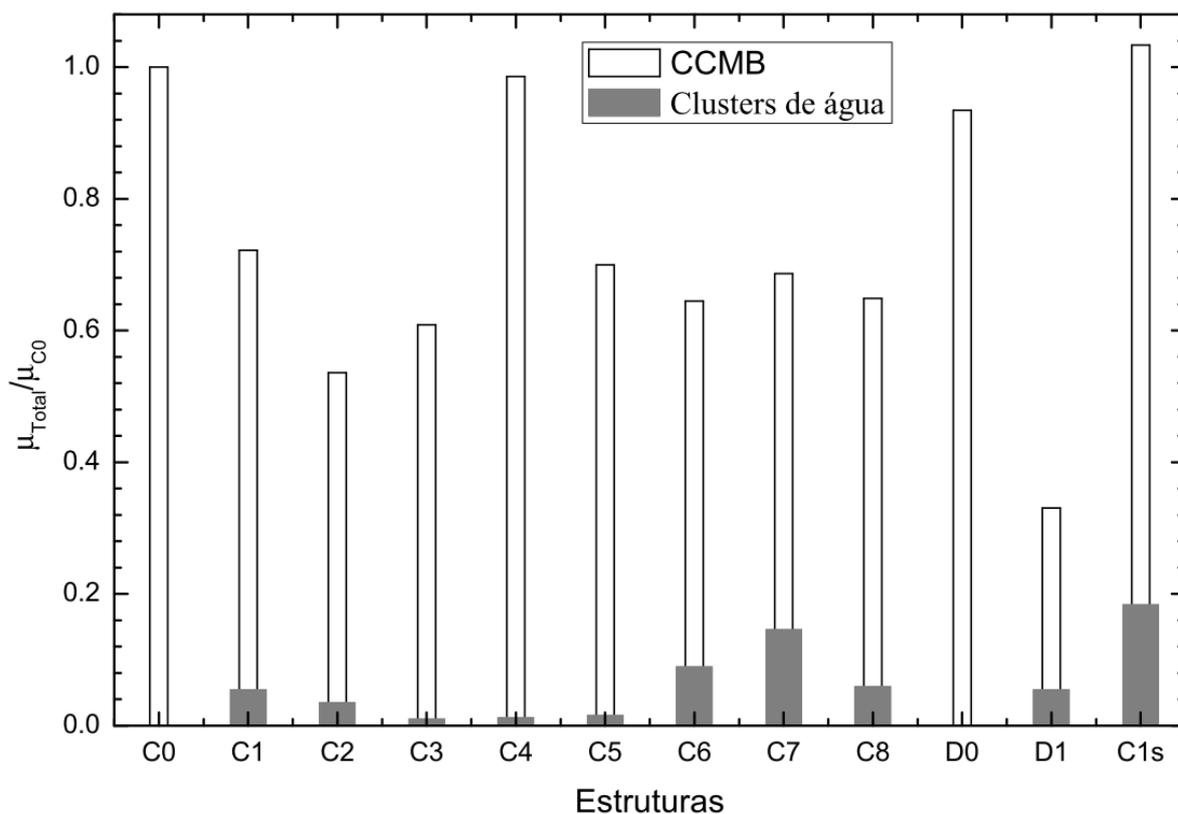
Neste trabalho, os momentos de dipolo calculados para cada uma das estruturas são mostrados no Gráfico 9.

Dentre os modelos C, C2 é o que tem o menor momento de dipolo, enquanto C0, C4 e C1s apresentam os valores mais elevados. Sabe-se que um organismo vivo quando

submetido a um trauma, da mesma forma que quando submetido a outros fatores externos, tais como produtos químicos ou bactérias, pode apresentar doenças que afetam o comportamento de colágeno. Tais fatores podem favorecer a formação de RNOS e, conseqüentemente, os processos de transferência de elétrons, que por sua vez alteram o momento de dipolo de biomoléculas [82,157]. Observou-se que C2 tem o menor momento de dipolo. Isto mostra a quantidade mínima de água necessária para que a transferência de elétrons ocorra. Enquanto que para os valores mais elevados de momento de dipolo, como C0 representa o colágeno sem água e a proteína seca não tem atividade biológica, e C4, embora apresente o maior momento de dipolo, não é um modelo encontrado na natureza, C1 é aquele em que os processos de transferência eletrônica são mais favorecidos. Também foram analisados os momentos de dipolo de clusters de água isolados, $(H_2O)_n$ com $n = 1-8$. À medida que a simetria do tetrâmero de água assegura que o seu momento de dipolo é zero [158], esse valor foi considerado como erro dos cálculos. Assim, o dímero e o pentâmero de água, são aqueles com os menores valores mensuráveis de momentos de dipolo. Então, quando cercado por colágeno, C2 é o que menos favorece o processo de transferência de elétrons. Além disso, o momento de dipolo do tetrâmero da água é zero. Neste sentido, espera-se que os valores de C4 e C0 sejam tão próximos, apesar de C0 ser biologicamente inativo.

Analisando também os modelos D, é possível perceber que estes apresentam menor momento de dipolo, comparados aos modelos C, sem água (C0) e com uma molécula de água (C1), e que o modelo D1 é aquele que apresenta o menor momento de dipolo. Portanto, de todos os modelos, D1 é aquele que menos favorece os processos de transferência eletrônica e, conseqüentemente, o mais próximo de um tecido de mucosa normal.

Gráfico 9 - Momento de dipolo total de cada confinamento.



Com base nos vetores momentos de dipolo dos átomos em cada frequência, foram construídos arquivos de visualização para as vibrações e análise dos picos característicos. Estes dados foram tabelados e são apresentados nas tabelas a seguir. De C0 a C8, os modelos C0, C3, C4, C6 e C7 são aqueles que melhor caracterizam os picos de tecidos inflamatórios e normal, por conseguinte, seus modos vibracionais, na região de $2800-3600\text{cm}^{-1}$, estão compilados na Tabela 15. Também foram analisados o modelos C1s (Tabela 16), D0 (Tabela 17) e D1 (Tabela 18). Pelos resultados obtidos, observa-se que os modos de vibração estão de acordo com os modos experimentais descritos por Movasaghi [137], apresentam as vibrações de estiramento OH-NH-CH. Além disso, pôde-se visualizar outros modos específicos para colágeno e as suas interações com os aglomerados de água, ainda não descritos na literatura. Os modos vibracionais estão descritos nestas tabelas.

Tabela 6 - Atribuição das bandas Raman para C0. Frequências em cm⁻¹.

Experimental	Atribuição de CCMB	Atribuição usual
2990-3550	Torção e estiramento de pelo menos um dos anéis; estiramento C-C, CN, CH, C=O, NH, CH ₂ ; CH wagging, amida II e III	estiramento OH-NH-CH; e estiramento simétrico e assimétrico de CH, CH ₂ , & CH ₃
Sub-bandas	Pico 4 2990-3040	estiramento CH ₃ ; estiramento intenso CH, CH do CH ₂ , CH ₃
	Pico 5 3040-3085	CH ₂ wagging; CH rocking
	Pico 6 3085-3280	estiramento NH ₂ ; estiramento intenso NH, CH, CH ₃ ; estiramento assimétrico CH ₂ , NH ₂ , CH ₃ ; NH, CH ₂ wagging
	Pico 7 3280-3550	estiramento intenso NH e CH; estiramento assimétrico CH ₂ ; NH wagging

Tabela 7 - Atribuição das bandas Raman para C1. Frequências em cm⁻¹.

