



**Universitat  
Autònoma  
de Barcelona**

**Escola de Doctorat i Formació Continuada  
Departament de Química**

**CICLODEXTRINES GEGANTS.  
CICLODEXTRINES MODIFICADES AMB  
GRUPS ANCORATS: DÍMERS I EFECTE  
EN SISTEMES D'INTERÈS BIOLÒGIC.  
ESTUDIS COMPUTACIONALS.**



**Itziar Maestre Asenjo  
Desembre 2004**

---

Aquesta memòria d'investigació, presentada per optar al grau de Doctor titulada "Ciclodextrines gegants. Ciclodextrines modificades amb grups ancorats: Dímers i efecte en sistemes d'interès biològic. Estudis computacionals" ha estat realitzada en els laboratoris del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona per Itziar Maestre Asenjo sota la direcció del professor Carles Jaime Cardiel.

Bellaterra, Desembre 2004

Vist i plau

Itziar Maestre Asenjo

Carles Jaime Cardiel  
Catedràtic de Química Orgànica

---

Aquest treball de recerca s'ha dut a terme gràcies als aports financers de:

Projecte: "Avances en el reconocimiento quiral. Nuevos disolventes de solvatación quiral y asociación supramolecular", PPQ2000-0369.

Projecte: "Compuestos difuncionales y macrociclos con propiedades enantiodiferenciadoras. Preparación y estudio estructural, teórico, y experimental", BQU2003-01231.

Contractes de professor associat de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Contracte professor ajudant de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Portada: Representació esquemàtica de la forma de la ciclodextrina de 26 unitats de glucosa.

Grup de Química Orgànica Estructural  
Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona  
Edifici Cn. 08193 Bellaterra  
Telf: ++34-935811266 Fax: ++34-935811265

*“Caminante no hay camino se hace camino al andar”*

*J.M Serrat*

A tots aquells que m'han donat una oportunitat.  
Als que m'han ensenyat i als que m'han ajudat.  
Als que m'han fet costat.  
Amb els que hem arribat fins al final i amb els que  
comencem de nou.  
Als que m'escolten i a qui escolto.  
Als que sempre tenen un somriure per a mi.  
Als que ja no són aquí.  
Als que m'estimen i a qui estimo.  
Amb els que encara continuem somiant desperts.

MOLTES GRÀCIES A TOTS VOSALTRES

## ÍNDEX

<b><u>I. RESUM I OBJECTIUS.....</u></b>	<b>13</b>
<b>1 RESUM I OBJECTIUS.....</b>	<b>15</b>
<b><u>II. INTRODUCCIÓ.....</u></b>	<b>17</b>
<b>2 CICLODEXTRINES.....</b>	<b>19</b>
2.1 BREU HISTÒRIA DE LES CICLODEXTRINES.....	20
2.2 NOMENCLATURA.....	21
2.2.1 Nomenclatura de cadenes de polisacàrids.....	23
2.3 CARACTERÍSTIQUES ESTRUCTURALS.....	23
2.3.1 La unitat de glucosa.....	23
2.3.2 Ciclodextrines comunes.....	25
2.4 CICLODEXTRINES GEGANTS.....	29
2.4.1 CA9, CA10 i CA14.....	29
2.4.2 CA26.....	32
2.5 PROPIETATS FÍSIIQUES I PARÀMETRES ESTRUCTURALS.....	33
2.6 CICLODEXTRINES MODIFICADES.....	37
2.6.1 Ciclodextrines persubstituïdes.....	37
2.6.2 Ciclodextrines amb fragments orgànics ancorats.....	38
<b>3 PROTEÏNES DE XOC TÈRMIC.....</b>	<b>40</b>
3.1 BREU VISIÓ HISTÒRICA.....	40
3.2 HSP70.....	41
3.2.1 Domini d'unió del substrat.....	42
3.2.2 Domini d'unió de l'ATP.....	43
<b>4 ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE LA TRIPSINA.....</b>	<b>47</b>
4.1 MECANISME CATALÍTIC.....	48

**III. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....51**

<b>5</b>	<b>ANÀLISI CONFORMACIONAL DE LES CICLOAMILOSES.....</b>	<b>53</b>
5.1	INTRODUCCIÓ AL PROBLEMA.....	53
5.2	DETERMINACIÓ DEL NOMBRE DE CONFÒRMERS AL LLARG DE LA SIMULACIÓ DE DINÀMICA MOLECULAR.....	57
5.3	ANÀLISI CONFORMACIONAL DE LES CICLOAMILOSES AMB EL CAMP DE FORCES PARM94.....	58
5.3.1	Anàlisi conformacional de la CA14.....	58
5.3.2	Anàlisi conformacional de la CA21.....	60
5.3.3	Anàlisi conformacional de la CA26.....	61
5.3.4	Anàlisi conformacional de la CA28.....	62
5.4	ANÀLISI CONFORMACIONAL DE LES CICLOAMILOSES AMB EL CAMP DE FORCES PARM99.....	63
5.4.1	Anàlisi conformacional de les ciclodextrines comunes.....	63
5.4.2	Anàlisi conformacional de la CA14.....	64
5.4.3	Anàlisi conformacional de la CA21.....	66
5.4.4	Anàlisi conformacional de la CA26.....	68
5.4.5	Anàlisi conformacional de la CA28.....	70
5.5	ANÀLISI CONFORMACIONAL DE LES CICLOAMILOSES AMB EL CAMP DE FORCES GLYCAM 2000A.....	72
5.5.1	Anàlisi conformacional de les ciclodextrines comunes.....	73
5.5.2	Anàlisi conformacional de la CA14.....	73
5.5.3	Anàlisi conformacional de la CA21.....	75
5.5.4	Anàlisi conformacional de la CA26.....	77
5.5.5	Anàlisi conformacional de la CA28.....	79
5.6	ANÀLISI CONFORMACIONAL DE LES CICLOAMILOSES AMB EL CAMP DE FORCES MM3*.....	81
<b>6</b>	<b>CARACTERITZACIÓ ESTRUCTURAL DE LES CICLOAMILOSES.....</b>	<b>82</b>
6.1	ANÀLISI DELS PARÀMETRES GEOMÈTRICS.....	82
6.1.1	Anàlisi de les trajectòries obtingudes amb el camp de forces parm94.....	83
6.1.2	Anàlisi de les trajectòries obtingudes amb els camps de forces parm99, glycam 2000a i MM3*.....	85
6.2	ANÀLISI DELS ENLLAÇOS D'HIDROGEN.....	104
6.2.1	Anàlisi dels enllaços d'hidrogen amb el camp de forces parm99.....	105
6.2.2	Anàlisi dels enllaços d'hidrogen amb el camp de forces glycam 2000a.....	106
6.3	ANÀLISI DELS DESCRIPTORS DE FORMA.....	108

<b>7 AVALUACIÓ DELS CAMPS DE FORCES PER MODELITZAR LES CICLOAMILOSES</b>	<b>111</b>
7.1 PARÀMETRES DE <i>STRETCHING</i> I <i>BENDING</i> .....	111
7.2 PARÀMETRES DE TORSIÓ.....	113
7.3 PARÀMETRES DE VAN DER WAALS.....	116
7.4 RESUM FINAL DE L'ESTUDI ESTRUCTURAL DE LES CICLOAMILOSES.....	119
<b>8 ESTUDI CONFORMACIONAL DELS DÍMERS DE LA 3-O-(2-METILNAFTIL)-b-CICLODEXTRINA</b> .....	<b>121</b>
8.1 PRECEDENTS I INTRODUCCIÓ AL PROBLEMA.....	121
8.2 ANÀLISIS DELS DIEDRES.....	123
8.2.1 Anàlisi conformacional del monòmer.....	124
8.2.2 Anàlisi conformacional del dímer HHi.....	126
8.2.3 Anàlisi conformacional del dímer HHp.....	128
8.2.4 Anàlisi conformacional del dímer HT.....	131
8.3 ANÀLISIS DELS ENLLAÇOS D'HIDROGEN.....	134
8.3.1 Anàlisi dels enllaços d'hidrogen en fase gas.....	134
8.3.2 Anàlisi dels enllaços d'hidrogen en solució aquosa.....	137
8.3.3 Anàlisi de les funcions de distribució radial.....	139
8.4 ESTUDI DELS TERMES ENERGÈTICS.....	142
8.5 RESUM DELS RESULTATS.....	143
<b>9 EFECTE D'UNA b-CICLODEXTRINA MODIFICADA EN LA DEGRADACIÓ DE L'HSP70 PER LA TRIPSINA</b> .....	<b>144</b>
9.1 INTRODUCCIÓ AL PROBLEMA.....	144
9.2 CERCA DELS POSSIBLES PUNTS D'HIDRÒLISI DE LA PROTEÏNA.....	147
9.3 ANÀLISI CONFORMACIONAL DE LA 6 <sup>A</sup> ,6 <sup>D</sup> -BIS(DANSIL-GLY)-β-CICLODEXTRINA.....	151
9.4 ANÀLISI CONFORMACIONAL DE L'HSP70 SENSE I AMB ATP COMPLEXAT.....	154
9.4.1 Anàlisi estructural de l'Hsp70 sense i amb ATP complexat.....	155
9.4.2 Anàlisi geomètrica de l'Hsp70 sense i amb ATP complexat.....	156
9.5 PUNTS DE COMPLEXACIÓ ENTRE LA CICLODEXTRINA I LA PROTEÏNA.....	159
9.6 RESUM DELS RESULTATS.....	163
<b><u>IV. CONCLUSIONS</u></b> .....	<b>165</b>
<b>10 CONCLUSIONS</b> .....	<b>167</b>

---

<b>V. METODOLOGIA.....</b>	<b>169</b>
<b>11 MÈTODES DE CÀLCUL.....</b>	<b>171</b>
11.1 MECÀNICA MOLECULAR.....	173
11.1.1 Camp de forces MM3.....	176
11.1.2 Camp de forces AMBER.....	180
11.1.3 Camp de forces CHARMM.....	181
<b>12 MÈTODES DE CERCA CONFORMACIONAL.....</b>	<b>183</b>
12.1 DINÀMICA MOLECULAR.....	184
12.2 MÈTODE MONTE CARLO .....	186
12.2.1 Algorisme de MC.....	187
12.3 ALGORITMES GENÈTICS.....	189
<b>13 MÈTODES DE SOLVATACIÓ.....</b>	<b>190</b>
13.1 MÈTODES IMPLÍCITS DE SOLVATACIÓ.....	190
13.2 MÈTODES EXPLÍCITS DE SOLVATACIÓ .....	190
13.2.1 Condicions periòdiques de contorn.....	191
13.2.2 Condicions estocàstiques .....	192
<b>14 AMBER.....</b>	<b>193</b>
14.1 PROGRAMES PREPARATORIS.....	195
14.1.1 Obtenció de les càrregues. Metodologia RESP.....	195
14.1.2 LEaP.....	195
14.1.3 Antechamber.....	196
14.2 PROGRAMES ENERGÈTICS.....	197
14.2.1 SANDER.....	197
14.2.2 Gibbs, nmode i roar.....	197
14.3 PROGRAMES D'ANÀLISI.....	197
14.3.1 Anal.....	197
14.3.2 Ptraj.....	198
14.3.3 Carnal.....	198
14.3.4 MM/PBSA.....	198
<b>15 CHARMM.....</b>	<b>200</b>
15.1 GENERACIÓ DE NOUS SISTEMES.....	200



**VI. APÈNDIX.....203**

<b>APÈNDIX A: TAULES DE NOMENCLATURA.....</b>	<b>205</b>
A.1 NOMENCLATURA DE LES ESTRUCTURES OBTINGUDES AMB EL CAMP DE FORCES PARM94.....	205
A.2 NOMENCLATURA DE LES ESTRUCTURES OBTINGUDES AMB EL CAMP DE FORCES PARM99.....	206
A.3 NOMENCLATURA DE LES ESTRUCTURES OBTINGUDES AMB EL CAMP DE FORCES GLYCAM 2000A.....	207
A.4 NOMENCLATURA DE LES ESTRUCTURES OBTINGUDES AMB EL CAMP DE FORCES MM3*.....	208
<b>APÈNDIX B: PROGRAMES FORTRAN COMB.F I SUMAFRAGS.F.....</b>	<b>209</b>
B.1 COMB.F.....	209
B.2 SUMAFRAGS.F.....	210
<b>APÈNDIX C: CAPÍTOLS REALITZATS AMB AMBER.....</b>	<b>213</b>
C.1 CÀLCUL DE LES CÀRREGUES: OPTIMITZACIÓ I CÀLCUL DEL POTENCIAL ELECTROSTÀTIC AMB GAUSSIAN.....	213
C.1.1 Càrregues atòmiques de les molècules estudiades amb AMBER.....	213
C.2 TOPOLOGIA I FITXER <i>PREP</i> DEL RESIDU DE GLUCOSA.....	216
C.3 EXEMPLE DE FITXER D'ENTRADA DE LEAP.....	217
C.4 EXEMPLE DE FITXERS PER MINIMITZAR L'ENERGIA.....	218
C.5 EXEMPLE DE FITXERS PER REALITZAR LES SIMULACIONS DE DINÀMICA MOLECULAR.....	219
C.5.1 Simulació de dinàmica molecular de les ciclodextrines.....	219
C.5.2 Simulació de dinàmica molecular de l'HSP70.....	222
C.6 EXEMPLE DE FITXERS PER REALITZAR LES ANÀLISIS DE LES SIMULACIONS DE DINÀMICA MOLECULAR.....	223
C.6.1 Exemples d'anàlisis realitzades amb ptraj.....	223
C.6.2 Exemples d'anàlisis realitzades amb carnal.....	224
<b>APÈNDIX D: CAPÍTOLS REALITZATS AMB CHARMM.....</b>	<b>230</b>
D.1 PARAMETRITZACIÓ.....	230
D.2 FITXER DE TOPOLOGIA DE RESIDUS (RTF).....	233
D.2.1 Topologia de la glucosa.....	233
D.2.2 Topologia de residus d'ajust ( <i>patches</i> ).....	235

D.3 CREACIÓ D'UN NOU SEGMENT.....	235
D.4 FITXER PER SOLVATAR EL SOLUT.....	236
D.5 EXEMPLE DE FITXER PER REALITZAR UNA SIMULACIÓ DE DINÀMICA MOLECULAR .....	237

## **I. RESUM I OBJECTIUS**

---



## 1 RESUM I OBJECTIUS

Quan s'inicia el doctorat dins de l'àmbit de la química computacional, s'estableix tant el tema a estudiar com la metodologia a emprar. No obstant, una tesi no és independent del seu entorn, i és habitual que al llarg dels quatre anys de doctorat tant el tema com la metodologia emprada variï, ja sigui pels nous interessos que puguin sorgir dins del propi grup de recerca, com per la feina realitzada per altres membres del grup o per altres grups d'investigació.

En el nostre grup de recerca, **les ciclodextrines** és un tema comú en totes les línies d'investigació, però l'estudi de les ciclodextrines comunes ha esdevingut un tema esgotat i per aquest motiu, en els darrers anys s'ha iniciat l'estudi de nous sistemes ciclodextrínics com per exemple les ciclodextrines gegants, els carcerands i els rotaxans, i també s'ha iniciat l'estudi de ciclodextrines modificades. Existeix una gran varietat de metodologies que es poden emprar per estudiar els sistemes esmentats, però entre totes cal destacar **la dinàmica molecular** la qual proporciona resultats acurats en un temps de computació raonable. Així doncs, aparentment podria semblar que els temes tractats en la present tesi doctoral són totalment independents un de l'altre, no obstant, en tots ells s'estudien derivats de ciclodextrines o ciclodextrines modificades i a més, la dinàmica molecular és la metodologia emprada comú en tots ells, per tant, podríem dir que aquesta és el fil conductor d'unió.

El primer tema tractat, l'estudi de les ciclodextrines gegants, va sorgir com a continuació dels estudis iniciats pel doctor Ivan Beà dins del nostre grup d'investigació al final de la seva tesi doctoral. En aquest cas, s'ha emprat la mateixa metodologia (simulacions de dinàmica molecular) però s'han millorat les anàlisis realitzades anteriorment, per obtenir informació més precisa d'aquests sistemes. El segon tema a estudiar, els dímers de la 3-O-(2-metilnaftil)- $\beta$ -ciclodextrina, va ser l'inici dels estudis de les ciclodextrines modificades amb grups ancorats dins del nostre grup de recerca i es va dur a terme en col·laboració amb el grup del professor K. J. Naidoo de la *University of Cape Town* de Sud-àfrica. En aquest cas, es va mantenir la metodologia, però el programa utilitzat va ser un altre diferent al que fem habitualment en el nostre grup de recerca. Finalment, el darrer tema a estudiar ha suposat l'inici d'una nova via d'investigació dins del nostre grup de recerca. S'ha treballat amb sistemes d'interès biològic, les proteïnes, on hi ha una ciclodextrina modificada complexada que actua com a amfitrió o *guest* trencant amb la típica química *host-guest*, on les ciclodextrines sempre actuaven com a hostes o *hosts*.

Així doncs, en els següent punts es resumeixen els objectius proposats en la present tesi doctoral:

- ☐ Realitzar un estudi estructural de les ciclodextrines gegants de 14, 21, 26, i 28 unitats de glucosa en fase gas i en solució aquosa com a pas previ per determinar si són capaces de formar complexos d'inclusió i de quin tipus. Estudis de dinàmica molecular amb AMBER i Macromodel.
- ☐ Avaluar la influència del camp de forces en l'estudi de les ciclodextrines gegants i trobar-ne un que proporcioni resultats coherents amb les dades experimentals existents. Simulacions realitzades amb els camps de forces parm94, parm99, glycam 2000a i MM3\*.
- ☐ Desenvolupar una nova nomenclatura per descriure la conformació relativa dels monòmers dins d'una cadena de polisacàrids i identificar seqüències que determinin motius estructurals concrets.
- ☐ Estudiar i caracteritzar els tres dímers de la 3-O-(2-metilnaftil)- $\beta$ -ciclodextrina proposats experimentalment per trobar-ne el més estable. Estudis de dinàmica molecular amb CHARMM.
- ☐ Avaluar la influència de la 6<sup>A</sup>,6<sup>D</sup>-bis(dansil-Gly)- $\beta$ -ciclodextrina modificada sobre la degradació per part de la tripsina d'una proteïna de xoc tèrmic, l'Hsp70 humana. Estudis de dinàmica molecular amb AMBER i *docking* amb el programa Autodock.

## **II. INTRODUCCIÓ**

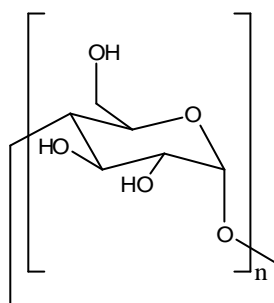
---





## 2 CICLODEXTRINES

Les ciclodextrines, o cicloamiloses, són oligosacàrids cíclics d' $\alpha$ -D-glucopiranosos. A la natura, els enzims glicosiltransferases són capaços d'hidrolitzar una o més voltes d'hèlix de la fracció d'amilosa, les quals es poden tornar a unir pels seus extrems per formar les ciclodextrines (Figura 2-1).



**Figura 2-1 Representació esquemàtica de les ciclodextrines.**

Donat que les glicosiltransferases són enzims poc específics, es formen diferents tipus de ciclodextrines que es diferencien entre si pel nombre d'unitats de monosacàrid que contenen. Les més habituals són l' $\alpha$ -, la  $\beta$ -, i la  $\gamma$ -ciclodextrina que contenen 6, 7, i 8 unitats de glucosa respectivament. Aquestes han estat àmpliament estudiades i es coneixen moltes de les seves propietats estructurals, algunes de les quals es comentaran més endavant.

La baixa especificitat de les glicosiltransferases és la responsable de què en la hidròlisi de l'amilosa també es formen altres fraccions minoritàries que contenen major nombre de glucoses. En la darrera dècada ha sorgit un especial interès per l'estudi d'aquestes fraccions minoritàries i actualment ja es coneixen les estructures de raig-X de les ciclodextrines de 9,<sup>1</sup> 10,<sup>2</sup> 14,<sup>3</sup> i 26<sup>4</sup> unitats de glucosa.

<sup>1</sup> Fujiwara, T.; Tanaka, N.; Kobayashi, S., *Chem. Lett.*, **1990**, (5), 739-742.

<sup>2</sup> Ueda, H.; Endo, T.; Nagase, H.; Kobayashi, S.; Nagai, T., *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, **1996**, 25(1-3), 17-20.

<sup>3</sup> Harata, K.; Endo, T.; Ueda, H.; Nagai, T., *Supramolecular Chemistry*, **1998**, 9(2), 143-150.

<sup>4</sup> Gessler, K.; Uson, I.; Takaha, T.; Krauss, N.; Smith, S.M.; Okada, S.; Sheldrick, G.M.; Saenger, W., *Chemistry*, **1996**, 96(8), 4246-4251.

A més a més, s'han preparat ciclodextrines de més de 100 unitats de glucosa per acció d'enzims desproporcionadors sobre l'amilosa.<sup>5</sup>

## 2.1 BREU HISTÒRIA DE LES CICLODEXTRINES

A l'any 1891 Villier va descobrir un material cristal·lí provinent de la degradació bacterial de l'amilosa de la patata pel *Bacillus amylobacter*,<sup>6</sup> al qual va anomenar "celulosina". Aquest descobriment va ser la primera referència publicada del que anys més tard es denominaria com a ciclodextrina.

Uns anys més tard, Schardinger, mentre investigava aliments fets malbé, va trobar dues estructures cristal·lines que va anomenar  $\alpha$ - i  $\beta$ -dextrina cristal·lina.<sup>7</sup> Al 1935 Freudenberg i Jacobi van desenvolupar un mètode relativament simple de purificació de l' $\alpha$ -dextrina, la  $\beta$ -dextrina i d'una nova fracció: la  $\gamma$ -dextrina.<sup>8</sup> Un any més tard, els mateixos Freudenberg i col·laboradors,<sup>9</sup> van proposar l'estructura cíclica d'aquestes molècules, la qual es va confirmar posteriorment en diversos estudis.<sup>10</sup>

Malgrat tots aquests desenvolupaments, les ciclodextrines van trigar molt a aparèixer a la indústria ja que el seu preu era prohibitiu. Quan es va trobar un mètode de preparació industrial, van aparèixer més treballs i patents sobre l'ús de les ciclodextrines. Actualment, la síntesi industrial de la  $\beta$ -ciclodextrina es duu a terme amb el *Bacillus n° 38-2*; la seva glicosiltransferassa és selectiva a aquesta ciclodextrina i s'obté amb un rendiment del 80%, obtenint-ne quantitats molt petites d'altres ciclodextrines.

Els primers indicis de l'existència de les ciclodextrines de més de 8 unitats de glucosa van ser publicats al 1948 per Freudenberg i Cramer.<sup>11</sup> Una dècada més tard, aquests estudis van ser recolzats per French i col·laboradors, els quals van publicar l'existència de ciclodextrines amb 9,

---

<sup>5</sup> Takaha, T.; Yanase, M.; Takata, S.; Okada, S.; Smith, S.M., *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271(6), 2902-2908.

<sup>6</sup> Villier, M.A., *Comptes. Rendus. Acad. Sci.*, **1891**, 112, 536.

<sup>7</sup> Schardinger, F., *Zent. Bacteriol. Parasitenk. Abt. II*, **1911**, 29, 188-197.

<sup>8</sup> Freudenberg, K.; Jacobi, R., *Ann. Chem.*, **1935**, 518, 102-108.

<sup>9</sup> Freudenberg, K.; Blomqvist, G.; Ewald, L.; Soff, K., *Chem. Ber.*, **1936**, 69B, 1258-1266.

<sup>10</sup> French, D., *Adv. Carbohydr. Chem.* **1957**, 12, 189-260.

<sup>11</sup> Freudenberg, K.; Cramer, F., *Z. Naturforsch.*, **1948**, 3b, 464.

10, 11, i 12 unitats de glucosa.<sup>12</sup> Però durant molts anys aquests estudis foren dubtosos donat que, experimentalment no es podien distingir entre les ciclodextrines gegants i les ciclodextrines ramificades. Fins i tot, al 1988 Szejtli, en el seu monogràfic “*Cyclodextrin technology*”,<sup>13</sup> dubtava de l'existència d'aquestes fraccions de major nombre de glucoses.

Va ser a la dècada passada quan es va corroborar l'existència d'aquestes ciclodextrines, i avui en dia es poden preparar en els primers passos de l'acció enzimàtica de les glicosiltransferases del *Bacillus A2-5a* sobre l'amilosa sintètica ciclodextrines en tot el rang, des de la de 9 fins a la de 60 unitats de glucosa. No obstant, es coneix que amb incubacions prolongades s'obté major conversió i el producte final majoritari és la  $\beta$ -ciclodextrina. El mateix succeeix utilitzant les glicosiltransferases del *Bacillus macerans* i del *Bacillus stearothermophilus*, amb la diferència que amb incubacions prolongades s'obté majoritàriament l' $\alpha$ -ciclodextrina.<sup>14</sup>

## 2.2 NOMENCLATURA

El terme ciclodextrina ha estat utilitzat durant molts anys com a terme general per descriure oligosacàrids cíclics de D-glucosa formats per 6, 7, i 8 unitats glicosídiques, i units per enllaços  $\alpha$ -(1-4). Però aquest terme només especifica la natura del sacàrid (dextrosa va ser l'antic sinònim de glucosa) i no conté informació sobre la unió entre sacàrids.<sup>15</sup>

Al 1996 la “*Joint Commission on Biochemical Nomenclature*” va recomanar l'ús d'altres noms semisistemàtics com per exemple ciclomaltohexosa per denominar a l' $\alpha$ -ciclodextrina.<sup>16</sup> Aquesta nomenclatura s'inicia amb el prefix ciclo-, seguit del terme on s'indica la naturalesa de l'enllaç intersacàrid (malto per glucoses unides per enllaços  $\alpha$ -(1-4)), del nombre d'unitats (hexa per sis) i amb la terminació -osa. Però la terminació -osa implica l'existència d'un centre anomèric lliure, el qual no existeix en les ciclodextrines.

---

<sup>12</sup> (a) Pulley, A.O.; French, D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1961**, 5, 11-15. (b) French, D.; Pulley, A.O.; Effenberger, J.A.; Rougvie, M.A.; Abdullah, M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **1965**, 111(1), 153-160.

<sup>13</sup> Szejtli, J., *Cyclodextrin Technology*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, **1988**.

<sup>14</sup> Terada, Y.; Sanbe, H.; Takaha, T.; Kitahata, S.; Koizumi, K.; Okada, S., *Appl. Environ. Microbiol.*, **2001**, 67(4), 1453-1460.

<sup>15</sup> (a) Lichtenthaler, F.W.; Immel, S., *Tetrahedron. Asym.*, **1994**, 5(11), 2045-2060. (b) Immel, S.; Brickmann, J.; Lichtenthaler, F.W., *Liebigs. Ann.*, **1995**, (6), 929-942.

<sup>16</sup> Mc. Naught, A.D., *Carbohydr. Res.*, **1997**, 297(1), 192. (Recomanacions nomenclatura de carbohidrats 1996)

Per aquest motiu, es va proposar una altra nomenclatura sistemàtica, on els oligosacàrids cíclics formats per un únic tipus de residu es poden anomenar amb el prefix ciclo-, seguit d'un sufix multiplicatiu, per exemple hexakis per sis, i del tipus d'unió entre parèntesis, per exemple (1-4), i acabat amb el nom sistemàtic del residu, per exemple  $\alpha$ -D-glicosil. Així doncs, l' $\alpha$ -ciclodextrina s'anomenaria ciclohexakis-(1-4)-  $\alpha$ -D-glicosil.

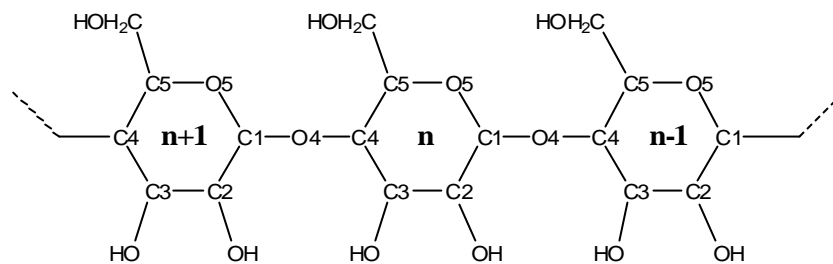
Malgrat l'existència d'aquestes recomanacions, entre els investigadors s'ha estès la utilització dels prefixos grecs  $\alpha$ -,  $\beta$ -, i  $\gamma$ - per descriure les ciclodextrines de menor grandària. Encara que, a l'hora de fer cerques bibliogràfiques és especialment útil la nomenclatura semisistemàtica acabada de descriure.

Respecte a les ciclodextrines gegants, la utilització dels prefixos grecs només pot descriure fins a la ciclodextrina de 29 unitats ( $\gamma$ -ciclodextrina) donat que l'alfabet grec és finit i, per tant, no permet descriure el creixent nombre de ciclodextrines gegants descrites en la literatura. A més a més, els investigadors estan molt familiaritzats amb els termes  $\alpha$ -,  $\beta$ -, i  $\gamma$ -ciclodextrina però l'ús de lletres gregues per a la descripció de ciclodextrines gegants és confús i poc descriptiu per a la grandària del macrocicle. Per aquest motiu, i tenint en compte que cicloamilosa és sinònim de ciclodextrina, una nomenclatura àmpliament utilitzada per a la descripció de les ciclodextrines de major grandària consisteix en fer servir el prefix ciclo-, seguit d'un sufix multiplicatiu, per exemple deca per deu, i acabat amb la terminació -amilosa, així doncs, la ciclodextrina de 10 glucoses s'anomena ciclodecaamilosa. En referència a aquesta nomenclatura existeix una abreviació molt utilitzada en la literatura per descriure aquestes ciclodextrines que és CAn, on CA fa referència a cicloamilosa i n determina el nombre d'unitats de glucosa; per exemple, es fa servir l'abreviació CA10 per anomenar la cicloamilosa de 10 unitats de glucosa.

En la present tesi doctoral s'ha fet servir aquestes abreviacions per fer referència a les ciclodextrines gegants i els prefixos grecs i les abreviacions per fer referència a les ciclodextrines comunes.

### 2.2.1 Nomenclatura de cadenes de polisacàrids

Per anomenar una cadena de polisacàrids<sup>17</sup> la IUPAC estableix que, a partir del primer monòmer de la cadena, el segon és aquell que està més a prop de l'extrem no reduït. En el cas de les glucoses l'extrem reduït correspon al carboni en posició 1 i l'extrem no reduït correspon al carboni en posició 4, per tant, la numeració dels monòmers va en sentit antihorari (Figura 2-2). Aquest ordre de numeració s'escull perquè el guany o pèrdua d'un residu en l'extrem no reduït no canvia la numeració de la cadena.



**Figura 2-2 Numeració de les cadenes de polisacàrids.**

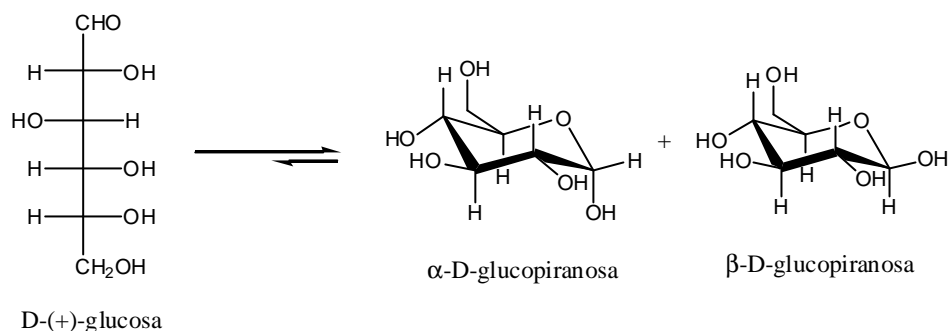
La IUPAC també estableix diverses regles per anomenar les distàncies, angles, diedres, i interaccions no enllaçants en cadenes de polisacàrids. No obstant, no existeix cap nomenclatura que permeti anomenar la posició relativa de dos monosacàrids consecutius de la cadena entre si.

## 2.3 CARACTERÍSTIQUES ESTRUCTURALS

### 2.3.1 La unitat de glucosa

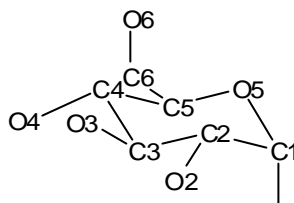
La glucosa és un monosacàrid polihidroxilaldehid de sis àtoms de carboni, que pertany al grup de les aldohexoses (Figura 2-3). De tots els monosacàrids, la D(+)-glucosa és el més abundant i important. La glucosa existeix majoritàriament en forma d'hemiacetal cíclic (l'equilibri entre la forma oberta i la forma cíclica està molt desplaçat cap a la dreta), i aquest conté 6 membres al cicle, amb el que pertany al grup de les piranoses. De les dues formes hemiacetàliques possibles, l' $\alpha$ - és la que trobem present en les ciclodextrines (la que té el grup OH del carboni anomèric al mateix costat en la projecció de Fischer que l'OH del centre estereogènic de major numeració) i, per tant, la de major interès en el present treball.

<sup>17</sup> a) Anònim, *Eur. J. Biochem.*, **1983**, 131(1), 5-7. b) *Pure Appl. Chem.*, **1983**, 55(8), 1269-1272. c) International Union of Biochemistry and Molecular Biology, *Compendium of Biochemical Nomenclature* (2nd Edition); Portland Press: IUBMB, **1992**.



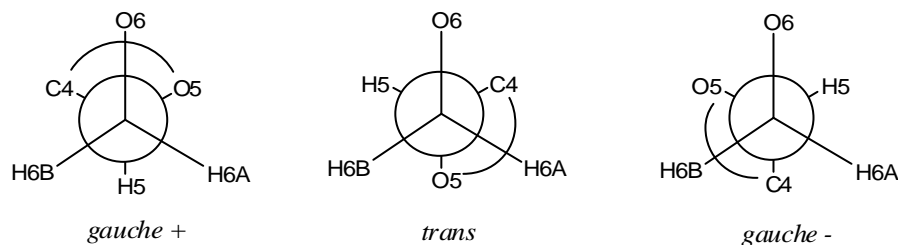
**Figura 2-3 Equilibri entre la forma oberta i les dues formes hemiacetàliques cícliques de la D-(+)-glucosa.**

Les característiques geomètriques dels diferents tipus de ciclodextrina difereixen notablement de les més petites a les més grans, el que no varia és la conformació de la glucosa. Es compleix que, igual que en l'amilosa, les glucoses s'uneixen per enllaços  $\alpha$ -(1-4) glicosídics i aquestes adopten una conformació cadira tipus  ${}^4C_1$  (Figura 2-4).



**Figura 2-4 Numeració dels àtoms pesats i conformació  ${}^4C_1$  de la glucosa.**

Es coneix que els angles de torsió endocíclics de la glucosa varien en un rang molt estret i per aquest motiu, es descriu la glucosa com un bloc rígid. D'altra banda, l'hidroxi primari sí que pot rotar al voltant de l'enllaç C5-C6. En un principi, s'esperarien tres conformacions diferents per a la rotació d'aquest enllaç (*gauche*(+), *gauche*(-) i *trans* respecte de l'àtom O5) però experimentalment en les ciclodextrines només s'observen les dues primeres.



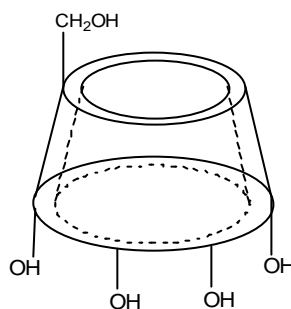
**Figura 2-5 Conformacions obtingudes per rotació de l'enllaç C5-C6 de la glucosa.**

El motiu pel qual es pot explicar l'absència de la conformació *trans* en les ciclodextrines és perquè en aquesta conformació hi poden haver repulsions entre l'hidroxi i els àtoms de les glucoses veïnes. A més a més, entre les dues conformació *gauche* es coneix que la *g*(-) és

majoritària, donat que en la conformació  $g(+)$  el grup hidroxil apunta cap al centre de la cavitat. S'ha estimat experimentalment que la població relativa entre les tres conformacions descrites és aproximadament 6:4:0 per  $g(-)$ ,  $g(+)$  i *trans* respectivament.<sup>18</sup> La conformació  $g(+)$  es troba preferentment en complexos d'inclusió on l'hidroxil pot formar enllaços d'hidrogen amb el *guest*.

### 2.3.2 Ciclodextrines comunes

Les ciclodextrines comunes tenen forma de con truncat (Figura 2-6), la qual prové com a conseqüència de la rigidesa de cadascuna de les glucoses. En el con es defineix un extrem ample i un altre extrem estret; en l'extrem ample es situen els hidroxils secundaris C2-OH i C3-OH, i en l'extrem estret es situen els hidroxils primaris C6-OH. Tant els hidroxils secundaris entre si, com els hidroxils primaris entre si, formen una xarxa extensa d'enllaços d'hidrogen que proporcionen estabilitat a les ciclodextrines.



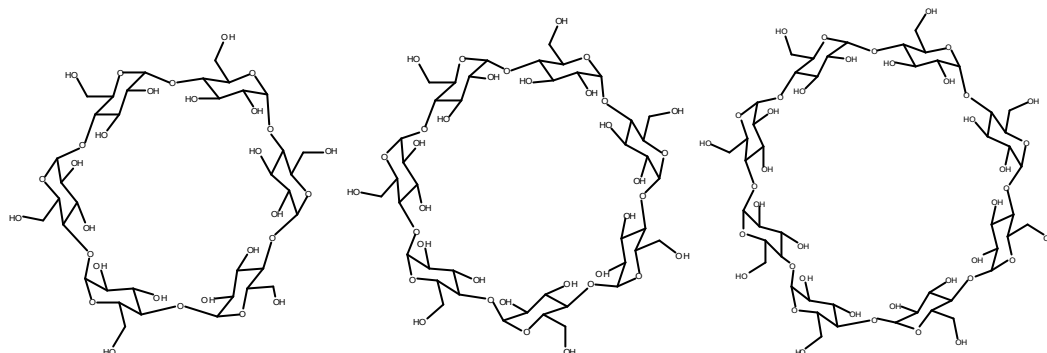
**Figura 2-6 Estructura de con truncat de les ciclodextrines comunes.**

Una de les característiques més rellevants de les ciclodextrines comunes és la disposició dels grups hidrofílics i dels grups hidrofòbics. Els hidroxils primaris i secundaris de caràcter hidrofílic estan situats als extrems del con i proporcionen a les ciclodextrines una certa solubilitat en aigua. D'altra banda, tant els hidrògens C3-H, C5-H i C6-H<sub>2</sub>, com els oxígens glicosídics O4 estan orientats cap al centre de la cavitat i proporcionen a aquesta un caràcter hidrofòbic.

Per aquest motiu, sovint es fa servir el terme "entorn microheterogeni" per fer referència a les cavitats de caràcter hidrofòbic en un medi aquós, de caràcter hidrofílic. A més a més, és important remarcar que els oxígens interglicosídics es situen coplanars a l'hipotètic hemisferi del con truncat, descrivint polígons regulars de tants costats com unitats de glucosa hi ha.

