



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO 

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
Facultad de Química

INTERACCIONES DE PÉPTIDOS CON
FULERENOS: UN ESTUDIO TEÓRICO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A:
ALFREDO CRUZ GREGORIO

Tutor: Dr. *Vladimir Basiuk* Evdokimenko

MÉXICO, D. F.

/2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, ya que dentro de ella me he formado como profesional de la Química y he adquirido un crecimiento personal enorme, hago extenso este agradecimiento por su apoyo financiero.

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM por la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Al Instituto de Ciencias Nucleares (ICN) de la UNAM, por permitirme el uso de sus instalaciones, el espacio y el material provisto.

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico de la UNAM por el apoyo mediante el proyecto de investigación DGAPA-IN100610.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo a través del proyecto 127299.

A CONACyT por el apoyo económico mediante la beca de maestría otorgada durante mis estudios.

Agradezco especialmente a mi tutor principal Dr. Vladimir Basiuk
Evdokimenko por su apoyo y asesoría durante mis estudios de posgrado.

Al comité tutorial que me guió durante toda la investigación:

Dr. Enrique García Hernández

Dr. Alejandro Sosa Peinado

Al jurado que analizó, discutió y me sugirió correcciones acertadas para
mejorar el documento de tesis:

Dr. Miguel Costas Basín

Dr. José de Jesús García Trejo

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco

Dr. Ismael Bustos Jaimes

Dr. Gabriel del Rio Guerra

Dedicatoria:

A mis padres Patricio Cruz y Zita Gregorio que me han apoyado durante este proceso y que siempre han estado junto a mí en mis alegrías y tristezas.

A mi hermana Guadalupe Cruz con todo mi cariño.

A Olga Ruvalcaba que desde que llego a mi vida ha iluminado un camino que parecía oscuro y muy desviado, gracias por los ánimos que siempre supo darme y que sin ellos tal vez no hubiera empezado y completado este proceso.

A Claudio Meléndez que en el momento necesario que lo necesitaba allí estuvo.

A todas las personas que han compartido un poco de su tiempo para conversar o divertirnos, especialmente al ya casi desaparecido árbol.

Índice

Agradecimientos	2
Dedicatoria	3
Resumen	8
1. Antecedentes	9
1.1. Introducción.....	9
1.2. Estructura y propiedades del fullereno y nanotubos de carbono.....	11
1.2.1 Fullerenos.....	11
1.2.2 Nanatubos.....	13
1.3. Toxicidad de fullerenos.....	13
1.3.1. Absorción en el organismo.....	15
1.3.2. Daños en el organismo causados por Fullerenos.....	17
1.4. Interacción de proteínas y fullerenos.....	19
1.5. Mecánica molecular.....	22
1.5.1. Principios básicos de la mecánica molecular.....	24
1.5.2. Campos de fuerza MM+ y AMBER.....	32
1.6. Justificación del trabajo.....	35

1.7. Hipótesis.....	36
1.8. Objetivos.....	37
1.8.1. Objetivo general.....	37
1.8.2. Objetivos específicos.....	37
2. Métodos computacionales.....	38
3. Resultados y discusión.....	41
3.1. Resultados de cálculos por MM+.....	42
3.1.1. Hebra β	42
3.1.2. Hélice α	57
3.2. Resultados de cálculos por AMBER.....	69
3.2.1. Hebra β	69
3.2.2. Hélice α	80
4. Conclusiones.....	90
5. Perspectivas.....	91

6. Anexo I
 Artículo publicado.....92

5. Referencias.....101

Resumen

En este trabajo teórico, se estudio las interacciones de péptidos con fulerenos C_{60} . Los péptidos escogidos fueron homopéptidos *zwitterionicos* de L-Valina desde un dipéptido de valina hasta un péptido con 20 residuos, en configuraciones de hélice alfa y hebra beta, para su comparación. Los métodos computacionales usados fueron los campos de fuerza AMBER y MM+. Los valores calculados de energías totales de los complejos péptido+ C_{60} exhibieron una alta variabilidad dependiendo de en donde se posicionaba la molécula de C_{60} en la geometría del péptido. En MM+, sí el fullereno se colocaba cerca del amino terminal o carboxilo terminal, las energías totales se comportaron de manera muy inestables; sin embargo, la energías se estabilizaban dentro de 1-2 kcal/mol sí la posición del fullereno se posicionaba cerca de los residuos de valina centrales en la cadena peptídica. Los cálculos de energía total para AMBER fueron menos homogéneos, por lo que para estandarizar las condiciones de geometría, se colocó a la molécula de fullereno aproximadamente en el centro de la cadena peptídica. Los cambios conformacionales presentados por las cadenas peptídicas dependieron del tipo de péptido (hélice α o hebra β) y del campo de fuerza empleados. Los cálculos de energía de formación para MM+ en una conformación de hebra β mostraron que estas energías tienden a decrecer llegando hasta un mínimo en el complejo con el péptido con 7 valinas ($\Delta E = -11.71$ kcal/mol), para después crecer hasta un máximo en el complejo con 16 valinas ($\Delta E = -7.79$ kcal/mol), y finalmente decrecer hasta el complejo con 20 valinas, que fue el péptido más largo en este estudio. Los tres casos restantes (hélice α calculada con MM+, y tanto hebra β como hélice α calculadas con AMBER) exhibieron características parecidas, donde la energía de formación decrece y se estabiliza alrededor de 12-16 kcal/mol. La geometría de los péptidos de valina fue en general muy rígida y estable, y sólo en algunos casos se observaron cambios conformacionales, donde la cadena peptídica adquiría un mejor contacto con el fullereno.

1. Antecedentes

1.1 Introducción

Los estudios relacionados con la influencia del ambiente a nanoescala sobre la estructura de las proteínas y su función son de gran importancia en el desarrollo de nuevos bionanohíbridos y nanomateriales biocompatibles para aplicaciones biomédicas¹⁻¹⁶. De interés particular son los nanomateriales de carbono tales como los fullerenos y los nanotubos de carbono debido a sus prometedores usos en farmacología (como fármacos, acarreadores de genes, fotosintetizadores en terapia fotodinámica, agentes de contraste en imágenes de resonancia magnética), biosensores, diseño de implantes e ingeniería de tejidos entre muchos otros^{1,3,15,16}.