Experimental	Atribuição de CCMB	Atribuição usual
2870-3550	Torção e estiramento de pelo menos um dos anéis; estiramento C-C, CH, CN, NH, C=O, CH ₂ ;	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃
Sub-bandas	Pico 1 2800-2870	estiramento CH, C=O; intenso CH ₂ scissoring; estiramento CH ₃ ; rocking CH, amida III
	Pico 2 2870-2910	estiramento intenso CH, estiramento simétrico CH ₃ ; estiramento assimétrico CH ₂ ; CH ₂ scissoring; CH, NH wagging, intenso N-C=O N-N-C wagging, CH rocking, C-C-H scissoring, amida III
	Pico 3 2910-2995	estiramento intenso CH, estiramento simétrico CH ₃ ; estiramento assimétrico O=C-H; CH, NH wagging
	Pico 4 2990-3040	estiramento intenso simétrico CH ₃ ; estiramento assimétrico CH ₂ ; CH ₂ wagging
	Pico 5 3040-3085	estiramento assimétrico CH ₂ , CH ₃ , amida III; intenso twisting CH ₂ ; CH wagging; CH, CH ₂ , NH ₂ scissoring; OH wagging da molécula de H ₂ O; estiramento OH da molécula de H ₂ O;
	Pico 6 3085-3280	Estiramento intenso CH ₂ ; estiramento assimétrico NH ₂ , CH ₂ , CH ₃ ; estiramento simétrico NH ₂ ; CH, CH ₂ rocking; CH ₂ twisting; CH, CH ₂ scissoring; NH, CH, CH ₂ , C-C-H wagging; amida II e III; OH wagging da molécula de H ₂ O; estiramento OH da molécula de H ₂ O; estiramento simétrico H ₂ O; estiramento assimétrico H ₂ O

Pico 7 3280-3550	Estiramento assimétrico CH ₂ , H-C=O; estiramento intenso CH, NH; estiramento NH ₂ ; amida III; CH wagging; estiramento OH da molécula de H ₂ O; estiramento assimétrico H ₂ O	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃ ; estiramento OH
---------------------	--	--

Tabela 8 - Atribuição das bandas Raman para C2. Frequências em cm⁻¹.

Experimental	Atribuição de CCMB	Atribuição usual
2870-3550	Torção e estiramento de pelo menos um dos anéis; estiramento C-C, CH, CN, NH, C=O, CH ₂ ; CH wagging	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃
Pico 1 2800-2870	Estiramento assimétrico CH ₂ ; amida III, estiramento OH de pelo menos uma molécula de H ₂ O	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃
Pico 2 2870-2910	estiramento assimétrico CH ₂ ; CH, H-C-N scissoring; amida III; OH wagging de pelo menos uma molécula de H ₂ O; OH scissoring de pelo menos uma molécula de H ₂ O	
Pico 3 2910-2995	Estiramento intenso CH, CH ₃	
Pico 4 2990-3040	Estiramento intenso CH ₂ ; C-C-H scissoring; amida III	
Pico 5 3040-3085	Estiramento intenso CH ₂ ; estiramento CH ₃ ; estiramento assimétrico CH ₂ ; NH ₂ rocking; amida III	
Pico 6 3085-3280	Estiramento intenso CH ₂ , OH; estiramento assimétrico CH ₂ , CH ₃ , NH ₂ ; CH, CH ₂ scissoring; C-C-H wagging; amida II e III; estiramento simétrico H ₂ O; estiramento OH de pelo menos uma molécula de H ₂ O; wagging de pelo menos uma molécula de H ₂ O;	
Pico 7 3280-3550	Estiramento assimétrico CH ₂ , H-C=O; estiramento intenso CH, NH; estiramento NH ₂ ; amida III; CH rocking; estiramento OH da molécula de H ₂ O; estiramento simétrico H ₂ O; estiramento assimétrico H ₂ O	

Sub-bandas

Tabela 9 - Atribuição das bandas Raman para C3. Frequências em cm⁻¹.

Experimental	Atribuição de CCMB	Atribuição usual
2990-3600	Torção e estiramento de pelo menos um dos anéis; estiramento C-C, CH, CN, NH, C=O, CH ₂ ; estiramento intenso CH ₂ , CH; estiramento OH e OH wagging de pelo menos uma molécula de H ₂ O	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃ ; e estiramento OH
Pico 4 2990-3040	estiramento intenso CH ₃ ; CH wagging	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃
Pico 5 3040-3085	estiramento CH ₃ ; estiramento assimétrico CH ₂ ; NH, CH ₂ wagging; amida II e III; C-C-H scissoring, oscilações de uma molécula de H ₂ O	
Sub-bandas	Pico 6 3085-3280	estiramento CH ₂ de CH ₃ , CH de CH ₃ ; estiramento intenso NH, CH ₃ , H-C=O; estiramento assimétrico CH ₂ , CH ₃ ; CH, NH, NH ₂ wagging; NH ₂ scissoring, amida II e III; estiramento simétrico H ₂ O; estiramento assimétrico H ₂ O
	Pico 7 3280-3600	estiramento intenso NH, H-C=O; estiramento assimétrico CH ₂ ; CH ₂ wagging; C-C e H-C=O wagging intenso, amida II e III; OH wagging intenso de uma molécula de H ₂ O

Tabela 10 - Atribuição das bandas Raman para C4. Frequências em cm⁻¹.

Experimental	Atribuição de CCMB	Atribuição usual	
2870-3600	Estiramento de pelo menos um dos anéis; estiramento C-C, CH, CN, CH ₂ ; CH wagging; estiramento OH de pelo menos uma molécula de H ₂ O; H ₂ O scissoring	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃ ; estiramento OH	
Sub-bandas	Pico 2 2870-2910	Torção de pelo menos um dos anéis; estiramento NH, C=O; estiramento intenso CH, C=O; estiramento assimétrico CH ₂ ; amida III; oscilações H ₂ O	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃
	Pico 3 2910-2995	estiramento intenso CH ₃	
	Pico 5 3040-3085	Torção de pelo menos um dos anéis; estiramento NH, C=O, CH ₃ ; estiramento intenso CH de CH ₃ ; estiramento assimétrico CH ₂ , CH ₂ ; NH wagging, H-C-C scissoring; amida III; H ₂ O wagging	
	Pico 6 3085-3280	Torção de pelo menos um dos anéis; NH, C=O, NH ₂ estiramento; estiramento intenso NH, CH, CH ₂ , CH ₃ ; estiramento assimétrico CH ₂ , CH ₃ ; NH wagging; NH ₂ scissoring; amida II e III; OH wagging de pelo menos uma molécula de H ₂ O	

Pico 7 3280-3600	Torção de pelo menos um dos anéis; estiramento NH, C=O, NH ₂ ; estiramento intenso NH, CH, CH ₂ ; estiramento assimétrico CH ₂ ; NH wagging; amida II e III; oscilações H ₂ O	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃ ; estiramento OH
---------------------	---	--

Tabela 11 - Atribuição das bandas Raman para C5. Frequências em cm⁻¹.