<sup>18</sup> (a) Bock, K.; Duus, J.O., *J. Carbohydr. Chem.*, **1994**, 13(4), 513-543. (b) Nishida, Y.; Ohru, H.; Meguro, H., *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25(15), 1575-1578.

A la Figura 2-7 es representen les estructures químiques de les tres ciclodextrines comunes. Com a tret característic, es pot observar l'existència d'una cavitat troncocònica a l'interior del con.



**Figura 2-7 D'esquerra a dreta estructures de l' $\alpha$ -, la  $\beta$ - i la  $\gamma$ -ciclodextrina.**

Aquesta cavitat és la responsable de que aquests sistemes siguin idonis per incloure una àmplia diversitat de petites molècules, ions i fins i tot radicals. Per poder formar complexos d'inclusió, l'únic requisit és que el *guest* es pugui acomodar a l'interior de la cavitat, ja sigui parcial o totalment. Per aquest motiu, el nombre de complexos d'inclusió que es poden trobar a la bibliografia són enormes, i els tipus de *guests* poden ser diversos: gasos nobles, parafines, alcohols, àcids carboxílics, derivats del benzè, sals, entre d'altres.<sup>13,19</sup> Aquells compostos d'inclusió de major interès són els que tenen aplicacions a la indústria.<sup>20</sup> Per exemple, les substàncies aromàtiques utilitzades en la indústria alimentària (terpenoids i derivats del fenilpropà) acostumen a ser molt volàtils, però formen complexos d'inclusió estables amb les ciclodextrines. Aquests complexos es mantenen estables durant llargs períodes de temps a temperatura ambient sense cap altre protecció.

Finalment, les ciclodextrines tenen un paper important com a model enzimàtic i en sistemes que permeten investigar les forces conductores de la formació de complexos d'inclusió.

---

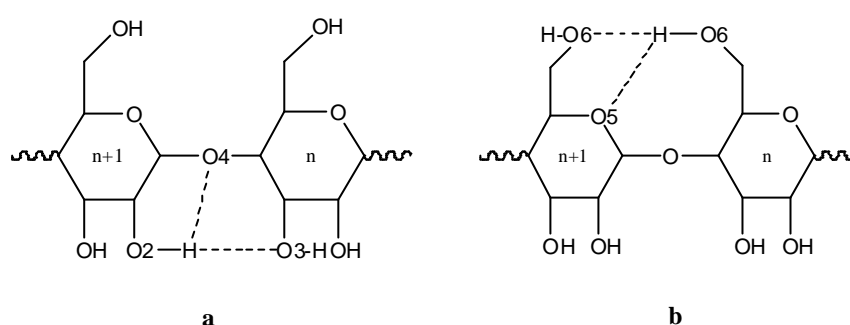
<sup>19</sup> (a) Duchêne, D., Ed *Cyclodextrin and their Industrial Uses*; Editions de Santé: Paris, 1987. (b) Szejtli, J.; Osa, T., *Comprehensive Supramolecular Chemistry Vol. 3 Cyclodextrins*, Pergamon: Oxford, 1996.

<sup>20</sup> Szejtli, J., *J. Mater. Chem.*, **1997**, 7(4), 575-587.



## 2.3.2.1 Enllaços d'hidrogen

Els enllaços d'hidrogen entre els àtoms O2(n+1) i O3(n) són importants perquè en primer lloc, determinen l'estructura de les ciclodextrines comunes i, en segon lloc, perquè són el component majoritari d'enllaços d'hidrogen a tres centres, on el component minoritari és aquell en què l'àtom O4(n) d'unió entre les dues glucoses actua com a acceptor (Figura 2-8a). Paral·lelament, els enllaços d'hidrogen entre els hidroxils primaris O6-H(n) i O6-H(n+1) també són responsables de l'estabilitat de les ciclodextrines comunes, i són el component majoritari d'enllaços d'hidrogen a tres centres on el component minoritari és aquell enllaç d'hidrogen on l'àtom O5(n+1) actua com a acceptor (Figura 2-8b).



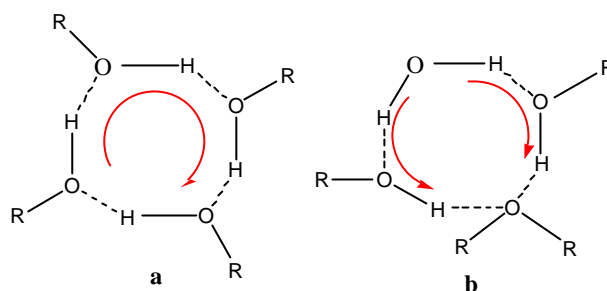
**Figura 2-8 Enllaços d'hidrogen a tres centres a) entre hidroxils secundaris O2(n+1)-H... O3(n) i O2(n+1)-H... O4(n) i b) entre hidroxils primaris O6(n)-H...O6(n+1) i O6(n)-H...O5(n+1).**

Per difracció de neutrons de les estructures cristal·lines s'ha pogut observar que els hidroxils estan força ordenats i que es formen xarxes extenses d'enllaços d'hidrogen. També s'ha detectat, que tots els enllaços d'hidrogen apunten en la mateixa direcció O-H... O-H... O-H... ; aquest fet suggereix que predomina un efecte cooperatiu. Per càlculs de mecànica quàntica, s'ha determinat que aquest efecte cooperatiu pot contribuir en un 25% en l'energia d'estabilització respecte dels enllaços d'hidrogen individuals.<sup>21</sup> Donat que tots els hidroxils apunten cap a la mateixa direcció, aquest fenomen s'anomena homodròmic (Figura 2-9a).<sup>22</sup> Però en les estructures cristal·lines també s'han observat organitzacions del tipus antidròmic (Figura 2-9b), on una molècula d'aigua dóna dos enllaços d'hidrogen de manera cíclica o lineal, que després col·lapsen en un mateix acceptor. Les organitzacions heterodròmiques on els hidroxils s'organitzen

<sup>21</sup> (a) Lesyng, B.; Saenger, W., *Biochim. et Biophys. Acta*, **1981**, 678(3), 408-413. (b) Koehler, J.E.H.; Saenger, W.; Lesyng, G., *J. Comput. Chem*, **1987**, 8(8), 1090-1098.

<sup>22</sup> Saenger, W., *Nature*, **1979**, 279(5711), 343-344.

aleatòriament no s'han detectat en les estructures cristal·lines, probablement perquè són menys estables que les homodròmiques o les antidròmiques.



**Figura 2-9 Representació de les organitzacions a) homodròmica i b) antidròmica.**

Per difracció de neutrons i estudis calorimètrics també s'ha determinat que en la  $\beta$ -ciclodextrina, la xarxa extensa d'enllaços d'hidrogen entre els hidroxils O2-H i O3-H existeix en una direcció que tant pot ser O2-H... O3-H com O3-H... O2-H. Mitjançant aquesta tècnica també s'ha determinat que a temperatura ambient el sistema no és estable amb aquesta xarxa en una única direcció, i que existeix un canvi cooperatiu ràpid d'aquests enllaços d'hidrogen d'una direcció a l'altre, el qual s'ha anomenat *flip-flop*.<sup>23</sup> Conseqüentment durant el *flip-flop* la geometria canvia i el canvi confereix un cert grau de flexibilitat.

### 2.3.2.2 Flexibilitat de les ciclodextrines

Els estudis de raig-X han descrit tradicionalment les ciclodextrines com estructures rígides amb forma de con truncat, tal i com s'ha descrit anteriorment. A més a més, durant molts anys la tendència entre els investigadors ha estat de pensar que aquesta mateixa estructura és la que existeix en dissolució. Però sembla evident que la facilitat de les ciclodextrines per formar complexos d'inclusió amb molècules de formes tan diverses ha de ser deguda a una certa flexibilitat d'aquests sistemes. A més a més, és conegut que la unió interglicosídica del tipus  $\alpha$ -(1-4) es caracteritza per tenir una barrera de rotació de l'enllaç C-O molt baixa (al voltant dels 4 kJ/mol), la qual no pot imposar rigidesa a aquests macrocicles. Existeixen diferents evidències experimentals d'aquesta "no-rigidesa" de les ciclodextrines tant en estructures cristal·lines com en dissolució.

<sup>23</sup> Hanabata, H.; Matsuo, T.; Suga, H., *J. Inclusion Phenom.*, **1987**, 5(3), 325-333.

Per exemple, una primera manifestació de la flexibilitat de l'enllaç interglucosídic C-O-C es dedueix per comparació dels angles de torsió en diferents estructures cristal·lines d'una sèrie de complexos d'inclusió: es poden observar variacions entre  $\pm 30^\circ$ , en comparació amb els diedres intraglicosídics que només varien en un rang de  $\pm 7^\circ$ . D'altra banda, en dissolució també s'ha pogut detectar aquesta flexibilitat. Per exemple, en les anàlisis de  $^1\text{H-RMN}$  de complexos d'inclusió d'un compost aromàtic inclòs dintre de la cavitat no s'observen senyals múltiples per als protons H3 i H5 com hauria de succeir si la ciclodextrina fos rígida.<sup>24</sup>

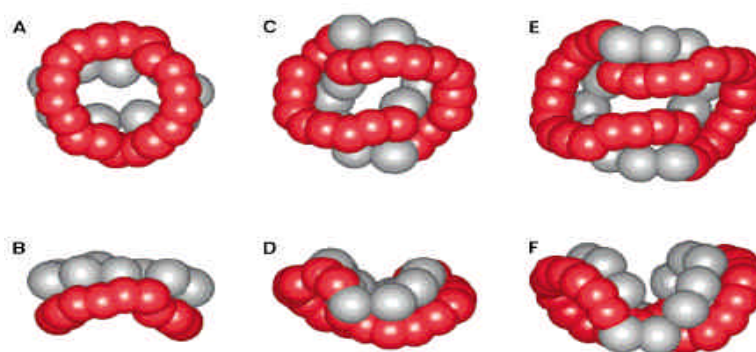
Per tant, a la vista d'aquestes observacions, sembla clar que l'escala de temps de les tècniques experimentals és crucial per avaluar-ne els resultats obtinguts.

## 2.4 CICLODEXTRINES GEGANTS

Com ja s'ha comentat en apartats anteriors, les característiques estructurals de les ciclodextrines gegants difereixen notablement de les ciclodextrines comunes. L'aparició de les estructures cristal·lines de les ciclodextrines de 9, 10, 14 i 26 unitats van ser determinants per entendre millor com són aquest nou tipus de ciclodextrines, i els nous tipus de motius estructurals.

### 2.4.1 CA9, CA10 i CA14

A la Figura 2-10 es representen les estructures cristal·lines de les ciclodextrines de 9, 10 i 14 unitats de glucosa.

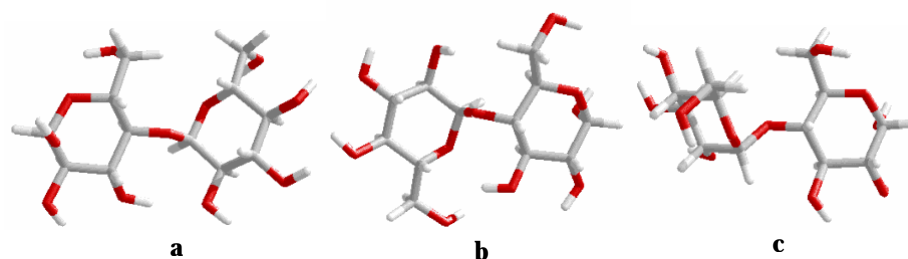


**Figura 2-10 Estructures cristal·lines de la CA9 (A i B), de la CA10 (C i D) i de la CA14 (E i F). Les boles vermelles representen als hidroxils secundaris i les boles blanques als hidroxils primaris.**

<sup>24</sup> Inoue, Y., *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, **1993**, 27, 59-101.

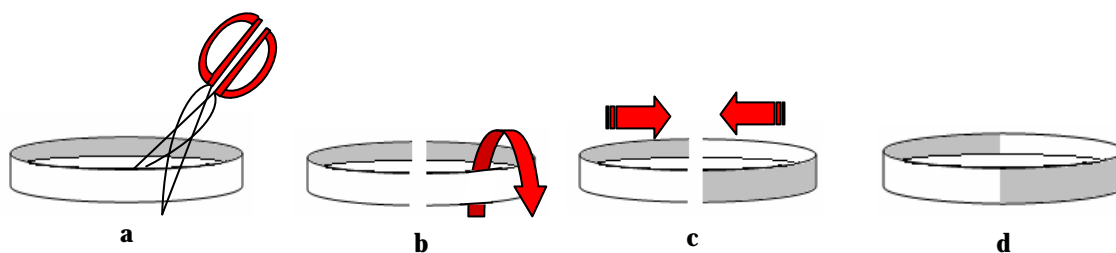
La cicloamilosa de 9 unitats, és la ciclodextrina intermèdia entre les ciclodextrines comunes i les gegants (Figura 2-10 A i B). En aquesta, els oxígens glicosídics es disposen en forma d'el·lipse distorsionada com si fos una nau i, per tant, es perd la forma de con truncat de les ciclodextrines comunes. Els hidroxils secundaris es situen a la part ampla de la nau i els hidroxils primaris apunten cap al centre de la cavitat, esdevenint aquesta molt més col·lapsada en comparació amb les ciclodextrines comunes. Estudis de mecànica molecular han demostrat que aquesta ciclodextrina té la grandària màxima per tenir una estructura de tipus anular.<sup>2a</sup>

L'increment de tan sols una glucosa més, provoca repulsions estèriques que fan que es perdi l'estructura anular de les ciclodextrines entre 6 i 9 unitats de glucosa. En les ciclodextrines de 10 (Figura 2-10 C i D) i de 14 (Figura 2-10 E i F) unitats de glucosa, degut a les repulsions estèriques, apareixen dos motius estructurals nous que són la inversió i la inclinació de glucoses. La inversió comporta que dues glucoses consecutives adoptin una conformació relativa *anti*, i la inclinació comporta que dues glucoses consecutives adoptin una conformació relativa que es denomina *kink* (Figura 2-11).



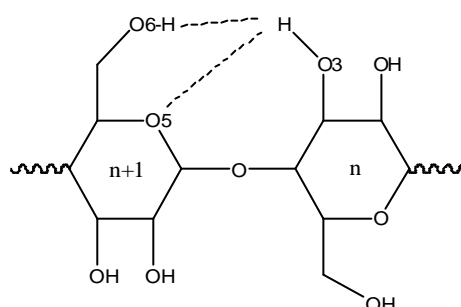
**Figura 2-11** Conformacions de les glucoses; a) conformació *syn* b) conformació *anti* i c) conformació *kink*.

Així doncs, la CA10 i la CA14 presenten una forma de papallona, i en totes dues es poden observar dues glucoses diametralment oposades invertides respecte la glucosa adjacent; aquestes dues glucoses es situen al que seria l'hipotètic cos de la papallona. Per tant, per definir aquestes estructures amb inversió de la banda, un es pot imaginar que té una cinta tancada, la qual es talla per la meitat (Figura 2-12a), es gira 180° una de les parts (Figura 2-12b), i es torna a unir pels seus extrems (Figura 2-12c) de manera que, al final la cinta queda dividida en dues parts simètriques (Figura 2-12d).



**Figura 2-12 Representació de les estructures amb inversió de banda.**

Aquest nou motiu trenca amb l'estructura cilíndrica típica de les ciclodextrines comunes, i la cavitat no és oberta i rodona sinó que es defineix com si fos un tall. A més a més, aquest motiu estructural trenca amb la xarxa d'enllaços d'hidrogen entre els àtoms O2 i O8 de glucoses adjacents que s'ha descrit per a les ciclodextrines comunes. D'altra banda, l'estabilització prové d'enllaços d'hidrogen intramoleculars a tres centres, on l'hidroxil O3(n) actua com a donador i els hidroxils O6(n+1) i O5(n+1) de la glucosa adjacents com a acceptors. Així doncs, es tenen enllaços d'hidrogen del tipus O3(n)-H... O6(n+1) i O3(n)-H... O5(n+1) (Figura 2-13).

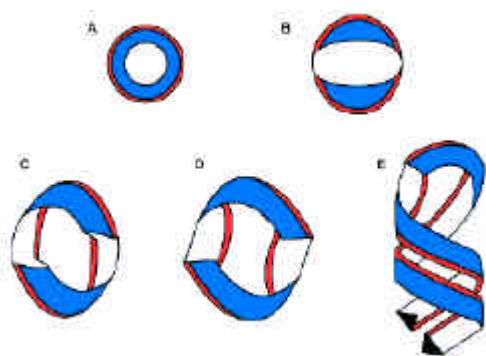


**Figura 2-13 Representació dels enllaços d'hidrogen a tres centres en glucoses amb conformació relativa *anti*.**

La diferència entre la CA10 i la CA14 està en la posició de les glucoses inclinades. En la CA10 les glucoses invertides estan seguides de glucoses inclinades una respecte de l'altre, però en la CA14 les glucoses inclinades es localitzen tres glucoses més enllà de les glucoses invertides. En aquestes glucoses que adopten una conformació relativa tipus *kink* s'observa un augment en la distància entre els oxígens tipus O2 i O3 (3.98 Å en la CA10 i 3.39 Å en la CA14), que fa que es trenqui l'enllaç d'hidrogen entre aquests dos àtoms, o que aquest sigui més dèbil que el que formen les glucoses en conformació relativa *syn*.

Fins ara, s'han descrit les ciclodextrines comunes que tenen una cavitat circular (Figura 2-14 A), la CA9 que ja presenta alguna distorsió en la forma de la cavitat (Figura 2-14 B), i la CA10 (Figura 2-14 C) i la CA14 (Figura 2-14 D) que incorporen nous motius estructurals.

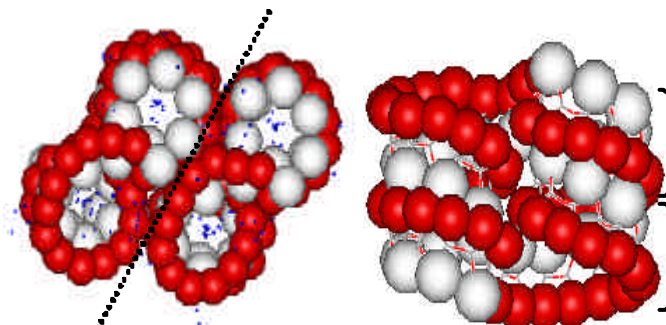
Considerant aquesta evolució, es podria pensar que totes les ciclodextrines gegants presenten una estructura similar a la descrita per a la CA10 i la CA14. En base a aquestes estructures amb inversió de la banda, es podria pensar que en les ciclodextrines més grans també hi hauria dues glucoses invertides i les altres es situarien a ambdós costats formant enllaços d'hidrogen entre els àtoms  $O2(n) \cdots O3(n-1)$ . Les glucoses en conformació *kink* podrien variar la seva posició o inclús desaparèixer segons l'energia de tensió residual. D'aquesta manera, s'acabarien formant dues bandes d'orientació oposada que s'associarien mitjançant enllaços d'hidrogen entre els àtoms tipus O2 i O3 donant lloc a una hèlix antiparal·lela levògira (Figura 2-14 E).



**Figura 2-14** Esquemes dels replegaments A: anell no tensionat de la CA7; B: anell tensionat de la CA9; C i D: deformacions el·líptiques de la CA10 i de la CA14; E: doble hèlix antiparal·lela levògira proposada per les ciclodextrines més grans. Les bandes vermelles connecten als àtoms O2 i O3 i les bandes blaves connecten als àtoms O6.

## 2.4.2 CA26

L'estructura cristal·lina de la CA26 (Figura 2-15) presenta una forma molt diferent a les altres ciclodextrines descrites, i no es replega, com es podria proposar a partir de les estructures de la CA10 i de la CA14, amb una doble hèlix antiparal·lela amb inversió de banda en el *loop*.



**Figura 2-15** Estructura cristal·lina de la CA26. Esquerra: vista superior de dues molècules de la CA26 i dreta: vista frontal d'una molècula de la CA26.

S'observa que la CA26 té forma de vuit on cada una de les meitats consisteix en dues voltes d'hèlix simples levògires, formades per sis unitats de glucosa. Les dues hèlix estan estabilitzades per enllaços d'hidrogen entre àtoms tipus O2 i O3 de glucoses adjacents, i per enllaços d'hidrogen entre àtoms O2...O6 i O3...O6 entre les diferents voltes. Les dues hèlix estan connectades per una cadena superior i una altre inferior de tres glucoses, en les quals es pot observar que la glucosa central està invertida respecte la glucosa adjacent. Les dues hèlix estan fortament associades per enllaços d'hidrogen i interaccions de tipus van der Waals. Aquesta estructura conté característiques de les ciclodextrines de 6 i 10 glucoses, i de la conformació proposada per a la V-amilosa. A l'estructura cristal·lina també es pot observar la presència de canals a l'interior de les dues hèlix amb una amplada similar a la de la cavitat de l' $\alpha$ -ciclodextrina. A més, s'observa que hi ha molècules d'aigua a l'interior d'aquests canals (punts de color blau), fet que suggereix que es podrien incloure altres tipus de molècules, sempre i quan, poguessin ajustar-se a la grandària del canal.

Sembla que aquesta estructura és molt específica per a aquest nombre particular de glucoses i que l'increment o reducció en el nombre de glucoses produeixen canvis estructurals. Aquesta visió està suportada pel fet que només les ciclodextrines de 10, 14 i 26 unitats s'han pogut cristal·litzar, encara que, en dissolució es tenen tota la sèrie de ciclodextrines.

Les estructures cristal·lines de les ciclodextrines gegants descrites fins ara, només es poden tenir en compte parcialment per representar a les conformacions presents en dissolució aquosa. Estudis de SAXS de la CA26<sup>25</sup> mostren que la conformació en dissolució no es pot representar per la conformació en l'estat sòlid, sinó que en dissolució aquosa la CA26 sembla estar descrita per un model d'hèlix simple circular. Paral·lelament, la conformació de la CA14 en dissolució aquosa es podria descriure amb una forma de 8 amb dues pseudocavitats comparables a les de la CA6 i la CA7.

## 2.5 PROPIETATS FÍSiques I PARÀMETRES ESTRUCTURALS

Com ja s'ha esmentat en apartats anteriors, es coneixen nombroses propietats físiques de les ciclodextrines comunes, no obstant, són menys les que es coneixen de les ciclodextrines més grans. A la Taula 2-1 es resumeixen algunes de les propietats físiques més importants de les ciclodextrines gegants i també s'inclouen els mateixos valors per a les ciclodextrines comunes.

---

<sup>25</sup> Kitamura, S., *Cyclic polymers*, J. A. Semlyen Edition, **2000**, 125.

**Taula 2-1 Propietats físiques d'algunes de les ciclodextrines.**

	<b>CA6</b>	<b>CA7</b>	<b>CA8</b>	<b>CA9</b>	<b>CA10</b>	<b>CA14</b>	<b>CA21</b>	<b>CA26</b>
Número de glucoses	6	7	8	9	19	14	21	26
Pes molecular	972.9	1135.0	1297.2	1459.3	1621.4	2270.0	3405.0	4215.7
Volum de la cavitat (Å <sup>3</sup> )	174	262	472	-	-	-	-	-
Solubilitat en H <sub>2</sub> O (g/100 ml a 25 °C)	14.5	1.85	23.2	8.19	2.82	2.30	> 100	-
Rotació específica [α] <sub>D</sub> <sup>25</sup>	147.8	161.1	175.9	187.5	204.9	199.7	205.3	-
Vida mitjana obertura anell (h)	33	29	15	4.2	3.2	3.6	3.2	-
Radi de gir (Å)	6.0	6.7	7.3	-	-	-	11.5	19.6

Es pot observar en primer lloc, la diferent solubilitat de les ciclodextrines comunes; la CA7 és força més insoluble que les altres dues homòlogues, la CA6 i la CA8. D'altra banda, cal destacar que la solubilitat de les ciclodextrines de més de 21 unitats és molt elevada, i per aquest motiu, no s'ha pogut determinar amb exactitud. Respecte les ciclodextrines de 9, 10 i 14 unitats de glucosa s'observa que tenen una solubilitat molt baixa (del mateix ordre que la solubilitat de la CA7), i aquesta característica és una de les principals responsables de que aquestes ciclodextrines s'hagin pogut cristal·litzar a diferència d'altres de major grandària que només s'ha pogut aïllar en dissolució aquosa. Una altra propietat d'especial interès és la vida mitjana d'obertura de l'anell, calculada a partir de la velocitat de catàlisi àcida. Aquesta disminueix a mida que augmenta el nombre de glucoses, probablement degut a un augment de la flexibilitat i a un major nombre de punts de descomposició (unions tipus α-(1-4)). Finalment, cal destacar els valors del radi de gir, que dóna una idea de la grandària de les ciclodextrines. Aquest augmenta d'una ciclodextrina a l'altre i, per tant, les ciclodextrines esdevenen més grans a l'augmentar el nombre de glucoses.

A part de les propietats físiques, que varien notablement d'una ciclodextrina a l'altre, els paràmetres estructurals també varien de les més petites a les més grans. S'ha vist en apartats anteriors que a mida que augmenta el nombre de glucoses augmenten les tensions, i aquestes provoquen canvis en les estructures de les ciclodextrines. Aquests canvis, també es veuen reflectits en els diferents paràmetres geomètrics. Per entendre millor les diferències, a la Taula 2-2 es resumeixen els paràmetres geomètrics que permeten caracteritzar a les ciclodextrines.



**Taula 2-2 Paràmetres estructurals dels hidrats de les ciclodextrines.**

		CA6 <sup>a</sup>	CA7 <sup>b</sup>	CA8 <sup>c</sup>	CA9 <sup>d</sup>	CA10 <sup>e</sup>	CA14 <sup>e</sup>	CA26 <sup>e</sup>
O4(n)···O4(n+1)	Mitjana	4.24	4.39	4.50	4.49	4.49	4.54	4.56
	Mín.	4.16	4.27	4.43	4.26	4.36	4.45	4.11
	Màx.	4.30	4.50	4.59	4.73	4.63	4.61	4.39
O2(n)···O3(n-1)	Mitjana	2.98	2.88	2.82	2.91	2.93	2.83	3.10
	Mín.	2.90	2.80	2.77	2.74	2.85	2.76	2.65
	Màx.	3.15	2.99	2.91	3.23	3.01	2.90	2.86
O4(n)···O4(n+1)···O4(n+2)	Mitjana	119.9	128.3	134.9	136.6	138.2	138.2	136.7
	Mín.	116.9	125.2	133.5	126.8	126.7	131.6	117.9
	Màx.	122.3	132.5	136.9	149.9	145.9	142.5	126.4
C1(n)-O4(n-1)-C4(n-1)	Mitjana	118.7	118.7	116.8	116.3	118.2	117.2	120.7
	Mín.	117.6	117.4	115.6	114.2	115.5	115.7	114.6
	Màx.	119.6	119.8	117.7	118.9	120.5	118.9	118.3
$\phi^{26}$	Mitjana	109.2	109.8	108.9	112.1	99.4	103.4	115.3
	Mín.	102.0	102.3	103.6	88.4	94.1	96.6	91.1
	Màx.	114.9	118.6	123.2	138.3	102.1	110.2	103.6
$\psi^{26}$	Mitjana	128.8	127.6	127.1	124.7	106.1	112.6	131.4
	Mín.	115.1	114.2	111.9	97.6	96.3	103.6	97.4
	Màx.	148.7	140.4	138.5	144.5	122.3	135.2	115.3

Les distàncies en Å i els angles i els diedres en °.

a)  $\alpha$ -ciclodextrina·7.52 H<sub>2</sub>O b)  $\beta$ -ciclodextrina·11 H<sub>2</sub>O c)  $\gamma$ -ciclodextrina·14 H<sub>2</sub>O d)  $\delta$ -ciclodextrina·13 H<sub>2</sub>O e) Només els valors corresponents a les glucoses en conformació *syn*; les invertides i les inclinades no s'han considerat aquí.

La distància O4···O4, que defineix els costats dels macrocicles, es manté constants al voltant dels 4.5 Å en les ciclodextrines més grans, però augmenta en les ciclodextrines comunes de la CA6 a la CA8 degut a què les glucoses s'han d'adaptar al respectiu radi del macrocicle. El mateix comportament s'observa en l'angle definit pels oxígens O4 interglucosídics; es manté constant al voltant dels 138° en les ciclodextrines més grans, però augmenta en les ciclodextrines comunes amb valors de 119.9, 128.3 i 134.9° per a la CA6, la CA7, i la CA8 respectivament. Una característica rellevant de les ciclodextrines comunes és la coplanaritat entre els àtoms O4 (no estan detallats en la taula) que defineixen els hexa-, hepta- i octàgons. Aquest diedre varia en un rang inferior als 0.25 Å respecte del pla mitjà comú en les ciclodextrines comunes, però presenta desviacions molt més importants en els macrocicles definits a partir de la CA9 en endavant.

El valor de la distància entre els àtoms O2(n)··· O3(n-1) no és constant en totes les ciclodextrines sinó que decreix de la CA6 fins a la CA8, indicant que els enllaços d'hidrogen entre

<sup>26</sup>  $\phi$  està definit com el diedre entre els àtoms O5(n)-C1(n)-O4(n-1)-C4(n-1) i  $\psi$  està definit com el diedre entre els àtoms C1(n)-O4(n-1)-C4(n-1)-C3(n-1)

aquests àtoms esdevenen més forts a mida que anem de la CA6 a la CA8. Aquest comportament està corroborat per mesures d'intercanvi hidrogen/deuteri en solució aquosa, que presenten una velocitat força baixa en les ciclodextrines comunes, indicant la presència d'enllaços d'hidrogen intramoleculars.<sup>27</sup>

L'estabilitat que proporcionen els enllaços d'hidrogen entre glucoses consecutives limita l'espai conformacional dels angles de torsió  $\phi$  i  $\psi$ . S'observa a la taula que els valors d'aquests no es veuen gaire afectats per l'increment del nombre de glucoses. Només en la CA9 s'observa certa inestabilitat per l'augment del nombre de glucoses amb valors extrems de  $88^\circ$  per a l'angle  $\phi$ . No obstant, els valors d'aquests diedres sí que es veuen altament afectats per la inversió i la inclinació de glucoses. A la Taula 2-3 es detallen els paràmetres que ens defineixen glucoses amb conformació relativa *kink* i *anti*, i en alguns casos també es comparen amb els mateixos paràmetres de les glucoses en conformació *syn*.

**Taula 2-3 Paràmetres geomètrics mitjans per a les glucoses en conformació *kink*, *anti* i *syn*.**

		CA10	CA14	CA26
$\phi$	<i>anti</i>	84	82	88.1
	<i>kink</i>	76	93	-
	<i>syn</i>	99.4	103.4	115.3
$\psi$	<i>anti</i>	-65	-69	-48.4
	<i>kink</i>	84	92	-
	<i>syn</i>	106.1	112.6	131.4
O4(n)···O4(n+1)···O4(n+2)	<i>anti</i>	-	-	143.6
O4(n)···O4(n+1)	<i>anti</i>	-	4.61	4.65
O3(n)···O6(n+1)	<i>anti</i>	2.77	3.00	2.73
O3(n)···O5(n+1)	<i>anti</i>	3.20	3.33	3.07

Les glucoses en conformació relativa *anti* tenen valors negatius de l'angle diedre  $\psi$  i el valor és força similar en la CA10 i la CA14 però és menys negatiu en la CA26. El diedre  $\phi$  en les glucoses en conformació *anti* és en tots els casos menor que el corresponent valor en les glucoses en conformació *syn*, i força similar en les tres ciclodextrines. D'altra banda, les glucoses inclinades en conformació *kink* presenten valors dels diedres  $\psi$  i  $\phi$  que són aproximadament  $20^\circ$  menors que els corresponents en les glucoses en conformació *syn*.

<sup>27</sup> (a) Casu, B.; Reggiani, M.; Gallo, G.G.; Vigevani, A., *Chem. Soc. Spec. Publ.*, **1968**, 23, 217-226. (b) Bergeron, R.; Channing, M.A., *Bioorg. Chem.*, **1976**, 5(4), 437-449.

A més a més, l'angle i les distàncies entre oxígens glicosídics també es veuen afectats per la inversió de glucoses i augmenten els valors respecte les glucoses en conformació *syn*. La distància entre àtoms  $O3(n)\cdots O6(n+1)$  és del mateix ordre que la distància entre àtoms  $O2(n)\cdots O3(n-1)$  en les glucoses en conformació *syn* i, per tant, es corrobora la formació d'enllaços d'hidrogen entre aquests àtoms quan dues glucoses consecutives presenten una conformació relativa *anti*. D'altra banda, la distància entre els àtoms  $O3(n)\cdots O5(n+1)$  és lleugerament superior a l' anterior i, per tant, aquests enllaços d'hidrogen són més febles.

## 2.6 CICLODEXTRINES MODIFICADES

Fins ara s'han descrit les ciclodextrines naturals que només contenen grups hidroxil com a grup funcional. Però en els darrers anys s'han sintetitzat un elevat nombre de ciclodextrines modificades per mètodes químics. El principal interès d'aquestes modificacions és canviar les propietats físiques i químiques, amb l'objectiu de millorar la capacitat de formar complexos d'inclusió d'aquestes molècules per a aplicacions industrials. A més a més, donat que les ciclodextrines només contenen hidroxils com a grups funcionals només són solubles en aigua o en dissolvents orgànics d'elevada polaritat i, per tant, la utilització de les ciclodextrines amb els dissolvents orgànics habituals és molt limitada. Les modificacions més altament emprades són:

- a. Substitució total o parcial dels hidroxils per un mateix grup funcional (persubstitució).
- b. Ancoratge de fragments orgànics regioespecíficament en alguna de les cares de la ciclodextrina per obtenir mono o múltiples derivats de ciclodextrines.

### 2.6.1 Ciclodextrines persubstituïdes

La solubilitat i la capacitat complexant de les ciclodextrines persubstituïdes varia considerablement respecte les mateixes propietats de les ciclodextrines naturals, i en la majoria dels casos milloren. Entre les ciclodextrines persubstituïdes més comunes estan les que contenen grups funcionals èter i ester en la seva estructura. Els èters més estudiats són els metil, etil, (2-hidroxi)propil i pentil èters. Entre aquests, els metil i els 2-hidroxi-propil èters es produeixen a escala industrial i s'utilitzen en diversos productes i tecnologies.<sup>28</sup> D'altra banda, l'interès principal dels derivats amb esters és la utilització d'aquests com a precursors per ancorar fragments orgànics.

---

<sup>28</sup> Szejtli, J., *J. Mater. Chem.*, **1997**, 7(4), 575-587.

### 2.6.2 Ciclodextrines amb fragments orgànics ancorats

Al 1975<sup>29</sup> es va introduir per primer cop el terme de “gorra” per fer referència a aquests fragments orgànics que es situen a sobre de la cavitat de les ciclodextrines. Els primers tipus de gorres només tenien grups ancorats en una glucosa; aquestes es van anomenar gorres flexibles (Figura 2-16a). Poc temps després,<sup>30</sup> es va introduir per primera vegada derivats en els quals un fragment orgànic unia dues glucoses formant un pont; aquestes es van anomenar gorres rígides (Figura 2-16b).

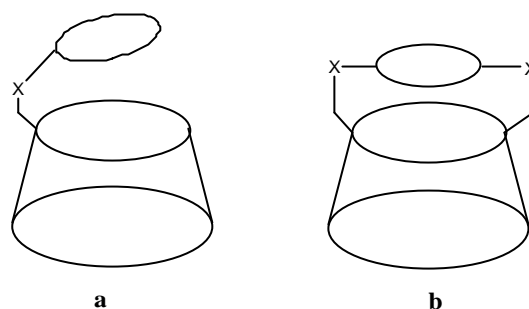


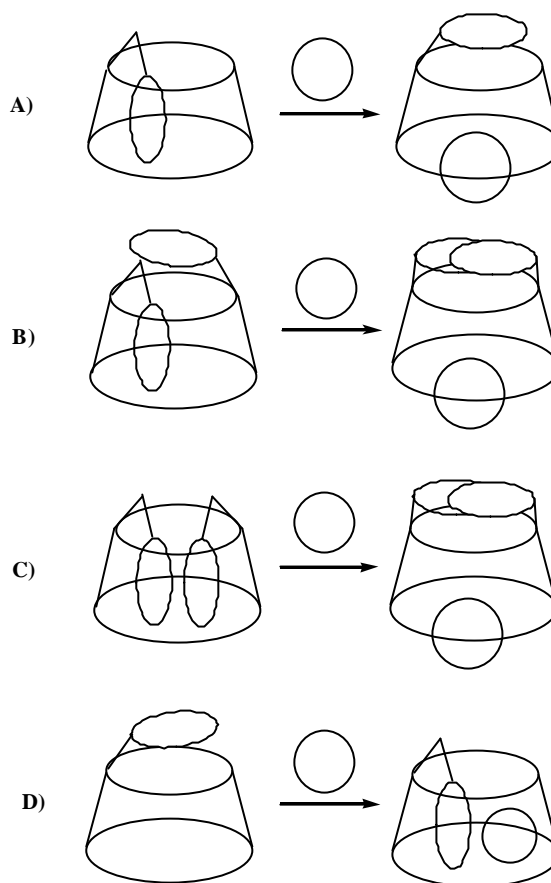
Figura 2-16 Esquema de a) gorres flexibles i b) gorres rígides.

Una de les avantatges d'ancorar fragments orgànics és l'augment de la grandària de la cavitat i, conseqüentment, la possibilitat d'incloure un major nombre de molècules al seu interior. A més a més, es coneix que els grups units poden proporcionar un sòl hidrofòbic que redueix la llibertat rotacional d'un substrat unit, i permet una millor orientació dels grups funcionals respecte de les ciclodextrines naturals. També és important remarcar que el grup ancorat acostuma a ser un grup cromòfor, el qual proporciona propietats espectroscòpiques a les ciclodextrines que, *per se*, són espectroscòpicament inactives. En aquest cas, la unió del *guest* a la ciclodextrina indueix perturbacions espectroscòpiques del grup cromòfor ancorat, les quals es poden detectar per absorció, fluorescència o dicroisme circular. No obstant, les perturbacions depenen de la interacció entre el *guest* i el grup covalent unit a la ciclodextrina, i de com la cavitat de la ciclodextrina actua d'intermediària en la interacció.

Existeixen diversos models de complexos formats entre aquestes ciclodextrines amb grups ancorats i el substrat, alguns dels més habituals es representen a la Figura 2-17.

<sup>29</sup> Emert, J.; Breslow, R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97(3), 670-672.

<sup>30</sup> Tabushi, I.; Shimokawa, K.; Shimizu, N.; Shirakata, H.; Fujita, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98(24), 7855-7856.



**Figura 2-17 Tipus de complexos formats entre ciclodextrines modificades amb grups cromòfors ancorats i un substrat donat.**

En el model A de la figura, el substrat desplaça el grup orgànic que està inclòs dins de la pròpia cavitat de la ciclodextrina. En els models B i C el substrat desplaça a un o als dos grups orgànics inclosos en la cavitat de la ciclodextrina doblement substituïda. Finalment, en el model D es regula l'espai de la cavitat de la ciclodextrina, i tant el grup cromòfor com el substrat queden inclosos en ella.