Para entender la estructura y propiedades tanto de los fullerenos como de los nanotubos, se discutirán brevemente las propiedades y estructuras del átomo de carbono. Un átomo de carbono cuenta con 6 electrones; dos de ellos llenan el orbital 1s y los cuatro restantes (electrones de valencia) se acomodan en los orbitales 2s y 2p. Estos orbitales se hibridan para la construcción de las estructuras del diamante, grafito, fullerenos o nanotubos (Figura 1).

En el diamante los cuatro electrones de valencia de cada carbono ocupan el orbital híbrido sp^3 y crea cuatro enlaces equivalentes σ para conectar otros 4 carbonos en las 4 direcciones tetraédricas. Estas tres dimensiones entrelazadas en la estructura hacen que el diamante sea el material más duro conocido. Debido a que los electrones en el diamante forman enlaces covalentes σ y no se deslocalizan en uniones π , el diamante es eléctricamente aislante. En el grafito tres electrones fuera del armazón de cada átomo de carbono ocupa un orbital molecular sp^2 para formar tres uniones σ en el plano y un orbital π fuera de este mismo plano, lo que provoca una red hexagonal. Este orbital π fuera del plano o electrón distribuido sobre el plano del grafito lo hace térmica y eléctricamente más conductivo. Debido a que se forman interacciones débiles de van

der Waals entre las hojas de grafito, estas se pueden mover fácilmente una sobre la otra, así el grafito se torna suave y puede comportarse como lubricante¹⁷.

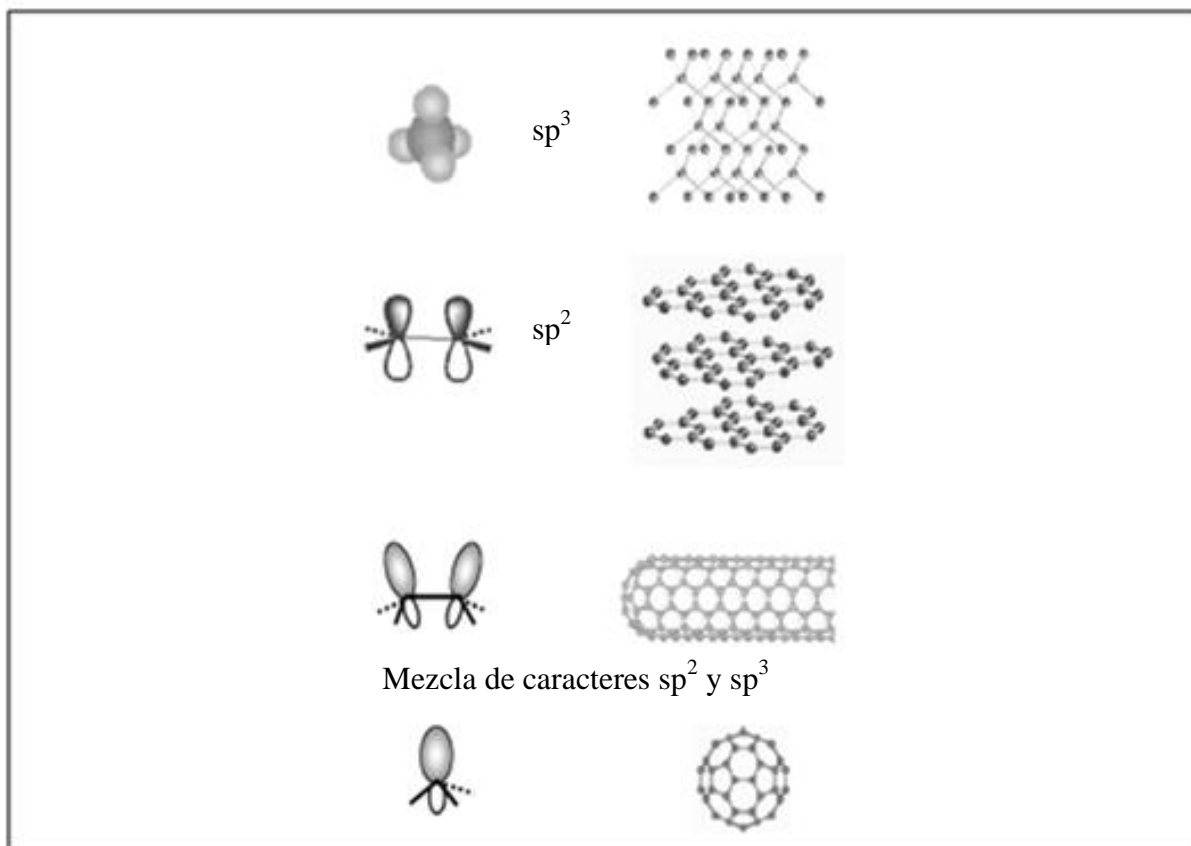


Figura 1. Estructuras de unión del diamante, grafito, nanotubo de carbono y fullereno. Tomada de Han, 2005.

Hasta el siglo XX, el grafito y el diamante eran las únicas formas alotrópicas conocidas del carbono, pero a comienzos de la década de 1970, dos nuevas ramas la astroquímica y la química de racimos o de agregados abrieron el camino a nuevos descubrimientos con la ayuda de la radioastronomía (las señales de radio generadas por las nubes interestelares pueden utilizarse para detectar moléculas). Mediante la astroquímica se identificó un inusual espectro de emisión de un gran cúmulo (cúmulo es un conjunto de átomos unidos, con tamaños intermedios entre una molécula y un sólido) de carbono que provenía de una estrella gigante roja rica en carbono¹⁸. Al

mismo tiempo el desarrollo de las técnicas de vaporización láser de cúmulos, sugirieron la posibilidad de crear agregados de carbono que presentaran el mismo espectro IR que se detectó de las estrellas gigantes rojas.