Experimental	Atribuição de CCMB	Atribuição usual
2870-3550	Torção e estiramento de pelo menos um dos anéis; estiramento C-C, CH, CN, NH, C=O, CH ₂ ; estiramento OH de pelo menos uma molécula de H ₂ O	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃
Pico 1 2800-2870	Estiramento assimétrico CH ₂ ; CH scissoring; amida I; OH rocking de pelo menos uma molécula de H ₂ O; OH scissoring de pelo menos uma molécula de H ₂ O	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃
Pico 2 2870-2910	Estiramento assimétrico CH ₂ ; CH ₂ scissoring; amida I e III; estiramento simétrico H ₂ O; OH wagging de pelo menos uma molécula de H ₂ O; H ₂ O scissoring	
Pico 3 2910-2995	Estiramento simétrico intenso CH ₂ , CH ₃ ; CH wagging; CH rocking; amida I; estiramento simétrico H ₂ O; OH wagging de pelo menos uma molécula de H ₂ O; H ₂ O rocking	
Sub-bandas	Pico 5 3040-3085	Estiramento intenso CH ₂ ; estiramento CH ₃ ; estiramento assimétrico CH ₂ ; CH wagging; NH ₂ scissoring; amida II e III; OH wagging de pelo menos uma molécula de H ₂ O; OH scissoring de pelo menos uma molécula de H ₂ O
	Pico 6 3085-3280	Estiramento intenso CH, CH ₂ , CH ₃ ; estiramento assimétrico CH ₂ , CH ₃ , NH ₂ ; CH scissoring; CH wagging; amida II e III; OH wagging de pelo menos uma molécula de H ₂ O; OH scissoring de pelo menos uma molécula de H ₂ O;
	Pico 7 3280-3550	Estiramento assimétrico CH ₂ ; estiramento intenso CH, CH ₂ , NH; estiramento simétrico NH ₂ ; amida II; CH wagging; OH wagging de pelo menos uma molécula de H ₂ O; OH rocking de pelo menos uma molécula de H ₂ O; estiramento simétrico H ₂ O; estiramento assimétrico H ₂ O

Tabela 12 - Atribuição das bandas Raman para C6. Frequências em cm⁻¹.

Experimental	Atribuição de CCMB	Atribuição usual
2910-3600	Torção e estiramento de pelo menos um dos anéis; estiramento C-C, CN, CH, NH, C=O, CH ₂ ; estiramento intenso CH ₂ ; estiramento assimétrico CH ₂ ; estiramento OH de pelo menos uma molécula de H ₂ O	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃ ; estiramento OH
Pico 3 2910-2995	estiramento intenso CH ₃ ; estiramento assimétrico H-C=O	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃
Pico 4 2995-3040	estiramento intenso CH; CH wagging; amida III; wagging de pelo menos uma molécula de H ₂ O	
Pico 5 3040-3085	estiramento CH ₃ ; NH, CH wagging; H-C-C scissoring; amida III	
Sub-bandas	Pico 6 3085-3280	estiramento CH ₂ de CH ₃ , NH ₂ ; estiramento intenso CH, CH ₃ ; estiramento assimétrico CH ₃ ; CH wagging; amida II e III; C-C-H scissoring; OH wagging de uma molécula de H ₂ O; OH scissoring de uma molécula de H ₂ O
	Pico 7 3280-3600	estiramento intenso CH; amida II; CH scissoring; estiramento simétrico de H ₂ O; estiramento assimétrico de H ₂ O

Tabela 13 - Atribuição das bandas Raman para C7. Frequências em cm⁻¹.

Experimental	Atribuição de CCMB	Atribuição usual
2910-2995 e 3040-3600	Torção e estiramento de pelo menos um dos anéis; estiramento C-C, CN, CH, CH ₂ ; estiramento intenso CH ₂ intenso; CH wagging; estiramento OH de pelo menos uma molécula de H ₂ O	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃ ; estiramento OH
Pico 3 2910-2995	estiramento CH ₃ ; estiramento intenso CH ₃ ; OH wagging de algumas moléculas de H ₂ O; oscilações H ₂ O	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃
Pico 5 3040-3085	estiramento NH, C=O; estiramento intenso CH; estiramento assimétrico; CH ₂ , NH wagging; amida III; OH wagging de algumas moléculas de H ₂ O	
Sub-bandas	Pico 6 3085-3280	estiramento NH, C=O, CH ₃ ; estiramento intenso NH, CH, CH ₃ ; estiramento assimétrico CH ₂ ; NH wagging; amida I e III; OH wagging de uma molécula de H ₂ O
	Pico 7 3280-3600	estiramento NH, C=O, NH ₂ ; estiramento intenso CH; estiramento assimétrico CH ₂ ; NH wagging; C-C-H scissoring; amida III; scissoring de algumas moléculas de H ₂ O; oscilações de uma molécula de H ₂ O

Tabela 14 - Atribuição das bandas Raman para C8. Frequências em cm⁻¹.

Experimental	Atribuição de CCMB	Atribuição usual
2870-3550	Torção e estiramento de pelo menos um dos anéis; estiramento C-C, CH, CN, NH, C=O, CH ₂ ; estiramento OH de pelo menos uma molécula de H ₂ O	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃
Sub-bandas	Pico 1 2800-2870	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃
	Pico 3 2910-2995	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃
	Pico 5 3040-3085	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃
	Pico 6 3085-3280	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃
	Pico 7 3280-3550	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃ ; estiramento OH

Tabela 15 - Atribuição das bandas Raman para CCMB (C0, C3, C4, C6, C7). Frequências em cm⁻¹.

Experimental	Atribuição de CCMB	Atribuição usual
2870-3550	Torção e estiramento de pelo menos um dos anéis; estiramento C-C, CH, CN, NH, C=O, CH ₂ ; estiramento assimétrico CH ₂ ; CH wagging; estiramento OH de pelo menos uma molécula de H ₂ O	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃
Sub-bandas	Pico 2 2870-2910	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃
	Pico 3 2910-2995	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃

Pico 4 2990-3040	estiramento CH ₃ ; estiramento intenso CH, CH do CH ₂ , CH ₂ , CH ₃ ; amida II e III; OH wagging de pelo menos uma molécula de H ₂ O; H ₂ O wagging	
Pico 5 3040-3085	estiramento CH ₃ , CH de CH ₃ ; estiramento intenso CH ₂ , CH; NH, CH ₂ wagging; amida II e III; CH rocking; C-C-H scissoring; OH wagging de pelo menos uma molécula de H ₂ O; H ₂ O oscillation; H ₂ O scissoring; H ₂ O wagging	
Pico 6 3085-3280	estiramento NH ₂ , CH ₂ do CH ₃ , CH do CH ₃ ; estiramento intenso NH, CH, CH ₂ , CH ₃ ; estiramento assimétrico NH ₂ , CH ₃ ; NH, CH ₂ , NH ₂ wagging; NH ₂ scissoring; C-C-H scissoring; amida II e III; OH wagging de pelo menos uma molécula de H ₂ O; estiramento simétrico H ₂ O; estiramento assimétrico H ₂ O; H ₂ O scissoring; OH scissoring de uma molécula de H ₂ O	
Pico 7 3280-3550	estiramento NH ₂ ; estiramento intenso NH, CH, CH ₂ ; NH, CH ₂ wagging; wagging intenso C-C e H-C=O; amida II e III; CH scissoring; C-C-H scissoring; OH wagging de pelo menos uma molécula de H ₂ O; OH wagging intenso de uma molécula de H ₂ O; H ₂ O scissoring; oscilações H ₂ O; estiramento simétrico H ₂ O; estiramento assimétrico H ₂ O	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃ ; estiramento OH

Tabela 16 - Atribuição das bandas Raman para C1s. Frequências em cm⁻¹.