Existeixen un elevat nombre d'articles on s'observen aplicacions d'aquests sistemes. Com a mode d'exemple, s'han descrit ciclodextrines amb grups ancorats que presenten una càrrega deslocalitzada, els quals s'assemblen als enzims (de caràcter polielectròlit) i, per tant, ciclodextrines modificades amb aquestes propietats s'han utilitzat com a models enzimàtics.<sup>31</sup>

D'altra banda, també s'han descrit ciclodextrines modificades que canvien el seu espectre d'absorció en la zona del visible després de la complexació amb un substrat; aquestes es poden

<sup>31</sup> Wang, Y.; Ikeda, T.; Ueno, A.; Toda, F., *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34(31), 4971-4974.

utilitzar com a indicadors pel canvi de color que presenten al detectar determinades espècies orgàniques en solució aquosa.<sup>32</sup>

Per últim, també s'ha descrit que les ciclodextrines (que contenen un elevat nombre de centres quirals) indueixen en el *guest* complexat un dicroisme circular, fins i tot si el *guest* no és quiral. En aquests casos és possible calcular les constants de complexació *host-guest* a partir de la variació d'aquest dicroisme circular induït.<sup>33</sup>

### 3 PROTEÏNES DE XOC TÈRMIC

#### 3.1 BREU VISIÓ HISTÒRICA

En els primers anys de la dècada dels cinquanta es va conèixer que cada proteïna està constituïda per una seqüència única, que prové de la combinació de vint aminoàcids diferents. Aquest descobriment va fer que els investigadors del moment es plantegessin una sèrie de preguntes: Com adquireixen l'estructura activa les proteïnes? Quins són els mecanismes que condueixen a què una determinada seqüència d'aminoàcids adopti una estructura amb propietats funcionals concretes?

Entre les nombroses investigacions que es van dur a terme per intentar resoldre aquestes qüestions van destacar els descobriments de Anfinsen,<sup>34</sup> que van demostrar que la informació necessària per a què una proteïna adopti la seva estructura nativa està en la seva pròpia seqüència. No obstant, avui en dia es sap que això no és del tot cert, ja que sota algunes circumstàncies les proteïnes no poden adquirir la seva conformació funcional per elles mateixes.

---

<sup>32</sup> Ueno, A.; Kuwabara, T.; Nakamura, A.; Toda, F., *Nature*, **1992**, 356(6365), 136-137.

<sup>33</sup> Ueno, A.; Yoshimura, H.; Saka, R.; Osa, T., *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101(10), 2779-2780.

<sup>34</sup> Anfinsen, C.B., *Science*, **1973**, 181(96), 223-230.

Hi ha principalment dos factors que no permeten que les proteïnes adoptin la seva conformació funcional. Un molt important és que l'elevada concentració de macromolècules existents a la cèl·lula (200-400 mg/ml) s'allunya molt de la concentració en les condicions *in vitro*, i pot produir interaccions no desitjades entre les proteïnes que s'estan sintetitzant. Un altre dels problemes són les condicions d'estrès (tèrmic, salí,...), que produeixen la desnaturalització de certes proteïnes més sensibles a aquests estats.

Actualment, es coneix que les proteïnes de xoc tèrmic (Hsp: *Heat shock proteins*), ó xaperones moleculars, són un conjunt de proteïnes especialitzades que s'uneixen a estats no nadius d'altres proteïnes i les assisteixen per a què adquireixin una conformació funcional. En la majoria dels casos, aquest procés comporta una despesa d'ATP. Les proteïnes xaperones generalment reconeixen superfícies hidròfobes d'espècies no natives, i formen interaccions no covalents amb elles, és a dir, les estableixen per evitar agregacions proteiques irreversibles. L'alliberació del polipèptid complexat en la proteïna es duu a terme degut a un canvi conformacional de la xaperona induït per l'ATP, permetent així, successius passos de plegament del polipèptid. Quan aquest pas falla, pot donar-se el reconeixement i recompleixió del polipèptid per la mateixa o una altre xaperona, de manera que és possible una altre oportunitat per assolir una conformació productiva.

Existeixen moltes xaperones que es diferencien en la seva grandària, en la manera en què complexen al substrat, i en les seves funcions cel·lulars. Entre totes, les Hsp70 són proteïnes de xoc tèrmic de 70 kDa i formen una de les famílies més àmpliament estudiades.<sup>35</sup> A continuació, es detallaran característiques d'aquesta família de xaperones.

### 3.2 HSP70

Les Hsp70, conjuntament amb les seves co-xaperones, comprenen un conjunt de màquines cel·lulars molt abundant que actuen en pràcticament tots els compartiments cel·lulars. Històricament van ser identificades per inducció sota condicions d'estrès, en les quals és conegut que duen a terme una tasca essencial de prevenció d'agregacions i assistència en el plegament de proteïnes, però també tenen un paper molt important en condicions normals.

---

<sup>35</sup> Bukau, B.; Horwich, A.L., *Cell*, **1998**, 92(3), 351-366.

A continuació es nombren algunes de les seves funcions més importants:

- a. Assistir en el plegament de proteïnes acabades de traduir.
- b. Guiar proteïnes a través de les membranes de diversos orgànuls.
- c. Trencament d'estructures proteiques oligomèriques.
- d. Facilitació de la degradació proteolítica de proteïnes inestables.

Totes les Hsp70 consisteixen en els mateixos dominis: un primer domini N-terminal de 44 kDa molt conservat i on s'uneix l'ATP, i un segon domini C-terminal de 25 kDa, que a la vegada es divideix en un domini conservat de 15 kDa on s'uneix el substrat, i un altre domini no conservat de 10 kDa de funcionalitat desconeguda.

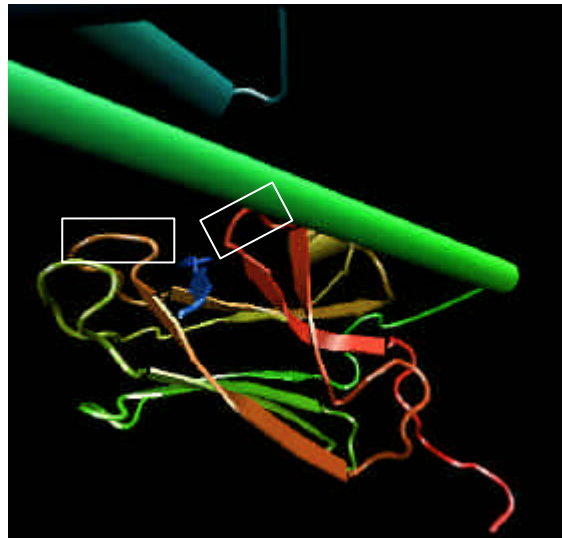
### 3.2.1 Domini d'unió del substrat

Per entendre les bases moleculars de la unió de les Hsp70 amb proteïnes no natives es va estudiar l'homòleg bacterià DnaK mitjançant estudis cristal·logràfics i bioquímics.<sup>36</sup> El DnaK complexa preferentment amb segments curts de caràcter hidrofòbic i que presentin una conformació estesa. És a dir, per a què aquesta família de proteïnes qualifiqui un pèptid com a substrat, el mínim requeriment és que aquest presenti un segment únic reconeixible, ja sigui per un desplegament local o per un element intrínsec desplegat, com per exemple un *loop*. L'estructura cristal·lina del domini C-terminal del DnaK complexat amb un heptapèptid<sup>36b</sup> es representa a la Figura 3-1. Aquesta presenta una estructura de sandvitx  $\beta$  format per dues fulles de quatre cadenes cada una, i seguida per dues hèlixs  $\alpha$  que s'estenen pel darrere del sandvitx. De la fulla superior es deriven quatre *loops*, dos dels quals formen la butxaca per complexar el substrat (a la figura, el de color vermell i el de color taronja). La complexació també està estabilitzada per interaccions amb una de les hèlixs superiors (a la figura de color verd), la qual podria actuar com una tapadora permetent l'entrada i la sortida del substrat.

---

<sup>36</sup> (a) Schmid, D.; Baici, A.; Gehring, H.; Christen, P., *Science*, **1994**, 263(5149), 971-973. (b) Zhu, X.; Zhao, X.; Burkholder, W.F.; Gragerov, A.; Ogata, C.M.; Gottesman, M.; Hendrickson, W.A., *Science*, **1996**, 272(5268), 1606-1614.





**Figura 3-1 Estructura cristal·lina del domini C-terminal del DnaK complexat amb un heptapèptid (Asn-Arg-Leu-Leu-Leu-Thr-Gly) representat en color blau.**

Una cerca entre diferents bases de dades de pèptids en la segona meitat dels anys noranta va demostrar que existeix un motiu estructural comú en tots els substrats.<sup>37</sup> Aquest consisteix en un nucli hidrofòbic, format per entre quatre i cinc residus i envoltats de residus de caràcter bàsic. A més, es coneix que entre els residus del nucli, la Leu és l'aminoàcid present en el 90% dels pèptids i que els aminoàcids de caràcter àcid estan exclosos d'aquest nucli.

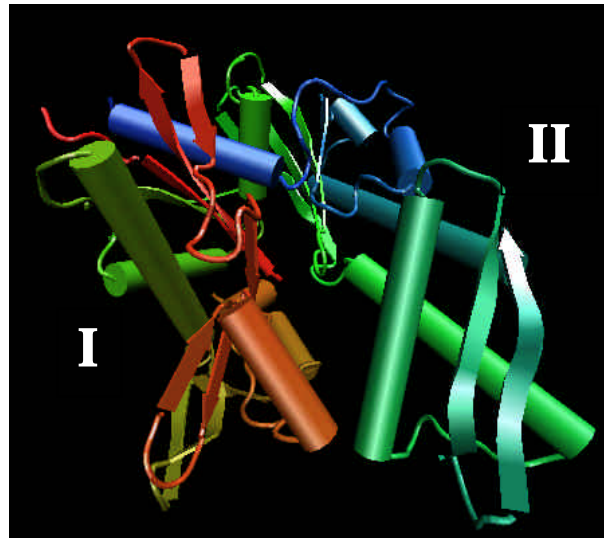
### 3.2.2 Domini d'unió de l'ATP

S'ha cristal·litzat el domini d'unió de l'ATP de diferents proteïnes de xoc tèrmic. Entre les diferents estructures cristal·lines, cal destacar les que corresponen a aquest domini de l'Hsp70 humana (codi pdb: 1HJO<sup>38</sup> i 1S3X<sup>39</sup>). Com a exemple, a la Figura 3-2 es mostra l'estructura cristal·lina amb codi pdb: 1HJO. S'observa que aquest domini es caracteritza per tenir dos subdominis globulars (I i II), units per dues hèlixs  $\alpha$  creuades ( a la figura de color verd i de color blau), i separats per una gran esclatxa central. Els dos subdomins, conjuntament amb les hèlixs que els connecten, contribueixen a formar la butxaca on es complexa el nucleòtid i els ions divalents necessaris.

<sup>37</sup> Rüdiger, S.; Germeroth, L.; Schneider-Mergener, J.; Bukau, B., *EMBO J.*, **1997**, 16(7), 1501-1507.

<sup>38</sup> Osipiuk, J.; Walsh, M.A.; Freeman, B.C.; Morimoto, R.I.; Joachimiak, A., *Acta crystallogr. B, Biol. Crystallogr.*, **1999**, 55(5), 1105-1107.

<sup>39</sup> Osipiuk, M.S.; Freeman, B.C.; Morimoto, R.I.; Joachimiak, A., *Structure*, **1997**, 5(3), 403-414.



**Figura 3-2 Estructura cristal·lina del domini N-terminal de l'Hsp70 humana.**

La unió de l'ATP en la proteïna es dona en dos passos: en una primera etapa, es forma un complex feble, i en una segona etapa, es produeixen les reorganitzacions estructurals.<sup>40</sup> Aquesta segona etapa, és la que clarament reflecteix la inclusió del nucleòtid dins de la butxaca d'unió de la proteïna, ja que la primera és cinèticament molt ràpida. A més, aquesta darrera etapa està cinèticament acoblada a l'alliberament o intercanvi d'un polipèptid prèviament complexat en el domini C-terminal.

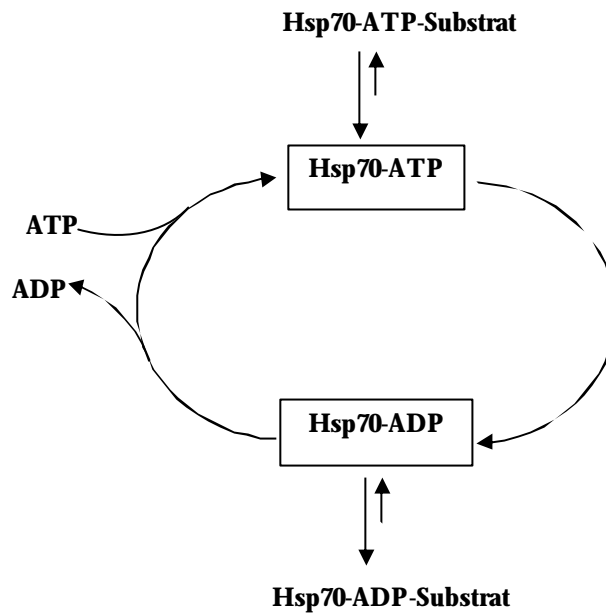
### 3.2.2.1 El cicle de l'ATP

L'ATP complexat en el domini N-terminal és el responsable d'induir canvis conformacionals en el domini C-terminal, on es complexa el substrat, modificant així la seva afinitat. Existeix un cicle de l'ATP (Figura 3-3), el qual es pot visualitzar com l'intercanvi entre dos estats: un primer estat amb l'ATP complexat amb baixa afinitat pel substrat i, per tant, un intercanvi ràpid amb aquest (la butxaca d'unió del substrat està oberta), i un segon estat on l'ATP s'ha hidrolitzat, hi ha l'ADP complexat, i s'observa una elevada afinitat pel substrat i, per tant, un intercanvi lent amb aquest (la butxaca d'unió del substrat està tancada). A partir de les propietats cinètiques d'aquests dos estats, sembla clar que la ràpida associació de les Hsp70 amb el substrat només pot succeir si l'ATP està complexat, perquè quan aquest s'hidrolitza i l'ADP està

---

<sup>40</sup> (a) Ha, J.-H.; McKay, D.B., *Biochemistry*, **1995**, 34(36), 11635-11644. (b) Theyssen, H.; Schuster, H.-P.; Bakau, B.; Reinstein, J., *J. Mol. Biol.*, **1996**, 263(5), 657-670.

complexat, l'intercanvi amb el substrat és massa lent en comparació amb l'escala de temps de les reaccions de plegament.



**Figura 3-3** Cicle de l'ATP.

S'ha proposat un mecanisme per a la hidròlisi de l'ATP emprant com a model l'Hsc70 (*Heat shock cognate*) bobina.<sup>41</sup> Els canvis estructurals produïts en l'Hsp70 quan es complexa l'ATP són els responsables de que el grup fosfat de l'ATP en la posició  $\gamma$ -<sup>42</sup> també es reajusti, i es formi un complex bidentat entre els oxígens dels fosfats en les posicions  $\beta$ - i  $\gamma$ - i el ió divalent. D'aquesta manera, es pot produir l'atac d'una molècula d'aigua que està unida mitjançant enllaços d'hidrogen a la Lys71 propera al nucleòtid.

No obstant, en el cicle de l'ATP també intervenen diverses co-xaperones, les quals augmenten la velocitat dels diferents processos ja que, la velocitat del cicle de l'ATP de l'estat més estable del sistema és massa baixa (entre 0.02 i 0.2 min<sup>-1</sup>) com per dur a terme l'activitat xaperona, inclús en presència del substrat que habitualment estimula la seva activitat.<sup>43</sup> Per aquest motiu, és

<sup>41</sup> (a) Flaherty, K.M.; Wilbanks, S.M.; DeLuca-Flaherty, C.; McKay, D.B., *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269(17), 12899-12907. (b) O'Brien, M.C.; Flaherty, K.M.; McKay, D.B., *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271(27), 15874-15878.

<sup>42</sup> Partint de la ribosa els grups fosfat s'anomenen  $\alpha$ -,  $\beta$ -, i  $\gamma$ -.

<sup>43</sup> (a) Flynn, G.C.; Chappell, T.G.; Rothman, J.E., *Science*, **1989**, 245(4916), 385-390. (b) Gao, B.; Greene, L.; Eisenberg, E., *Biochemistry*, **1994**, 33(8), 2048-2054. (c) Jordan, R.; McMacken, R., *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270(9), 4563-4569.

necessària la presència d'un mecanisme regulador per augmentar la velocitat del cicle i conseqüentment, l'activitat xaperona. La hidròlisi de l'ATP és el primer pas a regular, per exemple, en els homòlegs bacterians, els membres de la família del DnaJ són les proteïnes que duen a terme aquesta tasca.<sup>44</sup> Aquesta és una família de proteïnes que contenen un domini molt conservat d'aproximadament 80 aminoàcids que és essencial per a l'estimulació de l'activitat de l'ATP.<sup>45</sup> D'altra banda, la regulació de l'alliberament de l'ADP i P també és essencial en moltes de les cèl·lules bacterials. Aquesta es duu a terme per les proteïnes de la família del GrpE.<sup>44a,46</sup> L'associació d'aquestes proteïnes amb el complex DnaK-ADP accelera l'intercanvi dels nucleòtids reduint l'afinitat de DnaK per l'ADP.<sup>47</sup> Es coneix que les activitats conjuntes del DnaJ i del GrpE sobre la DnaK en les cèl·lules bacterials provoquen un augment de la velocitat del cicle de l'ATP uns centenars de vegades superior a la mateixa en absència de les co-xaperones.<sup>44b</sup>

### 3.2.2.2 Acoblament entre els dominis NH<sub>2</sub>- i COOH-terminal

El mecanisme pel qual l'energia química de l'ATP s'utilitza per crear treball mecànic, és a dir, per obrir i tancar la butxaca on es complexa el substrat, encara no es coneix. No obstant, hi ha diverses teories al respecte. Una d'aquestes teories proposa que hi ha petits canvis en el domini N-terminal que s'amplifiquen per proporcionar considerables canvis en el domini G-terminal. Una altre teoria, postula que les estructures cristal·lines no reflecteixen els canvis de les conformacions que ocorren en tota la proteïna com a resposta del nucleòtid. Per tant, si aquesta segona teoria fos certa, seria necessari obtenir l'estructura cristal·lina del domini N-terminal conjuntament amb el domini d'unió del substrat. Una darrera teoria postula que la complexació de l'ATP desencadena una associació entre els dos dominis i que aquesta causa més canvis conformacionals dins del propi domini de complexació amb el substrat. No obstant, els canvis concrets que obren la butxaca on complexa el substrat encara són desconeguts.

---

<sup>44</sup> (a) Liberek, K.; Marszalek, J.; Ang, D.; Georgopoulos, C.; Zylicz, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, 88(7), 2874-2878. (b) McCarty, J.S.; Buchberger, A.; Reinstein, J.; Bakau, B., *J. Mol. Biol.*, **1995**, 249(1), 126-137.

<sup>45</sup> Wall, D.; Zylicz, M.; Georgopoulos, C., *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269(7), 5446-5451.

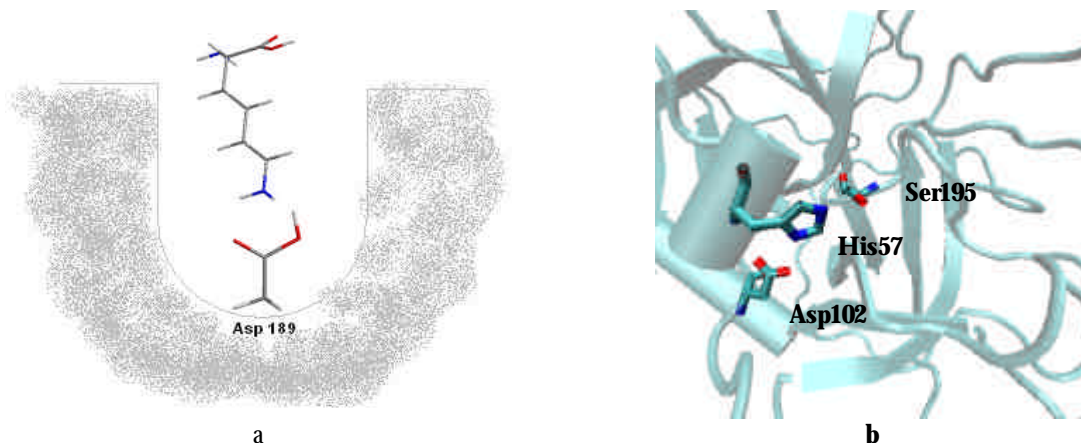
<sup>46</sup> Dekker, P.J.; Pfanner, N., *J. Mol. Biol.*, **1997**, 270(3), 321-327.

<sup>47</sup> Packschies, L.; Theysen, H.; Buchberger, A.; Bakau, B.; Goody, R.S.; Reinstein, J., *Biochemistry*, **1997**, 36(12), 3417-3422.

## 4 ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE LA TRIPSINA

La tripsina és un enzim de la família de les proteases involucrada en reaccions d'hidròlisi o degradació d'altres proteïnes. Més concretament, pertany al grup de les serinproteases, és a dir, una Ser del centre actiu és essencial per a la seva activitat.<sup>48</sup> El seu centre actiu consisteix en una boca o bossa on es poden introduir cadenes peptídiques poc organitzades, és a dir, s'hidrolitzen cadenes peptídiques que tinguin estructures secundàries tipus girs, i no poden entrar dins d'aquesta bossa cadenes peptídiques amb estructures secundàries organitzades del tipus hèlix a o fulla  $\beta$ .

La presència de l'Asp189, que es troba a la part posterior de la bossa de fixació del substrat (Figura 4-1a), és la responsable de que aquest enzim hidrolitzi preferentment les Lys i les Arg, ja que les seves cadenes laterals de caràcter catiònic poden formar parells iònics amb les cadenes de l'Asp189. Aquest fet, és el que diferencia a la tripsina d'altres enzims de la mateixa família que trenquen selectivament les cadenes peptídiques per altres aminoàcids.



**Figura 4-1 a) Formació del parell iònic entre les cadenes laterals de la Asp 189 a la part posterior de la bossa i una Lys. b) Representació del centre actiu de la tripsina.**

Per a la seva activitat enzimàtica són essencials la Ser195, la His57 i l'Asp102 situades al centre actiu (Figura 4-1b).<sup>49</sup> La Ser195 actua com a nucleòfil, la His57 és la donadora i acceptora de protons i, per tant, la que permet les transferències protòniques, i l'Asp102 mitjançant enllaços

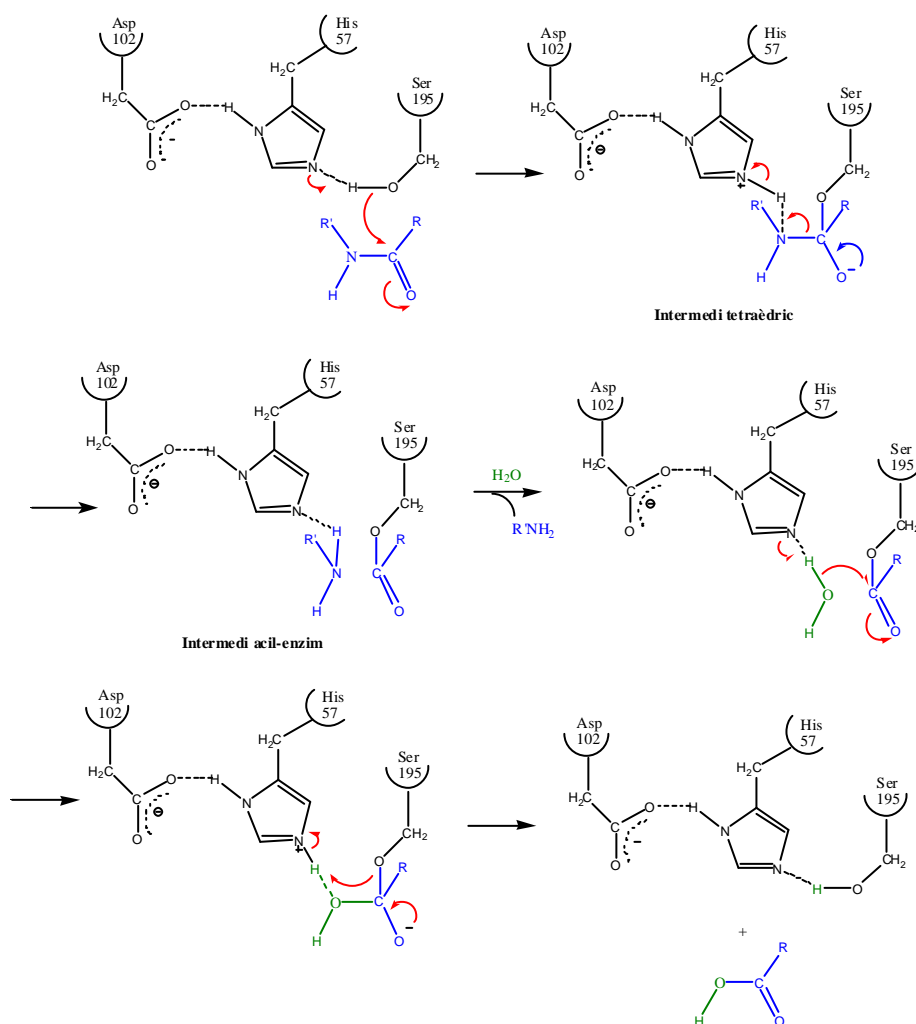
<sup>48</sup> Voet, D.; Voet, J., *Bioquímica*, Ed. Omega: España **1992** (Capítol 14).

<sup>49</sup> Blow, D.M; Steitz, T.A, *Ann. Rev. Biochem.*, **1970**, 39, 63-100.

d'hidrogen amb la His57, permet que aquesta última orienti adequadament les cadenes laterals que a la vegada, formen enllaços d'hidrogen amb la Ser195.

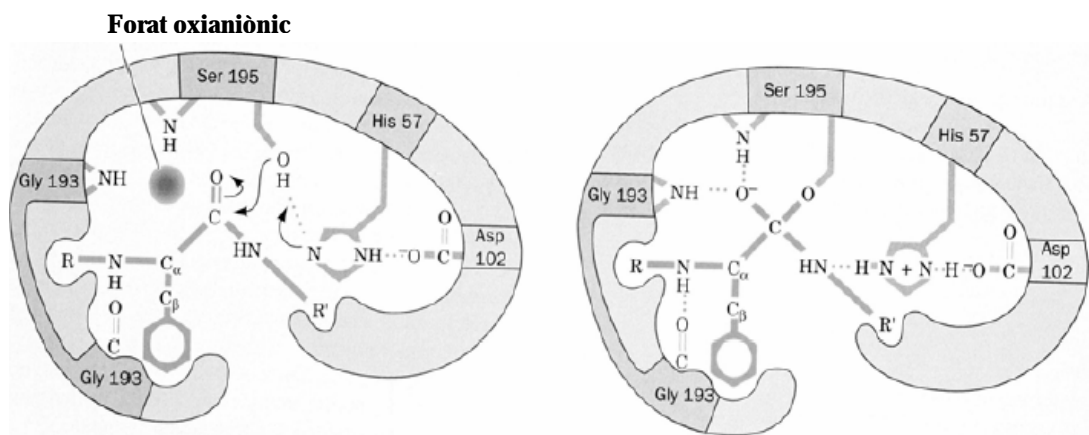
#### 4.1 MECANISME CATALÍTIC

En base a dades químiques i estructurals acumulades durant molts anys, s'ha proposat un mecanisme catalític comú per a totes les serinproteases (Figura 4-2). Un cop s'ha fixat el substrat i s'ha format el complex enzim-substrat, la Ser195 ataca nucleofilicament al grup carbonil del pèptid que s'ha d'hidrolitzar formant un intermedi tetraèdric, i l'anell d'imidazole de la His57 capta el protó alliberat, formant un ió imidazoli. Aquest pas, està afavorit per l'efecte polaritzant del ió carboxilat sense solvatar de l'Asp102, que s'uneix per enllaç d'hidrogen a la His57. Aquest intermedi tetraèdric descomposa per donar l'intermedi acil-enzim i, posteriorment, el grup amino  $R'-NH_2$  alliberat es substituït per una molècula d'aigua. Finalment, per atac nucleòfil de l'aigua al carbonil del grup acil, s'allibera el producte carboxilat i es regenera l'enzim.



**Figura 4-2 Mecanisme catalític d'hidròlisi de pèptids per part de les serinproteases.**

La eficiència catalítica de les serinproteases prové majoritàriament de la capacitat per estabilitzar l'intermedi tetraèdric. És conegut que l'oxigen carbonílic del pèptid en l'intermedi tetraèdric es desplaça cap al fons del centre actiu, de manera que ocupa una posició que abans estava lliure: el forat oxianiónic (Figura 4-3). Allà pot formar dos enllaços d'hidrogen amb els grups NH de la cadena principal de la Gly193 i la Ser195 de l'enzim, que no es poden formar si el grup carbonil està en la seva forma trigonal habitual. Així doncs, gràcies a la formació d'aquests enllaços d'hidrogen extrems, l'enzim fixa aquest intermedi amb preferència al complex enzim-substrat o a l'intermedi acil-enzim.



**Figura 4-3 Representació del forat oxianiónic i estabilització de l'intermedi tetraèdric per formació d'enllaços d'hidrogen amb la Gly 193.**





### III. RESULTATS I DISCUSSIÓ

---

En aquesta secció, es detallen únicament els resultats obtinguts dels estudis realitzats. Però en una tesi on es realitzen estudis computacionals, la metodologia no és independent. No obstant, seguint l'estructura de les tesis experimentals, on es separa la part teòrica de la part experimental, i amb l'objectiu de no omplir els resultats de detalls computacionals, que poden resultar difícils de seguir per a tots aquells que no estiguin familiaritzats amb aquestes tècniques, els fonaments teòrics de les metodologies s'han separat d'aquesta secció i es detallen en la de Metodologia. A més, les condicions concretes que s'han utilitzat en cada cas, es detallen en els diversos exemples que es troben en l'Apèndix. És a dir, aquesta secció no és independent de la Metodologia i l'Apèndix sinó que les tres es complementen mútuament. Així doncs, per a tots aquells que vulguin tenir una visió més detallada dels estudis realitzats o que en un futur vulguin seguir els mateixos passos és molt recomanable que també consultin la **METODOLOGIA** i l'**APÈNDIX**.



## 5 ANÀLISI CONFORMACIONAL DE LES CICLOAMILOSES

### 5.1 INTRODUCCIÓ AL PROBLEMA

Són molts els estudis que s'han realitzat sobre les ciclodextrines comunes, tant a nivell experimental com amb càlculs teòrics, però en són menys, els que s'han realitzat de les ciclodextrines de major grandària. Ja s'ha comentat en la introducció, que en la darrera dècada va sorgir un especial interès per estudiar les ciclodextrines gegants, però és ara quan el nombre de publicacions que fan referència a aquesta nova família de molècules comença a créixer. No obstant, la majoria d'aquestes publicacions fan referència a la síntesi d'aquestes,<sup>50</sup> o descriuen les seves propietats fisicoquímiques,<sup>51</sup> o en alguns casos també descriuen la seva capacitat per formar complexos d'inclusió.<sup>52</sup> Però són escasses les publicacions que fan referència a estudis teòrics d'aquestes molècules i, avui en dia, només hi ha un parell de publicacions que realitzen una anàlisi conformacional d'aquests sistemes.<sup>53</sup> En el nostre grup de recerca, el doctor Ivan Beà en la seva tesi doctoral<sup>54</sup> va iniciar l'estudi sistemàtic de les ciclodextrines de més de 8 unitats de glucosa mitjançant càlculs teòrics. Els seus objectius eren: obtenir una visió global del tema, avaluar si es produïen canvis estructurals accentuats i clars, i si aquests es podien determinar per modelització molecular. A més, també pretenia avaluar quins paràmetres energètics eren els responsables d'aquests canvis estructurals. Un cop finalitzada la seva tesi doctoral, els estudis van quedar en un estadi inicial i amb alguns punts febles que s'havien de millorar. Un d'aquests eren les estructures de partida, ja que no es coneixien dades cristal·logràfiques de la majoria de ciclodextrines i es van haver de construir manualment. I un segon punt feble, va ser referent al camp de forces. Es va utilitzar un únic camp de forces, que havia proporcionat resultats satisfactoris en l'estudi de ciclodextrines comunes, però que no s'havia utilitzat mai en l'estudi de ciclodextrines gegants. I és

---

<sup>50</sup> (a) Qi, Q.; She, X.; Endo, T.; Zimmermann, W., *Tetrahedron*, **2004**, 60(3), 799-806. (b) Zheng, M.; Endo, T.; Zimmerman, W., *J. Incl. Phen. Macro. Chem.*, **2002**, 44(1-4), 387-390. (c) Endo, T.; Zheng, M.; Zimmerman, W., *Australian Journal of Chemistry*, **2002**, 55(1,2), 39-48.

<sup>51</sup> (a) Ueda, H., *J. Incl. Phen. Macro. Chem.*, **2002**, 44(1-4), 53-56. (b) Ueda, H.; Wakisaka, M.; Nagasa, H.; Takaha, T.; Okada, S., *J. Incl. Phen. Macro. Chem.*, **2002**, 44(1-4), 403-405. (c) Motohama, S.; Ishii, E.; Endo, T.; Nagase, H.; Ueda, H.; Takaha, T.; Okada, S., *Biologicheskii Zhurnal Armenii*, **2001**, 53, 27-33.

<sup>52</sup> Larsen, K.L.; Endo, T.; Ueda, H.; Zimmermann, W., *Carbohydrate Research*, **1998**, 309(2), 153-159.

<sup>53</sup> (a) Nakata, Y.; Norisuye, T.; Kitamura, S., *Biopolymers*, **2002**, 64(2), 72-79. (b) Ivanov, P. M.; Jaime, C., *J. Phys. Chem. B*, **2004**, 108(20), 6261-6274.

<sup>54</sup> Beà, I. Tesi Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, **Desembre 2001**.

important recordar que les ciclodextrines gegants tenen característiques estructurals diferents de les comunes i, per aquest motiu, no es tenia cap garantia que el camp de forces utilitzat les pogués modelitzar correctament.

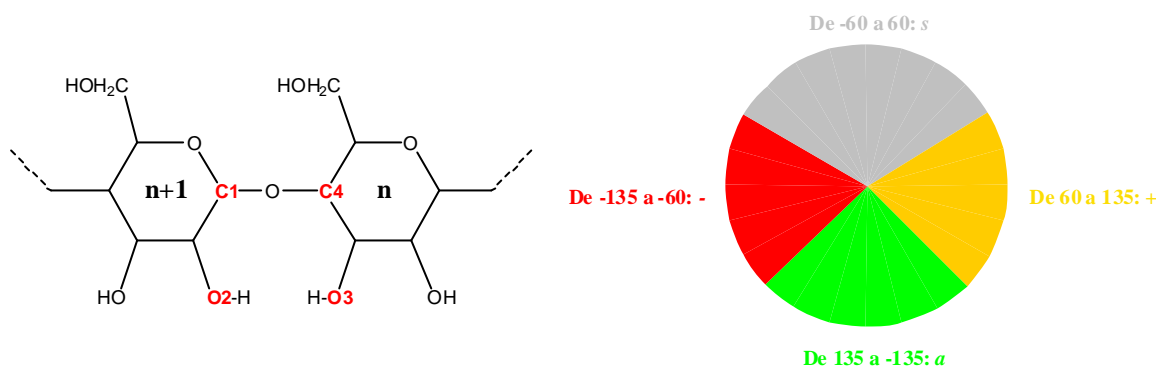
Així doncs, tenint en compte aquests precedents, en aquest capítol i els dos capítols següents s'aprofundeix en els estudis de les ciclodextrines gegants iniciats pel doctor Ivan Beà. Donada la complexitat d'aquests sistemes, degut a l'elevat nombre de graus de llibertat en comparació amb les ciclodextrines comunes, s'estudien amb més detall les ciclodextrines de 14, 21, 26, i 28 unitats de glucosa. Amb aquestes es vol estudiar una sèrie de ciclodextrines que es diferenciïn en unitats de 7 glucoses i, aprofitant que es coneix l'estructura cristal·lina de la CA26, també s'inclou en l'estudi. No obstant, com ja es veurà més endavant, en alguns casos també s'ha considerat necessari estudiar les ciclodextrines comunes.

D'altra banda, donats els escassos estudis que existeixen d'aquestes ciclodextrines a nivell teòric, i que estudis dels últims anys han demostrat que les estructures de les ciclodextrines gegants són altament dependents del camp de forces utilitzat,<sup>55</sup> també s'avalua la influència del camp de forces en els resultats obtinguts, i s'intenta trobar un que proporcioni uns resultats coherents amb les dades experimentals existents. Així doncs, s'han realitzat simulacions de dinàmica molecular emprant els camps de forces parm94 implantat en Amber 5, parm99 i glycam 2000a implantats en Amber 7 i MM3\* implantat en Macromodel.

Finalment, tenint en compte la dificultat per descriure la posició relativa entre monosacàrids dins d'una cadena de polisacàrids, es desenvolupa una nova nomenclatura per aprofundir en la caracterització d'aquesta cadena. La nomenclatura proporciona informació sobre la posició relativa dels diferents monòmers entre si a partir dels valors del diedre virtual  $O3(n)\cdots C4(n)\cdots C1(n+1)\cdots O2(n+1)$  o diedre *flip*. Segons el valor d'aquest diedre es defineixen quatre conformacions possibles: *s*, *+*, *a*, *i* – (Figura 5-1).

---

<sup>55</sup> (a) Shimada, J.; Kaneko, H.; Takada, T.; Kitamura, S.; Kajiwaru, K., *J. Phys. Chem. B*, **2000**, *104*(9), 2136-2147. (b) Momany, F.A.; Willett, J.L., *Carbohydr. Res.*, **2000**, *326*(3), 194-209. (c) Momany, F.A.; Willett, J.L., *Carbohydr. Res.*, **2000**, *326*(3), 210-226.