Esto motivó en 1985 a Kroto, Smalley y colaboradores a intentar simular las condiciones de las estrellas gigantes rojas en el laboratorio¹⁹. En el diseño experimental de Smalley, un potente láser evaporaba un fragmento de grafito que se convertía en una nube caliente de partículas que se enfriaban después con He gaseoso, lo que permitía que los átomos se condensaran en agregados. La mezcla fue analizada mediante un espectrómetro de masas, el cuál indicó un gran número de moléculas con una masa de 720. Los únicos elementos presentes eran He y C. Como el He es un gas inerte, la conclusión fue que las moléculas investigadas debían estar compuestas por 60 átomos de carbono, cada uno de los cuales tiene una masa de 12. El pico de 720 del gráfico producido por el espectrómetro de masa era muy intenso, lo que implicaba que esta molécula de 60 carbonos (C_{60}) era capaz de formarse y sobrevivir en el ambiente de alta energía del espectrómetro. Esto significaba que esa configuración de 60 átomos de C era de alguna manera extraordinariamente estable. Los investigadores propusieron una hipótesis según la cual los 60 átomos de C se organizaba en una estructura muy simétrica similar a una pelota de balompié, en donde cada C se localizaba en los vértices de un icosaedro truncado, a éste descubrimiento lo bautizaron como *buckminsterfullerene* en honor al arquitecto Buckminster Fuller, cuyas construcciones geodésicas tenían gran similitud con el agregado. Cabe anotar que por comodidad la palabra *buckminsterfullerene* se abrevia normalmente como *fullerene* (fulereno en español) o *buckyball*.

1.2 Estructura y propiedades del fulereno y nanotubos de carbono

1.2.1 Fulerenos

Los fulerenos son moléculas en forma de caja cerrada formadas solamente por pentágonos y hexágonos. La geometría y estabilidad de los fulerenos está gobernada

en muchos de los casos por la *regla de los pentágonos aislados* (IPR), según la cual dos pentágonos adyacentes provocan una mayor curvatura local en la superficie del fullereno produciendo un aumento de la tensión entre los carbonos. Es así como en los fulerenos más estables, los pentágonos siempre están rodeados de cinco hexágonos, manteniéndolos alejados unos de otros. El fullereno más pequeño que satisface la IPR es el C_{60} ²⁰.

En esta estructura cada carbono está unido a otros tres átomos de C, de igual forma que en las láminas de grafito cuenta con una hibridación sp^2 . Sin embargo, en los fulerenos en general, la hibridación no es completamente sp^2 , ya que la presencia de los pentágonos proporciona curvatura a la superficie de unión entre carbonos adyacentes, lo que conlleva a cierto carácter sp^3 del enlace (Figura 1).

Esta mezcla de hibridación entre sp^2 y sp^3 , provoca que los fulerenos sean moléculas extremadamente fuertes, capaces de resistir grandes presiones, cualidades importantes a la hora de preparar nuevos materiales. Al igual que el grafito, los fulerenos se pueden usar como lubricantes, y las propiedades eléctricas y ópticas de los fulerenos también los hacen buenos candidatos para transistores, memoria de bits, fotoconductores, diodos de túnel y sensores. Debido a estas propiedades, los fulerenos han sido estudiados para aplicaciones electrónicas, magnéticas, ópticas, químicas, biológicas y médicas^{1,16}.

Existe una limitación en los fulerenos, son muy pocos solubles en la mayoría de los disolventes y especialmente insolubles en agua; esto restringe muchas de sus aplicaciones a nivel biológico debido a que en dichas aplicaciones es necesario que el fullereno sea soluble (por ejemplo: se ha reportado la inhibición de la proteasa del VIH y la hepatitis C, por algunos derivados de fulerenos solubles en agua). Este problema de la solubilidad se puede resolver a través de la *funcionalización* o *derivatización química*, que consiste en adicionar grupos activos a las superficies de los fulerenos para modificar sus propiedades fisicoquímicas²¹.

1.2.2 Nanatubos

Un nanotubo de carbono (NTC) puede ser visto como un cilindro hueco formado por una hoja de grafito enrollada. Las uniones en nanotubos son esencialmente sp^2 , pero la curvatura como en el caso del fullereno causa confinamiento cuántico y la hibridación sp^2 , en la que se encuentran los tres enlaces σ tienden a salir del plano, induciendo que el orbital π se encuentra más deslocalizado fuera del tubo. Esto hace al nanotubo mecánicamente más fuerte, eléctrica y térmicamente más conductivo y de manera muy importante química y biológicamente más activo que el grafito. Aun más, los nanatubos permiten defectos topológicos tales como ser la incorporación de pentágonos y heptágonos a la red hexagonal para formar: tapas, curvatura, toroides y nanotubos en forma de hélice, como se puede inferir los electrones también estarán localizados en los pentágonos y heptágonos debido a una redistribución de electrones π ¹⁷.

Ya que el tamaño del material alcanzado por estas moléculas (fulerenos y NTC) está en el régimen de nanómetros (10^{-9} metros) han iniciado un progreso en la nanociencia y nanotecnología. Con respecto al tamaño de las biomoléculas como proteínas y ADN, se piensa que tanto fulerenos como NTC (conocidos también como nanocúmulos de carbono) interactúan directamente con estas biomoléculas de manera individual, en contraste con los macro y micro-aparatos convencionales, los cuales llegan a ensamblarse con una gran cantidad de muestra. Por lo que se pueden construir nanomateriales que muestren nuevas propiedades electrónicas, ópticas y mecánicas inherentes con la dimensión a nanoescala. Tales propiedades son más sensibles al ambiente y a las moléculas blanco en la muestra.

1.3 Toxicidad de fulerenos

La lista actual de los derivados de fulerenos cubre prácticamente todas las clases de los componentes químicos, demostrando tanto una alta actividad química como una gran versatilidad de reacciones químicas. Esta gran versatilidad ha provocado un

crecimiento considerable en la producción de los fulerenos para su uso comercial en varias aplicaciones, tales como: protección del daño oxidativo de la piel causado por radiación UV (A) y UV (B), productos cosméticos anti-envejecimiento, cremas para aclarar la piel (esto debido a sus propiedades antioxidantes), barredores de radicales libres, inhibición de la melanogénesis, e inhibición del crecimiento microbiano, lo que ha llevado a una preocupación generalizada acerca de su potencial para causar efectos adversos a la salud humana ²².

Existen algunos reportes que se han enfocado en entender el riesgo de los fulerenos para la salud humana (de los cuales se hablará a continuación); sin embargo, el rápido desarrollo de estos, su variada población con respecto al tamaño, forma y composición han superado a estos estudios. Aun así sirven como base para el entendimiento de los riesgos de los fulerenos en un futuro. Es necesario observar que estos estudios no tuvieron un enfoque sobre el tamaño o las nanodimensiones de los fulerenos, en lugar de esto, se enfocaron en la toxicidad y la biocompatibilidad de los fulerenos. Enfoque que es sumamente importante pero no da una perspectiva completa de los mecanismos de reacción o daños que puede ocasionar la molécula de C₆₀ a las proteínas, por lo que se piensa que es necesario realizar estudios relacionados al tamaño de los fulerenos en su ambiente a nanoescala.