Experimental	Atribuição de CCMB	Atribuição usual
2910-3550	Torção e estiramento de pelo menos um dos anéis; estiramento C-C, CH, CN, NH, C=O, CH ₂ ; estiramento assimétrico CH ₂ ; CH wagging; amida III; estiramento de OH de pelo menos uma molécula de H ₂ O; OH wagging de pelo menos uma molécula de H ₂ O	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃ ; estiramento OH
Pico 1 2800-2870	Estiramento intenso CH, OH, C=O; N-C-H twisting; CH ₂ rocking; amida II	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃
Pico 3 2910-2995	estiramento intenso CH, CN; H-C=O, NH wagging; CH ₂ , H-C=O, CH, CH ₂ scissoring; OH scissoring de pelo menos uma molécula de H ₂ O; H ₂ O rocking	
Pico 4 2995-3040	estiramento intenso CH ₂ ; CH ₂ scissoring; amida II; H ₂ O scissoring	
Pico 6 3085-3280	estiramento NH ₂ , CH ₂ de CH ₃ ; estiramento intenso CH, CH ₂ , CH ₃ ; estiramento assimétrico NH ₂ , CH ₃ ; NH, CH ₂ , NH ₂ wagging; CH ₂ , C-C-H scissoring; amida II; estiramento simétrico H ₂ O; estiramento assimétrico H ₂ O; H ₂ O scissoring; OH scissoring de pelo menos uma molécula de H ₂ O	

Sub-bandas

Pico 7 3280-3550	estiramento simétrico CH ₃ , NH ₂ ; estiramento intenso OH, NH, NH ₂ , CH, CH ₂ ; estiramento assimétrico N-C=O; NH wagging; CH ₂ scissoring; amida II; estiramento assimétrico H ₂ O; estiramento simétrico H ₂ O	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃ ; estiramento OH
---------------------	---	--

Tabela 17 - Atribuição das bandas Raman para D0. Frequências em cm⁻¹.

Experimental	Atribuição de CCMB	Atribuição usual
2870-3550	Torção e estiramento de pelo menos um dos anéis; estiramento C-C, CH, CN, NH, C=O, OH, CH ₂ ; amida III	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃
Pico 1 2800-2870	estiramento intenso CH; NH, C-N, CH ₂ wagging; OH, C-C-H scissoring; CH ₂ rocking	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃
Pico 2 2870-2910	estiramento intenso CH, estiramento assimétrico CH ₂ ; CH scissoring; CH, NH wagging; CH ₂ rocking	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃
Pico 3 2910-2995	estiramento intenso NH; CH wagging; CH, CH ₂ rocking; amida III	
Sub-bandas	Pico 4 2990-3040	estiramento intenso C=O; NH, CH wagging; CH, NH, C-N-H scissoring; CH rocking
	Pico 5 3040-3085	estiramento intenso NH, C=O; CH wagging; C-C-H, CH ₂ scissoring; NH, CH, CH ₂ rocking
	Pico 6 3085-3280	Estiramento intenso NH, CH ₂ ; estiramento assimétrico O=C-O, O-C-H, CH ₂ ; CH rocking; CH ₂ scissoring; NH, CH wagging
Pico 7 3280-3550	Estiramento intenso NH ₃ , CH ₂ ; estiramento simétrico NH ₃ ; estiramento assimétrico CH ₂ ; C-O-H, CH wagging; NH, CH scissoring; NH, CH ₂ rocking	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃ ; estiramento OH

Tabela 18 - Atribuição das bandas Raman para D1. Frequências em cm⁻¹.

Experimental	Atribuição de CCMB	Atribuição usual
2870-3550	Torção e estiramento de pelo menos um dos anéis; estiramento C-C, CH, CN, NH, C=O, CH ₂ ; amida III	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃

Pico 2 2870-2910	estiramento intenso NH; NH wagging; CH, CH ₂ rocking; CH, CH ₂ scissoring; H ₂ O scissoring	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃
Pico 3 2910-2995	estiramento intenso CN, CH; estiramento assimétrico CH ₂ ; CH wagging; CH scissoring; CH, CH ₂ rocking; H ₂ O rocking; estiramento OH da molécula de H ₂ O	
Pico 5 3040-3085	estiramento intenso C-O, NH, CH ₂ ; estiramento assimétrico CH ₂ ; O-C-H twisting; CH, NH wagging; OH scissoring da molécula de H ₂ O; OH rocking da molécula de H ₂ O; estiramento OH da molécula de H ₂ O	
Pico 6 3085-3280	Estiramento intenso C=O, CH ₂ ; estiramento assimétrico O-C=O, CH ₂ ; NH rocking; C-C-H twisting; CH ₂ scissoring; H ₂ O rocking; estiramento OH da molécula de H ₂ O	
Pico 7 3280-3550	Estiramento intenso CH, C=O, NH ₂ , CH ₂ ; Estiramento assimétrico CH ₂ ; NH wagging; C-N-H twisting; CH, C-N-H scissoring; CH ₂ rocking; OH scissoring da molécula de H ₂ O; estiramento OH da molécula de H ₂ O; estiramento assimétrico H ₂ O	estiramento OH-NH-CH; estiramento simétrico e assimétrico CH, CH ₂ , & CH ₃ ; estiramento OH

Observando estas tabelas, é possível perceber vibrações características em cada pico. Dentre os modelos estudados, C4 é característico do pico 2, com estiramento C=O intenso. O modelo C0 se destaca por representar o pico 5, que apresenta o modo de vibração CH *rocking*. As vibrações de NH₂ são notáveis no pico 6, que mostra os modos de estiramento assimétricos de NH₂ (proveniente de C0), NH₂ *wagging* (proveniente de C3) e NH₂ *scissoring* (proveniente de C3 e C4) e o modo de estiramento assimétrico de CH₃ (proveniente de C0, C4 e C6), também muito característico. No pico 7, observam-se modos característicos intensos de C-C *wagging* (provenientes de C3) e CH *scissoring* (de C6). Os picos 6 e 7 também representam as regiões de modos vibracionais relacionados com a água. Especificamente, no pico de 6, existe a presença de vibrações OH *scissoring* de uma molécula de H₂O (proveniente de C6) e o pico 7 apresenta OH *wagging* intenso de uma molécula de H₂O (proveniente de C3). Por fim, os picos 3 e 4 mostram modos de vibração semelhantes a outros picos. A maioria dos modelos de C0 até C8 estão contidas nos modelos C1s, na região dos picos 6 e 7. Em particular, o modelo C1s adiciona os modos vibracionais: CH₂ *scissoring* no pico 6, e o estiramento assimétrico de N-C=O, no pico 7.

Estes resultados podem melhorar a compreensão de diferentes processos biológicos em tecidos normais e patológicos e, com isso, podem, inclusive, orientar a

formulação de estratégias de controle e tratamento de doenças. A comprovação experimental de picos característicos de diagnóstico, embora de extremo valor científico, não é suficiente para afirmar se há a real definição de um estado patológico. É necessário compreender o que estes picos significam. O desenvolvimento de um modelo teórico, aqui apresentado, contribui para tais estudos. Os modelos estudados são complementares aos dados experimentais e ajudam a compreender o que está por trás das características que contribuem para o diagnóstico óptico. Puderam-se observar os átomos e as moléculas envolvidas em cada pico característico e a importância da água no diagnóstico de infiltrados inflamatórios. Embora, neste estudo tenha sido utilizado um recorte de colágeno e a presença/ausência de *clusters* de água confinada, é possível ainda adicionar outras moléculas ao modelo, como as que surgem em reações bioquímicas responsáveis pelo estado inflamatório, a fim de investigar e caracterizar este tipo de tecido. De um modo geral, observou-se que um pequeno peptídeo de colágeno mimético tem implicações no comportamento conformacional dos colágenos nativos e não só deles, mas o método também pode ser expandido e utilizado ainda para outras macromoléculas.

7 CONCLUSÕES

Os resultados dos modos vibracionais colaboraram para elucidar o que está por trás das características que podem contribuir para o diagnóstico óptico. Foi possível observar que a hidratação interna, embora muitas vezes ignorada em experimentos biológicos é de suma importância na região analisada, $2800-3600\text{ cm}^{-1}$. Notou-se também que existem bandas características para os confinamentos analisados, que se referem ao colágeno ou colágeno mais água.