**Figura 5-1 Definició de les conformacions relatives entre monòmers a partir del valor del diedre virtual  $O3(n)\dots C4(n)\dots C1(n+1)\dots O2(n+1)$ .**

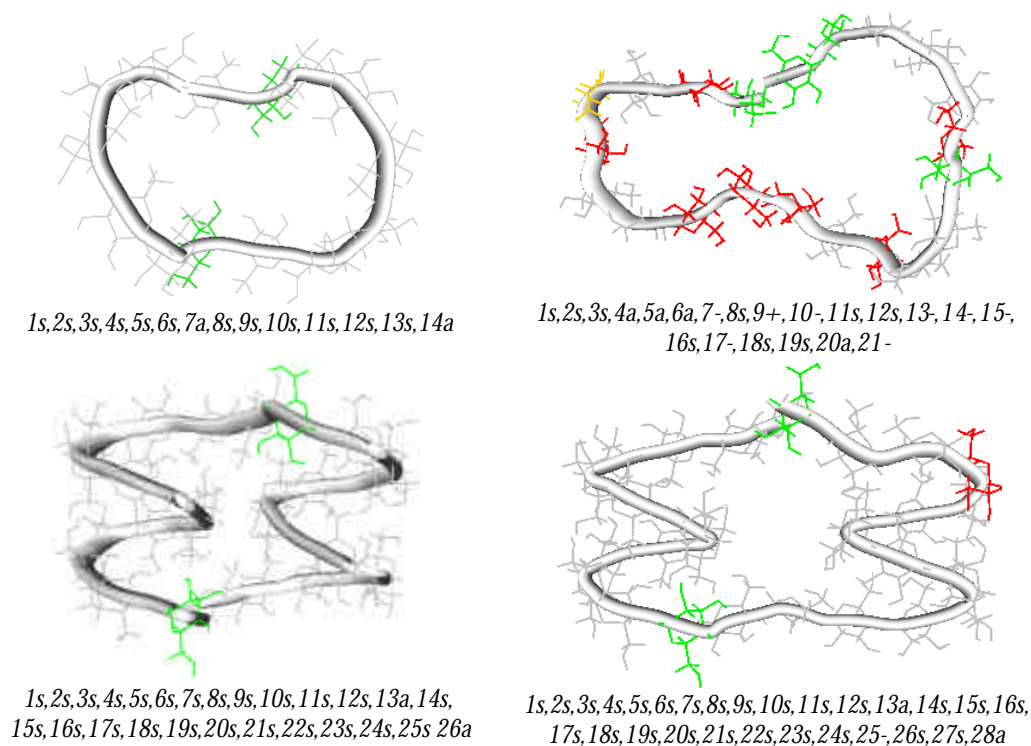
Com es pot observar, la definició de les glucoses en conformació *s* inclou un rang més ampli de valors del diedre  $\tau$ , conseqüentment, la definició de les glucoses inclinades en conformació *+* i *-* un rang lleugerament més estret. Aquest fet, és degut a la necessitat d'adaptar la nomenclatura als sistemes dinàmics que s'estudien. Com ja es veurà més endavant, en les anàlisis de les distribucions d'aquest diedre s'observen un o dos pics amb valors compresos entre  $-60$  i  $60^\circ$  i centrats al voltant dels  $0^\circ$  per a les glucoses en conformació *syn* i, per tant, sembla lògica la necessitat d'utilitzar un rang de valors del diedre més ampli per definir les glucoses en aquesta conformació que el corresponent rang per definir les glucoses inclinades (conformació *-* i *+*). Així doncs, tenint en compte aquesta adaptació, no ha de sorprendre que sistemes estàtics, com per exemple les estructures cristal·lines, no es vegin caracteritzats de la mateixa manera, i només es caracteritzarien de la mateixa manera si es definissin rangs homogenis per als valors del diedre.<sup>56</sup>

Un cop coneguda la conformació relativa de les glucoses consecutives entre si, es determina quin és el primer monòmer de la cadena: és aquell a partir del qual, s'obté un major nombre de glucoses en conformació *s* al principi de la cadena. Finalment, la cadena s'anomena començant pel primer monòmer seguit de la identificació de la conformació relativa amb la glucosa adjacent. Per exemple, l'estructura cristal·lina de l' $\alpha$ -ciclodextrina on totes les glucoses tenen una conformació relativa *syn* i, per tant, valors d'aquest diedre compresos entre  $-60$  i  $60^\circ$ , s'anomena  $1s,2s,3s,4s,5s,6s$ .

<sup>56</sup> Amb rangs homogenis les glucoses en conformació *syn* tindrien valors entre  $-45$  i  $45^\circ$ , les glucoses en conformació *+* valors entre  $45$  i  $135^\circ$ , les glucoses en conformació *-* valors entre  $-135$  i  $-45^\circ$ , i les glucoses en conformació *anti* valors entre  $-135$  i  $135^\circ$ .

En la present tesi doctoral, s'ha utilitzat aquesta nomenclatura per a l'estructura de partida de cada cicloamilosa, però en les posteriors estructures es manté la mateixa numeració de la cadena. D'aquesta manera és possible avaluar els canvis conformacionals que es produeixen al llarg de les simulacions en cada una de les glucoses.

Per realitzar les simulacions de dinàmica molecular s'ha partit en tots els casos de les estructures cristal·lines existents (CA6, CA7, CA8, CA14, i CA26), i s'han construït manualment amb el programa Macromodel 5.0 les estructures de partida per a la CA21 i la CA28. A la Figura 5-2 es representen les estructures de partida utilitzades en cada cas. Per facilitar la comprensió de la forma associada a la nomenclatura a la figura es representa l'esquelet C4-O4-C1 amb una cinta, i les glucoses es mostren en diferents colors segons quina és la seva conformació relativa amb la glucosa següent. Així doncs, les glucoses en conformació *s* es representen de color gris, les glucoses en conformació *+* es representen de color groc, les glucoses en conformació *a* es representen de color verd, i les glucoses en conformació *-* es representen de color vermell. La nomenclatura completa es detalla al peu de cada figura i a més, en l'apèndix s'inclouen les taules de nomenclatura de totes les estructures de les ciclodextrines gegants que s'esmenten en aquest capítol, i és recomanable consultar-les per comprendre millor les diferències entre una estructura i l'altre.



**Figura 5-2 De esquerra a dreta i de dalt a baix estructures de partida de la CA14, CA21, CA26, i CA28.**

De la figura convé destacar en primer lloc que, degut a l'adaptació de la nomenclatura als sistemes dinàmics que s'estudien, en l'estructura de partida de la CA14 no es defineixen les dues glucoses en conformació *kink* o inclinades que estan descrites en l'estructura cristal·lina. I d'altra banda, l'estructura de partida de la CA21 té un elevat nombre de glucoses inclinades en conformació - (color vermell), i també una en conformació + (color groc). A més, en aquesta hi ha quatre glucoses invertides (color verd).

## 5.2 DETERMINACIÓ DEL NOMBRE DE CONFÒRMERS AL LLARG DE LA SIMULACIÓ DE DINÀMICA MOLECULAR

En la tesi precedent es van observar elevades desviacions associades als valors dels paràmetres geomètrics i, especialment, associades als valors dels diedres. Aquest fet, clarament va indicar que les ciclodextrines de major grandària adquireixen diverses conformacions al llarg de la simulació i, per tant, que s'ha de tenir cura a l'hora d'analitzar les trajectòries. Per aquest motiu, en la present tesi s'han realitzat simulacions de dinàmica molecular en fase gas i dissolució aquosa i, un cop obtingudes les trajectòries, s'ha aprofundit en les anàlisis de cada un dels confòrmers per separat amb l'objectiu de millorar-ne la seva caracterització.

Així doncs, en primer lloc s'ha realitzat l'anàlisi del RMS (*Root Mean Square*) de totes les trajectòries, considerant com a estructura de referència l'última estructura obtinguda en cada una de les simulacions. A continuació, per determinar el nombre de conjunts d'estructures que representen als diferents confòrmers detectats al llarg de la simulació, s'ha considerat la variació de RMS que ve donada per l'Equació 5-1.

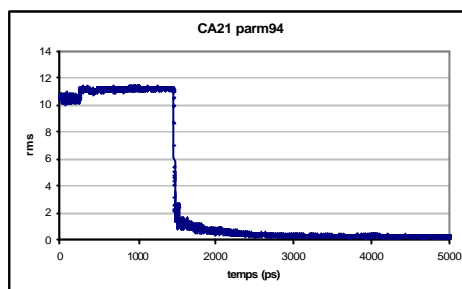
$$\Delta RMS = 0.015 \cdot N \quad \text{Equació 5-1}$$

On N representa el número total d'àtoms considerats en cada cicloamilosa per calcular el RMS. Així doncs, s'ha predeterminat per a cada ciclodextrina estudiada el valor de la diferència de RMS a partir del qual es pot considerar que dos conjunts d'estructures són diferents (Taula 5-1).

**Taula 5-1 Criteri de selecció de RMS.**

	Nº glucoses	Nº àtoms RMS	?RMS
CA14	14	70	1.05
CA21	21	105	1.58
CA26	26	130	1.95
CA28	28	140	2.10

Com a exemple de l'aplicació d'aquest criteri, a la Gràfica 5-1 es mostra l'anàlisi del RMS realitzat per a la CA21 amb el camp de forces parm94 en fase gas. En aquest cas, s'observarien estrictament tres grups d'estructures diferents però, pel criteri del RMS utilitzat, la diferència entre els dos primers grups és molt petita ( $\text{RMS} \sim 1.0$ ) i per aquest motiu, només es consideren dos grups d'estructures que representen a dues conformacions diferents del sistema.



**Gràfica 5-1 RMS de la CA21 en fase gas amb el camp de forces parm94.**

En els següents apartats es detallen les anàlisis conformacionals realitzades per a cada una de les cicloamiloses estudiades i amb els diferents camps de forces. Les gràfiques del RMS s'ometen aquí però es poden consultar en l'apèndix.

### **5.3 ANÀLISI CONFORMACIONAL DE LES CICLOAMILOSES AMB EL CAMP DE FORCES PARM94**

S'ha iniciat l'estudi amb el camp de forces parm94 perquè és el mateix camp de forces que es va utilitzar en la tesi doctoral precedent. En aquest cas, no s'han estudiat les ciclodextrines comunes perquè dins del nostre grup de recerca ja s'han realitzat altres estudis d'aquestes amb el mateix camp de forces.<sup>54,57</sup>

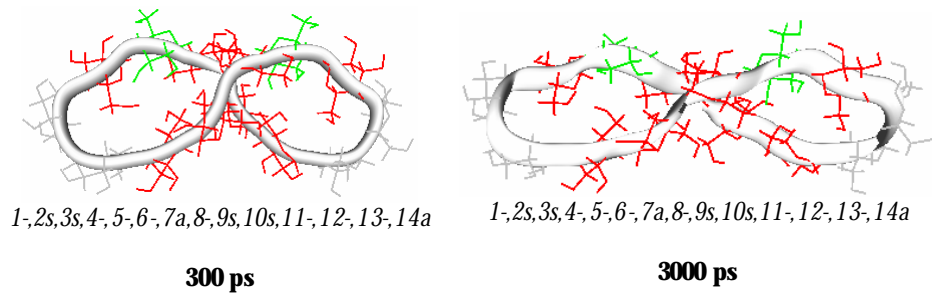
#### **5.3.1 Anàlisi conformacional de la CA14**

A la Figura 5-3 es representen les estructures de la CA14 als 300 i als 3000 ps de la simulació de dinàmica molecular en fase gas. Les dues conformacions detectades presenten una forma de vuit; s'observa un creuament entre les dues cadenes que dona lloc a dues pseudocavitats formades per set glucoses cada una.

---

<sup>57</sup> Bonnet, P., Tesi Doctoral en cotutela Universit  d'Orl ans i Universitat Autònoma de Barcelona, **Maig 2001**.





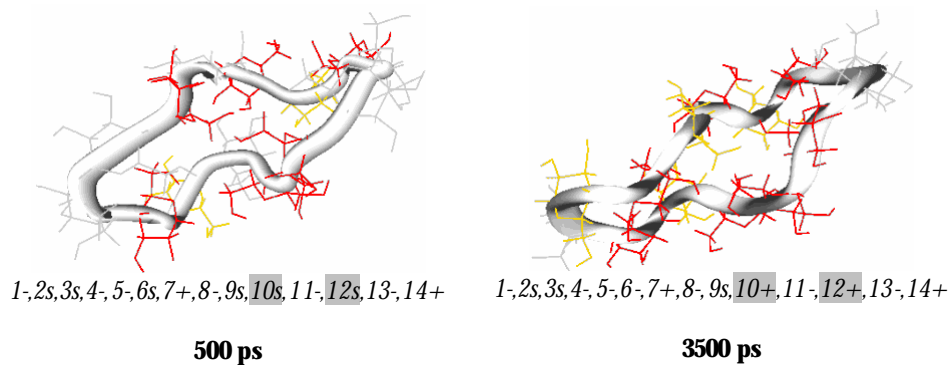
**Figura 5-3 Estructures de la CA14 als 300 i als 3000 ps de la simulació en fase gas amb el camp de forces parm94.**

Ambdues estructures tenen la mateixa conformació, presenten un elevat nombre de glucoses inclinades i també un parell de glucoses invertides. La diferència entre les dues es representa a la Figura 5-4: degut a petites variacions de la posició relativa de les glucoses entre si, l'estructura als 3000 ps (de color vermell) està més estirada que l'estructura als 300 ps (de color gris) i, conseqüentment, la cavitat descrita en cada una de les meitats és més ovalada en la segona estructura que en la primera.



**Figura 5-4 Superposició de les estructures als 300 (gris) i als 3000 (vermell) ps de la CA14.**

D'altra banda, en dissolució aquosa (Figura 5-5) també es detecten dues conformacions que es repleguen respecte l'estructura de partida, però no s'observa el creuament de cadenes com en la simulació en fase gas.

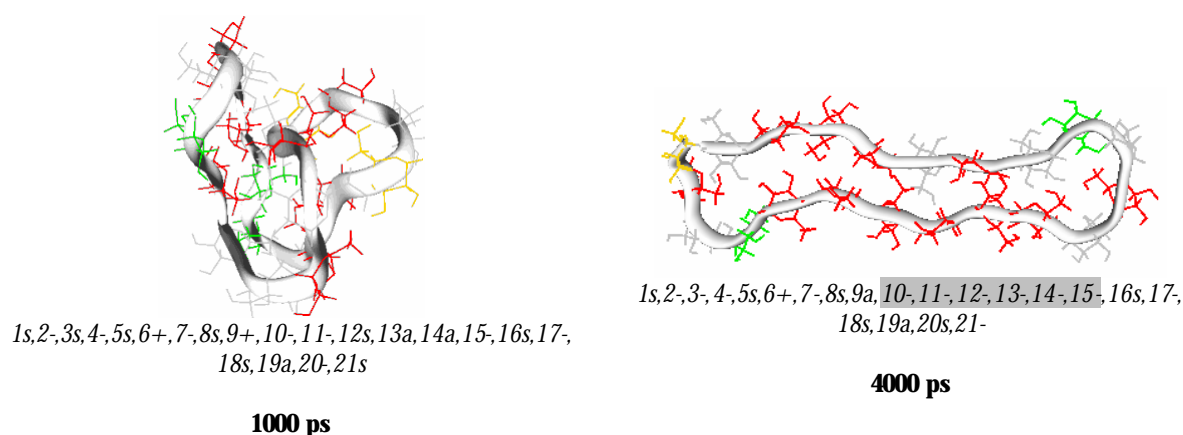


**Figura 5-5 Estructures de la CA14 als 500 i als 3500 ps de la simulació en dissolució aquosa amb el camp de forces parm94.**

La principal diferència entre totes dues estructures està en la conformació de les glucoses 10 i 12, que al principi tenen conformació *s* però un cop avançada la simulació tenen una conformació *+*. Per tant, degut a aquest augment de glucoses inclinades s'explica que l'estructura als 3500 ps estigui més replegada que la precedent.

### 5.3.2 Anàlisi conformacional de la CA21

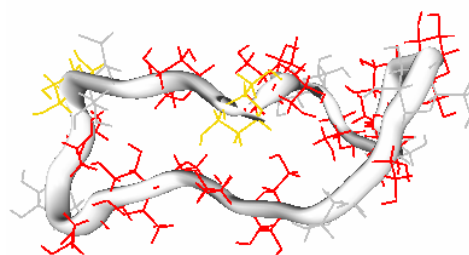
En aquest cas, s'han escollit les estructures als 1000 i als 4000 ps com a estructures representatives de les dues conformacions de la CA21 detectades al llarg de la simulació en fase gas. Aquestes es representen a la Figura 5-6.



**Figura 5-6 Estructures de la CA21 als 1000 i 4000 ps de la simulació en fase gas amb el camp de forces parm94.**

L'estructura als 1000 ps està plegada per la meitat, però no presenta cap tipus de simetria com presenten les conformacions de la CA14 en fase gas. A mida que avança la simulació l'estructura s'estira, i al final s'observa que l'estructura als 4000 ps està totalment estirada amb una cavitat molt estreta i allargada i sense cap creuament de cadenes ni *loops*. A partir de la conformació d'aquesta darrera estructura, es pot associar l'estirament a un augment de glucoses consecutives amb conformació *-* (color vermell) respecte la glucosa adjacent.

D'altra banda, en dissolució aquosa es detecta una única conformació (Figura 5-7). No s'aprecien gaires canvis conformacionals respecte l'estructura de partida i es manté força bé la forma en la part dreta de la molècula (glucoses 7-18). La part esquerra (glucoses 19-6) presenta més variacions, s'observa que s'ha replegat lleugerament sobre si mateixa i que augmenta el nombre de glucoses en conformació *-* respecte l'estructura de partida.

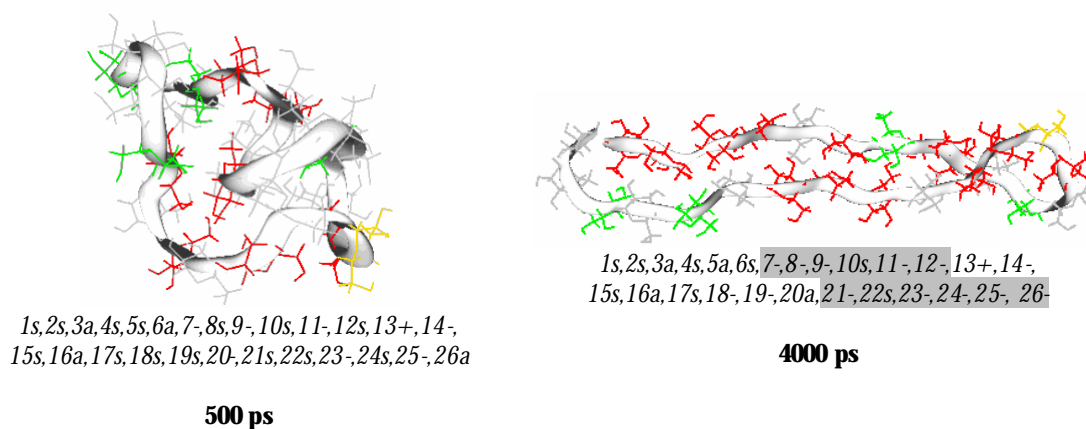


1s,2-,3s,4-,5-,6+,7-,8s,9+,10-,11s,12-,13-,14-,15-,16s,17-,18s,19-,20-,21-

**Figura 5-7 Estructura representativa de la CA21 en dissolució aquosa amb el camp de forces parm94.**

### 5.3.3 Anàlisi conformacional de la CA26

Al llarg de la simulació en fase gas de la CA26 es detecten novament dos conjunts d'estructures diferents. Als 500 ps de la simulació (Figura 5-8) ja s'observen importants desviacions respecte de l'estructura de partida amb un major nombre de glucoses inclinades. D'altra banda, als 4000 ps de la mateixa simulació l'estructura de la CA26 està totalment estirada, i només en l'extrem dret s'observa la presència d'un petit retorçiment que forma un *loop* format per sis glucoses aproximadament. Novament s'observa que l'estirament de les estructures comporta un augment de glucoses consecutives amb conformació – respecte la glucosa adjacent.



1s,2s,3a,4s,5s,6a,7-,8s,9-,10s,11-,12s,13+,14-,  
15s,16a,17s,18s,19s,20-,21s,22s,23-,24s,25-,26a

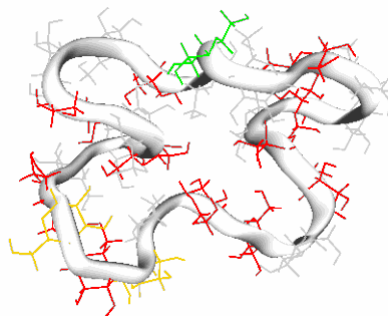
**500 ps**

1s,2s,3a,4s,5a,6s,7-,8-,9-,10s,11-,12-,13+,14-,  
15s,16a,17s,18-,19-,20a,21-,22s,23-,24-,25-,26-

**4000 ps**

**Figura 5-8 Estructures de la CA26 als 500 i als 4000 ps de la simulació en fase gas amb el camp de forces parm94.**

En dissolució aquosa es detecta una única conformació (Figura 5-9), no s'aprecien grans canvis conformacionals respecte l'estructura de partida i encara es detecten les dues voltes d'hèlix. És a dir, sembla que les molècules d'aigua juguen un paper determinant a l'hora de mantenir la conformació de les ciclodextrines gegants amb aquest camp de forces.

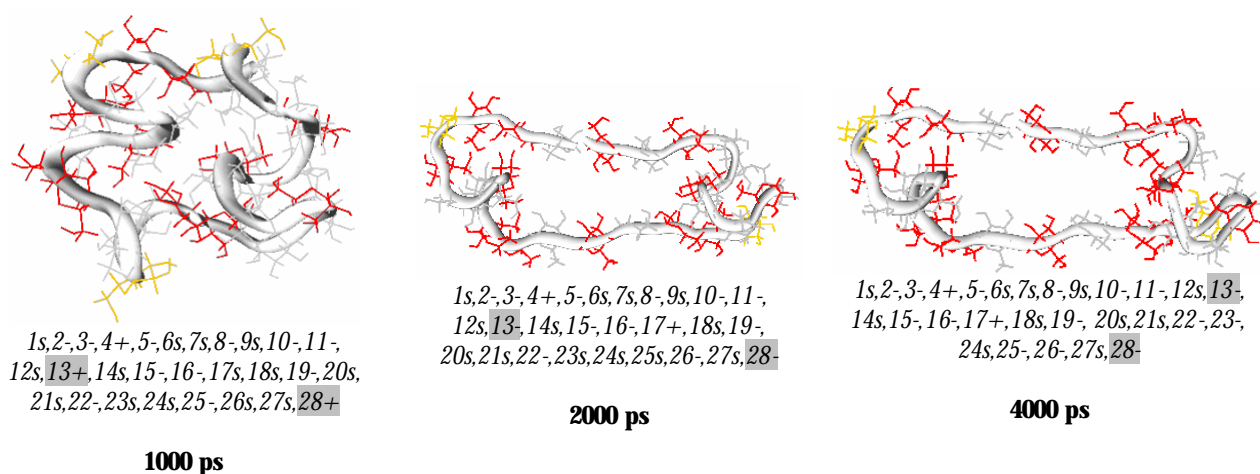


1s,2-,3s,4s,5-,6s,7-,8s,9s,10-,11+,12-,13+,14s,15-,16-,17s,18-,19-,20s,21-,22s,23s,24-,25s,26a

**Figura 5-9 Estructura representativa de la CA26 en dissolució aquosa amb el camp de forces parm94.**

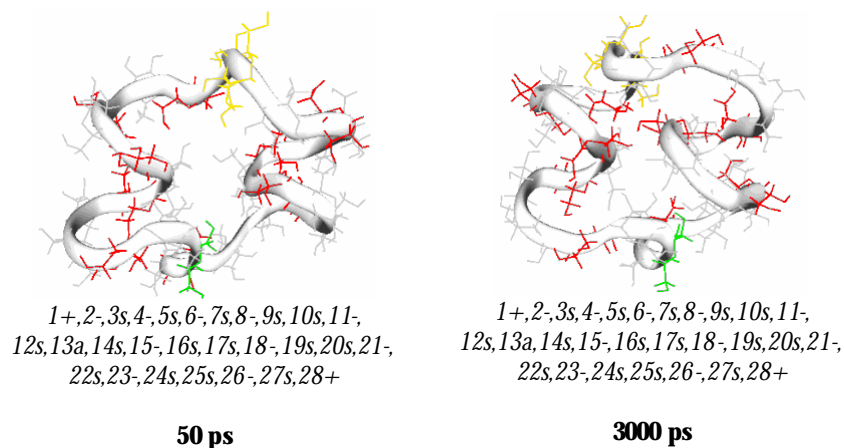
### 5.3.4 Anàlisi conformacional de la CA28

Finalment, a la Figura 5-10 es mostren les estructures de la CA28 als 1000, 2000, i 4000 ps de la simulació en fase gas, que representen a les tres conformacions detectades. S'observa que en l'estructura als 1000 ps encara es mantenen les dues voltes d'hèlix de l'estructura inicial, no obstant, presenta lleugeres desviacions respecte d'aquesta i augmenta el nombre de glucoses inclinades. A mida que avança la simulació, i anàlogament al que s'ha observat en casos anteriors, l'estructura s'estira. Però en aquest cas, tant en l'estructura als 2000 ps com en l'estructura als 4000 ps, s'observa la presència de dos *loops* en cada un dels laterals, que fan que al final de la simulació l'estructura no estigui totalment estirada com succeeix en les altres ciclodextrines. La diferència entre aquestes últimes estructures i l'estructura als 1000 ps està en la cadena superior i inferior que connecten als dos *loops*, en la primera estructura està replegada (conformació + de les glucoses 13 i 28) i en les altres dues està estirada (conformació - de les glucoses 13 i 28).



**Figura 5-10 Estructures de la CA28 als 1000, 2000, i 4000 ps de la simulació en fase gas amb el camp de forces parm94.**

Igual que s'ha descrit per a la CA26 en dissolució aquosa, en aquest cas tampoc es produeixen grans canvis conformacionals respecte l'estructura de partida. A la Figura 5-11 es representen les estructures als 50 i als 3000 ps d'aquesta simulació. Ambdues es caracteritzen per estar més desordenades que l'estructura inicial i presenten una estructura més replegada sobre si mateixa i amb major nombre de glucoses inclinades.



**Figura 5-11 Estructures de la CA28 als 50 i 3000 ps de la simulació en dissolució aquosa amb el camp de forces parm94.**

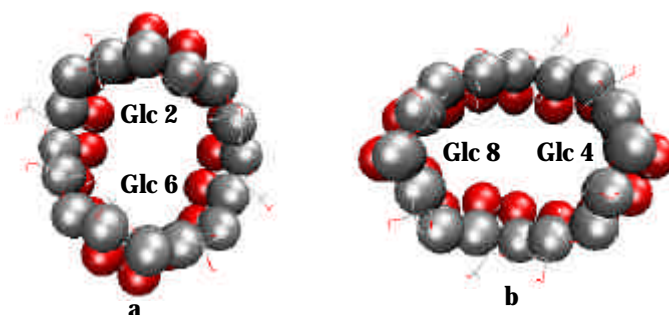
## 5.4 ANÀLISI CONFORMACIONAL DE LES CICLOAMILOSES AMB EL CAMP DE FORCES PARM99

El següent camp de forces emprat per realitzar l'estudi de les cicloamiloses ha estat el camp de forces parm99. Donat que, en el moment d'iniciar aquests estudis, en el nostre grup de recerca encara no s'havien realitzat simulacions de ciclodextrines amb aquest camp de forces, s'ha iniciat l'estudi amb les ciclodextrines comunes, i un cop conegut el comportament d'aquestes, s'ha prosseguit amb l'estudi de les ciclodextrines de major grandària. A més, convé remarcar que en aquest cas les simulacions en dissolució aquosa s'han realitzat durant 4 ns per a les ciclodextrines comunes, la CA14, i la CA21, però donat l'augment en el nombre d'àtoms de les altres dues ciclodextrines, les simulacions en dissolució aquosa s'han realitzat durant 5 ns amb l'objectiu de detectar canvis conformacionals que puguin requerir més temps.

### 5.4.1 Anàlisi conformacional de les ciclodextrines comunes

En aquest cas, no es detallen tots els resultats obtinguts, però sí que se'n remarcaran els trets més importants. En primer lloc, és important esmentar que no s'han observat oscil·lacions importants del RMS al llarg de les simulacions en fase gas i dissolució aquosa de les tres ciclodextrines comunes i, per tant, es detecta una conformació majoritària en tots els casos.

També convé destacar, que les estructures obtingudes a partir de la mitjana de les coordenades tenen forma de con truncat i una cavitat troncocònica, tal i com està definit en les estructures cristal·lines. No obstant, a partir d'una anàlisi més detallada d'algunes estructures aleatòries al llarg de la simulació s'ha observat que hi ha força moviment de les glucoses que col·lapsen lleugerament cap a l'interior de la cavitat. Com a exemple, es poden observar a la Figura 5-12 les estructures de la CA8 als 2500 i 4000 ps de la simulació en fase gas respectivament.

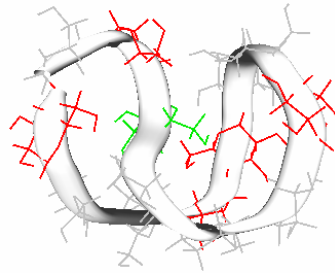


**Figura 5-12 Estructures de la CA8 als a) 2500 ps i b) als 4000 ps de la simulació en fase gas amb el camp de forces parm99.**

En ambdós casos s'ha perdut la forma de con truncat i hi ha dues glucoses diametralment oposades que s'inclinen cap a l'interior de la cavitat fent que aquesta adopti una forma el·líptica; als 2500 ps són les glucoses número 2 i 6 i als 4000 ps són les glucoses 4 i 8. No obstant, les glucoses no s'inclinen excessivament i per aquest motiu, les dues estructures mantenen la conformació  $1s, 2s, 3s, 4s, 5s, 6s, 7s, 8s$  de l'estructura cristal·lina. En resum, les estructures obtingudes a partir de la mitjana de les coordenades tenen una cavitat troncocònica i una forma de con truncat com a conseqüència de la mitjana de diferents conformacions el·líptiques, on glucoses diametralment oposades s'inclinen cap a l'interior de la cavitat.

#### 5.4.2 Anàlisi conformacional de la CA14

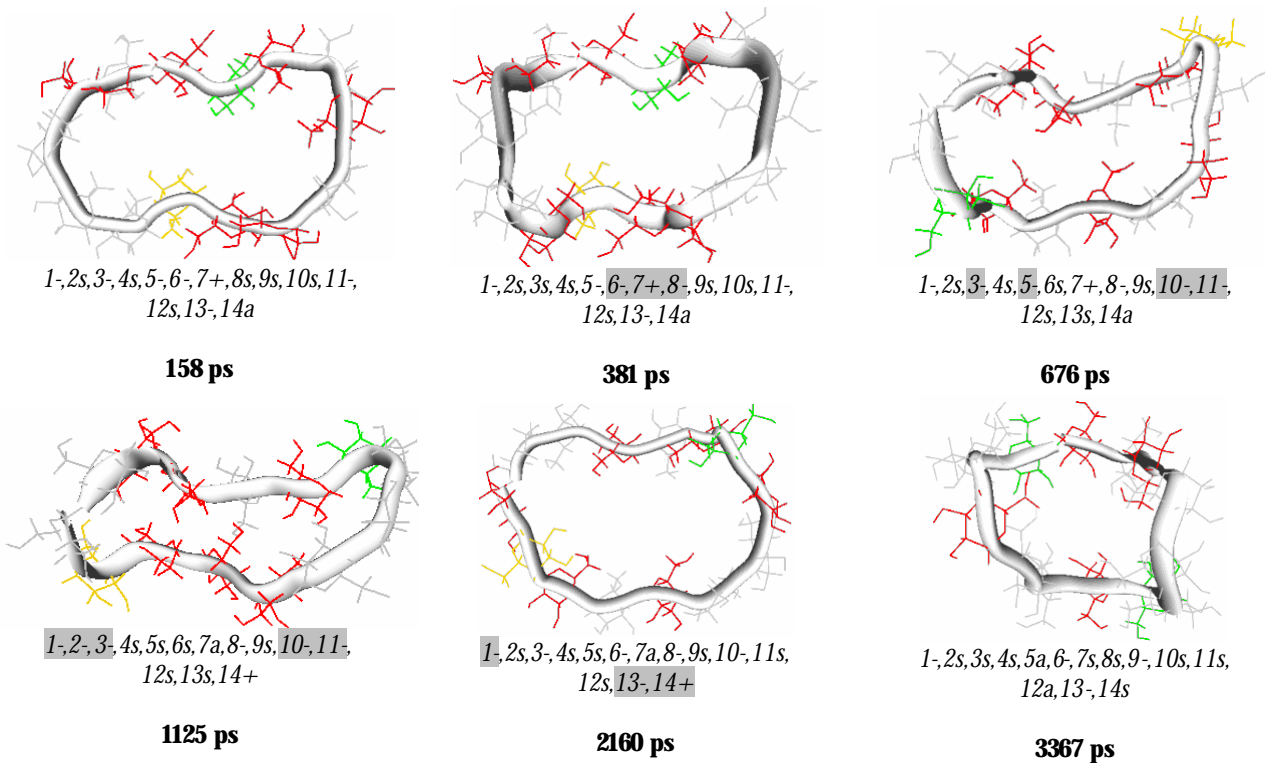
A la Figura 5-13 es mostra l'estructura obtinguda a partir de la mitjana de les coordenades al llarg de la simulació en fase gas de la CA14. Aquesta es manté plegada simètricament i, per tant, no s'han produït canvis conformacionals destacables des de l'estructura cristal·lina de partida.



*1a,2s,3s,4s,5s,6s,7a,8-,9-,10s,11s,12s,13s,14-*

**Figura 5-13 Estructura obtinguda a partir de la mitjana de les coordenades de la CA14 en fase gas amb el camp de forces parm99.**

D'altra banda, per entendre el que succeeix al llarg de la simulació en dissolució aquosa, s'han escollit diferents estructures que representen a diverses conformacions de la CA14 al llarg d'aquesta simulació (Figura 5-14).



**Figura 5-14 Estructures representatives de la CA14 en dissolució aquosa amb el camp de forces parm99.**

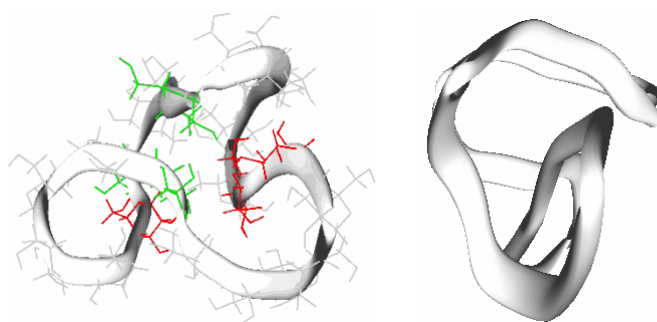
Als 158 ps s'observa una estructura molt similar a l'estructura cristal·lina de partida però amb un augment de glucoses inclinades amb conformació + i -. Als 381 ps l'estructura esdevé més replegada que la precedent, i convé destacar que la seqüència de tres glucoses consecutives del tipus -,+,- és la responsable de que la glucosa central es situï a sobre de la cavitat, fent que l'entrada d'aquesta esdevingui més obstaculitzada. Així doncs, als 381 ps la glucosa 7 (color groc) és la que obstaculitza l'entrada de la cavitat. Als 676 ps ha desaparegut la seqüència tipus -,+,- de

l'estructura anterior i s'observa una cavitat més estreta. Aquest estretament és degut a la conformació – de les glucoses 3 i 5 que apunten cap a l'interior de la cavitat i les glucoses 10 i 11, que estan diametralment oposades a les anteriors, i que també apunten cap a l'interior. Als 1125 ps l'estructura presenta una cavitat encara més allargada i estreta, que es pot descriure a partir de dos conjunts de glucoses consecutives (1-,2-,3-, i 10-,11-,) diametralment oposats i amb conformació -. Un cop passada aquesta situació límit, es retorna cap a estructures similars a l'estructura de partida. Als 2160 ps desapareix la seqüència de glucoses en conformació - de l'estructura precedent però s'observa novament una seqüència del tipus -,+,- que fa que la glucosa 14 es situï a sobre de la cavitat. Finalment, als 3367 ps s'observa novament una estructura molt similar a l'estructura de partida, la qual presenta força simetria i es poden definir dues meitats, una entre les glucoses 13-5 i l'altre entre les glucoses 6-12 que tenen pràcticament la mateixa seqüència.

Per tant, al llarg de la simulació s'observa el procés de tancament i obertura de la cavitat degut al canvi de la conformació relativa de les glucoses entre si, de manera que tant al principi com al final de la simulació l'estructura es força similar a l'estructura cristal·lina.

#### 5.4.3 Anàlisi conformacional de la CA21

En l'estructura obtinguda a partir de la mitjana de les coordenades de la simulació en fase gas de la CA21 (Figura 5-15), s'observa dos lòbuls inferiors formats per sis glucoses cada un, i un altre de major grandària, que es situa a la part superior de la molècula. Cal destacar que aquest lòbul més gran cobreix la resta de la molècula com si fos una tapadora.

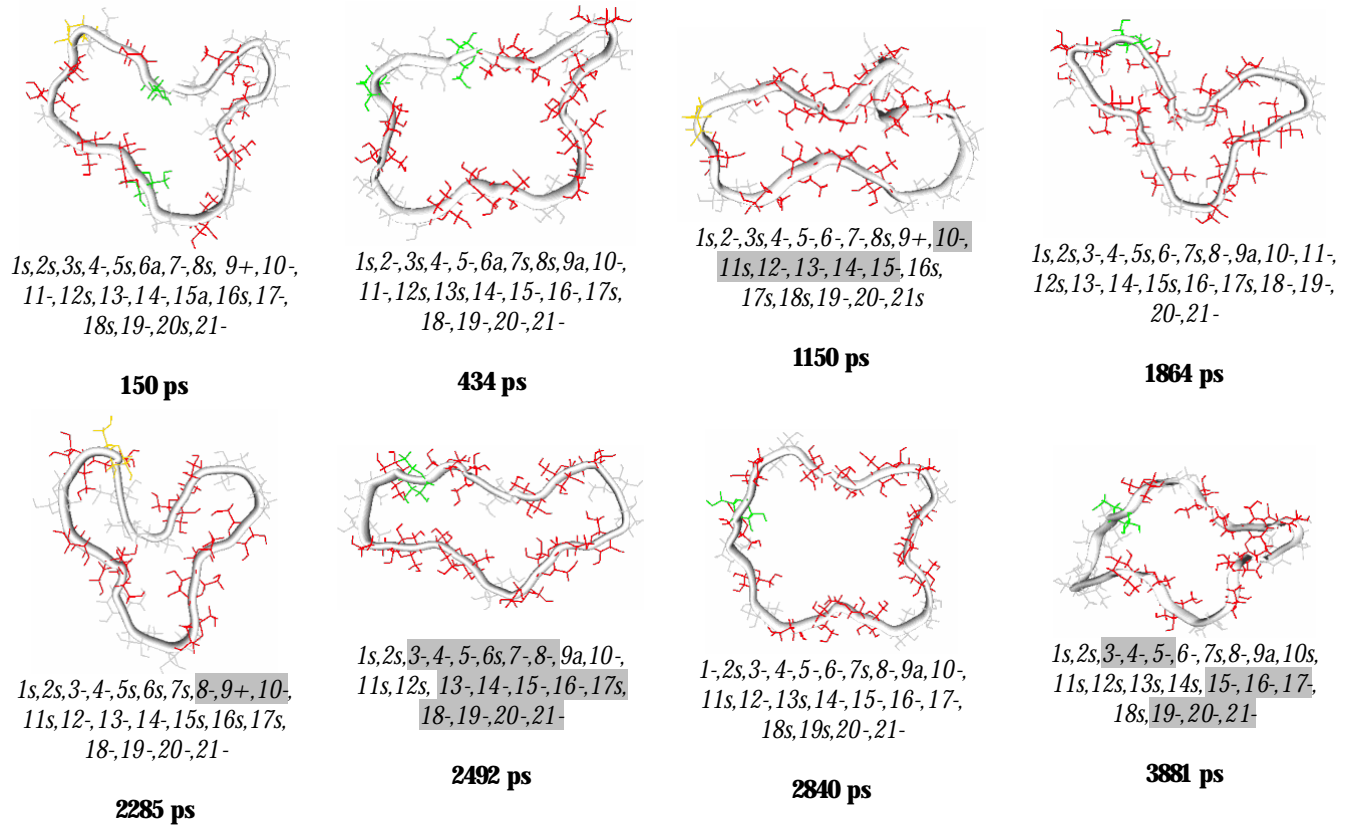


*1s,2s,3s,4s,5s,6a,7s,8s,9a,10-,11s,12s,13s,14s,15a,16s,17s,18s,19s, 20-,21-*

**Figura 5-15 Estructura obtinguda a partir de la mitjana de les coordenades de la CA21 en fase gas amb el camp de forces parm99. Esquerra vista frontal i dreta vista lateral.**



Per entendre quins són els canvis conformacionals que es produeixen al llarg de la simulació en dissolució aquosa de la CA21, novament s'han escollit algunes de les estructures representatives al llarg d'aquesta simulació (Figura 5-16).