Conocer el mecanismo de toxicidad producido por los fulerenos es sumamente importante, pero debido a las limitaciones experimentales* y poca caracterización fisicoquímica, no se ha logrado develar este mecanismo.

* Dentro de estas limitaciones experimentales se encuentran: la gran variedad de los fulerenos, diversidad de moléculas asociadas covalente y no covalentemente a los fulerenos y los diferentes procesos de síntesis utilizados para lograr solubilizarlos.

1.3.1 Absorción en el organismo

Un punto importante dentro de la toxicidad por los fulerenos es su absorción dentro del organismo. Por lo que se piensa que debido al número de aplicaciones posibles para los fulerenos, la absorción de estas moléculas puede ocurrir principalmente, por vía oral, dérmica o pulmonar. Aunque la toxicidad en el lugar de exposición es de particular interés (piel, pulmones y tracto gastrointestinal), también es importante conocer cómo es que se distribuyen a través del cuerpo, acumulándose dentro de los puntos distantes a su primera entrada, tales como el hígado o los riñones. Los estudios *in vivo* se han realizado mediante la administración de fulerenos vía: pulmonar, intravenosa, intraperitoneal o dérmica. Estos estudios son pocos en número y su disponibilidad relacionada a toxicidad son limitados, aun así es necesario recalcar estas investigaciones, ya que son importantes para identificar los posibles órganos blanco de la toxicidad de los fulerenos seguidas por la exposición por vía oral, respiratoria, dérmica, intraperitoneal o intravenosa.

Yamago y cols.²³ mostraron que derivados de fulerenos radiomarcados con ¹⁴C no mostraron ser efectivamente absorbidos por una administración oral para ratas y ratones, por un periodo de exposición de 160 h. La mayoría de estos fulerenos fueron excretados en heces dentro de un periodo de 48 h; sin embargo, algunas trazas fueron encontradas en orina lo que implica que son capaces de cruzar la pared intestinal. En un estudio realizado por Baker y cols.²⁴ se mostró que los fulerenos no fueron detectados en sangre después de haber sido inhalados por ratas, sugiriendo que ellos no se traslocan desde el sitio de exposición respiratoria, pero la deposición en los pulmones fue 50% más grande para los tamaños de nanopartícula (los fulerenos comúnmente se agregan en partículas más grandes, por lo que se considera a una nanopartícula con un tamaño de 10-50 nm) que para el grupo de micropartículas (el tamaño de las micropartículas ronda los 100 µm). Sin embargo, la vida media de los fulerenos fue similar a la de las micropartículas, sugiriendo un proceso de eliminación similar, tal como limpieza mucociliar y eliminación por macrófagos.

Por su parte Xia y cols.²⁵ mostraron con estudios *in vivo* e *in vitro* que los fulerenos C₆₀ pueden penetrar la piel hasta una profundidad del extracto corneo, pero que esta absorción está modulada por el tipo de solvente en el cual el fullereno está disperso, ya que el tolueno, ciclohexano y cloroformo pueden inducir un rápido transporte pero el agua mineral no logra tal efecto. Rouse y cols.²⁶ por su parte encontraron que al funcionalizar los fulerenos con derivados de fenilalanina estos podían penetrar a través de las capas epidermales vía difusión pasiva.

La posibilidad de absorción en la piel parece ser altamente relevante para el uso de fulerenos en cosméticos y en particular su explotación en cremas de la piel. Con respecto a esto último se han descrito diferentes tipos de fulerenos usados en cremas de la piel como los altamente purificados, los que están envueltos en polivinilpirrolidona, o fulerenos en escualeno vegetal²⁷. Además se ha mostrado que los fulerenos no entran a las capas más profundas de la piel, y no presentan irritación o sensibilización en la piel con o sin radiaciones UV a concentraciones más altas que las usadas en cosméticos²⁸.

De esta manera se tiene que la absorción/penetración de los fulerenos en la epidermis y no en la dermis, depende del fullereno y el tipo de solvente en el cual están suspendidos. Dependiendo de estos factores, la absorción puede estar cercana a cero, pero también puede ser considerada relevante con respecto al tiempo de contacto.

Chen y cols.²⁹ observaron que la administración vía intraperitoneal de los fulerenos tenía como consecuencia una acumulación en el riñón, vaso e hígado con evidencia de toxicidad en estos puntos de acumulación. Por vía intravenosa los fulerenos fueron rápidamente eliminados de la sangre, para acumularse principalmente en hígado, ya que la acumulación en tiroides, estómago, pulmones e intestino fue significativamente más baja³⁰. Gharbi y cols.³¹ por su parte observaron que después de una administración intraperitoneal, la acumulación de los fulerenos en el hígado se llevó a cabo en las células de Kupffer donde existía una alta actividad macrofágica.

In vitro se ha demostrado que los queratinocitos²⁶, las células epiteliales³² y las células del lente ocular³³ internalizan a los fulerenos, seguida de consecuencias oxidativas y muerte celular.

Con esta información se puede decir que probablemente hay una absorción limitada de los fulerenos después de que se ha administrado por las vías fisiológicas relevantes, y que los fulerenos tienden a permanecer en los sitios de deposición, específicamente dentro del pulmón, hígado e intestino, desde donde pueden ser eliminados a través de los macrófagos alveolares, mucocilios y/o orina o heces. Además de que es probable que la absorción de los fulerenos a través de la piel dependa del tipo de fullereno (por funcionalización), el solvente usado y las características de la piel. Es necesario recalcar que en estos momentos no se puede hacer una conclusión general del perfil de los fulerenos y sus derivados debido a la limitada cantidad de información disponible.

1.3.2 Daños en el organismo causados por fulerenos

La exposición a estos fulerenos que puede ocurrir a través de una vía oral, dérmica, inhalada o intravenosa, podría potencialmente iniciar una respuesta biológica adversa. Las propiedades fisicoquímicas más importantes de estos fulerenos como forma, tamaño de la partícula, estado de aglomeración, estructura cristalina, composición química, área superficial química, carga de la superficie y porosidad son responsables de la actividad biológica que ocurre en respuesta a la exposición de estas moléculas. Las interacciones exactas que ocurren entre fulerenos y el ambiente biológico, están poco entendidas, y las vías mecanísticas relativamente desconocidas. Sin embargo, se ha encontrado que existe un aumento significativo dosis-dependiente de citocinas pro-inflamatorias como IL-1, INF- α y IL-6 y un aumento de las citocinas TH1 tales como IL-12 y INF- γ en el lavado Bronco alveolar (BAL) un día después de la administración de 0.5, 1 y 2 mg/kg, sugiriendo una respuesta inflamatoria de C₆₀ en pulmón de ratón, además de alcanzar la máxima cantidad de IgE un día después del tratamiento. Por lo

que los autores concluyen que la permanencia de C₆₀ en el pulmón puede inducir daño del tejido³⁴.