Conforme os objetivos propostos, foi possível construir um modelo computacional capaz de mimetizar o tecido biológico da derme. Para este modelo, partimos de um peptídeo de colágeno com diferentes graus de hidratação e a presença de água confinada em sua estrutura, a fim de contribuir para a compreensão e interpretação dos espectros obtidos em estudos de biópsia óptica por espectroscopia vibracional. Pelas comparações dos resultados obtidos por simulações computacionais aos espectros Raman experimentais, observou-se que, quanto às características estudadas, os modelos D1 e C1s são aqueles que representam melhor o tecido da mucosa. Dependendo do estudo em questão, pode ser utilizado um ou outro modelo, ou ainda uma composição de ambos. D1 é menos favorável às ROS, enquanto C1s é mais favorável à presença de radicais livres. Para estudos de água confinada com vários tipos de *clusters*, o modelo C1s é preferencial, uma vez que a distância entre as hélices do colágeno permite a utilização de uma quantidade maior de moléculas de água e o agrupamento delas em diversos *clusters*. Já o modelo D1 permite a utilização de apenas uma molécula de água, porém, a formação deste protótipo é aquela mais energeticamente favorável na natureza. Se, por outro lado, o que se pretende estudar são os resultados espectrais, então a junção dos dois modelos, D1 e C1s, é preferencial, porque caracterizam bem a região alto número de onda (2800 cm^{-1} a 3600 cm^{-1}) como um todo.

Este estudo coopera para conectar a pesquisa básica à pesquisa clínica. Conforme apresentado, para que a biópsia óptica seja clinicamente utilizada é necessário compreender o significado químico de cada pico. Isso está relacionado ao fato de que as células vivas funcionam em determinadas condições e a estrutura e função das proteínas resultantes da expressão gênica podem caracterizar o diagnóstico. O modelo desenvolvido neste trabalho contribui para a formação de um catálogo de modos vibracionais de proteínas, começando com o colágeno e analisando as suas interações com os *clusters* de água. Também abre possibilidades de estudos aplicados a cosmetologia e farmacologia de tecidos, possibilitando

estudos teóricos, além de experimentais, contribuindo para as decisões de testes em animais, otimizando o tempo e questões éticas destes experimentos. Conclui-se que a água é de extrema importância nas funções protéicas e confirmou-se que existem alterações nos modos de vibraçõais da organizaçõais estrutural da água, o que consiste em uma informaçõais importante para a compreensõais dos processos biolõgicos em termos de bio-físico-químicos e fisiolõgicos.

8 PUBLICAÇÕES

a) Sobre modelos DFT em tecidos biológicos:

- CARVALHO, L. F. C. S.; SATO, E.T.; ALMEIDA, J. D.; MARTINHO, H.S. Diagnosis of inflammatory lesions by high-wavenumber FT-Raman spectroscopy. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 130, p. 1221-1229, 2011.
- SATO, E. T.; ROCHA, A. R.; CARVALHO, L. F. C. S.; ALMEIDA, J. D.; MARTINHO, H. A molecular model for hydrated biological tissues. **Physical Chemistry Chemical Physics**. arXiv:1404.3449. Artigo submetido, 2014.
- SATO, E.T.; ROCHA, A. R.; MARTINHO, H. Collagen-like bulk model: a suitable model for study the vibrational spectra of confined water in collagen. Em finalização.

b) Sobre modelos DFT de água confinada em biosistemas:

- LIMA, T A; LAGO, A F; PIRES, M O C; MARTINS, E T; GILES, C; COUTINHO-NETO, M D; MARTINHO, H; HOMEM-DE-MELLO, P; FERREIRA, F F; SATO, E T. Anharmonic transitions in nearly dry l-cysteine I. **Journal of Physics. Condensed Matter**, v. 24, p. 195104, 2012.

c) Sobre modos vibracionais em modelos DFT:

- SATO, E. T; COSTA, G.C.; TRINDADE, J. A. Analysis of Biomolecules Vibrational Modes by Visual Basic for Applications Subroutines. Em construção.

9 REFERÊNCIAS

1. NANDA, K. et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities. **Annals of Internal Medicine**, v. 132, p. 810–819, 2000.
2. BOYLE, P.; LEVIN, B. **World cancer report 2008**. Lyon: Agency for Research on Cancer, 2008.
3. PENTEADO, S. C. G. et al. Diagnosis of degenerative lesions of supraspinatus rotator cuff tendons by Fourier transform-Raman spectroscopy. **Journal of Biomedical Optics**, v. 13, p. 014018, 2008.
4. LIEBER, C. A.; KABEER, M. H. Characterization of pediatric Wilms' tumor using Raman and fluorescence spectroscopies. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 45, p. 549–554, 2010.
5. BACKHAUS, J. et al. Diagnosis of breast cancer with infrared spectroscopy from serum samples. **Vibrational Spectroscopy**, v. 52, p. 173–177, 2010.
6. CARVALHO, L. F. C. S. et al. Diagnosis of inflammatory lesions by high-wavenumber FT-Raman spectroscopy. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 130, p. 1221-1229, 2011.
7. GNIADACKA, M. et al. Structure of Water, Proteins, and Lipids in Intact Human Skin, Hair, and Nail. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 110, p. 393–398, 1998.
8. NIJSSEN, A. et al. Discriminating basal cell carcinoma from perilesional skin using high wave-number Raman spectroscopy. **Journal of Biomedical Optics**, v. 12, p. 034004, 2007.
9. FIROOZMAND, L. M.; ALMEIDA, J. D.; CABRAL, L. A. G. Study of denture-induced fibrous hyperplasia cases diagnosed from 1979 to 2001. **Quintessence International**, v. 36, 2005.
10. FIROOZMAND, L. M.; ALMEIDA, J. D.; CABRAL, L. A. G. Study of denture-induced fibrous hyperplasia cases diagnosed from 1979 to 2001. **Quintessence International**, v. 36, p. 825–829, 2005.
11. GARCÍA-FLORES, A. F. et al. High-wavenumber FT-Raman spectroscopy for in vivo and ex vivo measurements of breast cancer. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 130, p. 1231-1238, 2011.
12. GNIADACKA, M. et al. Diagnosis of basal cell carcinoma by Raman spectroscopy. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 28, p. 125-129, 1997.
13. XIE, L. et al. Novel computational approaches to polypharmacology as a means to define responses to individual drugs. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 52, p. 361-379, 2012.
14. STEINHAUSER, M. O.; HIERMAIER, S. A Review of Computational Methods in Materials Science: Examples from Shock-Wave and Polymer Physics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 5135–5216, 2009.
15. YAZID, A.; ABDELKADER, N.; ABDELMADJID, H. A state-of-the-art review of the X-FEM for computational fracture mechanics. **Applied Mathematical Modelling**, v. 33, p. 4269–4282, 2009.
16. LÜ, D. et al. Asymmetric migration of human keratinocytes under mechanical stretch and cocultured fibroblasts in a wound repair model. **PLoS One**, v. 8, p. e74563, 2013.
17. GROVES, R. B. et al. An anisotropic, hyperelastic model for skin: experimental