**Figura 5-16 Estructures representatives de la CA21 en dissolució aquosa amb el camp de forces parm99.**

Als 150 ps s'observa que entre les glucoses 6 i 14 es manté l'estructura de partida, però es produeixen canvis importants en la resta de la molècula. Igual que en fase gas s'han format dos lòbuls; el primer està definit entre les glucoses 15-19 i el segon entre les glucoses 20-5. Als 434 ps s'observa que l'estructura adopta una forma més quadrada, i la diferència més significativa amb l'estructura precedent està en el canvi d'una seqüència tipus 5s,6a,7- a una seqüència enantiòmerica del tipus 5-,6a,7s. Aquest canvi, fa que aquestes glucoses als 434 ps apuntin cap a l'exterior enlloc d'apuntar cap a l'interior de la cavitat (Figura 5-17).

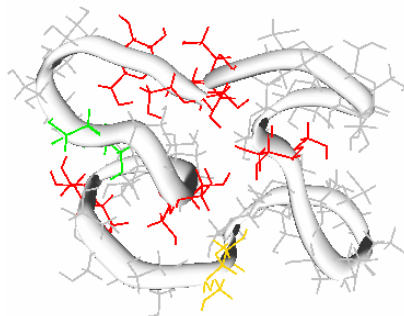


**Figura 5-17 Representació del fragment entre les glucoses 4-8 en les estructures als 150 ps (vermell) i als 434 ps (verd).**

Als 1150 ps s'observa que el lòbul entre les glucoses 20-5 està més tancat, i a més a més, el canvi de conformació de les glucoses 12 i 13 respecte l'estructura precedent fa que en aquesta zona l'estructura esdevingui més estirada degut a un augment de glucoses consecutives en conformació -. Als 1864 ps s'estreta el lòbul entre les glucoses 6-15 i als 2285 ps l'estructura és força similar a l'estructura anterior, però és important observar la presència d'una seqüència del tipus -,+,- que fa que la glucosa 9 obstaculitzi l'entrada de la cavitat. El canvi més accentuat s'observa als 2492 ps, i les seqüències entre les glucoses 3 i 8 i entre les glucoses 13 i 21 amb conformació - majoritàriament defineixen amb claredat l'estirament de l'estructura. Però sembla que aquesta no és gaire estable i als 2840 ps l'estructura és molt similar a l'estructura als 434 ps. Finalment, als 3881 ps s'aprecien quatre lòbuls: dos més estrets i allargats als lateral i dos més amples i curts a dalt i a baix. Tres d'aquests lòbuls estan clarament definits per conjunts de tres glucoses consecutives amb conformació - que apunten cap a l'interior de la cavitat fent que aquesta esdevingui més estreta.

#### 5.4.4 Anàlisi conformacional de la CA26

En aquest cas, s'observa que l'estructura de la CA26 obtinguda a partir de la mitjana de les coordenades de la simulació en fase gas (Figura 5-18) no presenta grans variacions respecte l'estructura cristal·lina de partida. Es mantenen els *loops* inicials encara que, en conjunt, l'estructura està lleugerament més desordenada.

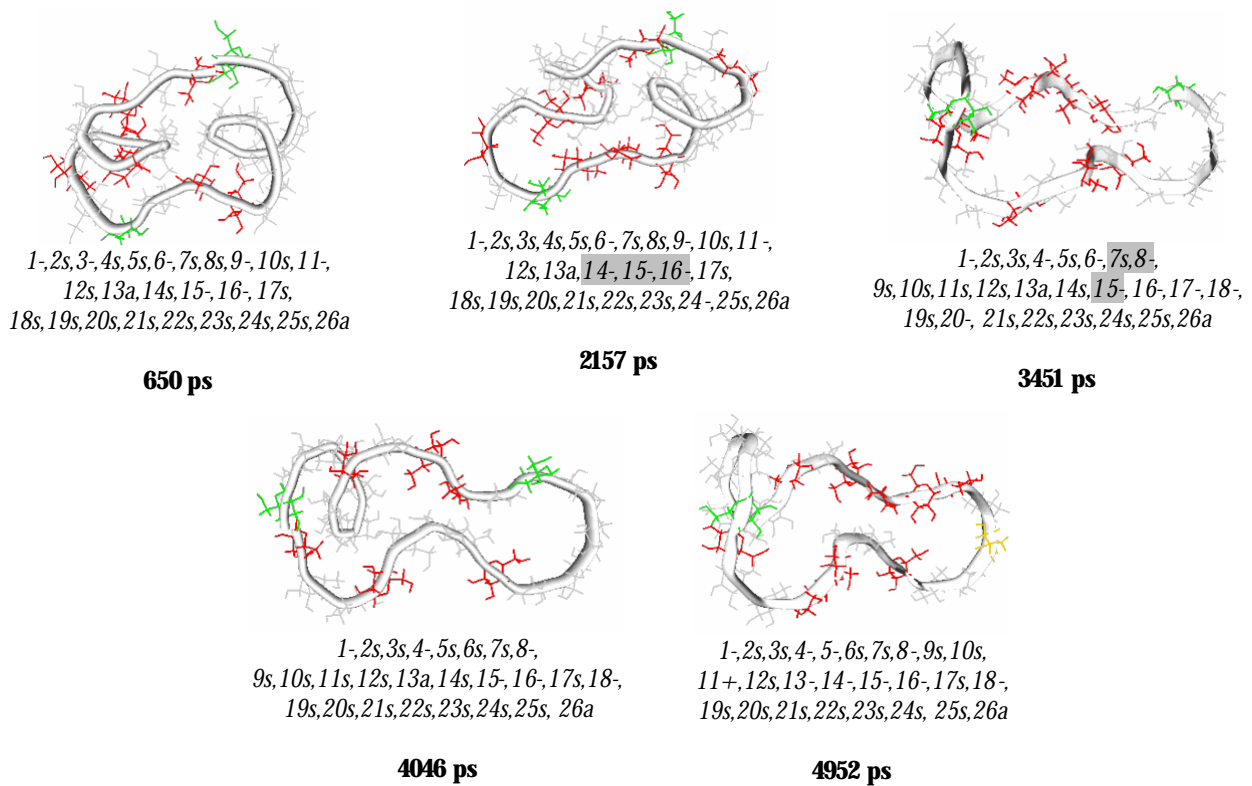


1-,2-,3s,4s,5a,6s,7-,8s,9s,10-,11s,12s,13+,14s,15s,16s,17s,18s,19s,20-,21s,22s,23s,24s,25s,26-

**Figura 5-18 Estructura obtinguda a partir de la mitjana de les coordenades de la CA26 en fase gas amb el camp de forces parm99.**

D'altra banda, en dissolució aquosa s'observa com, poc a poc, al llarg de la simulació, la ciclodextrina té tendència a desplegar-se (Figura 5-19). Als 650 ps encara es poden apreciar les dues voltes d'hèlix de l'estructura de partida però, com ja s'ha comentat en fase gas, en general l'estructura està més desordenada degut a un augment de glucoses inclinades en conformació -. Als 2157 ps també es poden apreciar les dues voltes d'hèlix de l'estructura de partida. No obstant,

ja s'aprecia la tendència a estirar-se en la zona de les glucoses 14-16. Als 3451 ps l'estructura s'ha estirat més respecte l'estructura precedent. Aquest comportament queda ben definit per la seqüència de glucoses 15-20 amb conformació  $\beta$ -majoritàriament. També s'observa la presència d'un *loop* definit per les glucoses 21-26, i a l'extrem oposat d'aquest es descriu un lòbul format per les glucoses 8-15. Aquest lòbul queda definit per la conformació  $\alpha$ -de les glucoses 7, 8 i 15 que apunten cap a l'interior de la cavitat. Als 4046 ps el *loop* format per les glucoses 21-26 ha variat lleugerament la seva posició en l'espai respecte l'estructura precedent. La resta de la molècula no presenta variacions importants. Finalment, als 4952 ps s'observa una estructura molt similar a la dels 3451 ps.

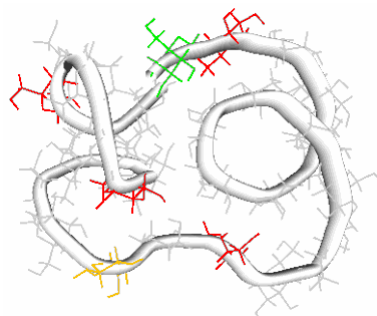


**Figura 5-19 Estructures representatives de la CA26 en dissolució aquosa amb el camp de forces parm99.**

A la vista d'aquests canvis conformacionals observats en la CA26 en dissolució aquosa, es podria pensar que l'estructura cristal·lina fos única, i que realment en dissolució aquosa la conformació de la CA26 presentés una cavitat allargada. Així doncs, només en el cas de tenir un agent extern, com les forces d'empaquetament en el cas de l'estructura cristal·lina, o una molècula complexant que provoqués canvis conformacionals en la CA26 en dissolució aquosa, es podria tenir l'estructura amb una doble hèlix antiparal·lela observada en l'estructura cristal·lina.

### 5.4.5 Anàlisi conformacional de la CA28

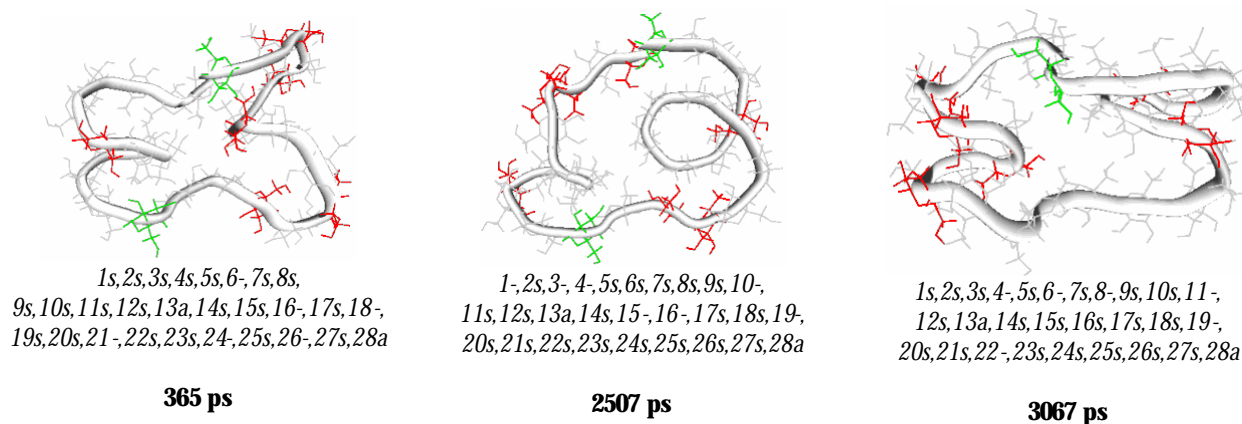
Finalment, en la simulació de la CA28 en fase gas es detecten dues conformacions diferents: una durant els primers 500 ps i l'altre durant tota la resta de la simulació. Ambdues són molt similars a l'estructura de partida. Per tant, novament s'han produït pocs canvis conformacionals al llarg d'aquesta simulació. Com a exemple, a la Figura 5-20 es representa l'estructura del segon confòrmer, que és el majoritari.



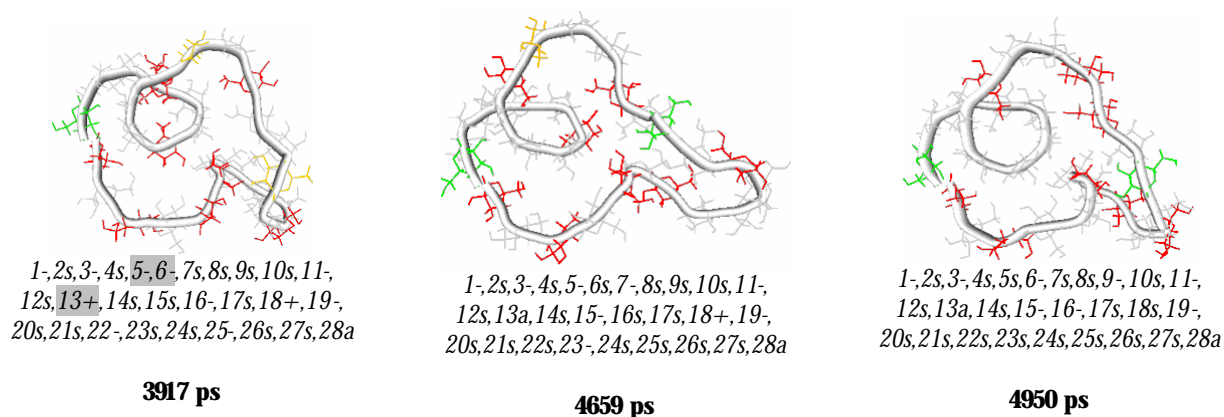
*1s, 2s, 3-, 4s, 5s, 6s, 7-, 8s, 9s, 10s, 11s, 12s, 13+, 14s, 15-,  
16s, 17s, 18s, 19s, 20s, 21s, 22s, 23s, 24s, 25s, 26s, 27-, 28a*

**Figura 5-20 Estructura obtinguda a partir de la mitjana de les coordenades de la conformació majoritària de la CA28 en fase gas amb el camp de forces parm99.**

En dissolució aquosa (Figura 5-21 i Figura 5-22), igual que s'ha descrit per a la CA26, la CA28 també presenta una certa tendència a desplegar-se encara que, en aquest cas, no és tan accentuada com en el cas anterior.

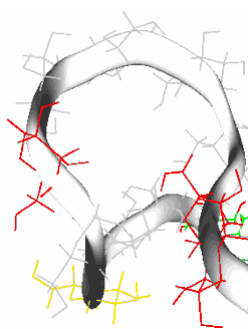


**Figura 5-21 Estructures representatives de la CA28 en dissolució aquosa amb el camp de forces parm99.**  
**Continua pàgina següent.**



**Figura 5-22** Continuació estructures representatives de la CA28 en dissolució aquosa amb el camp de forces parm99.

Als 365 ps es poden observar les dues voltes d'hèlix antiparal·leles de l'estructura de partida. Als 2507 ps s'observa que la volta d'hèlix de la dreta es situa en un pla paral·lel al pla del paper. A més, sembla que l'estructura intenta desplegar-se lleugerament. Als 3067 ps s'observa una estructura semblant a la inicial amb més glucoses en conformació *s*. Als 3917 ps novament es produeix un intent de desplegament. S'aprecia a la part superior de l'estructura la presència d'un *loop* (format per les glucoses 19-25) i a la part dreta inferior de la molècula un lòbul format per les glucoses 6-12 (Figura 5-23). La formació d'aquest lòbul està definit per la conformació – de les glucoses 5 i 6 que apunten cap a l'interior de la cavitat, i per la conformació + de la glucosa 13 que provoca un canvi clar d'orientació en la cadena.



**Figura 5-23** Detall del lòbul entre les glucoses 6-12 en l'estructura als 3917 ps (vista superior).

Als 4659 ps l'estructura manté el *loop* format per les glucoses 19-25. D'altra banda, s'observa que el lòbul de la part dreta inferior de la molècula ha variat la posició en l'espai respecte l'estructura precedent (Figura 5-24). En l'estructura anterior (color verd) aquest lòbul apuntava cap a fora, no obstant, en aquesta estructura (color vermell) el mateix lòbul es manté en el pla de la resta de la molècula.



**Figura 5-24 Comparació de la posició relativa del lòbul en les estructures de la CA28 als 3917 (color verd) i als 4659 (color vermell) ps.**

Al final de la simulació, als 4950 ps, s'observa que l'estructura és molt similar a la descrita per als 3917 ps i, per tant, no es comentaran més detalls.

## **5.5 ANÀLISI CONFORMACIONAL DE LES CICLOAMILOSES AMB EL CAMP DE FORCES GLYCAM 2000A**

Els estudis de les ciclodextrines gegants que s'han comentat fins ara, han estat realitzats amb un camp de forces específic de proteïnes (parm94 i parm99). Per aquest motiu, s'ha realitzat l'estudi de les cicloamiloses amb un nou camp de forces específic per oligosacàrids i glicoproteïnes, el glycam 2000a. Aquest camp de forces és consistent amb els camps de forces d'AMBER, i com a característica rellevant cal destacar la definició de nous tipus d'àtom per al carboni anomèric C1 i per a l'oxigen glicosídic O4.

La necessitat de definir nous tipus d'àtom sorgeix de les observacions experimentals que afirmen que les distàncies d'enllaç entre els àtoms C1-O5 i C1-O4 varien amb la configuració de l'anell de piranosa.<sup>58</sup> Així doncs, per tenir una bona modelització d'aquests enllaços i reproduir correctament les freqüències de vibració, s'haurien de considerar els termes creuats tipus *stretch-torsion* com en els camps de forces MM3 i MM4. Però donat que aquestes interaccions no estan definides en els camps de forces d'AMBER, en el cas dels carbohidrats es pot optar per una altra alternativa que consisteix en definir tipus d'àtoms específics per a cada anòmer. A més a més, aquest mètode té l'avantatge que és matemàticament més simple i, per tant, computacionalment més ràpid. Igual que amb el camp de forces parm99 també s'ha iniciat els estudis amb les ciclodextrines comunes.

---

<sup>58</sup> a) Deslongchamps, P., *Stereoelectronic Effects in Organic Chemistry*; Pergamon Press: New York, 1983. b) Jeffrey, G.A.; Pople, J.A.; Radom, L., *Carbohydr. Res.*, **1972**, 25(1), 117-131. c) Jeffrey, G.A.; Pople, J.A.; Binkley, J.S.; Vishveshwara, S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, 100(2), 373-379.

### 5.5.1 Anàlisi conformational de les ciclodextrines comunes

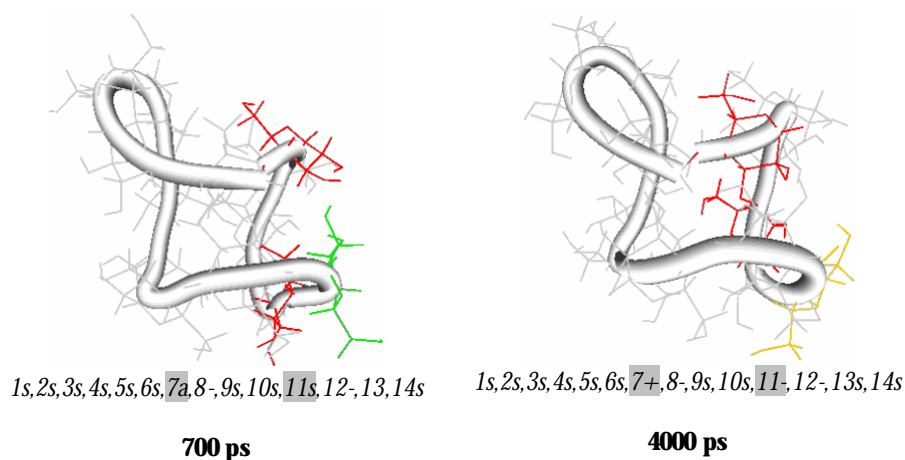
En aquest cas, tampoc es detallaran totes les dades de les anàlisis conformationals, però cal destacar que en dissolució aquosa aquestes esdevenen més flexibles i es detecten amb facilitat glucoses inclinades en conformació  $-i+$ . Per exemple, a la Figura 5-25 es representa l'estructura de la CA6 als 430 ps de la simulació en dissolució aquosa. S'observa com, efectivament, la ciclodextrina ha perdut la forma de con truncat de l'estructura cristal·lina i en aquest cas, hi ha una seqüència del tipus  $-,+,-$  que fa que la glucosa 1 obstaculitzi l'entrada de la cavitat.



**Figura 5-25 Estructura de la CA6 als 430 ps de la simulació en dissolució aquosa amb el camp de forces glycam 2000a.**

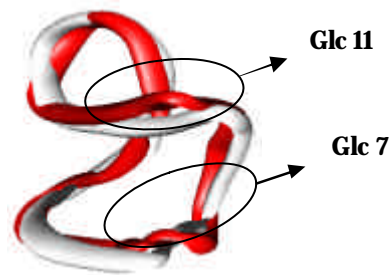
### 5.5.2 Anàlisi conformational de la CA14

En fase gas es detecten dues conformacions diferents per a la CA14, la primera es detecta durant els primers 1250 ps i la segona a partir d'aquest moment i fins al final de la simulació. Com a exemple per estudiar millor aquestes conformacions s'han escollit les estructures als 700 i als 4000 ps (Figura 5-26).



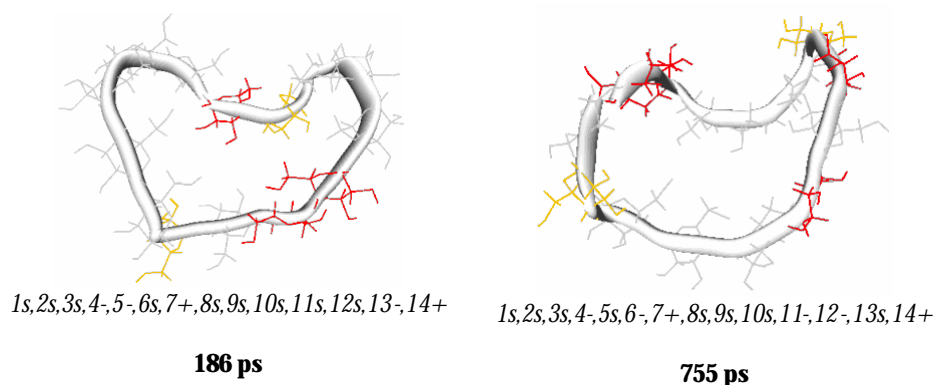
**Figura 5-26 Estructures de la CA14 als 700 ps i als 4000 ps de la simulació en fase gas amb el camp de forces glycam 2000a.**

S'observa que totes dues estructures s'han replegat respecte l'estructura inicial però el replegament és major en la segona estructura. Aquest està definit per un augment de glucoses inclinades (les glucoses 7 i 11). A la Figura 5-27 es representa la superposició de les dues estructures (als 700 ps de color gris i als 4000 ps de color vermell) i s'observa que la diferent conformació de la glucosa 7 provoca un lleuger canvi en l'orientació de la cadena principal i, a més a més, la diferència en la conformació de la glucosa 11, que en l'estructura als 4000 ps apunta cap a l'interior de la cavitat.



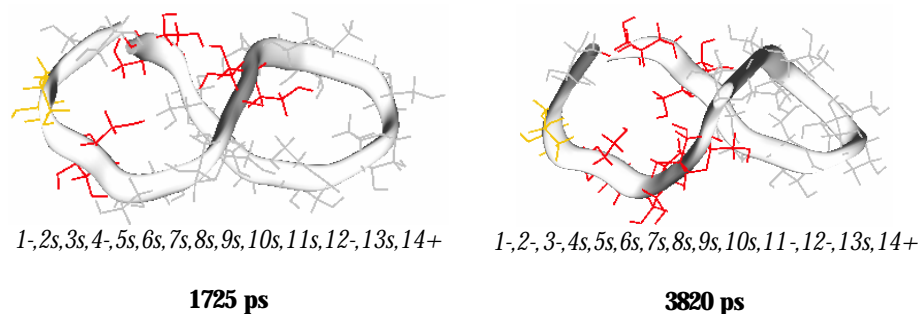
**Figura 5-27 Superposició de les estructures als 700 (color gris) i als 4000 ps (color vermell).**

Novament, per analitzar els canvis conformationals produïts al llarg de la simulació en dissolució s'han escollit algunes estructures representatives (Figura 5-28 i Figura 5-29). Als 186 ps l'estructura és molt similar a l'estructura de partida, encara que presenta major nombre de glucoses inclinades. Als 755 ps l'estructura es distorsiona una mica més però encara s'assembla a l'estructura de partida. Els canvis més importants es poden apreciar a partir dels 1725 ps, on s'observa que aquesta estructura presenta una forma de "vuit" amb dues subunitats formades per set glucoses. Finalment, als 3820 ps l'estructura és pràcticament igual a la precedent i, per tant, sembla que aquesta conformació és la més estable i la que es manté fins al final de la simulació.



**Figura 5-28 Estructures representatives de la CA14 en dissolució aquosa amb el camp de forces glycam 2000a. Continua pàgina següent.**

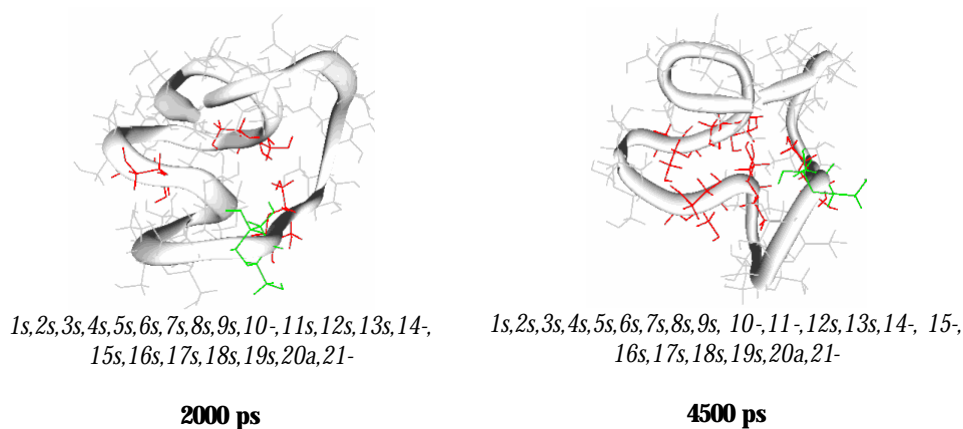




**Figura 5-29 Continuació estructures representatives de la CA14 en dissolució aquosa amb el camp de forces glycam 2000a.**

### 5.5.3 Anàlisi conformacional de la CA21

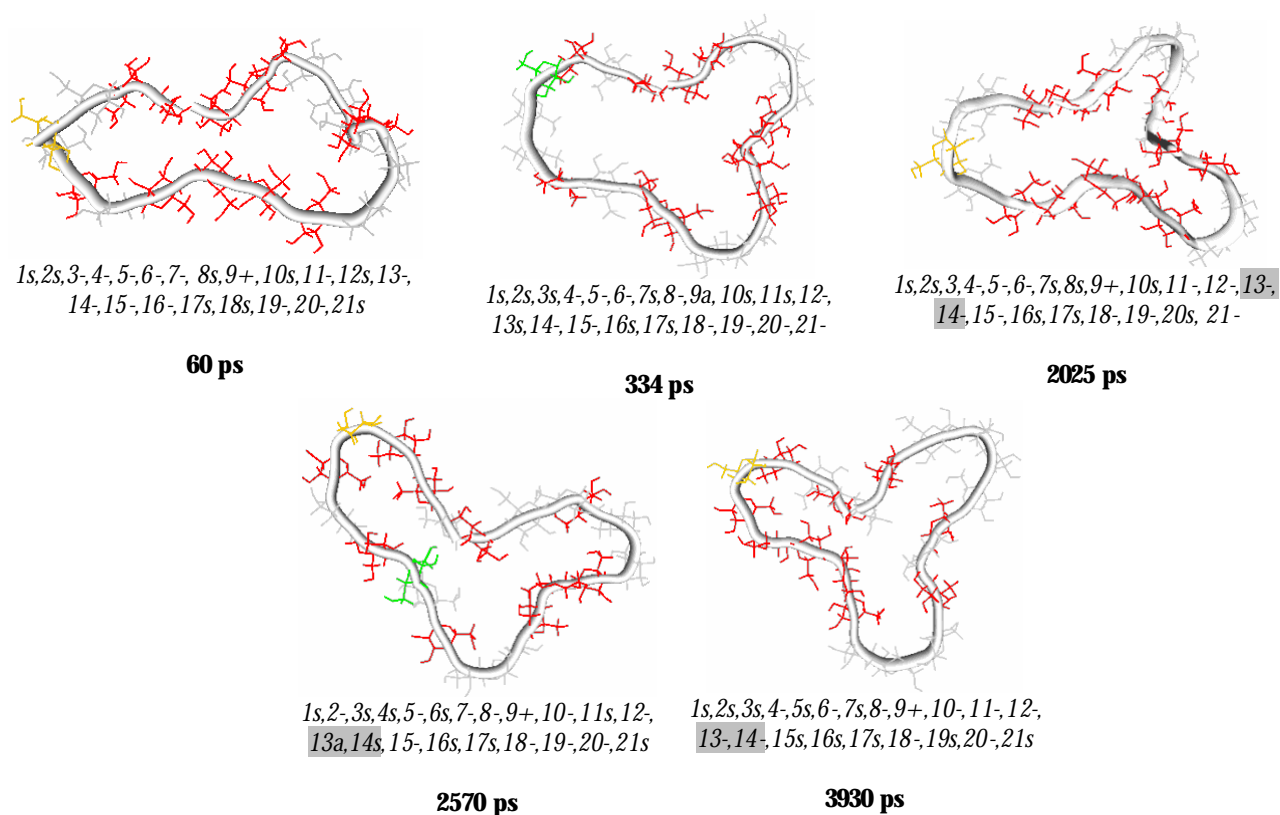
En aquest cas, la simulació en fase gas s'ha dut a terme durant 7 ns donat que al voltant dels 5 ns s'ha detectat l'aparició d'un nou conjunt d'estructures (consultar apèndix per veure les gràfiques RMS). Novament, s'han detectat dues conformacions diferents al llarg de la simulació: la primera es detecta fins als 4287 i a partir dels 5380 ps i la segona es detecta entre els 4290 i els 5380 ps. Com a exemple a la Figura 5-30 es representen les estructures als 2000 i als 4500 ps que mostren les dues conformacions detectades al llarg d'aquesta simulació.



**Figura 5-30 Estructures de la CA21 als 2000 i als 4500 ps de la simulació en fase gas amb el camp de forces glycam 2000a.**

S'observa que novament les dues estructures són molt similars i es caracteritzen per tenir tres bucles consecutius a la part esquerra d'aproximadament sis glucoses cada un. La resta de glucoses, situades a la part dreta, actuen com a cadena d'unió entre els extrems del bucle superior i inferior. A més, hi ha un augment de glucoses inclinades en la segona estructura respecte la primera i probablement, aquest augment és el responsable de que el bucle inferior variï la seva posició en l'espai d'una estructura a l'altre.

D'altra banda, de manera anàloga a com s'ha descrit en altres casos, s'han escollit algunes estructures representatives de les conformacions en dissolució (Figura 5-31). Als 60 ps s'observa que no s'han produït gaires canvis conformacionals respecte l'estructura de partida i, igual que en altres casos, hi ha un augment de glucoses en conformació *s* i *a*. Als 334 ps l'estructura té una cavitat més oberta que la precedent degut a una disminució de glucoses inclinades i s'observa un bucle de major grandària definit per les glucoses 6-13, i altres dos bucles de menor grandària definits entre les glucoses 14-19 i 20-4. Als 2025 ps tots els bucles esdevenen més estrets, i aquest fet és degut a un augment de glucoses inclinades en conformació *+ i -* que fan que la molècula es replegui més.

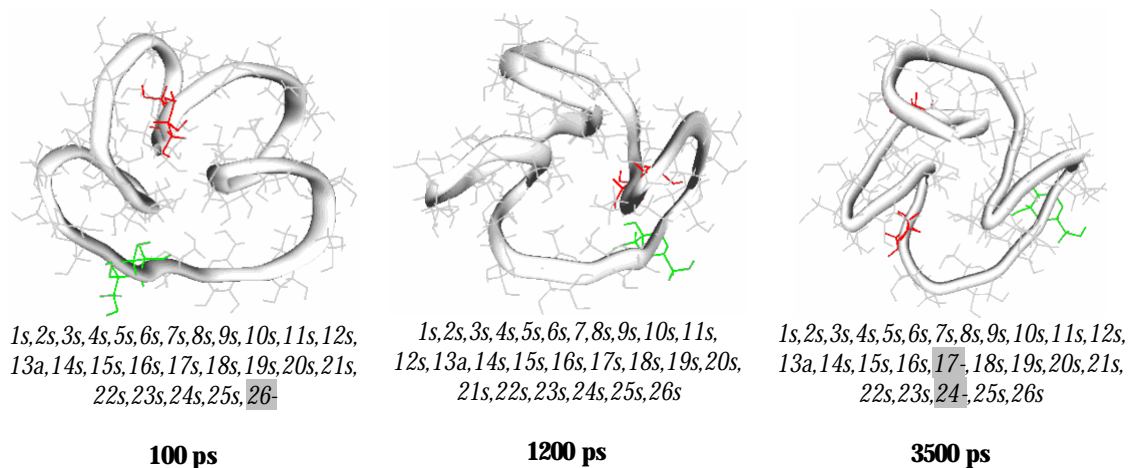


**Figura 5-31 Estructures representatives de la CA21 en dissolució aquosa amb el camp de forces glycam 2000a.**

Als 2570 ps s'observa una estructura amb forma de bota. La diferència principal amb l'estructura precedent està en el canvi de conformació de les glucoses 13 i 14 que en aquest cas tenen conformació *a* i *s* i, per tant, són responsables de que la molècula no estigui tan replegada en aquesta zona. No obstant, en l'estructura als 3930 ps aquestes glucoses novament estan inclinades i la molècula es torna a replegar. És important remarcar que, en aquest cas, l'estructura presenta major simetria i s'observen tres bucles de 7 glucoses cada un.

### 5.5.4 Anàlisi conformacional de la CA26

La següent ciclodextrina estudiada ha estat la de 26 unitats. En aquest cas, s'han detectat tres conformacions diferents al llarg de la simulació en fase gas. Per estudiar-les s'han escollit com a model les estructures als 100, 1200 i 3500 ps de la simulació (Figura 5-32).



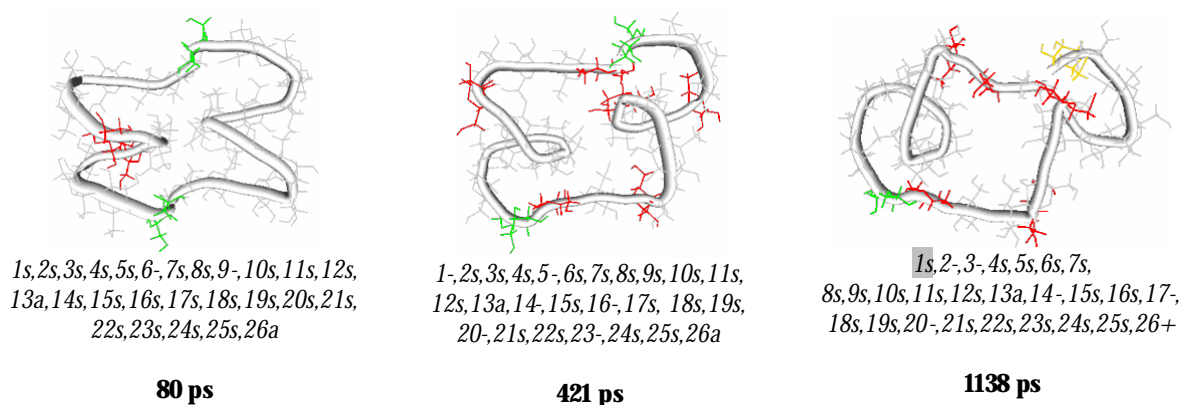
**Figura 5-32 Estructures de la CA26 als 100 ps, als 1200 ps, i als 3500 ps de la simulació en fase gas amb el camp de forces glycam 2000a.**

Novament es troben similituds entre les tres estructures. S'aprecien tres *loops* consecutius que formen un hèlix simple levògira, i cal destacar que aquestes estan d'acord amb els estudis de Kitamura i col·laboradors,<sup>25</sup> que descriuen la CA26 en solució com una hèlix simple circular. D'altra banda, s'observa que, igual que en el cas anterior, la resta de glucoses actuen com a pont d'unió, en aquest cas entre els dos *loops* laterals. A més, en tots els casos hi ha una majoria de glucoses en conformació *s* i la diferència entre les tres està en la posició de les glucoses inclinades. Per visualitzar millor les diferències a la Figura 5-33 es representa la superposició de les tres estructures. La primera de color gris és diferència força de les altres dues. En general s'observa que aquesta primera estructura no està tan compactada com les altres dues, i les glucoses entre *loops* estan més obertes fent que aquests siguin lleugerament més petits. D'altra banda, les altres estructures als 1200 i 3500 ps (color vermell i color verd respectivament) es diferencien principalment en el *loop* del costat dret, que està desplaçat un respecte de l'altre.

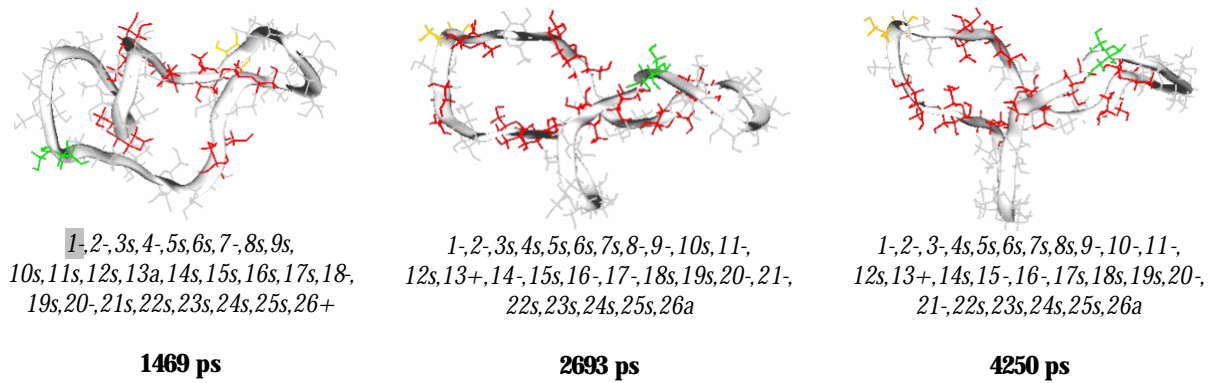


**Figura 5-33 Superposició de les estructures als 100 (color gris), als 1200 (color vermell) i als 3500 (color verd) ps de la CA26 en fase gas.**

En dissolució aquosa (Figura 5-34 i Figura 5-35), també es perd la conformació de l'estructura cristal·lina, igual que en el cas del camp de forces parm99. No obstant, la tendència no és la mateixa que la descrita anteriorment. S'observa als 80 ps una estructura molt similar a l'estructura cristal·lina. Als 421 ps l'estructura presenta majors distorsions degut a un augment de glucoses inclinades, però encara es poden apreciar les dues voltes d'hèlix de l'estructura inicial. Als 1138 ps s'observen més desviacions de l'estructura, i el *loop* de la part dreta ja ha desaparegut. No obstant, hi ha un bucle format per les glucoses 21-26 a la zona propera on anteriorment hi havia el *loop*. Als 1469 ps l'entrada del bucle definit per les glucoses 20-26 esdevé més estreta degut al canvi de conformació de la glucosa 1 respecte l'estructura precedent. En aquest cas té conformació – i, per tant, apunta clarament cap a l'interior de la molècula. No obstant, la resta de la molècula és força similar a l'estructura anterior. Als 2693 ps l'estructura està més estirada que la precedent degut a un augment de glucoses en conformació –. I finalment, als 4250 ps l'estructura és pràcticament igual a la precedent i, per tant, sembla que aquesta és l'estructura que es manté majoritàriament al llarg de la simulació.