Chen y cols.²⁹ mostraron que después de una inyección intraperitoneal en ratón de un derivado de fulereno C₆₀ conjugado a tiroglobulina (en adyuvante de Freud) indujo un comportamiento antigénico, estimulando la generación de anticuerpos isotipos IgG específicos de fulerenos. Estos hallazgos fueron expandidos por Erlanger y cols.³⁵ quienes demostraron que los anticuerpos anti-C₆₀ fueron capaces de interaccionar con nanotubos de carbono de una sola pared, por lo que estos hallazgos insinúan que los derivados de C₆₀ pueden actuar como agentes sensibilizantes y modular un respuesta inmune potencial.

En ensayos de mutagénesis se ha mostrado que los daños a ADN son dosis-dependientes ya que existe una actividad protectora efectiva a bajas dosis de fulerenos para efectos oxidantes, pero una respuesta pro-oxidativa a altas dosis de fulerenos. Estos resultados indican que el daño a ADN en algunos casos es influenciado por la dosis, tipo de fulereno y su preparación, tiempo de exposición, tipo de célula y modelo³⁶.

Una característica importante de los fulerenos que puede ser explotada dentro del tratamiento de enfermedades mediadas por agentes oxidantes es su capacidad para atrapar radicales libres. Sin embargo, se ha encontrado que los fulerenos son moléculas que pueden formar especies de oxígeno reactivo (ROS), por lo que son capaces de dañar potencialmente al ADN como resultado de los mecanismos basados en estrés oxidativo. Estos fulerenos no tienen un efecto directo sobre el ADN, sino a través de la formación de ROS, el cual produce el daño al ADN, proceso que se cree es dosis-dependiente²².

El rápido desarrollo comercial de los fulerenos provoca la necesidad de realizar evaluaciones toxicológicas y de seguridad para lograr asociar los riesgos biológicos asociados con la exposición de nanomateriales, aun así no se han logrado entender

profundamente las consecuencias toxicológicas de la interacción entre fulerenos y moléculas biológicas.

1.4 Interacción de proteínas y fulerenos

Aun en los términos químicos y bioquímicos más simples, la interacción de nanogrupos de carbono con biomoléculas, en específico con proteínas, es un proceso extremadamente complejo, debido a su alto peso molecular y a la complejidad de los componentes que interactúan. Estas últimas consideraciones son principalmente para proteínas (mientras que los fulerenos son estructuras relativamente rígidas y además pequeñas) las cuales exhiben una diversidad estructural enorme, funcionalidad y flexibilidad conformacional. Aun así, se ha observado que las uniones no covalentes formadas entre proteínas y nanocúmulos de carbono bajo condiciones fisiológicas, provocan dramáticos cambios conformacionales en la secuencia de aminoácidos de la proteína, aumentando hacia una pérdida parcial o total de las funciones bioquímicas de la proteína. Este efecto se ha aprovechado y dependiendo de las aplicaciones, puede ser positivo (inhibición de la proteasa de VIH^{37, 38} y agregación peptídica de la β -amiloidina que se asocia a la enfermedad de Alzheimer³⁹) o negativos (biosensores basados en enzimas, acarreador celular de proteínas). Por otra parte, se ha descubierto que los nanogrupos de carbono inducen un aumento de estabilidad de las enzimas aun encontrándose en un ambiente fuertemente desnaturizante, lo cual puede ser altamente beneficioso para el diseño de diagnósticos, sensores y vehículos de acarreamientos de fármacos¹⁴.

El mecanismo molecular relacionado con la influencia de la curvatura esférica del fullereno sobre la estructura de las proteínas y su funcionalidad aun no ha sido develado y es de crucial importancia para todos los aspectos de la bionano-ciencia y la bionano-tecnología. La principal restricción para develar este mecanismo de manera experimental se debe a que no se ha encontrado la forma de tener en solución tanto a la molécula de fullereno (el fullereno es altamente hidrofóbico y sólo soluble en solventes como tolueno) como al péptido/proteína en cuestión y así poder aplicar

técnicas experimentales que permitan mostrar la influencia del fullereno sobre una molécula proteica asociados uno a uno. Por lo que varios reportes de investigación han empleado cálculos teóricos de fullerenos interactuando con moléculas proteicas.

Dentro de estos cálculos teóricos o modelaje molecular de biomoléculas usualmente se requiere la evaluación de los potenciales de energía para conformaciones alternas de las proteínas (hélice α o hebra β). El enfoque que abarcaría de una forma más exacta estos potenciales sería el uso de la función de onda de la mecánica cuántica. Desafortunadamente, debido al gran tamaño de las macromoléculas biológicas, tales cálculos son extremadamente costosos en tiempo y sólo pueden aplicarse a un número limitado de conformaciones. Por tanto, la mayoría de los estudios de simulación emplean funciones de energía de la mecánica molecular (MM). Debido a la necesidad de utilizar estas funciones un gran número de veces durante la simulación, estas funciones son relativamente simples y utilizan muchos parámetros empíricos que pueden ser ajustables.

Estos cálculos teóricos se han centrado en simulaciones de dinámica molecular. Por ejemplo en la simulación de la proteasa de VIH complejada con un inhibidor basado en fullereno (difencil C_{60} alcohol) para revelar el mecanismo de unión y el sitio activo de la estructura³⁶. Otro ejemplo, son las simulaciones por *docking* molecular para proponer dos potentes análogos de fullerenos como fármacos anti-VIH, los cuales posteriormente fueron sujetos a estudios experimentales biológicos y los resultados mostraron que los nuevos compuestos descubiertos teóricamente poseían alta bioactividad³⁷. Este tipo de simulaciones también fueron utilizadas por Fu y colaboradores³⁹ para estudiar la interacción de los oligómeros de bajo peso molecular del péptido β -amiloide del Alzheimer con nanotubos de carbono de una sola pared de diferentes diámetros; estos investigadores encontraron que los nanotubos inducían una conformación de barril β , resultado que logró que los nanotubos de carbono se convirtieran en nuevos prospectos como agentes terapéuticos que retardan o previenen los procesos de fibrilación. Por otra parte Miranda Tomásio y Walsh⁴⁰ investigaron las interacciones entre nanotubos y péptidos usando tanto mecánica molecular MM+ como teoría de

estructura electrónica (incluyendo DFT); los resultados de la simulación predijeron las observaciones experimentales confirmando una relativa afinidad de unión.