- measurements, finite element modelling and identification of parameters for human and murine skin. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 18, p. 167-180, 2013.
18. MOGILNER, I. G.; RUDERMAN, G.; GRIGERA, J. R. Collagen stability, hydration and native state. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 21, p. 209-13, 2002.
 19. SIMONE, A. D.; VITAGLIANO, L.; BERISIO, R. Role of hydration in collagen triple helix stabilization. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 372, p. 121–125, 2008.
 20. BODIAN, D. L. et al. Molecular Dynamics Simulations of the Full Triple Helical Region of Collagen Type I Provide an Atomic Scale View of the Protein's Regional Heterogeneity. **Pacific Symposium on Biocomputing**, p. 193–204, 2011.
 21. STREETER, I.; LEEUW, N. H. A molecular dynamics study of the interprotein interactions in collagen fibrils. **Soft Matter**, v. 7, p. 3373-3382, 2011.
 22. SUÁREZ, E.; DÍAZ, N.; SUÁREZ, D. Thermochemical Fragment Energy Method for Biomolecules: Application to a Collagen Model Peptide. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 5, p. 1667–1679, 2009.
 23. REN, N. et al. GPU-based Monte Carlo simulation for light propagation in complex heterogeneous tissues. **Optics express**, v. 18, p. 6811-6823, 2010.
 24. ZHU, C.; LIU, Q. Review of Monte Carlo modeling of light transport in tissues. **Journal of Biomedical Optics**, v. 18, p. 50902, 2013.
 25. CHAPLIN, M. Do we underestimate the importance of water in cell biology? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, p. 861-866, 2006.
 26. CHAPLIN, M. **Water structure and science**. Disponível em: <<http://www.lsbu.ac.uk/water/vibrat>>. Acesso em: 15 fev. 2009.
 27. BOHR, J.; OLSEN, K. The close-packed triple helix as a possible new structural motif for collagen. **Theoretical Chemistry Accounts**, 2010.
 28. GOVERMAN, J. Our Natural Defense: The Skin! **Critical Care Medicine**, v. 42, p. 1575-1577, 2014.
 29. PEREIRA PINTO, L. et al. **Patologia básica: sinopse**. Natal: Proin/Edufrn, 1997.
 30. CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001.
 31. KARP, G. **Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos**. 3. ed. Barueri, SP: Manole, 2005.
 32. FONTAINE-VIVE, F. et al. Collagen and component polypeptides: Low frequency and amide vibrations. **Chemical Physics**, v. 355, p. 141-148, 2009.
 33. LEIKIN, S. et al. Raman spectral evidence for hydration forces between collagen triple helices. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 11312, 1997.
 34. JALKANEN, K. J. et al. Role of hydration in determining the structure and vibrational spectra of L-alanine and N-acetyl L-alanine N-methylamide in aqueous solution: a combined theoretical and experimental approach. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 119, p. 191–210, 2008.
 35. FRANKS, F. (Ed.). **Water, a comprehensive treatise**. New York: Plenum Press, v. 1-7, 1982.
 36. DENNY, M. W. **Air and water: the biology and physics of life's media**. Princeton: Princeton University Press, 1993.

37. LIU, K.; CRUZAN, J. D.; SAYKALLY, R. J. Water Clusters. **Science**, v. 271, p. 929-933, 1996.
38. KEUTSCH, F. N.; SAYKALLY, R. J. Water clusters: untangling the mysteries of the liquid, one molecule at a time. **PNAS**, v. 98, p. 10533-10540, 2001.
39. BALL, P. Water - an enduring mystery. **Nature**, v. 452, p. 291-292, 2008.
40. RASCHKE, T. M. Water structure and interactions with protein surfaces. **Current opinion in structural biology**, v. 16, p. 152-159, 2006.
41. HALLE, B. Protein hydration dynamics in solution: a critical survey. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 359, p. 1207-1224, 2004.
42. DUNN, R. V.; DANIEL, R. M. The use of gas-phase substrates to study enzyme catalysis at low hydration. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 359, p. 1309-1320, 2004.
43. STEITZ, R. et al. Nanobubbles and Their Precursor Layer at the Interface of Water Against a Hydrophobic Substrate. **Langmuir**, v. 19, p. 2409–2418, 2003.
44. JENSEN, T. R. et al. Water in Contact with Extended Hydrophobic Surfaces: Direct Evidence of Weak Dewetting. **Physical Review Letters**, v. 90, p. 086101, 2003.
45. SCHWENDEL, D. et al. Interaction of Water with Self-Assembled Monolayers: Neutron Reflectivity Measurements of the Water Density in the Interface Region. **Langmuir**, v. 19, p. 2284–2293, 2003.
46. YAMINSKY, V.; OHNISHI, S. Physics of Hydrophobic Cavities. **Langmuir**, v. 19, p. 1970–1976, 2003.
47. ZANGI, R. Water confined to a slab geometry: a review of recent-computer simulations studies. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 16, p. 5371-5388, 2004.
48. TUMMALA, N. R.; STRIOLO, A. Hydrogen-Bond Dynamics for Water Confined in Carbon Tetrachloride–Acetone Mixtures. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, p. 10675-10683, 2008.
49. EAVES, J. D. et al. Hydrogen bonds in liquid water are broken only fleetingly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 13019-13022, 2005.
50. LIU, Y. C. et al. Diffusion dynamics of water controlled by topology of potential energy surface inside carbon nanotubes. **Physical Review B**, v. 77, p. 125438, 2008.
51. PAWLUS, S.; KHOMODADADI, S.; SOLOKOV, A. P. Conductivity in hydrated proteins: no signs of fragile-to-strong crossover. **Physical review letters**, v. 100, p. 108103, 2008.
52. HAN, S.; KUMAR, P.; STANLEY, H. E. Absence of a diffusion anomaly of water in the direction perpendicular to hydrophobic nanoconfining walls. **Physical review E**, v. 77, p. 30201, 2008.
53. CHEN, Q. et al. Identification of endohedral water in single-walled carbon nanotubes by ¹H NMR. **Nano Letters**, v. 8, p. 1902-1905, 2008.
54. GIOVAMBATTISTA, N. et al. Hydrophobicity of protein surfaces: separating geometry from chemistry. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 105, p. 2274, 2008.
55. ANGELL, C. A. Insights into phases of liquid water from study of its unusual glass-forming properties. **Science**, v. 319, p. 582, 2008.
56. SWENSON, J.; JANSSON, H.; BERGMAN, R. Relaxation processes in supercooled confined water and implications for protein dynamics. **Physical review letters**, v. 96, p. 247802, 2006.

57. CHEUNG, M. S.; GARCIA, A. E.; ONUCHIC, J. N. Protein folding mediated by solvation: water expulsion and formation of the hydrophobic core occur after the structural collapse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 685-690, 2002.
58. BALL, P. Water as an Active Constituent in Cell Biology. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 74-108, 2008.
59. FERNÁNDEZ, A.; SCHERAGA, H. A. Insufficiently dehydrated hydrogen bonds as determinants of protein interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 113-118, 2003.
60. SMOLIN, N. et al. Properties of spanning water networks at protein surfaces. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, p. 10995-11005, 2005.
61. LI, Z.; LAZARIDIS, T. The effect of water displacement on binding thermodynamics: concanavalin. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, p. 662-670, 2005.
62. BEN-NAIM, A. Molecular recognition - viewed through the eyes of the solvent. **Biophysical chemistry**, v. 101-102, p. 309-319, 2002.
63. LIN, J.; BALABIN, I. A.; BERATAN, D. N. The nature of aqueous tunneling pathways between electron-transfer proteins. **Science**, v. 310, p. 1311-1313, 2005.
64. CUKIERMAN, S. Et tu, Grotthuss! and other unfinished stories. **Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics**, v. 1757, p. 876-885, 2006.
65. ALBISER, G.; LAMIRI, A.; PREMILAT, S. The A-B transition: temperature and base composition effects on hydration of DNA. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 28, p. 199-203, 2001.
66. ARAI, S. et al. Complicated water orientations in the minor groove of the B-DNA decamer d(CCATTAATGG)₂ observed by neutron diffraction measurements. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 3017-3024, 2005.
67. FUXREITER, M. et al. Interfacial water as a "hydration fingerprint" in the noncognate complex of BamHI. **Biophysical Journal**, v. 89, p. 903-911, 2005.
68. BALL, P. Life's matrix: Water in the cell. **Cellular and Molecular Biology**, v. 47, p. 717-720, 2001.
69. YE, M. et al. Confined Water Nanofilm Promoting Nonenzymatic Degradation of DNA Molecules. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, p. 2754-2758, 2011.
70. BELTON, P. S. Nuclear magnetic resonance studies of the hydration of proteins and DNA. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 89, p. 993-998, 2000.
71. DASTIDAR, S. G.; MUKHOPADHYAY, C. Structure, dynamics, and energetics of water at the surface of a small globular protein: a molecular dynamics simulation. **Physical Review E**, v. 68, p. 021921, 2003.
72. RUFFLE, S. V. et al. Inelastic incoherent neutron scattering studies of water interacting with biological macromolecules. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, p. 564-569, 2002.
73. GARCÍA-MARTIN, M. L.; BALLESTEROS, P.; CERDÁN, S. The metabolism of water in cells and tissues as detected by NMR methods. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 39, p. 41-77, 2001.
74. POLLACK, G. H. **Cells, gels and the engines of life; a new unifying approach to cell function**. Washington: Ebner and Sons Publishers, 2001.
75. HO, M.-W. et al. The liquid crystalline organism and biological water. In: POLLACK, G. H.; CAMERON, I.; WHEATLEY, D. N. **Water and the cell**. Dordrecht: Springer,