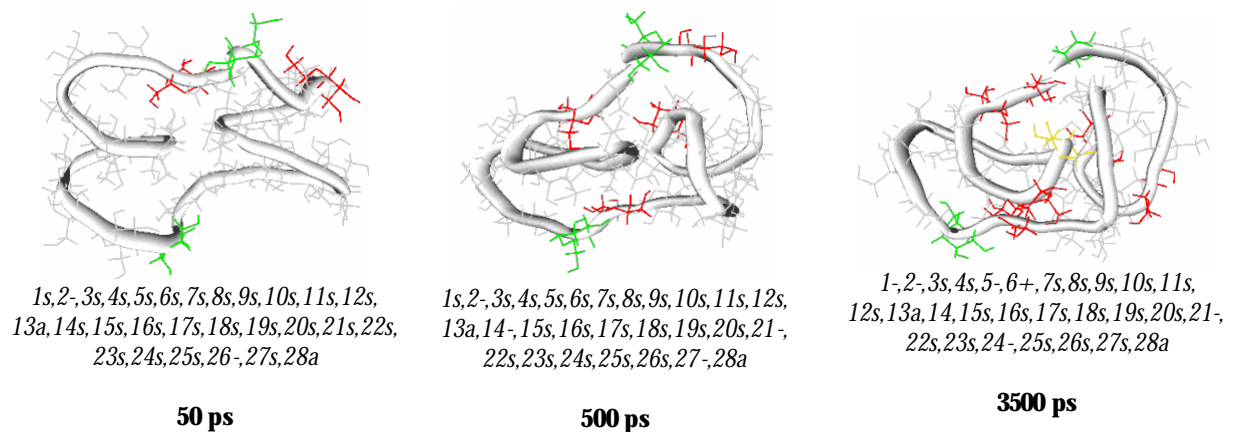
**Figura 5-34 Estructures representatives de la CA26 en dissolució aquosa amb el camp de forces glycam 2000a. Continua pàgina següent.**



**Figura 5-35** Continuació estructures representatives de la CA26 en dissolució aquosa amb el camp de forces glycam 2000a.

### 5.5.5 Anàlisi conformacional de la CA28

Per acabar les anàlisis del RMS, es comentaran els resultats de la ciclodextrina de 28 unitats. A la Figura 5-36 es mostren les estructures als 50, 500 i 3500 ps de la simulació en fase gas, que representen a les tres conformacions detectades al llarg d'aquesta simulació.



**Figura 5-36** Estructures de la CA28 als 50 ps, als 500 ps i als 3500 ps de la simulació en fase gas amb el camp de forces glycam 2000a.

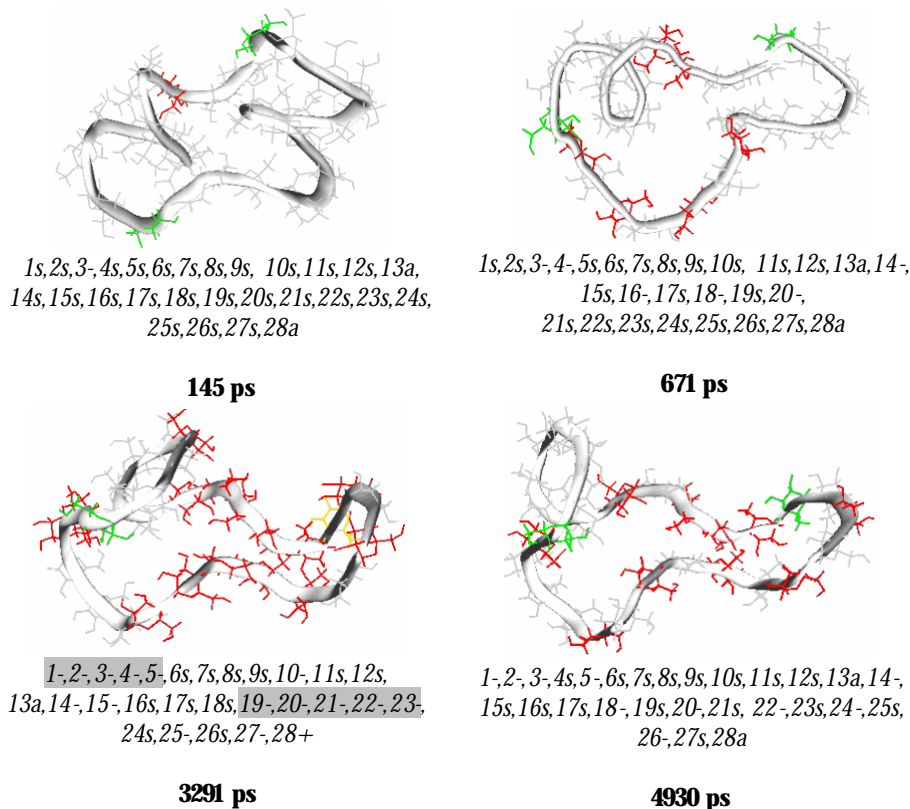
Cal destacar que en els tres casos hi ha dos *loops* laterals i dues cadenes d'unió entre aquests, però tant la grandària com la posició en l'espai dels *loops* i de les cadenes varien d'una estructura a l'altre. Als 500 ps els dos *loops* han augmentat de mida respecte l'estructura precedent; el *loop* de l'esquerra està format per sis glucoses, quan en l'estructura precedent està format per cinc, i el de la dreta per gairebé set glucoses, quan en la precedent també està format per cinc. Conseqüentment, les cadenes d'unió s'han escurçat i, a més a més, s'han replegat degut a un augment de glucoses inclinades. En l'estructura als 3500 ps els *loops* són de la mateixa grandària que l'estructura anterior, però el *loop* de l'esquerra s'ha desplaçat cap avall. A la Figura 5-37 es

representa la superposició de les darreres estructures, on s'observa amb claredat la diferent disposició en l'espai del *loop* de l'esquerra i les similituds que hi ha en la resta de la molècula.



**Figura 5-37 Superposició de les estructures als 500 ps (color gris) i als 3500 ps (color vermell).**

Finalment, a la Figura 5-38 es representen les estructures més representatives de la CA28 al llarg de la simulació en dissolució aquosa.



**Figura 5-38 Estructures representatives de la CA28 en dissolució aquosa amb el camp de forces glycam 2000a.**

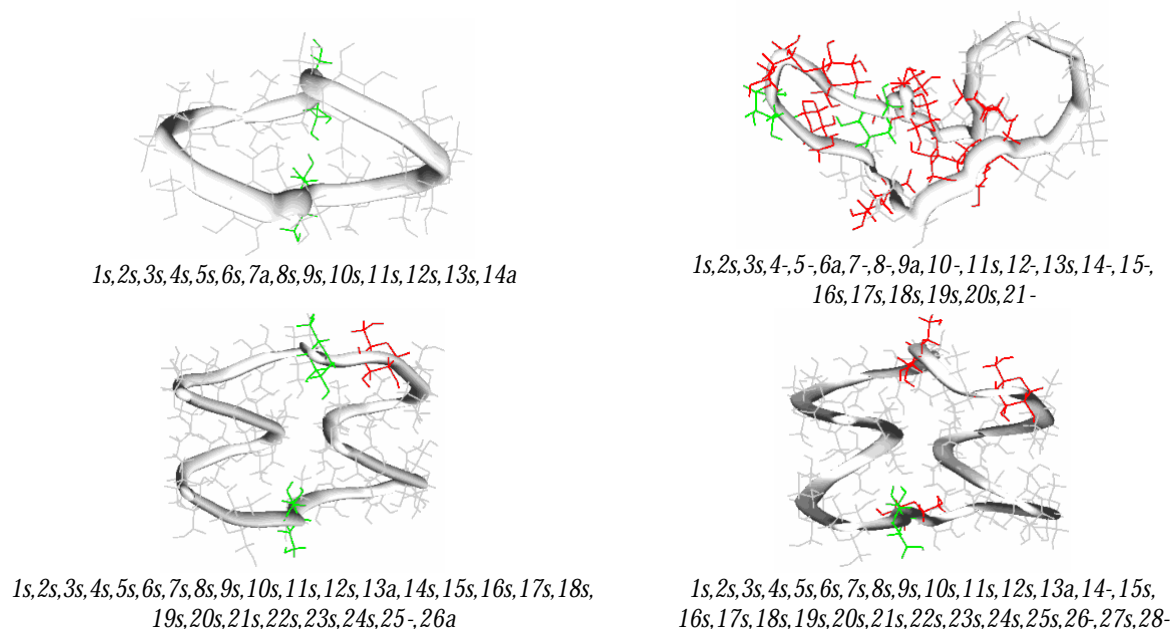
Als 145 ps l'estructura és molt similar a l'estructura de partida. Als 671 ps s'observa que l'estructura ja ha perdut un dels *loops* de l'estructura inicial i, a més a més, ha augmentat el nombre de glucoses inclinades. Als 3291 ps encara es manté el *loop* a la part superior de la molècula però l'estructura s'estira respecte l'estructura precedent i, igual que en altres casos, l'estirament

comporta un augment de glucoses consecutives en conformació  $\beta$ . Finalment, s'observa que aquesta estructura es manté al llarg de la simulació i als 4930 ps l'estructura és pràcticament igual a la precedent.

## 5.6 ANÀLISI CONFORMACIONAL DE LES CICLOAMILOSES AMB EL CAMP DE FORCES MM3\*

El darrer camp de forces que s'ha utilitzat ha estat el MM3\*, que és una adaptació del camp de forces MM3 per al programa Macromodel. Aquest camp de forces s'ha escollit perquè ha estat àmpliament utilitzat en la modelització de sistemes orgànics obtenint resultats molt positius. I a més, aquest camp de forces inclou tres termes creuats (*stretching-bending*, *torsion-stretching* i *bending-bending*) els quals podrien reproduir les observacions experimentals que afirmen que les distàncies d'enllaç entre els àtoms C1-O5 i C1-O4 varien amb la configuració de l'anell de piranosa.

Amb aquest camp de forces s'ha detectat una única conformació al llarg de les simulacions de dinàmica molecular. Per aquest motiu, s'ha estudiat la conformació de cada una de les ciclodextrines, prenent com a model l'estructura obtinguda a partir de la mitjana de les coordenades (Figura 5-39).



**Figura 5-39 D'esquerra a dreta i de dalt a baix estructures obtingudes a partir de la mitjana de les coordenades per a la CA14, la CA21, la CA26 i la CA28, respectivament amb el camp de forces MM3\*.**

S'observa que només la CA21 presenta canvis conformacionals importants respecte l'estructura de partida; s'han produït replegaments i s'han creat tres lòbuls diferents d'unes set glucoses cada un. D'altra banda en la CA14, la CA26 i la CA28 gairebé no s'observen canvis respecte les estructures inicials. Com a tret remarcable convé destacar que només en la CA14 s'ha tancat lleugerament la cavitat respecte l'estructura inicial, i en la CA26 i la CA28 hi ha major nombre de glucoses inclinades en conformació -.

En resum podem dir, que les ciclodextrines tenen tendència a estirar-se en fase gas amb el camp de forces parm94 per formar cavitat estretes i allargades o esclotxes. D'altra banda, per efecte del solvent es mantenen replegades i l'espai conformacional explorat és molt reduït. Amb el camp de forces parm99, s'observa un comportament totalment invers: en fase gas les ciclodextrines es mantenen plegades i l'espai conformacional explorat és molt petit, i per efecte del solvent s'observa una certa tendència a estirar-se en la majoria dels casos. Amb el camp de forces glycam 2000a cal destacar que l'espai conformacional explorat és major en fase gas i en general s'obtenen estructures amb un elevat nombre de glucoses en conformació s que formen voltes d'hèlix o hèlixs levogires senceres. Finalment, amb el camp de forces MM3\* les estructures obtingudes a partir de la mitjana de les coordenades són pràcticament idèntiques a les estructures de partida i, per tant, l'espai conformacional explorat és nul, excepte per a la CA21.

## **6 CARACTERITZACIÓ ESTRUCTURAL DE LES CICLOAMILOSES**

En el capítol anterior s'han descrit les conformacions obtingudes per a les quatre cicloamiloses més grans al llarg de les diverses simulacions de dinàmica molecular. Amb l'objectiu de caracteritzar estructuralment aquests sistemes, a partir de les mateixes trajectòries s'han estudiat diversos paràmetres geomètrics, i la formació dels enllaços d'hidrogen. A més, també s'ha completat la caracterització d'aquests sistemes emprant descriptors de forma. Així doncs, en els diversos apartats d'aquest capítol es detallen totes aquestes anàlisis que s'han realitzat per dur a terme la caracterització.

### **6.1 ANÀLISI DELS PARÀMETRES GEOMÈTRICS**

S'han analitzat amb el mòdul Carnal implementat en AMBER els paràmetres descrits en les estructures cristal·lines i a més, s'ha estudiat el diedre virtual *flip* que dóna idea de la posició relativa entre glucoses consecutives.



A continuació es resumeixen els paràmetres estudiats:

Distàncies:  $O4(n) \cdots O4(n+1)$

$O2(n) \cdots O3(n-1)$

Angles:  $O4(n) \cdots O4(n+1) \cdots O4(n+2)$

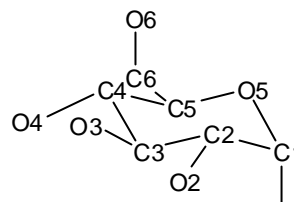
$C1(n)-O4(n-1)-C4(n-1)$

Diedres:  $O4(n) \cdots O4(n+1) \cdots O4(n+2) \cdots O4(n+3)$

$O3(n) \cdots C4(n) \cdots C1(n+1) \cdots O2(n+1)$  (*flip*)

$C1(n)-O4(n-1)-C4(n-1)-C3(n-1)$  ( $\psi$ )

$O5(n)-C1(n)-O4(n-1)-C4(n-1)$  ( $\phi$ )



### 6.1.1 Anàlisi de les trajectòries obtingudes amb el camp de forces parm94

Seguint els estudis iniciats en el nostre grup de recerca pel doctor Ivan Beà i emprant el mateix mètode d'anàlisi, en primer lloc s'han analitzat les trajectòries obtingudes en les simulacions de dinàmica molecular amb el camp de forces parm94. La diferència principal respecte les anàlisis realitzades anteriorment és que, amb l'objectiu de reduir les desviacions associades als valors calculats dels paràmetres, en aquest cas s'ha fet especial èmfasi en analitzar les conformacions per separat. És a dir, s'han analitzat aquells passos o *snapshots* que corresponen a un confòrmer concret.

Donat que en les quatre ciclodextrines les tendències observades són les mateixes, només es presentaran i discutiran els resultats obtinguts per a una de les ciclodextrines, però convé remarcar que les discussions són anàlogues en tots els casos, tant en fase gas com en dissolució aquosa. Com a exemple, a la Taula 6-1 es resumeixen els valors dels diferents paràmetres geomètrics per a les dues conformacions de la CA14 detectades al llarg de la simulació en fase gas.

**Taula 6-1 Valors dels paràmetres geomètrics de les conformacions de la CA14 en fase gas amb el camp de forces parm94.**

	CA14 (300 ps)		CA14 (3000ps)	
	avg	dev	avg	dev
O4(n)···O4(n+1)	4.44	0.15	4.59	0.04
O2(n)···O3(n-1)	4.53	0.27	4.38	0.06
O4(n)···O4(n+1)···O4(n+2)	132.06	5.74	137.93	1.14
C1(n)-O4(n-1)-C4(n-1)	114.36	2.44	114.25	0.75
O4(n)···O4(n+1)···O4(n+2)···O4(n+3)	-15.99	14.74	-18.74	3.53
O3(n)···C4(n)···C1(n+1)···O2(n+1)	-26.32	12.19	-27.91	2.33
C1(n)-O4(n-1)-C4(n-1)-C3(n-1)	85.50	9.31	80.25	1.86
O5 (n)-C1(n)-O4(n-1)-4(n-1)	77.52	10.48	81.24	2.03

S'observa en primer lloc, que a mida que s'estira la molècula augmenta la distància O4(n)···O4(n+1) i l'angle O4(n)···O4(n+1)···O4(n+2) entre els oxígens glicosídics. Aquesta tendència es pot entendre perquè les glucoses s'han d'ajustar a la forma global de la ciclodextrina i, per tant, s'aplanen lleugerament. D'altra banda, l'angle C1(n)-O4(n-1)-C4(n-1) no es veu afectat pels canvis conformacionals i en tots els casos es manté constant i proper als 114°.

També cal destacar que les distàncies entre àtoms tipus O2 i O3 de glucoses adjacents són força elevades (al voltant de 4.4 Å) comparant-les amb les dades de les estructures cristal·lines (al voltant de 2.8 Å). Un dels motius pels quals aquestes distàncies augmenten respecte dels valors experimentals és perquè en les estructures cristal·lines actuen les forces d'empaquetament, que mantenen les molècules molt més fixes, i aquestes no es poden reproduir en les simulacions de dinàmica molecular. Per tant, en les simulacions de dinàmica molecular s'obtenen estructures molt més flexibles on es formen i es trenquen enllaços d'hidrogen contínuament, fent que les distàncies variïn respecte de les dades experimentals. No obstant, el punt més important està relacionat amb el propi mètode d'anàlisi; aquests valors representen la mitjana del mateix valor per a cada glucosa dins d'una mateixa ciclodextrina. Ja s'ha comentat en l'anàlisi conformacional que en aquestes ciclodextrines hi ha glucoses inclinades i invertides respecte la glucosa adjacent. Quan es tenen aquestes conformacions relatives entre glucoses augmenta considerablement la distància entre els àtoms O2(n)···O3(n-1) i, per tant, la presència en la ciclodextrina de moltes glucoses inclinades i invertides fa augmentar considerablement la mitjana d'aquesta distància.

Finalment, respecte als valors dels diedres convé destacar que, gràcies a haver analitzat per separat les diferents conformacions, s'ha disminuït considerablement les desviacions respecte les calculades prèviament (més de 10 unitats en tots els casos i fins a més de 30 en alguns casos) i, especialment en la darrera conformació que és la més estabilitzada. Però els valors dels diedres calculats encara s'allunyen considerablement dels valors experimentals. Aquest fet prové, igual que en el cas de la distància entre els àtoms  $O2(n) \cdots O3(n-1)$ , del mètode d'anàlisi utilitzat ja que s'ha calculat la mitjana dels valors entre totes les glucoses, però les diferents glucoses entre si poden ser molt diferents i, per tant, s'ha de tenir cura en la seva valoració ja que pot conduir a valors que manquen de significat físic.

Així doncs, en arribat aquest punt, confirmem que la metodologia emprada no és adient per a aquests sistemes d'elevada flexibilitat i, per tant, s'utilitzarà una nova metodologia d'anàlisi per als altres camps de forces.

### **6.1.2 Anàlisi de les trajectòries obtingudes amb els camps de forces parm99, glycam 2000a i MM3\***

Per realitzar les següents anàlisis s'ha emprat una nova metodologia, que consisteix en determinar les distribucions de valors, a partir de les quals, s'obté el percentatge d'ocupació al voltant d'un valor donat. L'objectiu d'utilitzar aquest nou mètode d'anàlisi és evitar fer mitjanes de conjunts de valors molt diversos, les quals manquen en molts casos de significat físic. Així doncs, a partir dels resultats obtinguts amb Carnal s'ha estudiat el nombre de vegades que apareix un valor donat al llarg de la simulació. Per estudiar els diedres s'han analitzat en intervals de  $0.4^\circ$  tot el rang de  $-180$  a  $180^\circ$ . Els angles s'han analitzat en intervals de  $0.1^\circ$  en tot el rang de  $0$  a  $180^\circ$  i, finalment, les distàncies s'han analitzat en intervals de  $0.01 \text{ \AA}$  en tot el rang de  $0$  a  $10 \text{ \AA}$ . Els resultats obtinguts s'han normalitzat a 1 i s'han representat aquests valors en funció del valor del paràmetre estudiat.

S'han considerat dos aspectes importants de les distribucions: el primer és la forma d'aquesta, a partir de la qual s'obté una idea del tipus de moviment, i el segon és el nombre de pics que indica el nombre de motius estructurals i el % de població inclòs en cadascun dels pics, els quals donen idea de la flexibilitat global de la molècula. En moltes de les anàlisis de les ciclodextrines gegants les distribucions presenten diferent nombre de pics, que representen als diferents motius estructurals. Per identificar correctament cada un d'aquests pics s'han analitzat prèviament les ciclodextrines comunes i, agafant com a model els pics d'aquestes distribucions,

que corresponen a les glucoses en conformació *syn*, s'han pogut explicar els diferents pics observats en les distribucions de les ciclodextrines de major grandària.

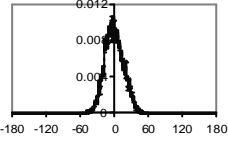
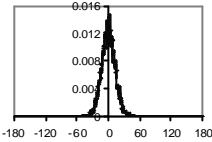
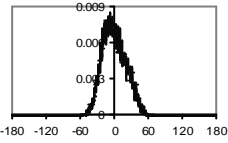
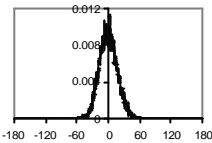
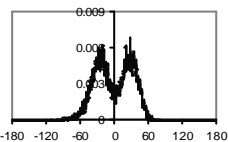
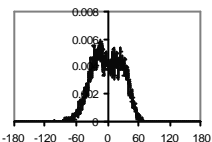
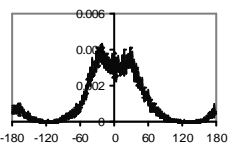
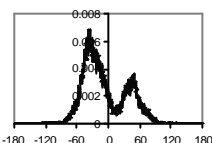
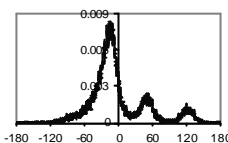
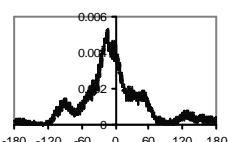
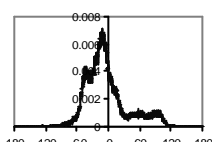
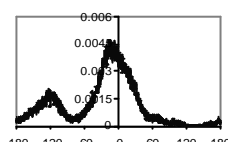
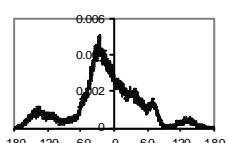
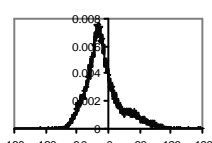
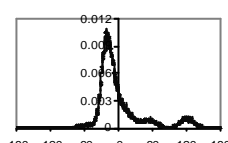
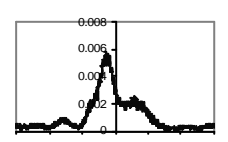
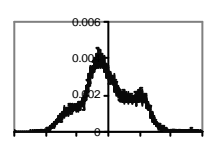
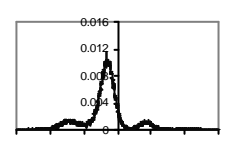
#### 6.1.2.1 Anàlisi dels diedres

En aquest cas, l'anàlisi dels paràmetres s'ha iniciat amb l'anàlisi dels diedres. En primer lloc, s'ha estudiat el diedre  $O4(n)\cdots O4(n+1)\cdots O4(n+2)\cdots O4(n+3)$  que dóna idea de la coplanaritat dels oxígens glicosídics entre les diferents glucoses. A la Taula 6-2 es representen aquestes distribucions per a les simulacions realitzades en fase gas.

Primerament, convé destacar que en les distribucions de les ciclodextrines comunes s'observa un pic que està centrat al voltant dels  $0^\circ$ . No obstant, a mesura que augmenta la grandària de les ciclodextrines, el pic s'eixampla, i en la distribució de la CA8 s'observen dos pics simètrics a cada un dels costats dels  $0^\circ$ . El % de població definit en el rang de  $-60$  a  $60^\circ$  disminueix de la CA6 a la CA8, per tant, és una clara manifestació de l'augment de la flexibilitat de les ciclodextrines comunes a mesura que augmenta el nombre de glucoses. D'altra banda, la pèrdua de la coplanaritat es veu molt més accentuada en les ciclodextrines gegants, i s'observa que en totes les distribucions hi ha major nombre de pics. A més, agafant com a model el mateix rang de  $-60$  a  $60^\circ$ , s'observa que el % de població comprès en aquest rang és molt inferior al de les ciclodextrines comunes.

També cal destacar que els percentatges de població calculats en les distribucions del camp de forces glycam 2000a són lleugerament superiors als calculats per al camp de forces parm99. Per tant, sembla que en fase gas es manté millor la coplanaritat dels oxígens glicosídics amb aquest camp de forces. Respecte dels percentatges calculats en les distribucions amb el camp de forces MM3\*, convé destacar que tots són similars entre si, excepte la CA21 que presenta majors distorsions de la coplanaritat.

**Taula 6-2 Distributions del diedre O4(n)··· O4(n+1)···O4(n+2)··· O4(n+3) de les CA en fase gas amb els camps de forces parm99, glycam 2000a i MM3\*.**

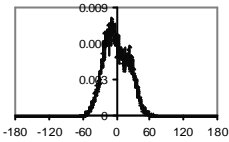
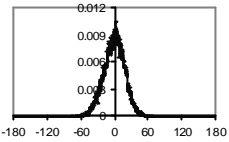
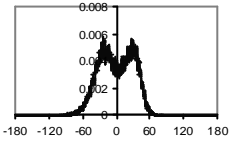
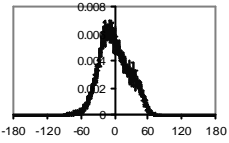
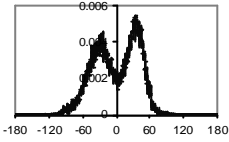
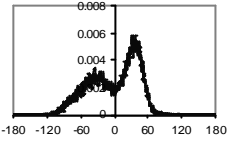
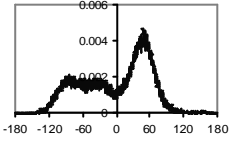
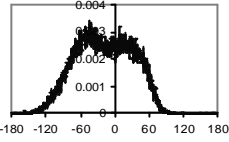
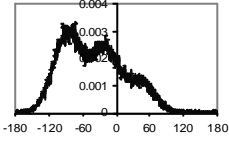
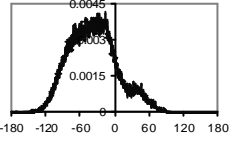
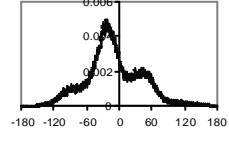
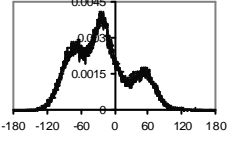
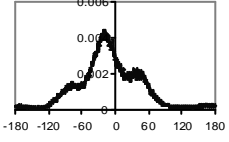
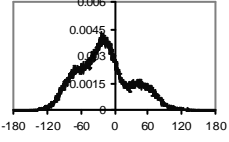
Ciclodextrina	Parm99		Glycam 2000a		MM3*	
	Distribució	%*	Distribució	%*	Distribució	%*
CA6		100.0		100.0	-	-
CA7		99.9		100.0	-	-
CA8		97.6		98.1	-	-
CA14		83.4		89.5		83.7
CA21		74.6		87.3		70.2
CA26		74.1		91.8		88.9
CA28		77.3		75.5		85.6

\*Aquest percentatge correspon al rang de valors comprès entre -60 i 60°.

La mateixa anàlisi s'ha realitzat per a les simulacions en dissolució aquosa amb els camps de forces parm99 i glycam 2000a. Els resultats es mostren a la Taula 6-3. En aquest cas, convé destacar en tots els casos el percentatge de població és lleugerament inferior que el respectiu

percentatge en fase gas i, per tant, aquest fet indica que en dissolució aquosa hi ha més desviacions de la coplanaritat entre oxígens glicosídics.

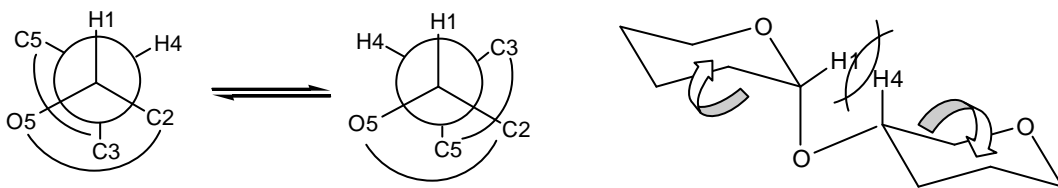
**Taula 6-3 Distribucions del diedre O4(n)... O4(n+1)...O4(n+2)... O4(n+3) de les CA en dissolució aquosa amb els camps de forces parm99 i glycam 2000a.**

Ciclodextrina	Parm99		Glycam 2000a	
	Distribució	%*	Distribució	%*
CA6		99.8		99.9
CA7		98.2		98.6
CA8		92.3		87.1
CA14		62.8		73.5
CA21		53.1		66.9
CA26		76.7		66.3
CA28		74.7		71.6

\* Aquest percentatge correspon al rang de valors comprès entre -60 i 60°.

A la vista d'aquestes distribucions, sembla lògic associar el baix percentatge de població amb els oxígens glicosídics coplanars a la presència d'altres conformacions relatives entre glucoses que provoquen la pèrdua de la coplanaritat, com per exemple la inclinació i la inversió de glucoses. Per tenir una millor idea de la posició relativa entre les glucoses al llarg de la simulació s'ha estudiat el diedre virtual *flip* que, com ja s'ha comentat anteriorment, està definit pels àtoms O3(n)··· C4(n)··· C1(n+1)··· O2(n+1).

Novament s'observen diferències entre les distribucions de les ciclodextrines comunes i les distribucions de les cicloamiloses més grans (Taula 6-4). En el cas del camp de forces parm99, s'observa en les distribucions de les ciclodextrines comunes dos pics centrats al voltant dels 0° que corresponen a les glucoses en conformació relativa *syn*, no obstant, en el camp de forces glycam 2000a no s'observen els dos pics fins a la distribució de la CA8. Aquests dos pics centrats a banda i banda dels 0° són conseqüència de les repulsions estèriques existents entre els H1 i H4 de glucoses adjacents, que fan que les glucoses s'inclinin alternativament cap a l'interior i l'exterior de la cavitat creant un moviment d'espeternecs<sup>59</sup> (Figura 6-1).



**Figura 6-1 Representació del moviment d'espeternecs degut a la repulsió entre H1 i H4 de glucoses adjacents.**

També és important observar que, en el cas del camp de forces parm99 la separació entre els dos pics augmenta de la CA6 a la CA8, és a dir, en la CA6 la probabilitat de trobar valors de 0° per a aquest diedre és més alta que en la CA7, i en aquesta és més alta que en la CA8, on la probabilitat és molt més baixa. Aquesta tendència indica que el moviment d'espeternecs entre glucoses consecutives disminueix de la CA6 a la CA8, malgrat la flexibilitat global del sistema augmenta en aquest mateix sentit. En el cas del camp de forces glycam 2000a, on no s'observen els dos pics fins a la distribució de la CA8, el moviment d'espeternecs és més ràpid que en el camp de forces parm99.

<sup>59</sup> Els espeternecs són el picament de peus dels nadons dins el bressol. Aquest moviment és anàleg al moviment de peus al nedar a crol.

**Taula 6-4 Distributions del diedre *flip* O3(n)... C4(n)... C1(n+1)... O2(n+1) de les CA en fase gas amb els camps de forces parm99, glycam 2000a i MM3\*.**

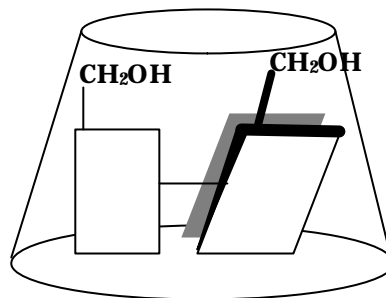
Ciclodextrina	Parm99		Glycam 2000a		MM3*	
	Distribució	%*	Distribució	%*	Distribució	%*
CA6		100.0		100.0	-	-
CA7		99.9		100.0	-	-
CA8		97.6		97.4	-	-
CA14		68.8 17.2 13.9		82.0 10.9 7.1		77.5 7.9 14.6
CA21		68.8 14.3 16.8		79.9 15.3 4.7		51.2 39.2 9.6
CA26		71.1 25.0 3.8		93.8 - 3.9		89.2 3.2 7.7
CA28		78.9 14.0 7.1		71.3 21.1 7.7		79.4 13.4 7.1

\*Els percentatges en les ciclodextrines comunes corresponen a les glucoses en conformació *syn*, i en les ciclodextrines gegants corresponen de dalt a baix a les glucoses en conformació *syn*, *kink*, i *anti* respectivament.

Finalment, és important destacar que quan el pic de l'esquerra és més gran que el pic de la dreta la inclinació va en el sentit en què els hidroxils primaris de les glucoses es desplacen cap a



l'exterior de la cavitat (Figura 6-2). D'altra banda, quan el pic de la dreta és superior al de l'esquerra el moviment va en sentit contrari.

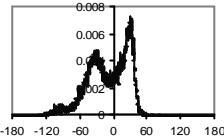
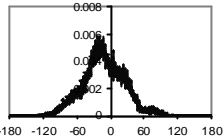
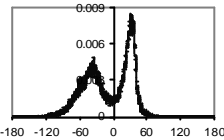
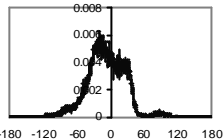
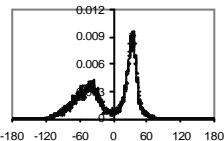
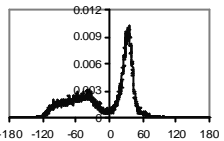
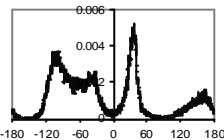
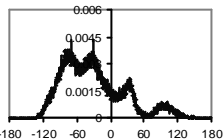
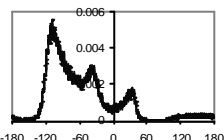
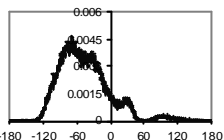
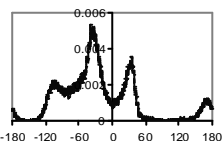
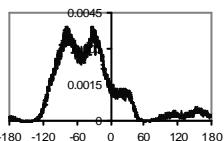
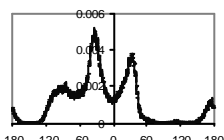
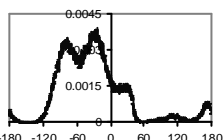


**Figura 6-2 Representació de la inclinació de les glucoses en què els hidroxils primaris apunten cap a l'exterior de la cavitat.**

En les distribucions de les cicloamiloses més grans s'observa que hi ha major nombre de pics. Hi ha els dos pics centrats al voltant dels  $0^\circ$  que, per analogia als mateixos pics descrits en les distribucions de les ciclodextrines comunes, corresponen a les glucoses en conformació *syn*. I a més, hi ha pics de menor grandària repartits al llarg de tot el rang de valors de l'angle diedre. A partir d'aquestes observacions, s'han definit tres grups diferents segons els valors dels diedres, que representen als tres tipus de motius estructurals. La definició dels tres grups, no s'ha realitzat d'una manera homogènia per a les quatre cicloamiloses més grans sinó que, d'acord amb el perfil de les distribucions, s'ha determinat en cada cas el valor del diedre que fa frontera entre un grup i un altre. El primer grup correspon a les glucoses en conformació *syn* (valors al voltant dels  $0^\circ$ ), el segon grup correspon a les glucoses inclinades, que tenen generalment valors d'aquest diedre compresos entre els  $\pm 150^\circ - \pm 60^\circ$ , finalment, el tercer grup correspon a les glucoses invertides, que tenen generalment valors d'aquest diedre entre  $\pm 180^\circ - \pm 150^\circ$ . S'observa que hi ha una majoria de glucoses que estan dins del primer grup per tant, es corrobora que la majoria de glucoses estan en conformació relativa *syn*. No obstant, el segon grup no és menyspreable i a més, cal destacar que aquest grup té majoritàriament valors negatius del diedre i, per tant, la tendència de les glucoses és d'inclinar-se preferentment de manera que els hidroxils primaris apunten cap a l'exterior de la cavitat. Per últim, s'observa que el tercer grup, que correspon a les glucoses en conformació relativa *anti*, és el minoritari en pràcticament tots els casos.

A la Taula 6-5 es mostren les mateixes anàlisis realitzades per a les trajectòries en dissolució aquosa.

**Taula 6-5** Distributions del diedre *flip* O3(n)··· C4(n)··· C1(n+1)··· O2(n+1) de les CA en dissolució aquosa amb els camps de forces parm99 i glycam 2000a.

Ciclodextrina	Parm99		Glycam 2000a	
	Distribució	%*	Distribució	%*
CA6		92.6		87.4
CA7		88.7		93.4
CA8		83.5		77.8
CA14		45.4 39.4 15.2		50.3 49.7 -
CA21		35.5 59.0 5.5		45.1 54.9 -
CA26		64.8 27.5 7.7		47.0 48.6 4.4
CA28		67.7 24.6 7.7		52.5 43.2 4.2

\* Els percentatges en les ciclodextrines comunes corresponen a les glucoses en conformació *syn*, i en les ciclodextrines gegants corresponen de dalt a baix a les glucoses en conformació *syn*, *kink*, i *anti* respectivament.

En primer lloc, cal destacar que, igual que en les anàlisis del diedre entre oxígens glicosídics, els percentatges de població per a les glucoses en conformació *syn* també són menors que els corresponents en fase gas i, per tant, la flexibilitat dels sistemes és superior en dissolució aquosa. A més, s'observa en les distribucions de les ciclodextrines comunes amb el camp de forces parm99 que el pic de la dreta és superior al pic de l'esquerra, per tant, en aquest cas la tendència dels hidroxils primaris és a col·lapsar cap a l'interior de la cavitat. Aquest fet, probablement és degut a què els hidroxils secundaris estan més disponibles per formar enllaços d'hidrogen amb el solvent, ja que els hidroxils primaris formen amb més facilitat enllaços d'hidrogen entre ells. En les distribucions de les ciclodextrines comunes amb el camp de forces glycam 2000a s'observa que els % de població dins del rang predeterminat no segueixen la mateixa tendència que en el camp de forces parm99 i en les distribucions en fase gas, sinó que varien en l'ordre descendent CA7>CA6>CA8 per tant, en aquest cas, hi ha majors distorsions de la geometria, les molècules són altament flexibles, i aquesta tendència és molt més accentuada en la CA6. Finalment, s'observa que en el cas de la CA21 amb el camp de forces parm99 hi ha una majoria de glucoses inclinades, i en el camp de forces glycam 2000a, s'observa l'absència de glucoses invertides en les distribucions de la CA14 i la CA21.

A partir de les distribucions del diedre *flip* s'han estimat el nombre de glucoses que hi ha en cada una de les conformacions. Els valors obtinguts i comparats amb els valors de les estructures inicials es resumeixen a la Taula 6-6.