Basiuk y Bassiouk⁴¹ analizaron teóricamente el comportamiento de homopéptidos simples (hasta deca péptidos, empezando con un aminoácido iniciador) derivados de L-glicina y L-alanina, en una hélice α y hebra β interactuando no covalentemente con el fullereno C_{60} . En este estudio se compararon dos técnicas computacionales: funcionales DFT (BLYP GGA y VWN LDA) y campos de fuerza (AMBER y MM+), obteniéndose resultados muy comparables entre el funcional DFT VWN y MM+. Este funcional DFT VWN produjo cálculos y valores mucho más consistentes para interacciones intermoleculares que en comparación con BLYP DFT por lo que se tomó a este funcional VWN DFT como referencia para comparar y en consecuencia validar los resultados obtenidos en los campos de fuerza (AMBER y MM+). En general, las conclusiones a las que se llega, es la existencia de una remarcada rigidez en los péptidos de hélice α y una considerable flexibilidad de la hebra β cuando se interacciona con las moléculas del fullereno. Es importante señalar que el grado en el cambio de conformación observado en la hebra β depende del aminoácido iniciador y de la longitud del péptido.

En este último trabajo se abordó el estudio teórico de las interacciones no covalentes entre proteínas y fulerenos de una manera más sistemática⁴¹: ya que se explicaron las interacciones entre estas moléculas mediante las propiedades que caracterizan estructuralmente a las proteínas, tales como las hélices α y las hojas β . En estos arreglos estructurales se dan diferentes formas de realizar puentes de hidrógeno intracatenarios y por lo tanto las estabildades son diferentes. Una hélice α contendrá una mayor cantidad de puentes de hidrógeno intramoleculares en comparación con la hebra β y en consecuencia la hélice α será termodinámicamente más estable y estructuralmente más rígida cuando esté interactuando con el fullereno, lo que se verificó en el estudio realizado por Basiuk y Bassiouk, tanto para los péptidos de glicina como de alanina. Donde se muestra una tendencia general de una asombrosa rigidez

de los péptidos con conformación de hélice α y una flexibilidad de la hebra β , cuando se interactúa con el fullereno.

De lo anterior se infiere que los fullerenos pueden ser tratados por simulaciones por computadora y el modelaje molecular. Por lo que durante los últimos años la importancia de la nanociencia y nanotecnología computacional basada en la simulación están apoyadas por las siguientes razones: el tiempo de cálculo se ha reducido y la cantidad de átomos que pueden entrar en tratamiento ha estado aumentando consistentemente para sistemas que se tratan por simulaciones por computadora y modelaje molecular de alta precisión. Además los cálculos realizados se han comprobado por los datos experimentales; por lo que, el modelaje molecular y las simulaciones por computadora se han convertido en predictivas, esto aunado al aumento en el poder del CPU disponible para simulaciones de rutina y análisis continuo, logra acercar más el cálculo teórico a los datos experimentales mediante las simulaciones basadas en caracterización y aplicación de diseño⁴².

1.5 Mecánica molecular

Los estudios teóricos anteriores alientan la idea de poder utilizar modelaje molecular en el estudio de las interacciones entre las formas principales de una proteína como son las hélices α y hebras β con los fullerenos. Además las comparaciones hechas por los grupos de Basiuk y Miranda Tomásio entre MM y DFT, sugieren que los resultados de MM son comparables y válidos para la interacción entre las estructuras de una proteína (hélices α y hebras β) y los nanocúmulos de carbono, por lo que apoyan fuertemente utilizar MM para la probable interpretación de interacciones entre estas moléculas.

Sumado a lo anterior, utilizar MM en estas interacciones de moléculas es de gran ayuda ya que permite calcular moléculas más grandes, en este caso, aumentar el número de residuos en el péptido (cálculo que en DFT se vuelven difíciles de realizar) obteniéndose una manera más viable de acercarse más a la realidad al obtener información acerca de estas interacciones con un número mayor de aminoácidos.

La mecánica molecular está basada en un modelo matemático que toma a una molécula como un conjunto de esferas (que corresponden a los átomos) unidas por un resorte (correspondiente a los enlaces). Dentro del marco de este modelo, la energía de la molécula cambia con respecto a su geometría porque los resortes se resisten a ser estirados o doblados más allá de su ángulo o longitud natural, además de que las esferas se resisten a ser empujadas para acercarse una a la otra. El modelo matemático es conceptualmente muy cercano al sentimiento intuitivo de las energías moleculares que se obtienen cuando se manipulan modelos moleculares de plástico o metal: el modelo resiste a distorsionarse (ya que podría llegar a romperse) desde una geometría natural que corresponde a las longitudes de enlace y ángulos impuestos por el fabricante. La MM no toma en cuenta a los electrones.

El principio detrás de la MM es expresar la energía de una molécula como una función de su resistencia hacia el estiramiento de enlace, el doblamiento de enlace y a la aglomeración atómica, para después usar esta ecuación para encontrar las longitudes de enlace, ángulos y ángulos diedros, correspondientes a la geometría de mínima energía o más precisamente, a los varios posibles potenciales de energía de superficie. En otras palabras, la MM usa conceptualmente el modelo mecánico de una molécula para encontrar su geometría de mínima energía (para moléculas flexibles, las geometrías de varios confórmeros). La forma de la expresión matemática para la energía y los parámetros en esta, constituyen un campo de fuerza y los métodos de mecánica molecular son algunas veces llamados métodos de campo de fuerza. El término surge porque el negativo de la primera derivada de la energía potencial de una partícula con respecto al desplazamiento a lo largo de algunas direcciones es la fuerza de la partícula; un campo de fuerza E (con coordenadas de átomos x , y , z) puede ser diferenciado para dar la fuerza de cada átomo.