- 2006.
76. LING, G. N. **Life at the cell and below-cell level. the hidden history of a functional revolution in biology**. New York: Pacific Press, 2001.
 77. FULLERTON, G. D.; KANAL, K. M.; CAMERON, I. L. On the osmotically unresponsive water compartment in cells. **Cell Biology International**, v. 30, p. 74-77, 2006.
 78. MCINTYRE, G. I. Cell hydration as the primary factor in carcinogenesis: a unifying concept. **Medical hypotheses**, v. 30, p. 74-77, 2006.
 79. ATIHÉ, M. M. **Redução de processo inflamatório com aplicação de laser de arseneto de gálio alumínio (x=830nm) em pós-operatório de exodontias de terceiros molares inferiores inclusos ou semi-inclusos**. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2002.
 80. BECHARA, Z. H.; SZABÓ, M. P. J. O processo inflamatório: Alterações vasculares e mediação química. **FCAV-UNESP Jaboticabal**. Disponível em: <<http://www.fcav.unesp.br/download/deptos/patologia/bechara/inflamacao1.pdf>>. Acesso em: 28 agosto 2010.
 81. NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, p. 846, 2002.
 82. SMITH, C.; MARKS, A.; LIEBERMAN, M. **Basic Medical Biochemistry - A Clinical Approach**. 2. ed. ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
 83. CARVALHO, L. F. C. S. **Análise ex vivo de hiperplasia fibrosa inflamatória de mucosa jugal por espectroscopia FT-Raman**. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. São José dos Campos. 2008.
 84. KANN, M.; LEWITTER, F. (Eds.). **Translational Bioinformatics**. [S.l.]: PLOS Computational Biology, 2013.
 85. RUTTENBERG, A. E. A. Advancing translational research with the Semantic Web. **BMC Bioinformatics**, v. 8 (Suppl 3), p. 1-16, 2007. ISSN S2.
 86. INSTITUTE FOR SYSTEMS BIOLOGY. Peptide Atlas. Disponível em: <<http://www.peptideatlas.org/>>. Acesso em: 20 jul. 2013.
 87. HÖLTJE, H. -D. et al. **Molecular Modeling - Basic Principles and Applications**. 2. ed. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2003.
 88. NOBELPRIZE.ORG. Additional background material on the Nobel Prize in Chemistry 1998. **Nobelprize.org**, 1998. Disponível em: <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1998/advanced-chemistryprize1998.pdf#search='dft'>. Acesso em: 25 nov. 2014.
 89. BUENO, W. A. **Ligação de hidrogênio**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil: Editora da Universidade de São Paulo, 1978.
 90. SIEBERT, F.; HILDEBRANDT, P. **Vibrational Spectroscopy in Life Science**. Weinheim: WILEY-VCH, 2008.
 91. WILLARD, H. H. et al. Espectroscopia de Raman. In: WILLARD, H. H., et al. **Métodos Instrumentales de Análisis**. 2. ed. México: Compañía Editorial Continental, 1986.
 92. SMEKAL, A. The quantum theory of dispersion. **Naturwissenschaften**, v. 11, p. 873, 1923.
 93. RAMAN, C. V. A new radiation. **Indian Journal of Physics**, v. 2, p. 1, 1928.
 94. SADLEJ, J. et al. Theoretical Study of Structure and Spectra of Cage Clusters (H₂O)_n, n = 7–10. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 103, p. 4933, 1999.

95. KAST, R. E. et al. Raman Spectroscopy Can Differentiate Malignant Tumors from Normal Breast Tissue and Detect Early Neoplastic Changes in a Mouse Model. **Biopolymers**, v. 89, p. 235-241, 2007.
96. NIELSEN, O. F. Low Frequency spectroscopic studies of intermolecular vibrational energy transfer in liquids. **Annual Reports on the Progress of Chemistry, Section C: Physical Chemistry**, v. 93, p. 57, 1997.
97. COLAIANNI, S. E. M. et al. Raman spectroscopic studies of some biochemically relevant molecules. **Vibrational Spectroscopy**, v. 9, p. 111-120, 1995.
98. MAEDA, Y.; KITANO, H. The structure of water in polymer systems as revealed by Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 51, p. 2433-2446, 1995.
99. PASTORCZAK, M.; KOZANECKI, M.; ULANSKI, J. Raman Resonance Effect in Liquid Water. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 112, p. 10705-10707, 2008.
100. KRISHNAMURTHY, S.; BANSIL, R.; WIAFE-AKENTEN, J. Low-frequency Raman spectrum of supercooled water. **Journal of Chemical Physics**, v. 79, p. 5863-5870, 1983.
101. NIELSEN, O. F. The structure of liquid water. A low-frequency (10-400cm⁻¹) raman study. **Chemical Physics Letters**, v. 60, p. 515-517, 1979.
102. NIELSEN, O. F. Low frequency spectroscopic studies of interactions in liquids. **Annual Reports on the Progress of Chemistry, Section C: Physical Chemistry**, v. 90, p. 3, 1993.
103. BELL, W.; BOOKSH, K. S.; MYRICK, M. L. Monitoring anhydride and acid conversion in supercritical/hydrothermal water by in situ fiber-optic raman spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 332-339, 1998.
104. RICCI, M. A.; SIGNORELLI, G.; MAZZACURATI, V. Raman spectra of water in the translational and librational regions. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 2, p. SA183-187, 1990.
105. LI-CHAN, E. C. Y. The applications of Raman spectroscopy in food science. **Trends in Food Science Technology**, v. 7, p. 361-370, 1996.
106. MOILANEN, D. E. et al. Ion–water hydrogen-bond switching observed with 2D IR vibrational echo chemical exchange spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 375-380, 2009.
107. CYBULSKI, H.; SADLEJ, J. On the calculations of the vibrational Raman spectra of small water clusters. **Chemical Physics**, v. 342, p. 163–172, 2007.
108. ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. **Computer simulation of liquids**. Oxford: Oxford University Press, 1989.
109. MARTIN, R. M. **Electronic structure: basic theory and practical methods**. New York: Cambridge University Press, 2004.
110. RAPAPORT, D. C. **The art of molecular dynamics simulation**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University, 2004.
111. KOCH, W.; HOLTHAUSEN, M. C. **A Chemist's Guide to Density Functional Theory**. Weinheim (Federal Republic of Germany): WILEY-VCH Verlag GmbH, 2001.
112. HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous electron gas. **Physical Review B**, v. 136, p. 864, 1964.
113. KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. **Physical Review A**, v. 140, p. 1133, 1965.
114. SCHILICK, T. **Molecular modelling and simulation: an interdisciplinary guide**. New