**Taula 6-6 Nombre de glucoses en cada conformació en les ciclodextrines gegants amb els camps de forces parm99, glycam 2000a i MM3\*.**

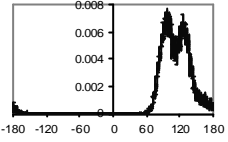
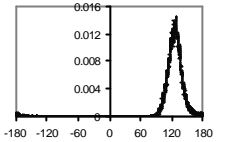
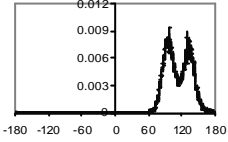
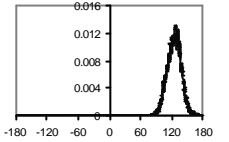
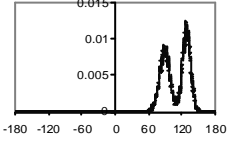
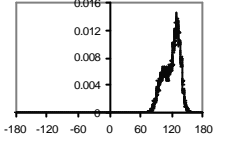
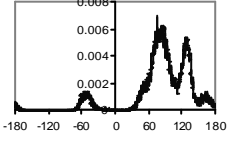
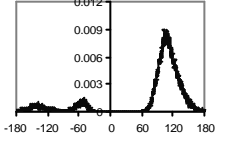
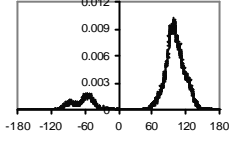
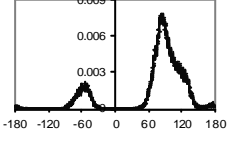
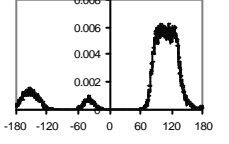
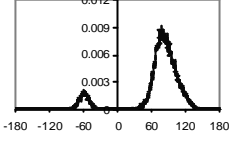
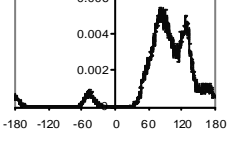
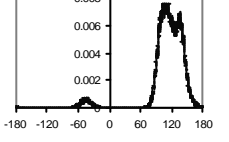
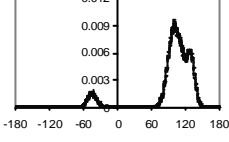
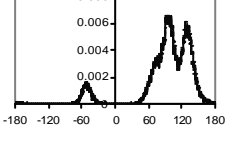
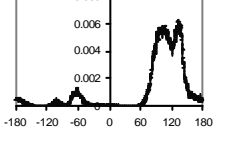
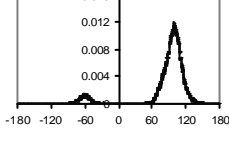
Ciclodextrina	Conformació	Inicial	Fase gas			Dissolució aquosa	
			Parm99	Glycam 2000a	MM3*	Parm99	Glycam 2000a
CA14	<i>syn</i>	12.0	9.0	11.5	10.8	6.4	7.0
	<i>kink</i>	-	4.0	1.5	1.1	5.5	7.0
	<i>anti</i>	2.0	1.0	1.0	2.0	2.1	-
CA21	<i>syn</i>	10.0	14.4	16.8	10.8	7.5	9.5
	<i>kink</i>	8.0	3.6	3.2	8.2	12.4	11.5
	<i>anti</i>	3.0	2.9	1.0	2.0	1.2	-
CA26	<i>syn</i>	24.0	18.5	24.4	23.2	16.8	12.2
	<i>kink</i>	-	6.5	-	0.8	7.1	12.6
	<i>anti</i>	2.0	1.0	1.0	2.0	2.0	1.1
CA28	<i>syn</i>	25.0	22.1	20.0	22.2	18.9	14.7
	<i>kink</i>	1.0	3.9	5.9	3.8	6.9	12.1
	<i>anti</i>	2.0	2.0	2.1	2.0	2.1	1.2

Si es comparen el nombre de glucoses en conformació *syn* i *kink* entre les estructures inicials i les estructures al llarg de les simulacions en fase gas amb el camp de forces parm99, s'arriba a la conclusió que glucoses consecutives canvien amb facilitat la seva posició relativa. Per tant, aquests resultats suggereixen que al llarg de les simulacions es superen les barreres energètiques de rotació dels enllaços interglucosídics, i que es generen noves estructures, probablement estabilitzades per interaccions entre àtoms no enllaçants. No obstant, la diferència és menor per a les simulacions realitzades amb els camps de forces glycam 2000a i MM3\* i, per tant, observem una clara influència del camp de forces; en aquests casos és més difícil superar les barreres energètiques de rotació dels enllaços interglucosídics. D'altra banda, s'observa amb freqüència un nombre imparell de glucoses en conformació *anti*, per tant, en aquests casos per a què es pugui tancar la cadena de polisacàrids, és necessari que existeixin glucoses inclinades en el mateix sentit per tal que al final l'efecte global sigui anàleg a tenir una glucosa més en conformació *anti*. En els casos concrets en què només hi ha una glucosa en conformació *anti* les ciclodextrines es poden descriure com una cinta de Möbius.

La inclinació i la inversió de glucoses són conseqüència de la rotació del diedre  $\psi$  i del diedre  $\phi$ , que recordem que estan definits pels àtoms  $C1(n)\cdots O4(n-1)\cdots C4(n-1)\cdots C3(n-1)$  i  $O5(n)\cdots C1(n)\cdots O4(n-1)\cdots C4(n-1)$  respectivament. Per aquest motiu, a continuació es detallen els resultats de les anàlisis d'aquests dos diedres.

En primer lloc, a la Taula 6-7 es resumeixen els resultats de les anàlisis del diedre  $\psi$  en fase gas. Com ja s'ha descrit en anàlisis anteriors, les distribucions de les ciclodextrines comunes difereixen notablement de les distribucions de les cicloamiloses més grans. En el camp de forces parm99 s'observen dos pics situats simètricament a cada costat dels  $120^\circ$  aproximadament. La desviació d'aquests pics respecte del valor teòric de  $120^\circ$  es pot explicar novament per les repulsions estèriques entre els protons H1 i H4 de glucoses adjacents. I en el camp de forces glycam 2000a s'observa un únic pic que es va eixamplant de la CA6 a la CA8. A més, s'observa que en ambdós casos els percentatges de població dins del rang predeterminat (entre  $50$  i  $150^\circ$ ) augmenta de la CA6 a la CA8. Aquesta tendència és deguda a què en la CA6 les glucoses estan més tensionades i es creen majors repulsions entre glucoses adjacents, de manera que, l'angle definit per aquest diedre varia més per alliberar tensions estèriques. Igualment es veurà més endavant que hi ha altres paràmetres, com per exemple la distància entre oxígens glicosídics, que també es veu influïda per aquest fet.

**Taula 6-7 Distribucions del diedre  $\gamma$  C1(n)··· O4(n-1)··· C4(n-1)··· C3(n-1) de les CA en fase gas amb els camps de forces parm99, glycam 2000a i MM3\*.**

Ciclodextrina	Parm99		Glycam 2000a		MM3*	
	Distribució	%*	Distribució	%*	Distribució	%**
CA6		94.0		96.0	-	-
CA7		98.3		98.7	-	-
CA8		100.0		99.9	-	-
CA14		74.6 17.8 7.5		85.5 7.6 6.9		85.8 14.2
CA21		70.0 15.7 14.3		81.8 13.4 4.8		90.4 9.6
CA26		77.4 18.4 4.1		96.0 4.0		92.3 7.7
CA28		73.3 19.4 7.1		82.9 10.1 6.9		92.9 7.1

\*Els percentatges en les ciclodextrines comunes corresponen a les glucoses en conformació *syn*, i en les ciclodextrines gegants corresponen de dalt a baix a les glucoses en conformació *syn*, *kink*, i *anti* respectivament.

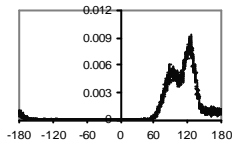
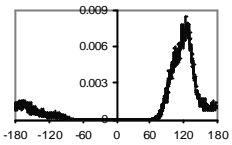
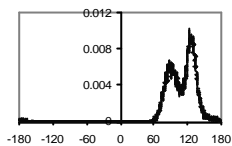
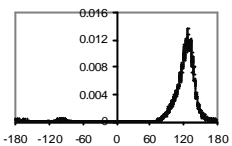
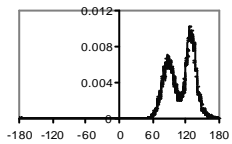
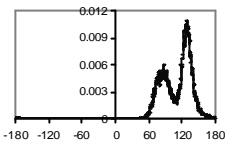
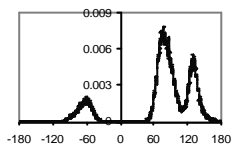
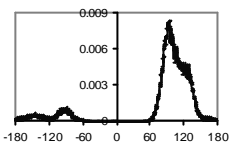
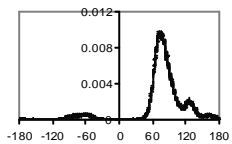
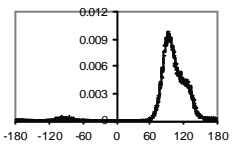
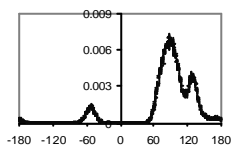
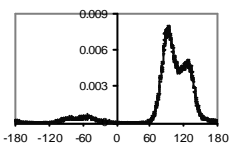
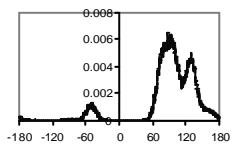
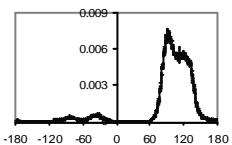
\*\*Els percentatges corresponen a la suma de les conformacions *syn* i *kink* i a les glucoses en conformació *anti* respectivament.

En les distribucions de les ciclodextrines de major grandària amb el camp de forces parm99 s'aprecia a la base dels dos pics que representen a les glucoses en conformació *syn* altres pics de menor grandària, que representen a les glucoses inclinades. Aquests dos pics indiquen que la pèrdua de la conformació *syn* pot venir per inclinació de les glucoses cap a dins o cap a fora de la cavitat de la ciclodextrina. No obstant, ja s'ha descrit que les glucoses adopten preferentment una conformació – de manera que els hidroxils primaris apunten cap a l'exterior de la cavitat i per aquest motiu, el pic situat a la part dreta de la base és superior al situat en la part esquerra. Amb el camp de forces glycam 2000a les glucoses inclinades tenen valors d'aquest diedre negatius (al voltant dels  $-150^\circ$ ). Aquest fet és degut a què existeixen diferents graus d'inclinació i en aquest cas, on els valors són més negatius, els hidroxils primaris estan més inclinats cap a l'interior de la cavitat. D'altra banda, en el camp de forces MM3\*, on l'espai conformacional explorat és molt més petit, no s'aprecia separació dels pics corresponents a les glucoses en conformació *syn* i *kink*. Finalment, és important destacar que en tots els casos, s'observa un pic aïllat entre els  $-120$  i els  $20^\circ$  que correspon a les glucoses en conformació *anti*.

Les distribucions en dissolució aquosa (Taula 6-8) per a les ciclodextrines més grans s'han dividit en només dos conjunts de pics. Aquest fet és degut a què en la majoria dels casos els pics corresponents a les glucoses en conformació *kink* estan solapats amb els pics corresponents a les glucoses en conformació *syn* i per aquest motiu, no s'ha pogut avaluar el percentatge de cada un d'ells per separat. Aquest fet, suggereix que en les ciclodextrines més grans el moviment d'espèrtecs entre glucoses consecutives és més ràpid en dissolució aquosa que en fase gas.

Finalment, és important destacar que, al contrari del que succeeix en fase gas, els percentatges de població dins del rang predeterminat ( $50$  a  $150^\circ$ ) per a les ciclodextrines comunes amb el camp de forces glycam 2000a és inferior al corresponent amb el camp de forces parm99, sent la CA6 el cas extrem. Per tant, novament s'observa l'elevada deformació que pateixen aquestes ciclodextrines amb el camp de forces glycam 2000a en presència del solvent.

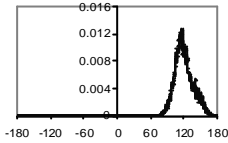
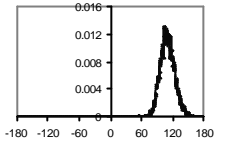
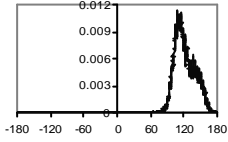
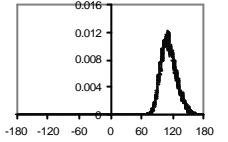
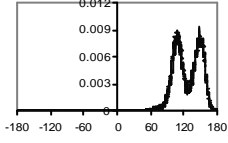
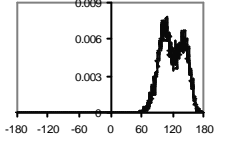
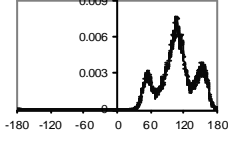
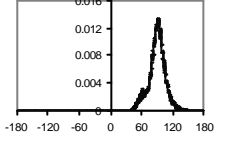
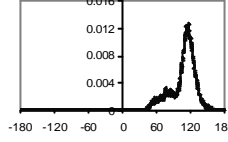
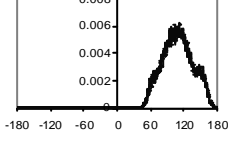
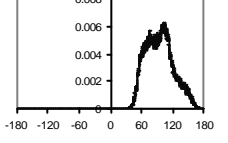
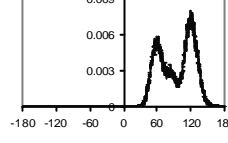
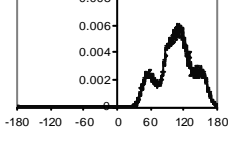
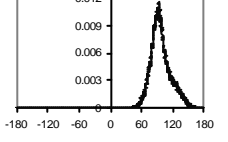
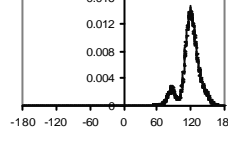
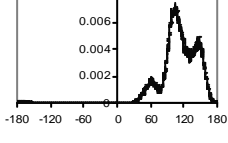
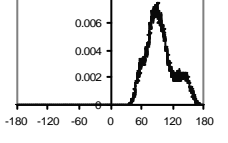
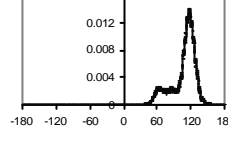
**Taula 6-8 Distributions del diedre  $\gamma$  C1(n)... O4(n-1)... C4(n-1)... C3(n-1) de les CA en dissolució aquosa amb els camps de forces parm99 i glycam 2000a.**

Ciclodextrina	Parm99		Glycam 2000a	
	Distribució	%*	Distribució	%*
CA6		93.1		78.5
CA7		97.8		95.1
CA8		98.8		98.5
CA14		84.0 14.3		100 -
CA21		91.6 5.4		100 -
CA26		89.3 7.3		95.4 4.6
CA28		88.7 7.1		95.8 4.3

\*Els percentatges en les ciclodextrines comunes corresponen a les glucoses en conformació *syn*, i en les ciclodextrines gegants corresponen de dalt a baix a la suma de les glucoses en conformació *syn* i *kink*, i a les glucoses en conformació *anti* respectivament.

Per acabar les anàlisi dels diedres a continuació es comentaran molt breument l'estudi del diedre  $\phi$ . Els resultats obtinguts en fase gas es mostren a la Taula 6-9.

**Taula 6-9** Distributions del diedre  $\phi$  O1(n)... C1(n)... O4(n-1)... C4(n-1) de les CA en fase gas amb els camps de forces parm99, glycam 2000a i MM3\*.

Ciclodextrina	Parm99		Glycam 2000a		MM3*	
	Distribució	%*	Distribució	%*	Distribució	%**
CA6		99.8		98.9	-	-
CA7		99.9		99.4	-	-
CA8		98.7		96.8	-	-
CA14		83.2 16.7		85.8 14.2		76.6 23.4
CA21		87.0 13.0		57.3 42.7		50.7 49.3
CA26		81.7 18.3		95.6 4.4		88.4 11.6
CA28		88.9 10.7		86.3 13.7		76.3 23.7

\*Els percentatges en les ciclodextrines comunes corresponen a les glucoses en conformació *syn*, i en les ciclodextrines gegants corresponen de dalt a baix a la suma de les glucoses en conformació *syn* i *kink*, i a les glucoses en conformació *anti* respectivament.

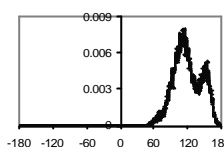
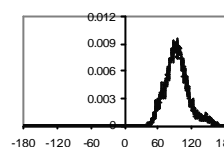
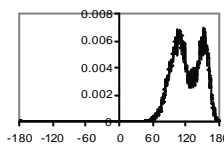
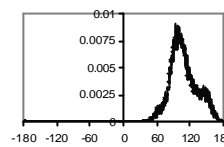
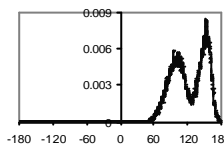
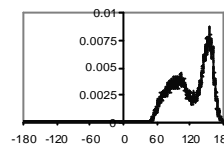
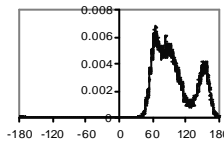
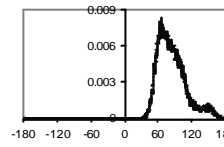
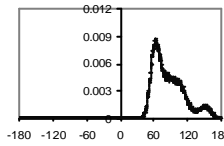
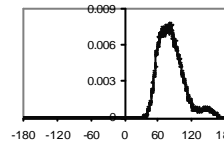
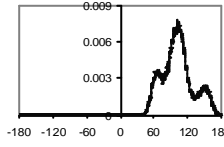
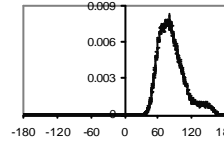
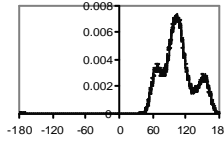
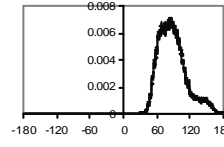


En primer lloc, és important esmentar que la forma de les distribucions de les ciclodextrines comunes segueix la mateixa tendència que ja s'ha descrit en els casos precedents: un únic pic que s'eixampla de la CA6 a la CA8. No obstant, en tots els casos es compleix que el percentatge de població dins del rang predeterminat (de 80 a 180°) varia en l'ordre descendent CA7 > CA6 > CA8. En el cas de les ciclodextrines gegants és difícil determinar les tres zones de la gràfica que representen als tres motius estructurals, ja que les tres conformacions relatives tenen valors d'aquest diedre molt similar. No obstant, també s'observen els dos pics que també apareixen en les distribucions de les ciclodextrines comunes, que representen a les glucoses en conformació *syn*, i a la part esquerra d'aquests, s'aprecia un altre pic que representa al conjunt de les glucoses inclinades i invertides.

En dissolució aquosa (Taula 6-10), s'observa un comportament anàleg al descrit en fase gas per a les ciclodextrines comunes i, igual que en altres anàlisis, s'observen percentatges de població menors que els corresponents en fase gas. En aquest cas, també s'observa en les distribucions de les ciclodextrines més grans amb el camp de forces glycam 2000a un pic molt ample que correspon al solapament de diversos pics. Aquest fet, és el responsable de que no s'hagin pogut diferenciar els diferents pics i a més, indica que probablement en aquest camp de forces el canvi d'orientació de glucoses consecutives es dona amb més facilitat per rotació d'aquest diedre.

En resum, podem dir que les anàlisis dels diedres mitjançant les seves distribucions han proporcionat resultats que s'ajusten molt millor a les dades experimentals que les anàlisis precedents. Per exemple, s'han detectat tres conjunts en les distribucions del diedre *flip* per a les ciclodextrines gegants que representen als tres motius estructurals: glucoses en conformació *syn*, en conformació *kink*, i en conformació *anti*. A més, els resultats suggereixen que l'efecte del solvent en el camp de forces glycam 2000a provoca excessives distorsions de la geometria que es manifesten en la pèrdua de les tendències observades en altres camps de forces o en fase gas amb el mateix camp de forces. Per una altra banda, amb el camp de forces MM3\* les variacions són mínimes i les molècules es mantenen excessivament estàtiques al llarg de la simulació.

**Taula 6-10 Distribucions del diedre  $\phi$  O1(n)... C1(n)... O4(n-1)... C4(n-1) de les CA en dissolució aquosa amb els camps de forces parm99 i glycam 2000a.**

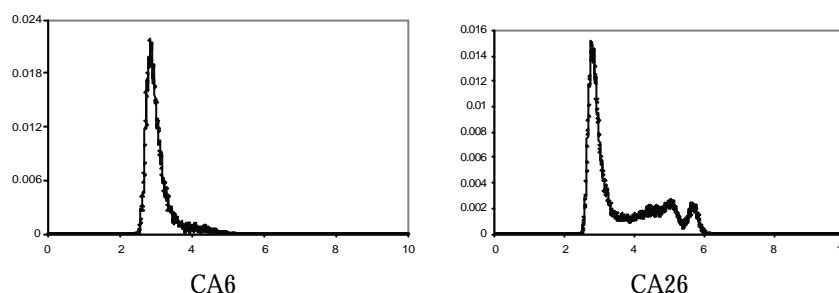
Ciclodextrina	Parm99		Glycam 2000a	
	Distribució	%*	Distribució	%*
CA6		95.6		75.1
CA7		96.1		90.7
CA8		92.7		86.7
CA14		63.8 36.1		-
CA21		50.2 49.8		-
CA26		78.2 21.8		-
CA28		79.9 20.2		-

\*Els percentatges en les ciclodextrines comunes corresponen a les glucoses en conformació *syn*, i en les ciclodextrines gegants corresponen de dalt a baix a la suma de les glucoses en conformació *syn* i a la suma de les glucoses en conformació *kink* i *anti* respectivament.

### 6.1.2.2 Anàlisi de les distàncies

A continuació, s'han analitzat les distàncies de la mateixa manera que s'ha descrit per als diedres. L'anàlisi s'ha iniciat amb la distància  $O2(n)\cdots O3(n-1)$  que dona una idea de percentatge de glucoses que poden formar enllaços d'hidrogen amb la glucosa adjacent i, per tant, que estan en una conformació relativa *syn*.

En primer lloc, cal destacar que les distribucions de les ciclodextrines comunes mostren un únic pic, és a dir, aquesta distància en les ciclodextrines comunes es manté constant al voltant d'un mateix valor, però en les distribucions de les ciclodextrines gegants s'observa que hi ha més pics i que tenen valors molt elevats d'aquesta distància (fins a més de 6 Å), com a conseqüència de les glucoses inclinades i en conformació *anti*. Com a exemple a la Gràfica 6-1 es representen les distribucions per a la CA6 i la CA26 en fase gas amb el camp de forces parm99.



**Gràfica 6-1** Distribucions de la distància  $O2(n)\cdots O3(n-1)$  per a la CA6 i per a la CA26 en fase gas amb el camp de forces parm99

El valor en el punt màxim del pic (Taula 6-11) per a les ciclodextrines comunes en fase gas amb el camp de forces parm99 és de 2.87, 2.84 i 2.77 Å per a la CA6, la CA7, i la CA8, respectivament, i amb el camp de forces glycam 2000a en les mateixes condicions és 3.03, 2.95, i 2.82 Å per a la CA6, la CA7, i la CA8 respectivament. Aquest valor disminueix de la CA6 a la CA8 amb el que indica que un augment de la grandària de les ciclodextrines comunes comporta la formació d'enllaços d'hidrogen més forts (fet que coincideix amb les dades experimentals de les estructures cristal·lines). A més, és important destacar que els valors en el punt màxim del pic calculats amb el camp de forces glycam 2000a s'ajusten millor als valors experimentals (2.98, 2.88, i 2.82 Å per a la CA6, la CA7 i la CA8 respectivament). Finalment, és important observar que els percentatges de població són menors amb el camp de forces glycam2000a que amb el parm99, per tant, sembla que hi ha menys glucoses adjacents que formen enllaços d'hidrogen entre els àtoms tipus  $O2(n+1)\cdots O3(n)$ , segurament degut al moviment d'espèrners més ràpid, fet que ja s'ha comentat en les anàlisis dels diedres.

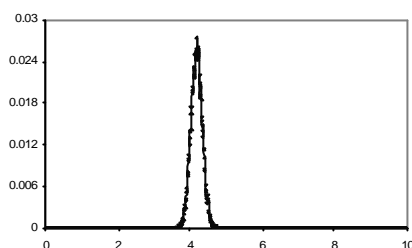
En dissolució aquosa, s'ha observat que el pic principal té tendència a eixamplar-se per la part dreta, és a dir, hi ha glucoses que tenen valors d'aquesta distància més elevada al llarg de la simulació. Conseqüentment, el % de població dins del rang predeterminat (de 0 a 3.3 Å) és en tots els casos menor que en fase gas, i en el cas del camp de forces parm99 varia per a les ciclodextrines comunes en l'ordre CA7>CA6>CA8. Aquesta tendència s'entén considerant la solubilitat de les ciclodextrines comunes: la CA7 és la més insoluble i, per tant, no forma tants enllaços d'hidrogen amb el solvent sinó que els forma intramolecularment; d'altra banda, la CA8 és la més soluble i, per tant, és la que forma menys enllaços d'hidrogen intramoleculars. En el camp de forces glycam 2000a no s'observa aquesta tendència perquè ja s'ha vist que hi ha fortes distorsions de la geometria.

**Taula 6-11 Percentatges d'ocupació dels pics de les distribucions de la distància O2(n)··· O3(n-1) en les CA en fase gas i dissolució aquosa amb els camps de forces parm99, MM3\*, i glycam 2000a.**

Ciclodextrina	Conformació	Fase gas			Dissolució aquosa	
		Parm99	Glycam 2000a	MM3*	Parm99	Glycam 2000a
CA6	<i>syn</i>	85.1	71.1	-	74.1	37.7
CA7	<i>syn</i>	90.0	81.8	-	75.3	62.5
CA8	<i>syn</i>	94.6	89.1	-	70.7	66.9
CA14	<i>syn</i>	59.1	78.4	78.1	47.4	30.5
	<i>kink</i>	34.2	13.8	7.8	38.5	62.1
	<i>anti</i>	6.7	7.8	14.1	14.1	7.5
CA21	<i>syn</i>	67.6	60.1	51.2	38.4	28.8
	<i>kink</i>	18.2	35.1	39.7	56.3	69.8
	<i>anti</i>	14.2	4.8	9.1	5.2	2.1
CA26	<i>syn</i>	63.3	92.2	92.3	60.9	29.5
	<i>kink</i>	28.6	-	-	28.6	59.8
	<i>anti</i>	8.1	7.8	7.7	10.6	10.7
CA28	<i>syn</i>	73.5	63.7	78.2	62.9	37.7
	<i>kink</i>	15.7	23.7	14.7	26.8	59.2
	<i>anti</i>	10.7	12.6	7.1	10.3	11.3

D'altra banda, per a les ciclodextrines més grans el valor de la distància en el punt màxim del primer pic és manté constant al voltant dels 2.8 Å i, per tant, és suficientment petit com per a què les glucoses adjacents formin enllaços d'hidrogen. En dissolució aquosa s'observa el mateix nombre de pics que en fase gas i, de manera anàloga a com s'ha descrit per a les ciclodextrines comunes, els % de població dins del primer pic són menors que en fase gas degut a l'augment de la flexibilitat. A més, convé destacar que els percentatges de població dins del primer pic amb el camp de forces glycam 2000a són menors que amb el camp de forces parm99, degut a l'augment de glucoses inclinades en aquestes simulacions.

A continuació, s'han estudiat les distàncies entre oxígens glicosídics de les diferents glucoses. S'ha observat en totes les distribucions un únic pic, i com a exemple a la Gràfica 6-2 es mostra la distribució per a la CA6 en fase gas amb el camp de forces parm99.



**Gràfica 6-2 Distribució de la distància O4(n)...O4(n+1) per a la CA6 en fase gas amb el camp de forces parm99.**

Així doncs, sembla clar que en totes les cicloamiloses aquesta distància es manté constant al voltant d'un valor donat i aquest fet és coherent amb la coneguda rigidesa de les glucoses dins de les ciclodextrines. Els valors de les distàncies en el punt màxim de la corba (Taula 6-12) augmenten, tant en fase gas com en dissolució aquosa, de la CA6 a la CA8 (excepte en la CA8 en dissolució amb el camp de forces glycam 2000a), però a partir de la CA8 es manté constant. Aquesta tendència també s'observa en les dades de les estructures cristal·lines i, com ja s'ha comentat en la introducció, és degut a què les glucoses en les ciclodextrines comunes s'han d'adaptar al seu radi. El valor en el punt màxim del pic per a les ciclodextrines gegants en dissolució aquosa és lleugerament superior que en fase gas, per tant, sembla que en dissolució aquosa les glucoses estan lleugerament més aplanades.

**Taula 6-12 Valor en el punt màxim del pic (en Å) de les distribucions de la distància O4(n)... O4(n+1) en les CA en fase gas i dissolució aquosa amb els camps de forces parm99, MM3\*, i glycam 2000a.**

Ciclodextrina	Fase gas			Dissolució aquosa	
	Parm99	Glycam 2000a	MM3*	Parm99	Glycam 2000a
CA6	4.19	4.32	-	4.18	4.47
CA7	4.30	4.48	-	4.28	4.52
CA8	4.34	4.52	-	4.36	4.34
CA14	4.34	4.47	4.34	4.43	4.65
CA21	4.33	4.47	4.32	4.42	4.38
CA26	4.34	4.61	4.33	4.42	4.64
CA28	4.34	4.63	4.34	4.43	4.65

## 6.1.2.3 Anàlisi dels angles

Finalment, s'han estudiat els angles d'unió entre glucoses C4(n)-O4(n)-C1(n-1). Novament s'ha observat un únic pic en totes les distribucions i els valors de l'angle en el punt màxim del pic es mostren a la Taula 6-13.

**Taula 6-13 Valor en el punt màxim del pic (en °) de les distribucions de l'angle C4(n)-O4(n)-C1(n+1) de les CA en fase gas i dissolució aquosa amb els camps de forces parm99, MM3\*, i glycam 2000a.**

Ciclodextrina	Fase gas			Dissolució aquosa	
	Parm99	Glycam 2000a	MM3*	Parm99	Glycam 2000a
CA6	116.2	119.6	-	116.8	119.0
CA7	115.2	118.3	-	116.4	118.8
CA8	114.7	117.8	-	115.5	116.5
CA14	117.2	119.2	115.1	116.8	118.8
CA21	117.2	119.3	117.5	117.9	117.7
CA26	116.8	118.4	115.9	116.5	118.6
CA28	116.3	118.5	115.9	116.3	118.7

La tendència en les ciclodextrines comunes és de tancar-se a mesura que augmenta el nombre de glucoses, pel mateix motiu pel qual augmenta la distància O4(n)···O4(n+1). Els valors en el punt màxim del pic comparats amb els valors de les estructures cristal·lines (118.7, 118.7 i 116.8 per a la CA6, la CA7 i la CA8 respectivament) s'ajusten millor amb el camp de forces glycam 2000a i, per tant, sembla que el camp de forces parm99 no acaba d'ajustar correctament els paràmetres geomètrics. D'altra banda, en les cicloamiloses de major nombre de glucoses, el valor d'aquest angle es manté constant al voltant dels 117°, ja que en aquest cas no hi ha tensions a les quals s'hagin d'adaptar. Finalment, cal destacar que no s'observen diferències apreciables per efecte del solvent i els valors en el punt màxim del pic són pràcticament iguals en dissolució aquosa i en fase gas.

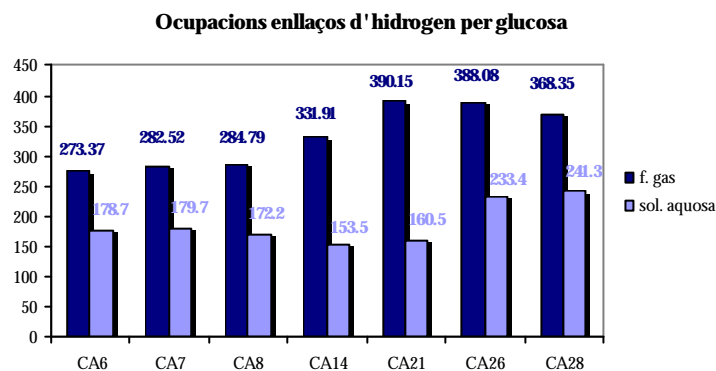
## 6.2 ANÀLISI DELS ENLLAÇOS D'HIDROGEN

Per a les simulacions realitzades amb els camps de forces parm99 i glycam 2000a s'han avaluat els enllaços d'hidrogen totals per ciclodextrina i entre glucoses no consecutives a partir dels percentatges d'ocupació calculats al llarg de les simulacions de dinàmica molecular. Novament s'ha emprat el mòdul Carnal d'AMBER per realitzar aquesta anàlisi.

### 6.2.1 Anàlisi dels enllaços d'hidrogen amb el camp de forces parm99

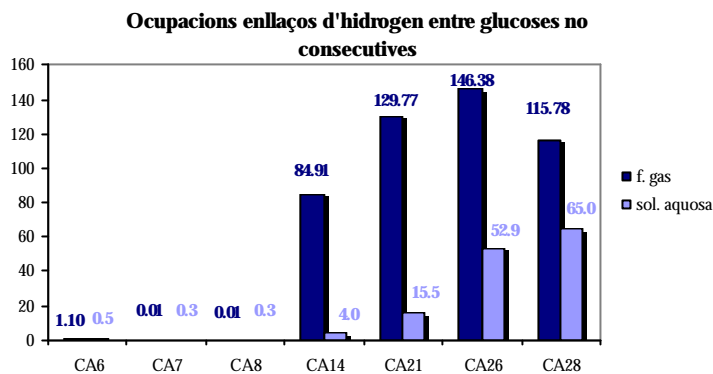
S'ha observat en l'anàlisi conformacional que la tendència de les ciclodextrines gegants en les simulacions en fase gas amb aquest camp de forces és de mantenir-se replegades, probablement estabilitzades per la formació d'enllaços d'hidrogen entre glucoses no consecutives. D'altra banda, la tendència observada en les simulacions en dissolució aquosa és d'estirar-se. Per explicar aquestes diferències s'han estudiat la suma dels percentatges d'ocupació per glucosa dels enllaços d'hidrogen intramoleculars, i també dels percentatges d'ocupació per glucosa dels enllaços d'hidrogen entre glucoses no consecutives.

A la Gràfica 6-3 es representen la suma dels percentatges d'ocupació per glucosa dels enllaços d'hidrogen en les simulacions de dinàmica molecular en fase gas i dissolució aquosa.



**Gràfica 6-3 Suma dels percentatges d'ocupació dels enllaços d'hidrogen per glucosa en les CA en fase gas i dissolució aquosa amb el camp de forces parm99.**

En primer lloc, s'observa que en fase gas la tendència és d'augmentar els percentatges d'ocupació dels enllaços d'hidrogen per glucosa de la CA6 a la CA21, però a partir d'aquesta tornen a disminuir lleugerament. En les ciclodextrines comunes aquesta tendència és coherent amb les dades experimentals on es demostra que la fortalesa dels enllaços d'hidrogen augmenta en el sentit CA6 → CA8. D'altra banda, en dissolució aquosa s'observa que en les ciclodextrines comunes la suma dels percentatges d'ocupació dels enllaços d'hidrogen varia en l'ordre CA7>CA6>CA8 i en les ciclodextrines de major grandària augmenta amb el nombre de glucoses. Com ja s'ha esmentat anteriorment, la tendència observada en les ciclodextrines comunes es pot explicar a partir de la solubilitat d'aquestes. Per entendre millor el comportament de les ciclodextrines gegants a la Gràfica 6-4 es representa la suma dels percentatges d'ocupació dels enllaços d'hidrogen entre glucoses no consecutives.



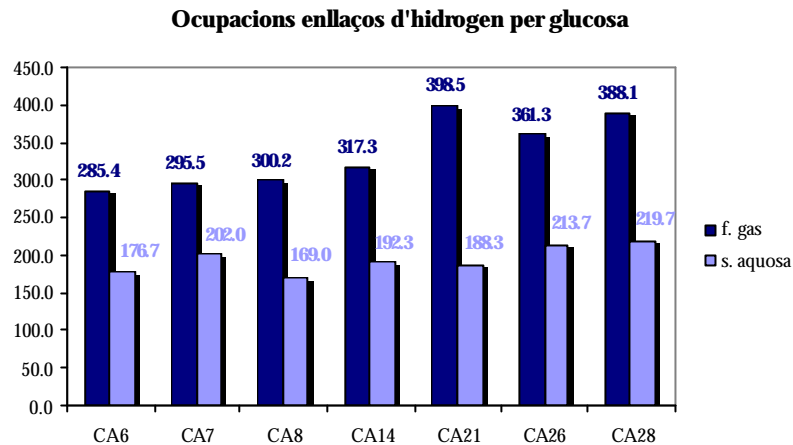
**Gràfica 6-4 Suma dels percentatges d'ocupació dels enllaços d'hidrogen entre glucoses no consecutives per glucosa, en les CA en fase gas i dissolució aquosa amb el camp de forces parm99.**

En primer lloc, s'observa que els percentatges d'ocupació dels enllaços d'hidrogen entre glucoses no consecutives són pràcticament inexistent en les ciclodextrines comunes, i tant en fase gas com en dissolució aquosa. Però aquests són molt elevats en les ciclodextrines gegants (en fase gas representen aproximadament 1/3 dels percentatges d'ocupació totals de la molècula). A més, en les ciclodextrines gegants s'observa que la tendència és a augmentar fins a la CA26 i disminueix una altra vegada en la CA28. Aquest canvi de tendència observat entre la CA21 i la CA26 suggereix que en la CA21 es formen més fàcilment enllaços d'hidrogen entre glucoses consecutives que en la CA26. Aquest fet, és degut probablement a què en aquesta ciclodextrina hi ha menor nombre de glucoses inclinades (veure Taula 6-6), i també influeix en la distància entre els àtoms O2 i O3 de glucoses adjacents que, en general, és menor a la mateixa distància en la CA26 (veure Taula 6-11). Finalment, la tendència en dissolució aquosa és d'augmentar a mida que augmenta el nombre de glucoses, tal i com s'ha observat en l'anàlisi dels percentatges d'ocupació totals, degut a què en dissolució aquosa les ciclodextrines no es repleguen i, per tant, el nombre d'enllaços d'hidrogen augmenta amb el nombre de glucoses.

### 6.2.2 Anàlisi dels enllaços d'hidrogen amb el camp de forces glycam 2000a

En aquest cas, s'ha vist que el comportament no és en tots els casos igual que el descrit en el camp de forces parm99 i, per exemple en la CA6 s'observa una flexibilitat molt elevada en dissolució aquosa. A la Gràfica 6-5 es representa la suma dels percentatges d'ocupació per glucosa dels enllaços d'hidrogen.