Específicamente los principios de MM, como un método potencial para el estudio de variaciones de energía de un sistema molecular con respecto a su geometría, fue formulada en 1946 por Westheimer y Meyer⁴³ y Hill⁴⁴, pero las principales

contribuciones al desarrollo de MM han sido desarrolladas por los grupos de Schleyer⁴⁵,⁴⁶ y Allinger^{47, 48}. El grupo de Allinger ha sido el responsable desde 1960 del desarrollo de las series MM, comenzando con MM1 y continuando con MM2, MM3 y MM4. Los programas de MM como Sybyl y UFF manejan moléculas que involucran a la mayoría de los átomos de la tabla periódica (aunque con alguna pérdida de exactitud); sin embargo, MM es el principal método usado para calcular geometrías y energías de moléculas biológicas como proteínas y ácidos nucleicos.

1.5.1. Principios básicos de la mecánica molecular.

La energía potencial de una molécula puede ser escrita como:

$$E = \sum_{\text{Enlace}} E_{\text{Estiramiento}} + \sum_{\text{Angulo}} E_{\text{Doblamiento}} + \sum_{\text{Diedros}} E_{\text{Torsión}} + \sum_{\text{Pares}} E_{\text{No enlazados}}$$

donde, $E_{\text{Estiramiento}}$, $E_{\text{Doblamiento}}$, etc. (ver Figura 3 y 4 respectivamente), son contribuciones de energía dadas por el estiramiento del enlace, flexión de la molécula (doblamiento del ángulo), el movimiento rotacional (rotación) de los enlaces sencillos y la interacción entre átomos o grupos que no están enlazados (no directamente unidos entre ellos). Las sumas son las de todos los enlaces, todos los ángulos definidos por 3 átomos A-B-C, todos los ángulos diedros definidos por los átomos A-B-C-D y todos los pares de interacciones significativas no enlazadas. La forma matemática de estos términos y los parámetros en ellos constituyen un campo de fuerza.

Podemos darnos una idea más específica considerando cada uno de estos cuatro términos:

(1) Término de estiramiento de enlace

El incremento en la energía de un resorte (hay que recordar que estamos modelando la molécula como una colección de esferas unidas por resortes) cuando éste es estirado (Figura 2) es aproximadamente proporcional al cuadrado de la extensión:

$$\Delta E_{\text{estiramiento}} = K_{\text{estiramiento}} (l - l_{\text{eq}})^2$$

donde $K_{\text{estiramiento}}$, es la constante de proporcionalidad y entre más grande sea, existirá una mayor resistencia en estirarlo; l , es la longitud de el enlace cuando se estira; y l_{eq} , es longitud de equilibrio del enlace, es la longitud “natural”.

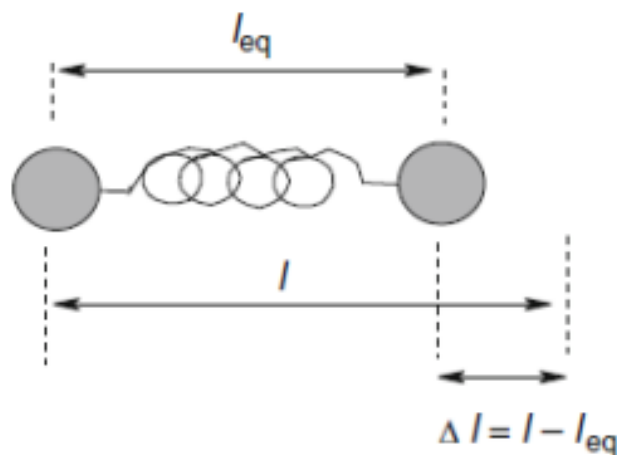


Figura 2. Cambios en las longitudes de enlace Δl dan como resultado cambios en energía de la molécula. Tales cambios son manejados por el término $E_{\text{Estiramiento}}$, en la mecánica molecular del campo de fuerza.

(2) Término de doblamiento de ángulo.

El incremento en energía de un sistema esfera-resorte-esfera-resorte-esfera, corresponde con la unidad triatómica A-B-C (el incremento en “energía de ángulo”) es aproximadamente proporcional al cuadrado del incremento en el ángulo (Figura 3):

$$E_{\text{doblamiento}} = K_{\text{doblamiento}} (a - a_{\text{eq}})^2$$

$K_{\text{doblamiento}}$, es proporcionalmente constante, a es el valor de el ángulo cuando se distorsiona; y a_{eq} es el valor de equilibrio del ángulo, este es el valor “natural”.

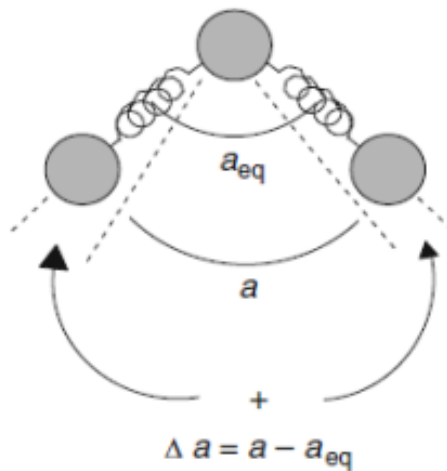


Figura 3. Los cambios en los ángulos dan como resultado cambios en energía de la molécula. Tales cambios son manejados por el término $E_{\text{Doblamiento}}$ en la mecánica molecular del campo de fuerza.

(3) Término torsional.

Si se considera a cuatro átomos secuencialmente unidos: A-B-C-D (Figura 4). El ángulo diedro o ángulo de torsión del sistema es el enlace A-B y el ángulo entre el enlace C-D, visto a lo largo del enlace B-C (Figura 4). Convencionalmente este ángulo es

considerado positivo si crece en dirección de las manecillas de reloj (empezando con A-B cubriendo o eclipsando C-D) desde el enlace trasero (C-D) con respecto al enlace delantero (A-B)