- York, USA: Springer, 2002.
115. SPRIK, M.; HUTTER, J.; PARRINELLO, M. Ab initio molecular dynamics simulation of liquid water: Comparison of three gradient-corrected density functionals. **The Journal of Chemical Physics**, v. 105, p. 1142-1152, 1996.
 116. SILVESTRELLI, P. L.; PARRINELLO, M. Water Molecule Dipole in the Gas and in the Liquid Phase. **Physical Review Letters**, v. 82, p. 3308-3311, 1999.
 117. GEISSLER, P. L. et al. Autoionization in liquid water. **Science**, v. 291, p. 2121-2124, 2001.
 118. GROSSMAN, J. C. et al. Towards an assessment of the accuracy of density functional theory for first principles simulations of water. **Journal of Chemical Physics**, v. 120, p. 300, 2004.
 119. ALLESCH, M. et al. A first principles simulation of rigid water. **Journal of Chemical Physics**, v. 120, p. 5192, 2004.
 120. PEDROZA, L. S.; SILVA, A. J. R. Adiabatic intramolecular movements for water systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 128, p. 104311, 2008.
 121. CHEN, B.; XING, J.; SIEPMANN, J. I. Development of polarizable water force fields for phase equilibrium calculations. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, p. 2391-2401, 2000.
 122. PEDROZA, L. S. **Método de Monte Carlo utilizando cálculos de energia total ab initio**. Instituto de Física da USP, São Paulo: [s.n.], 2006. 142f. p.
 123. MAKKONEN, L. Surface melting of ice. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 101, p. 6196-6200, 1997.
 124. HARRINGTON, S. et al. Liquid-liquid phase transition: evidence from simulations. **Physical Review Letters**, v. 78, p. 2409-2412, 1997.
 125. LUZAR, A.; CHANDLER, D. Effect of environment on hydrogen bond dynamics in liquid water. **Physical review letters**, v. 76, p. 928-931, 1996.
 126. PRENDERGAST, D.; GALLI, G. X-Ray absorption spectra of water from first principles calculations. **Physical Review Letters**, v. 96, p. 215502, 2006.
 127. VAITHEESWARAN, S. et al. Water in nonpolar cavities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 17002-17005, 2004.
 128. GREGORY, J. K.; CLARY, D. C. Structure of water clusters. The contribution of the many-body forces, monomer relaxation, and vibrational zero-point energy. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 105, p. 6626-6633, 1996.
 129. BUCK, U. et al. Structure and Spectra of Three-Dimensional (H₂O)_n Clusters, n=8, 9, 10. **Physical Review Letters**, v. 80, p. 2578, 1998.
 130. TUCKERMAN, M. Lectures notes. **Quantum Chemistry and Dynamics**. Disponível em: <<http://www.nyu.edu/classes/tuckerman/quant.mech/lectures.html>>. Acesso em: 26 maio 2009.
 131. BORN, M.; OPPENHEIMER, J. R. Zur Quantentheorie der Molekeln. **Ann. Physic**, v. 84, p. 458, 1927.
 132. ATKINS, P.; FRIEDMAN, R. **Molecular Quantum Mechanics**. 4 ed. ed. New York: Oxford University Press, 2005. 250-253 p.
 133. VON LILIENFELD, O. A. et al. Performance of optimized atom-centered potentials for weakly bonded systems using density functional theory. **Physical Review B**, v. 71, p. 195119, 2005.

134. LIN, I.-C. et al. Library of dispersion-corrected atom-centered potentials for generalized gradient approximation functionals: Elements H, C, N, O, He, Ne, Ar, and Kr. **Physical Review B**, v. 75, p. 205131, 2007.
135. THE CPMD CONSORTIUM. **CPMD Car-Parrinello Molecular Dynamics: An ab initio Electronic Structure and Molecular Dynamics Program**. [S.l.]: [s.n.], 2008.
136. CARVALHO, L. F. C. S. et al. Diagnosis of inflammatory lesions by high-wavenumber FT-Raman spectroscopy. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 130, p. 1221-1229, 2011.
137. MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. U. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 42, p. 493 - 541, 2007.
138. HINNES, W. W. **Probabilidade e Estatística na Engenharia**. 4.ed. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006.
139. JORGENSEN, W. L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **Journal of Chemical Physics**, v. 79, p. 926, 1983.
140. WALES, D. J.; HODGES, M. P. Global minima of water clusters (H₂O)_n, n ≤ 21, described by an empirical potential. **Chemical Physics Letters**, v. 286, p. 65-72, 1998.
141. LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review B**, v. 37, p. 785, 1988.
142. BELLA, J.; BRODSKY, B.; BERMAN, H. M. Hydration structure of a collagen peptide. **Structure**, v. 3, p. 893-906, 1995.
143. HALGREN, T. A. Merck Molecular Force Field. MMFF VI. MMFF94s Option for Energy Minimization Studies. **Journal of Computational Chemistry**, v. 20, p. 720-729, 1999.
144. AVOGADRO. **AVOGADRO**. Disponível em: <<http://avogadro.openmolecules.net>>. Acesso em: 22 fev. 2011.
145. HALGREN, T. A. MMFF VI. MMFF94s Option for Energy Minimization Studies. **Journal of Computational Chemistry**, v. 20, p. 720-729, 1999. ISSN 7.
146. VARETTO, U. **Molekel 5.4.0.8**. Manno (Switzerland): Swiss National Supercomputing Centre.
147. FRISCH, M. J. E. A. **Gaussian 03, Revision C.02**. [S.l.]: [s.n.], 2004. Disponível em: <<http://www.gaussian.com>>.
148. PARK, Y. J. et al. Theoretical study on structures and energetics of small water clusters. **Bulletin of Korean Chemical Society**, v. 3, p. 50-55, 1982.
149. WANG, L. et al. First-Principles Study of Water Chains Encapsulated in Single-Walled Carbon Nanotube. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, p. 5368–5375, 2009.
150. LEACH, A. R. Empirical Force Field Models: Molecular Mechanics. In: LEACH, A. R. **Molecular Modelling: Principles and Applications**. 2 ed. ed. London: Pearson Education, 2001.
151. **FITYK**: y(x) curve fitting and data analysis. Disponível em: <<http://www.unipress.waw.pl/fityk/>>. Acesso em: 24 abril 2009.
152. GELMAN-CONSTANTIN, J. et al. Structural transitions and dipole moment of water clusters (H₂O)_{n=4–100}. **J. Chem. Phys.**, 2010. 024506.
153. SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. Interstrand Dipole-Dipole Interactions Can Stabilize the Collagen Triple Helix. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 26, p. 22905–22912, 2011.
154. FATHIMAA, N. N. et al. Structure and dynamics of water in native and tanned collagen

- fibers: Effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, p. 590-596, 2010.
155. TAREK, M.; TOBIAS, D. J. Role of Protein-Water Hydrogen Bond Dynamics in the Protein Dynamical Transition. **Physical Review Letters**, v. 88, p. 138101-1, 2002.
 156. AHMED, Z. et al. State-resolved THz spectroscopy and dynamics of crystalline peptide-water systems. **Faraday Discussions**, v. 150, p. 175-192, 2011.
 157. CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Biochemistry**. 7th. ed. Canada: Cengage Learning, 2012.
 158. GREGORY, J. K. et al. The Water Dipole Moment in Water Clusters. **Science**, v. 275, p. 814-817, 1997.