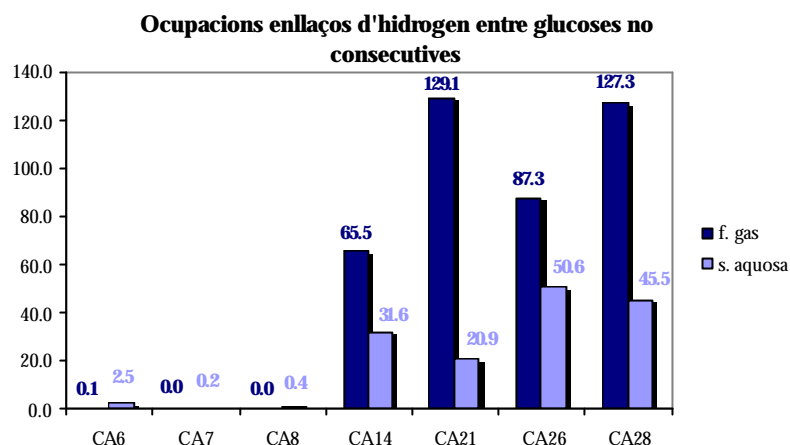


**Gràfica 6-5 Suma dels percentatges d'ocupació dels enllaços d'hidrogen per glucosa en les CA en fase gas i dissolució aquosa amb el camp de forces glycam 2000a.**

S'observa novament que en fase gas la tendència és a augmentar fins a la CA21, però a partir d'aquí s'observen irregularitats; en la CA26 disminueixen però tornen a augmentar en la CA28. No obstant, es pot afirmar que la CA21 és la ciclodextrina que major nombre d'enllaços forma, perquè és la que està més replegada. A més, s'observa que els percentatges d'ocupació dels enllaços d'hidrogen de les ciclodextrines comunes són superiors als descrits amb el camp de forces parm99. D'altra banda, en dissolució aquosa s'observa que entre les ciclodextrines comunes el percentatge d'ocupació dels enllaços d'hidrogen segueix l'ordre descendent CA7>CA6>CA8. Aquesta tendència és la mateixa que s'ha observat en el camp de forces parm99, però cal recordar que en aquest cas hi ha moltes distorsions de la geometria i, per tant, es sospita que aquesta tendència pot estar influïda pel nombre d'enllaços d'hidrogen entre glucoses no consecutives i, al contrari del cas anterior, no es pot explicar a partir de les solubilitats de les ciclodextrines comunes. Entre les ciclodextrines més grans s'observa que la tendència és d'augmentar de la CA14 a la CA28, excepte la CA21 que forma menys enllaços d'hidrogen intramoleculars.

L'anàlisi de la suma dels percentatges d'ocupació dels enllaços d'hidrogen entre glucoses no consecutives (Gràfica 6-6) mostra que les ciclodextrines comunes en fase gas no formen enllaços d'hidrogen entre glucoses no consecutives però, al contrari del que s'ha descrit en el camp de forces parm99, s'observa que la CA6 en dissolució aquosa té una certa tendència a formar enllaços d'hidrogen amb glucoses no adjacents, fet que s'associa a l'alta flexibilitat detectada, i confirma que la tendència observada en la gràfica anterior no és deguda únicament als enllaços d'hidrogen entre glucoses consecutives, tal i com succeeix en les altres ciclodextrines comunes. D'altra banda, a partir de la mateixa anàlisi també es confirma que la CA21 i la CA28

estan més replegades que la CA14 i la CA26 en fase gas, ja que la suma dels percentatges d'ocupació dels enllaços d'hidrogen entre glucoses no consecutives són superiors. Finalment, en dissolució aquosa s'observa que, de les ciclodextrines més grans, la CA26 és la que més enllaços d'hidrogen forma amb glucoses no consecutives i la CA21 la que menys en forma.



**Gràfica 6-6** Suma dels percentatges d'ocupació dels enllaços d'hidrogen entre glucoses no consecutives per glucosa, en cada CA en fase gas i dissolució aquosa amb el camp de forces glycam 2000a.

### 6.3 ANÀLISI DELS DESCRIPTORS DE FORMA

Les conformacions descrites per a cada una de les cicloamiloses també s'han caracteritzat amb el seu radi de gir ( $R_{gyr}$ )<sup>60</sup> i l'asfericitat (ASP). El radi de gir només dóna idea de la grandària de la molècula, és a dir, molècules esfèriques o el·líptiques podrien tenir els mateixos valors d'aquest descriptor i, per tant, no es podrien diferenciar. D'altra banda, l'asfericitat indica quant es desvia la molècula respecte d'una esfera: és =0 per molècules totalment esfèriques, és  $\approx 1/4$  si les molècules tenen forma cilíndrica, i és  $\approx 1$  per molècules aplanades amb forma de disc. Aquests descriptors de forma s'han calculat amb el programa DRAGON (versió web),<sup>61</sup> i el procediment que s'ha seguit és el següent: primer s'ha buscat la mitjana de les coordenades per a cada conformació, a continuació s'ha minimitzat amb 50 iteracions l'estructura resultant i finalment, donada la limitació en el número d'àtoms del programa, s'ha seleccionat en cada cas l'esquelet C1-O4-C4 de l'estructura minimitzada i s'han eliminat tots els altres àtoms de les cicloamiloses.

<sup>60</sup> Arteca, G. A., *Reviews in Computational Chemistry*, **1996**, 9, 191-253.

<sup>61</sup> Todeschini R.; Consonni V.; Mauri A.; Pavan M., [www.disat.unimib.it/dhm/](http://www.disat.unimib.it/dhm/)

A la Taula 6-14 es resumeixen tots els valors obtinguts per a les estructures en fase gas. En primer lloc, s'observa que en la majoria dels casos el radi de gir té tendència a augmentar de la CA6 a la CA28, excepte la CA28 amb el camp de forces parm94 que té un radi de gir inferior al de la CA26 amb el mateix camp de forces. Aquest fet indica que, en aquest cas, la CA28 és “més petita” que la CA26, i això és degut als *loops* que es formen en cada un dels extrems i que fan que aquesta no estigui totalment estirada.

**Taula 6-14 Descriptors de forma per a cada CA en fase gas.**

		CA6	CA7	CA8	CA14	CA21	CA26	CA28
RGyr (Å)	Experimental	6.0	6.7	7.3	-	11.5	19.6	-
	Parm94	4.181	6.676	6.226	12.782	23.272	31.380	28.260
	Parm99	4.211	5.376	6.282	9.079	13.223	16.602	18.274
	Glycam 200a	4.301	5.493	6.486	9.174	12.986	15.936	16.969
	MM3*	-	-	-	10.371	15.491	17.465	18.895
ASP	Parm94	0.238	0.233	0.267	0.705	0.943	0.887	0.673
	Parm99	0.249	0.249	0.246	0.085	0.094	0.201	0.211
	Glycam 200a	0.249	0.250	0.250	0.114	0.059	0.052	0.139
	MM3*	-	-	-	0.164	0.220	0.148	0.132

Si es comparen aquests valors amb els valors experimentals s'observa que en les ciclodextrines comunes són més petits. Aquest fet és degut a què en aquesta anàlisi s'ha simplificat la molècula a l'esquelet C1-O4-C4, per tant, considerant aquest raonament per a les ciclodextrines més grans també s'haurien de tenir valors del radi de gir inferiors als valors experimentals. En el camp de forces parm94 els valors d'aquest descriptor per a la CA21 i la CA26 són superiors als valors experimentals i molt elevats. Per tant, aquestes conformacions no corresponen a les conformacions experimentals. Amb els altres camps de forces el valor és superior per a la CA21 i inferior per a la CA26. Però és important recordar que amb els camps de forces parm99 i MM3\* l'espai conformacional explorat és molt petit, i probablement hi ha algun paràmetre del camp de forces que sobreestabilitza alguna de les interaccions. Així doncs, s'ha d'anar amb compte a l'hora d'avaluar aquests valors, ja que probablement les estructures obtingudes en aquestes simulacions tampoc corresponen a les estructures experimentals. Per tant, l'únic camp de forces que potser permet explicar les dades experimentals és el glycam 2000a, amb excepció de la CA21, que pot ser conseqüència de la pròpia estructura de partida.

L'asfericitat per a les ciclodextrines comunes té valors de 0.25, excepte amb el camp de forces parm94 que presenten més irregularitats. Per tant, l'esquelet C1-O4-C4 es pot descriure com un cilindre. I en les ciclodextrines més grans, no s'aprecien tendències clares, però en

general el valor d'aquest descriptor és menor que el corresponent valor en les ciclodextrines comunes i, per tant, l'esquelet C1-O4-C4 d'aquestes és més esfèric. Com ja s'ha vist en altres casos, l'excepció està en el camp de forces parm94, on s'aprecia que els valors de l'ASP tendeixen cap a 1 en les ciclodextrines més grans.

Per a les estructures obtingudes en les simulacions en dissolució aquosa s'ha realitzat la mateixa anàlisi (Taula 6-15). Amb el camp de forces parm94 s'observa que el radi de gir augmenta de la CA6 a la CA21, però a partir d'aquesta el valor es manté força constant al voltant de 17.6. Aquesta tendència indica que a l'augmentar el número de residus de glucosa augmenta la grandària, però també augmenta la compactació (les ciclodextrines tenen tendència a replegar-se sobre si mateixes), i la suma dels dos factors és la responsable de que el valor del radi del gir es mantingui constant en les ciclodextrines més grans. D'altra banda, s'observa que en els altres camps de forces es reproduïen molt bé els canvis conformacionals. Per exemple la CA26 i la CA28 que tendeixen a replegar-se amb el camp de forces glycam 2000a, tenen valors del radi de gir i de l'asfericitat que augmenten d'una estructura a l'altre. Finalment, convé destacar que els radis de gir de la CA21 i de la CA26 són en la majoria dels casos superiors al valor experimental i, per tant, cap de les estructures representa correctament la conformació experimental.

**Taula 6-15 Descriptors de forma per a cada CA en dissolució aquosa. Entre parèntesis s'especifica el temps (en ps) de l'estructura per a la qual s'ha calculat el descriptor.**

		CA6	CA7	CA8	CA14	CA21	CA26	CA28				
RGyr (Å)	Experimental	6.0	6.7	7.3	-	11.5	19.6	-				
	Parm94	3.966	4.837	5.856	10.855	17.793	17.679	17.486				
	Parm99	4.174	5.222	6.341	(158)	12.150	(434)	19.561	(650)	17.605	(365)	20.58
					(381)	11.276	(1150)	20.734	(2157)	18.579	(2507)	20.675
					(676)	11.462	(2285)	17.314	(3451)	24.189	(3067)	19.81
					(1125)	11.699	(2492)	16.712	(4046)	22.289	(3917)	20.667
	Glycam 2000a	4.670	5.419	6.461	(186)	11.973	(334)	21.054	(421)	18.373	(145)	19.652
					(3820)	10.761	(2025)	19.358	(1469)	19.583	(671)	23.567
					(3930)	18.961	(4250)	22.334	(4930)	26.019		
	ASP	Parm94	0.224	0.171	0.199	0.399	0.320	0.186	0.084			
Parm99		0.25	0.249	0.243	(158)	0.195	(434)	0.242	(650)	0.241	(365)	0.218
					(381)	0.108	(1150)	0.3	(2157)	0.277	(2507)	0.23
					(676)	0.241	(2285)	0.338	(3451)	0.468	(3067)	0.259
					(1125)	0.346	(2492)	0.125	(4046)	0.391	(3917)	0.187
Glycam 2000a		0.253	0.248	0.245	(186)	0.123	(334)	0.362	(421)	0.147	(145)	0.196
					(3820)	0.39	(2025)	0.252	(1469)	0.25	(671)	0.295
				(3930)	0.196	(4250)	0.306	(4930)	0.383			

## 7 AVALUACIÓ DELS CAMPS DE FORCES PER MODELITZAR LES CICLOAMILOSES

En els capítols anteriors s'han descrit els resultats obtinguts en les simulacions de DM de les cicloamiloses amb diferents camps de forces, i s'ha observat que depenent del camp de forces utilitzat el comportament conformacional d'una mateixa ciclodextrina varia considerablement. Per aquest motiu, en aquest darrer capítol d'estudi de les cicloamiloses es fa un repàs dels paràmetres que descriuen a les glucoses en cada un dels camps de forces i s'avalua com afecten aquests en la modelització de les ciclodextrines.

### 7.1 PARÀMETRES D'*STRETCHING* I *BENDING*

Els paràmetres corresponents a l'*stretching* dels enllaços no varien significativament d'un camp de forces a l'altre i, a més a més, aquests no afecten a la conformació de les ciclodextrines per tant, no es comentaran aquests paràmetres detalladament.

Respecte dels paràmetres corresponents al *bending* dels angles (Taula 7-1) s'observa que les constants de força en el camp de forces MM3\* són molt diferents a les corresponents amb els altres camps de forces perquè les equacions que s'utilitzen per modelitzar aquests angles són diferents en Amber i en Macromodel (consultar apartat de Metodologia per a més informació). Respecte als valors de l'angle d'equilibri no s'observen diferències significatives en els quatre primers casos, i per exemple si es comparen aquests valors per l'angle C1-O4-C4 entre els camps de forces parm99, glycam 2000a i MM3\* es pot entendre que en les distribucions d'aquest angle els valors en el punt màxim del pic segueixen l'ordre ascendent MM3\* < parm99 < glycam 2000a.

**Taula 7-1 Diferències en els paràmetres de *bending* segons el camp de forces.**

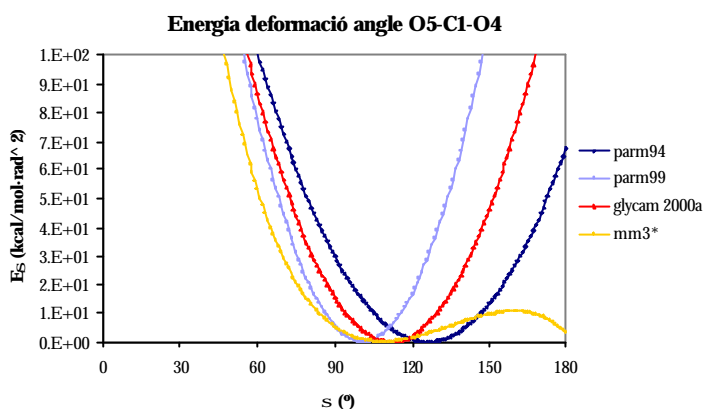
Angle	Parm94		Parm99		Glycam 2000a		MM3*	
	$k_s$ **	$Seq$ **	$k_s$ **	$Seq$ **	$k_s$ **	$Seq$ **	$k_s$ ***	$Seq$ ***
C1-C2-C3	40.0	109.5	40.0	109.5	40.0	111.8	0.67	110.2
H5-C5-O5	50.0	109.5	50.0	109.5	35.0	109.5	0.82	110.0
H1-C1-O5	50.0	109.5	50.0	109.5	35.0	109.5	0.82	110.0
C1-O4-C4	60.0	109.5	60.0	109.5	60.0	113.5	0.82	107.2
O5-C1-O4	80.0*	126.0*	160.1	101.0	110.7	112.0	0.54	108.6

\* Aquest angle no estava parametritzat en el parm94 i es van afegir aquests paràmetres.

\*\*  $K_\sigma$  en kcal/mol·rad<sup>2</sup> i  $\sigma$  en graus.

\*\*\*Kc en mdyn/rad<sup>2</sup> i  $\sigma$  en graus.

El més destacable de la taula són els paràmetres per a l'angle O5-C1-O4 ja que presenta grans diferències en tots els casos. El valor de l'angle d'equilibri és similar en els camps de forces glycam 2000a i MM3\*, però és molt superior en el camp de forces parm94 i és força inferior en el camp de forces parm99. A més, les constants de força també varien molt d'un camp de forces a l'altre i, per exemple, en els tres primers el cost energètic d'obrir i tancar aquest angle segueix l'ordre ascendent parm94<glycam 2000a<parm99. No obstant, amb l'objectiu d'avaluar millor les diferències a la Gràfica 7-1 es representa l'energia de deformació d'aquest angle.

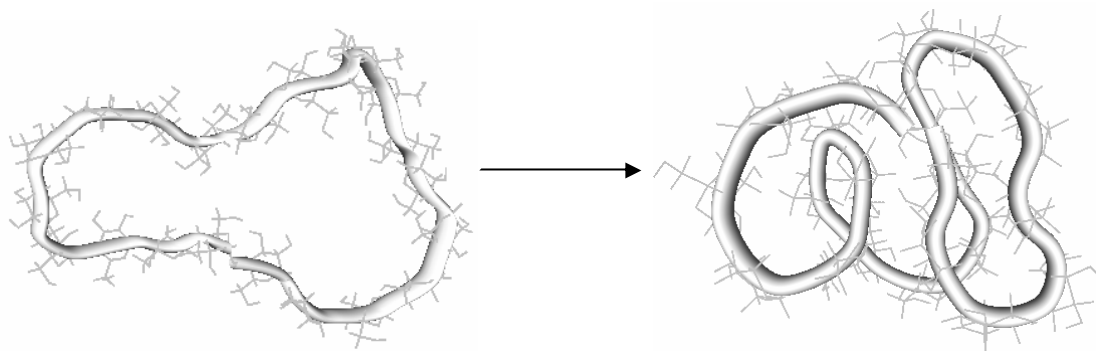


**Gràfica 7-1 Energia de deformació de l'angle O5-C1-O4 en els diferents camps de forces.**

S'observa com, efectivament, l'angle de mínima energia segueix l'ordre parm99<MM3\* ~ glycam 2000a<parm94. També és important observar que el cost energètic de variar lleugerament el valor d'aquest angle en el camp de forces MM3\* és inferior que en els altres tres camps de forces, degut a què les funcions utilitzades en aquest camp de forces són diferents. En els altres tres casos, s'observa que la paràbola és més ampla en el camp de forces parm94 que en el parm99, i aquesta és més ampla que en el camp de forces glycam 2000a.

En resum, en el camp de forces parm94 la deformació de l'angle O5-C1-O4 és menys energètica, i la distància d'equilibri és major que en els altres camps de forces. Aquests fets són els responsables de que en el camp de forces parm94 es produeixi un efecte "cremallera". És a dir, en cada glucosa aquest angle està una mica més obert que en els altres camps de forces i la suma d'aquestes diferències per a cada una de les glucoses de la ciclodextrina fa que al final l'efecte sigui molt superior. Per aquest motiu, les estructures obtingudes en les simulacions en fase gas de les ciclodextrines gegants tendeixen a estirar-se al contrari del que succeeix en tots els altres camps de forces. Aquest efecte s'ha confirmat realitzant una nova simulació de la CA21 amb el camp de forces parm94, però substituint els paràmetres d'aquest angle pels corresponents en el camp de

forces parm99. Al final de la simulació s'observa una estructura que no està estirada sinó que es manté replegada (Figura 7-1).



**Figura 7-1 Estructura inicial i estructura final de la CA21 en la simulació en fase gas amb el camp de forces parm94 però amb els paràmetres de l'angle O5-C1-O4 del camp de forces parm99.**

Per tant, es confirma que, malgrat aquest camp de forces hagi donat resultats positius en la modelització de les ciclodextrines comunes, no permet modelitzar correctament les ciclodextrines de major grandària degut a la manca de paràmetres adients per a l'angle O5-C1-O4.

## 7.2 PARÀMETRES DE TORSIÓ

Els paràmetres que defineixen els angles de torsió presenten més diferències entre un camp de forces i l'altre. Entre totes les diferències es farà especial esment a aquelles que afecten a la rotació dels enllaços interglicosídics, ja que són els que condueixen als canvis conformacionals més importants. A la Taula 7-2 es resumeixen els valors dels paràmetres per als diedres  $\psi$  (C1-O4-C4-C3) i  $\phi$  (O5-C1-O4-C4).

**Taula 7-2 Diferències en els paràmetres de torsió segons el camp de forces.**

Diedre	Parm94				Parm99				Glycam 2000				MM3*		
	Nº	V/2*	?*	n	Nº	V/2*	?*	n	Nº	V/2*	?*	n	V <sub>1</sub> *	V <sub>2</sub> *	V <sub>3</sub> *
O5-C1-O4-C4	3	1.15	0	3	1	1.35	180	1	1	1.39	265.77	-1	-2.5	0.0	0.85
	-	-	-	-	1	0.85	180	-2	1	0.70	312.04	-2			
	-	-	-	-	1	0.10	0.0	-3	1	0.91	347.7	3			
C1-O4-C4-C3	1	0.1	180.0	2	1	0.1	180.0	2	1	1.35	0	1	0.45	0.05	0.757
	1	0.383	0.0	-3	1	0.383	0.0	-3	1	0.0	0	-2			
	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0.0	0	-3			

\* V en kcal/mol i ? en graus.

En primer lloc, cal destacar que en el camp de forces parm94 el diedre que representa l'enllaç O5-C1-O4-C4 no està parametritzat i, per tant, per a la modelització d'aquest diedre s'utilitzen els paràmetres del diedre genèric X-CT-OS-X.<sup>62</sup> D'altra banda, en els camps de forces implementats en AMBER s'observa que el nombre i el tipus de termes cosinus varia d'un a l'altre. Igualment succeeix amb la degeneració de l'angle; varia considerablement d'un camp de forces a l'altre. Donat que les diferències són importants, per avaluar la seva influència s'han representat els perfils de les energies de rotació al voltant dels enllaços C1-O4 i O4-C4 considerant tots els diedres que hi contribueixen.

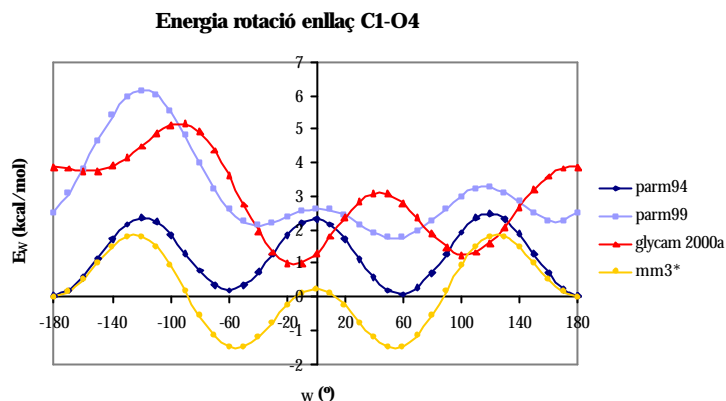
En primer lloc, a la Gràfica 7-2 es representa l'energia de rotació al voltant de l'enllaç C1-O4. S'observa que els perfils energètics dels camps de forces parm94 i MM3 són molt simètrics i similars entre ells. Ambdós presenten tres màxims energètics ( a -120, 0, i 120°) i tres mínims ( a -60, 60, i 180°). No obstant, el tres màxims i els tres mínims en el parm94 són idèntics en energia, però en el MM3\* els màxims als -120 i 120° són màxims absoluts i els mínims a -60 i 60° són mínims absoluts.

D'altra banda, s'observa que els perfils energètics en els camps de forces parm99 i glycam 2000a, trenquen amb la simetria dels perfils anteriors. En el camp de forces glycam 2000a s'observa un màxim absolut d'energia al voltant dels -90° i en el camp de forces parm99 s'observa un màxim absolut d'energia al voltant dels -120°. També s'observa que la zona dels valors positius de l'angle varia considerablement i, per exemple, en el camp de forces parm99 hi ha els mínims d'energia als voltant dels 60 i dels 160°, però en el camp de forces glycam 2000a el mínim d'energia està al voltant dels 120°. Així doncs, amb aquestes diferències dels perfils, s'entén que en les distribucions del diedre  $\phi$  amb el camp de forces parm99 s'observin pics més diferenciats per a les glucoses en conformació *syn* i inclinades ja que cauen en els dos pous d'energia que hi ha en el perfil. D'altra banda, en el camp de forces glycam 2000a cauen totes dins del mateix mínim d'energia i per aquest motiu, en les distribucions s'observa un pic més ample. Igualment es pot entendre que en les distribucions amb el camp de forces MM3\* hi hagi dos pics diferenciats perquè en la zona dels valors positius de l'angle també hi ha dos mínims d'energia, un al voltant dels 60° i l'altre cap als 180°.

---

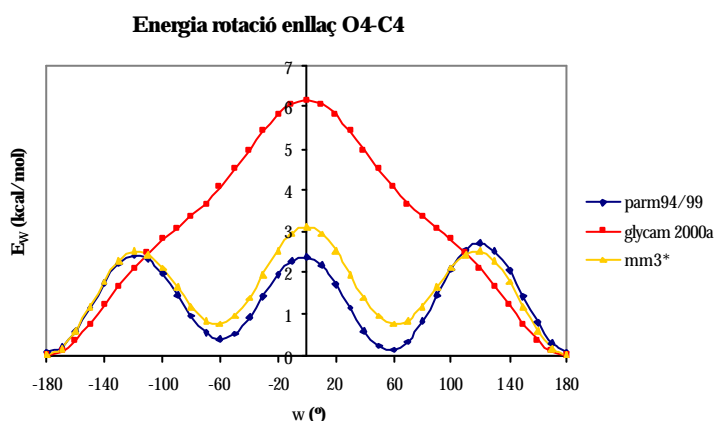
<sup>62</sup> Aquest paràmetre té els següents valors: N=3,  $V_n/2= 1.15$ ,  $\tau=0$ , n=3





**Gràfica 7-2 Energia de rotació al voltant de l'enllaç C1-O4 en els diferents camps de forces.**

En segon lloc, a la Gràfica 7-3 es representa l'energia de rotació al voltant de l'enllaç O4-C4. En aquest cas, s'observen perfils molt similars en els camps de forces parm94, parm99 i MM3\*, però un perfil molt diferent en el camp de forces glycam 2000a. S'observa en aquest últim una corba simètrica amb un màxim d'energia absolut als 0°. A partir d'aquestes diferències en els perfils, s'entén que en el cas de les simulacions de dinàmica molecular en fase gas realitzades amb el camp de forces glycam 2000a, el nombre de glucoses inclinades sigui molt inferior al nombre de glucoses inclinades amb el camp de forces parm99, ja que el cost energètic de variar el valor d'aquest diedre és molt superior al dels altres camps de forces. No obstant, s'ha observat que en dissolució aquosa el comportament és a l'inversa i, per tant, és lògic pensar que en aquest cas les interaccions no enllaçants entre el solvent i el solut són suficientment fortes com per permetre superar el cost energètic de variar aquest angle.



**Gràfica 7-3 Energia de rotació al voltant de l'enllaç O4-C4 en els diferents camps de forces.**

### 7.3 PARÀMETRES DE VAN DER WAALS

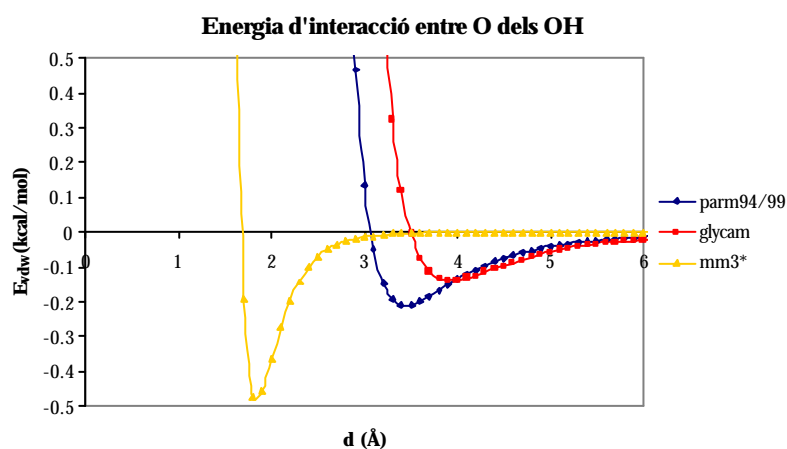
Les interaccions entre àtoms no enllaçants són molt nombroses però en aquest cas, tenint en compte que les molècules estudiades tenen un elevat nombre de grups hidroxil, i que es formen molts enllaços d'hidrogen intramoleculars, s'avalua en primer lloc la fortaleza dels enllaços d'hidrogen. I en segon lloc, es busquen aquelles interaccions entre el solut i el solvent que permeten explicar el diferent comportament observat en les simulacions en fase gas i en dissolució aquosa amb el camp de forces glycam 2000a.

**Taula 7-3 Paràmetres de van der Waals per als diferents tipus d'oxígens segons el camp de forces.**

Tipus d'àtom	Parm94/99		Glycam 2000a		MM3*	
	R <sub>i</sub> *	e*	R <sub>i</sub> *	e*	C*	D*
OW	1.7682	0.1521	1.7683	0.1520	-	-
OH	1.7210	0.2104	1.9610	0.1400	-	-
OS/OG	1.6837	0.1700	1.8310	0.1400	-	-
O3	-	-	-	-	3500	1250

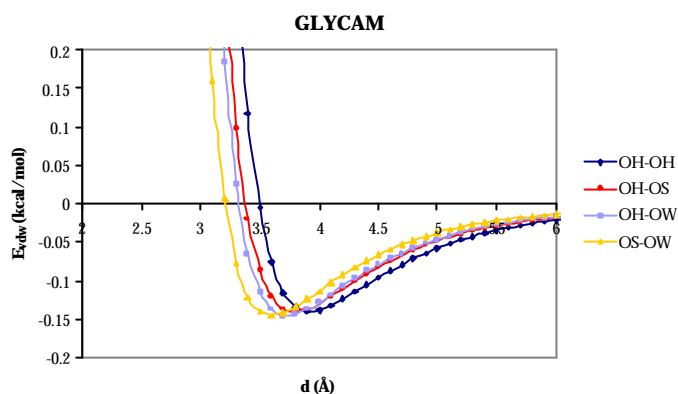
\* R<sub>i</sub> en Å i e en kcal/mol. C i D en kcal/mol.

A la Gràfica 7-4 es representa l'energia corresponent a les interaccions entre els oxígens hidroxílics de les ciclodextrines, les quals donen una idea de la fortaleza dels enllaços d'hidrogen formats. S'observa que el pou d'energia varia en l'ordre MM3\*>Parm94/99>glycam 2000a, i la distància d'equilibri varia en el mateix ordre. Per tant, es confirma que en els camps de forces parm99 i MM3\* hi ha una sobreestabilització energètica provinent dels enllaços d'hidrogen entre grups hidroxil, que es manifesta principalment en les simulacions en fase gas, on l'espai conformacional explorat és molt petit.



**Gràfica 7-4 Energia dels enllaços d'hidrogen en els diferents camps de forces.**

Amb l'objectiu d'entendre el diferent comportament observat en fase gas i en dissolució aquosa en les simulacions realitzades amb el camp de forces glycam 2000a, a la Gràfica 7-5 es representa l'energia d'interacció entre els oxígens dels hidroxils i els oxígens de les molècules d'aigua. S'observa en primer lloc, que la interacció entre els oxígens de la ciclodextrina i les molècules d'aigua és més forta que la interacció dels hidroxils entre si. Per tant, es sospita que, gràcies a les millors interaccions entre el solut i el solvent, es supera la barrera energètica de rotació de l'enllaç O4-C4 i, conseqüentment, el nombre de glucoses inclinades en dissolució aquosa és superior que en fase gas.



**Gràfica 7-5 Comparació de l'energia d'interacció entre els oxígens de l'aigua (OW) i els de la ciclodextrina (OH i OS), i dels oxígens de la ciclodextrina entre si amb el camp de forces glycam 2000a.**

No obstant, per confirmar aquest fet, i agafant com a model les interaccions entre els tipus d'àtom  $\text{OH}\cdots\text{OH}$  i  $\text{OH}\cdots\text{OW}$  s'ha estimat quantitativament l'estabilització que pot proporcionar aquesta diferència de 0.006 kcal/mol a favor de les interaccions amb el solvent, en el cas de la CA14. Per això s'han de tenir en compte les dades de Taula 7-4.

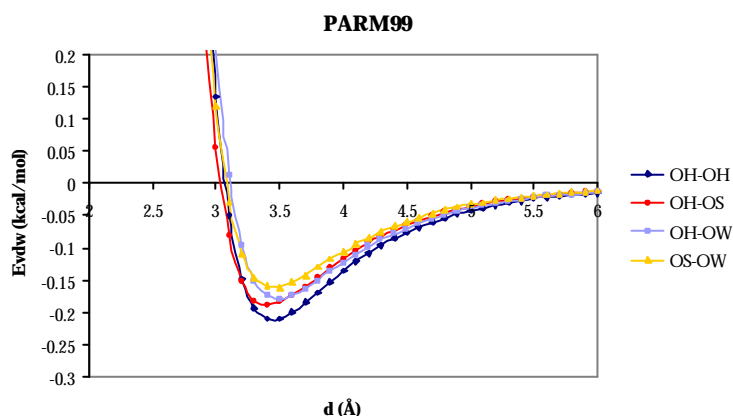
**Taula 7-4 Dades per calcular l'estabilització de la CA14 deguda als enllaços d'hidrogen en dissolució aquosa amb el camp de forces glycam 2000a.**

Fase gas	Dissolució aquosa		Mínim energètic interacció OH ... OH	Mínim energètic interacció OH ... OW
$\Sigma\%$ ocupació enllaços hidrogen intramoleculares	$\Sigma\%$ ocupació enllaços hidrogen intramoleculares	$\Sigma\%$ ocupació intermoleculares		
317.9	192.3	1220.9	-0.140	-0.146

Així doncs, a partir dels sumatoris de percentatges d'ocupació dels enllaços d'hidrogen al llarg de les simulacions s'obté una idea del nombre d'enllaços d'hidrogen per glucosa que es formen en fase gas i en dissolució aquosa. En el cas de la CA14, s'ha vist que el sumatori del percentatge d'ocupació per glucosa en fase gas és de 317.3, i s'ha calculat que en dissolució aquosa la suma del percentatge d'ocupació dels enllaços d'hidrogen per glucosa és de 1413.2, dels

quals 192.3 corresponen a enllaços d'hidrogen intramoleculars i 1220.9 corresponen a enllaços d'hidrogen amb el solvent. Així doncs, la diferència d'enllaços d'hidrogen intramoleculars en fase gas i dissolució aquosa és 125.0 i, per tant, l'energia associada a aquesta disminució dels enllaços d'hidrogen intramoleculars en dissolució aquosa respecte fase gas és 0.75 kcal/mol.<sup>63</sup> D'altra banda, en dissolució aquosa el sumatori del percentatge d'ocupació dels enllaços d'hidrogen entre el solut i el solvent és 1220.9, i aquest proporciona una estabilització de -178.3 kcal/mol.<sup>64</sup> Per tant, sumant els dos termes arribem a la conclusió que en dissolució aquosa es té una estabilització energètica provinent dels enllaços d'hidrogen amb el solvent de -177.6 kcal/mol. Així doncs, amb aquesta energia d'estabilització deguda a les interaccions entre el solvent i el solut es pot superar la barrera de 6 kcal/mol·glucosa observada en la rotació de l'enllaç O4-C4.

Finalment, a la Gràfica 7-6 s'observa que en el cas del camp de forces parm99 les interaccions entre aquests mateixos àtoms tenen una distància d'equilibri molt més similar entre ells, encara que els pous d'energia són lleugerament diferents, i les interaccions intramoleculars en la ciclodextrina són més favorables que les interaccions amb el solvent. Per tant, a partir d'aquestes observacions, s'entén que en les simulacions realitzades amb aquest camp de forces en fase gas i en solució no hi hagi tanta diferència en el nombre de glucoses inclinades en cada cicloamilosa.



**Gràfica 7-6 Comparació entre l'energia d'interacció entre els oxígens de l'aigua (OW) i els de la ciclodextrina (OH i OS,) i entre els de la ciclodextrina entre si amb el camp de forces parm99.**

<sup>63</sup> Aquest valor es calcula com la diferència en els percentatges d'ocupació en fase gas i dissolució aquosa per la diferència en els mínims d'energia de les interaccions tipus OH...OH i OH...OW ( $125.0 \cdot 0.006 = 0.75$ )

<sup>64</sup> Aquest valor s'ha calculat com el producte del percentatge d'ocupació dels enllaços d'hidrogen entre el solut i el solvent pel pou d'energia corresponent a aquestes interaccions ( $1220.9 \cdot (-0.146) = -177.3$ ).

## 7.4 RESUM FINAL DE L'ESTUDI ESTRUCTURAL DE LES CICLOAMILOSES

En resum podem dir que, de l'estudi conformacional de les cicloamiloses de 14, 21, 26, i 28 unitats de glucosa, s'han obtingut resultats molt diversos segons el camp de forces. Per exemple, la tendència observada amb el camp de forces parm94 en fase gas és a estirar-se les molècules degut a la manca de paràmetres adients per l'angle O5-C1-O4. Per tant, amb aquest camp de forces no s'han obtingut estructures que puguin explicar les dades experimentals existents. D'altra banda, en el cas dels camps de forces MM3\* i parm99 en fase gas, les estructures mantenen la seva conformació inicial degut a una sobreestabilització energètica provinent dels enllaços d'hidrogen.

En el cas del camp de forces parm99 en dissolució aquosa, malgrat que s'explora una zona molt més àmplia de la hipersuperfície de potencial, els radis de gir són superiors als valors experimentals i, per tant, les estructures tampoc permeten explicar les dades experimentals. No obstant, en aquest cas no s'ha trobat el paràmetre concret que no permet modelitzar adequadament aquests sistemes.

Finalment, en el cas del camp de forces glycam 2000a les ciclodextrines comunes en dissolució presenten una elevada flexibilitat, especialment en la CA6 i, per exemple, els percentatges de població dins del rang predeterminat calculats per al diedre *flip* són molt baixos. Igualment s'observen importants desviacions en les distribucions del diedre  $\psi$ , i un baix percentatge de població en les distribucions corresponents a la distància O2(n)···O3(n-1). S'ha estimat, que aquesta elevada flexibilitat és deguda a les interaccions d'enllaços d'hidrogen entre el solvent i el solut i, per tant, sembla que aquests paràmetres en aquest camp de forces estan sobreestabilitzats. Per aquest motiu, es sospita de la fiabilitat dels resultats de les ciclodextrines de major grandària amb les mateixes condicions de càlcul. D'altra banda, en les simulacions en fase gas amb el mateix camp de forces, s'han trobat estructures que s'ajusten molt millor a les dades experimentals. Cal destacar l'estructura de la CA26 que presenta una seqüència de tres *loops* consecutius que formen una hèlix levògira, i que el seu radi de gir s'ajusta al valor experimental. No obstant, en la mateixa simulació realitzada per a la CA21 no s'han trobat estructures coherents amb les dades experimentals.

Per tant, els resultats suggereixen que en el cas de la CA21, la pròpia estructura de partida és la responsable de que no s'hagin trobat conformacions que permetin explicar les dades experimentals. Malgrat la dinàmica molecular pugui ser una eina de cerca conformacional, les barreres energètiques que es poden superar no són gaire elevades, i és per aquest motiu que

l'estructura de partida pot influir notablement en els resultats obtinguts. Conseqüentment, podria ser que en el cas de la CA28 també hi hagués certa influència de l'estructura de partida. Encara que, en aquest cas, tan sols són suposicions, ja que no es disposa de dades experimentals per a aquesta cicloamilosa, que puguin donar idea sobre les possibles conformacions. Per tant, s'haurien de trobar noves estructures de partida per a aquestes dues cicloamiloses. Actualment, hi ha un membre del nostre grup de recerca que està realitzant una estada en el grup del professor Jonathan Goodman de la *University of Cambridge*, on està desenvolupant una nova metodologia de cerca conformacional basada en algorismes genètics, amb la qual es pretén en un futur realitzar cerques conformacionals d'aquestes cicloamiloses per trobar noves estructures de partida.