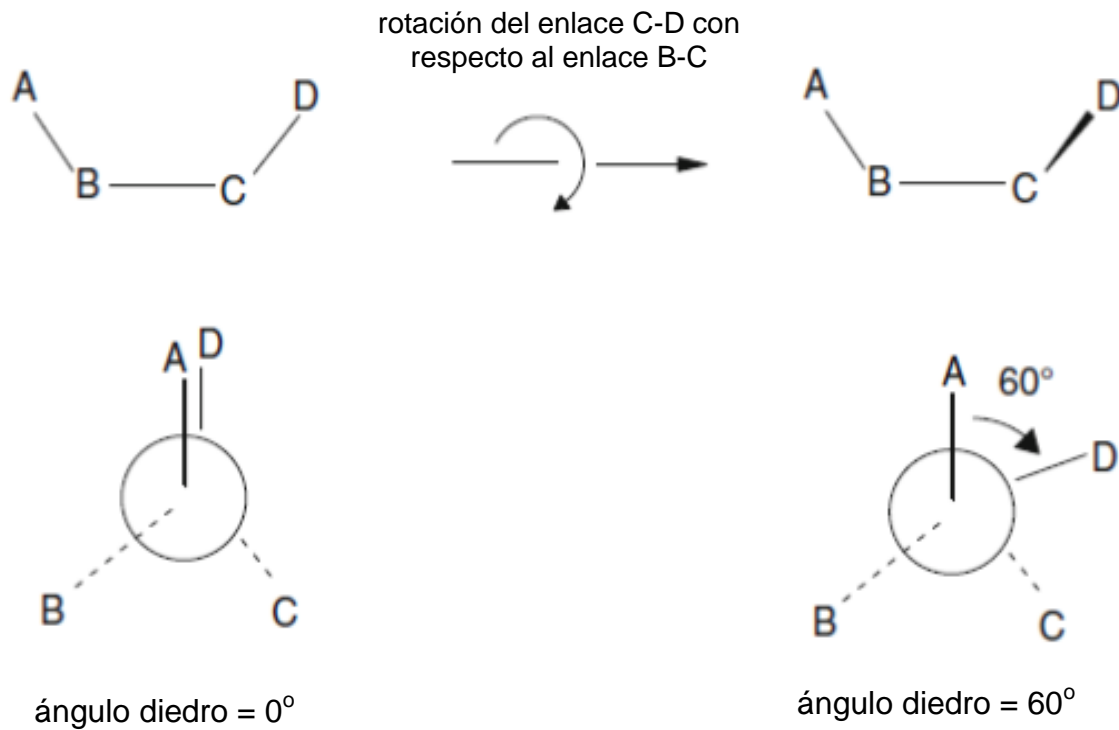


Figura 4. Ángulos diedros (ángulos torsionales) que afectan las geometrías y energías moleculares.

Así en la Figura 4 se muestra un ángulo diedro A-B-C-D de 60° (ángulo que también puede considerarse que empieza a -300° en dirección contraria a las manecillas de reloj), pero como la geometría se repite por si sola cada 360° , la energía variará con respecto al ángulo diedro en patrones de seno y coseno, como se muestra en la Figura 5 para el etano.

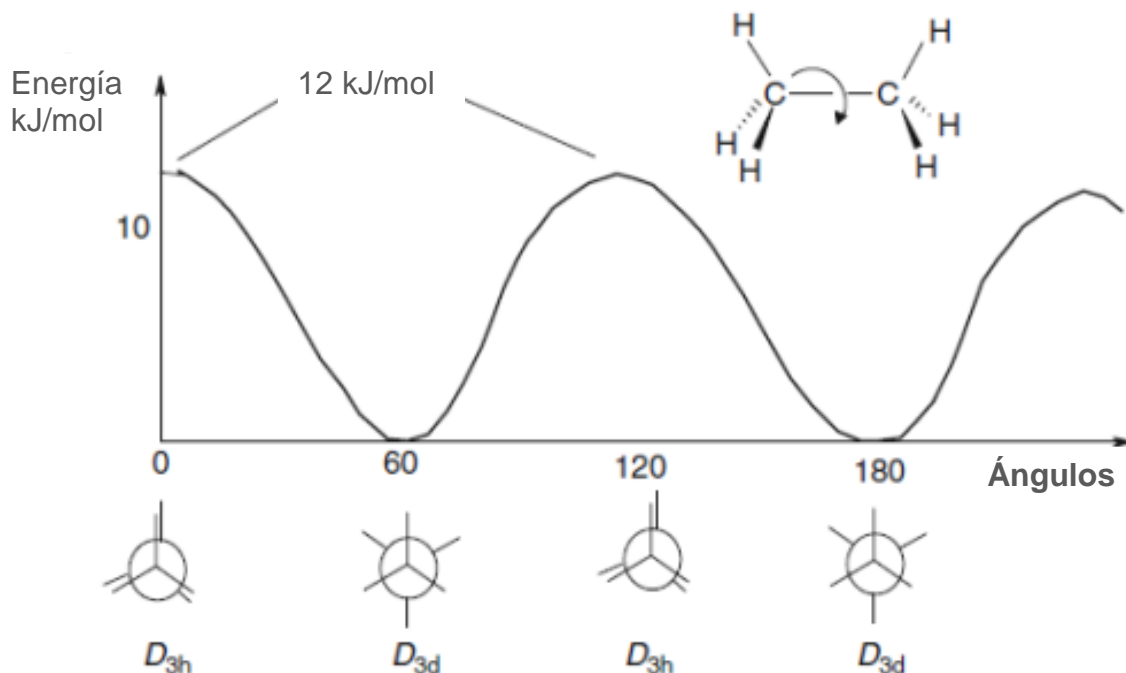


Figura 5. Variación de energía del etano con respecto a los ángulos diedros.

(4) Término de interacciones no enlazadas.

Este término representa el cambio en energía potencial con respecto a la distancia entre los átomos A y B que no están directamente unidos (A-B) y que además no están directamente unidos a un átomo en común (como en A-X-B); a estos átomos separados por al menos dos átomos (A-X-Y-B) o incluso en diferentes moléculas, se le conoce como no enlazados (respecto unos con otros). Hay que notar que los enlaces A-B y X-B ya fueron tomados en cuenta en el término $E_{\text{Estiramiento}}$ y $E_{\text{Doblamiento}}$ respectivamente, y como el término de no enlace contiene a su vez el caso A-X-Y-B cuyo término se sobrepone al término de $E_{\text{Torsión}}$, podríamos pensar en $E_{\text{Torsión}}$ como representante del término $E_{\text{No enlazados}}$; sin embargo, para ciertos átomos asociados a X y Y (aquellos que se encuentran en diferentes moléculas) existen interacciones de átomos no enlazados.

Estas interacciones siguen una curva de energía potencial para dos átomos no polares no enlazados, cuya curva tiene la forma general que se muestra en la Figura 6.

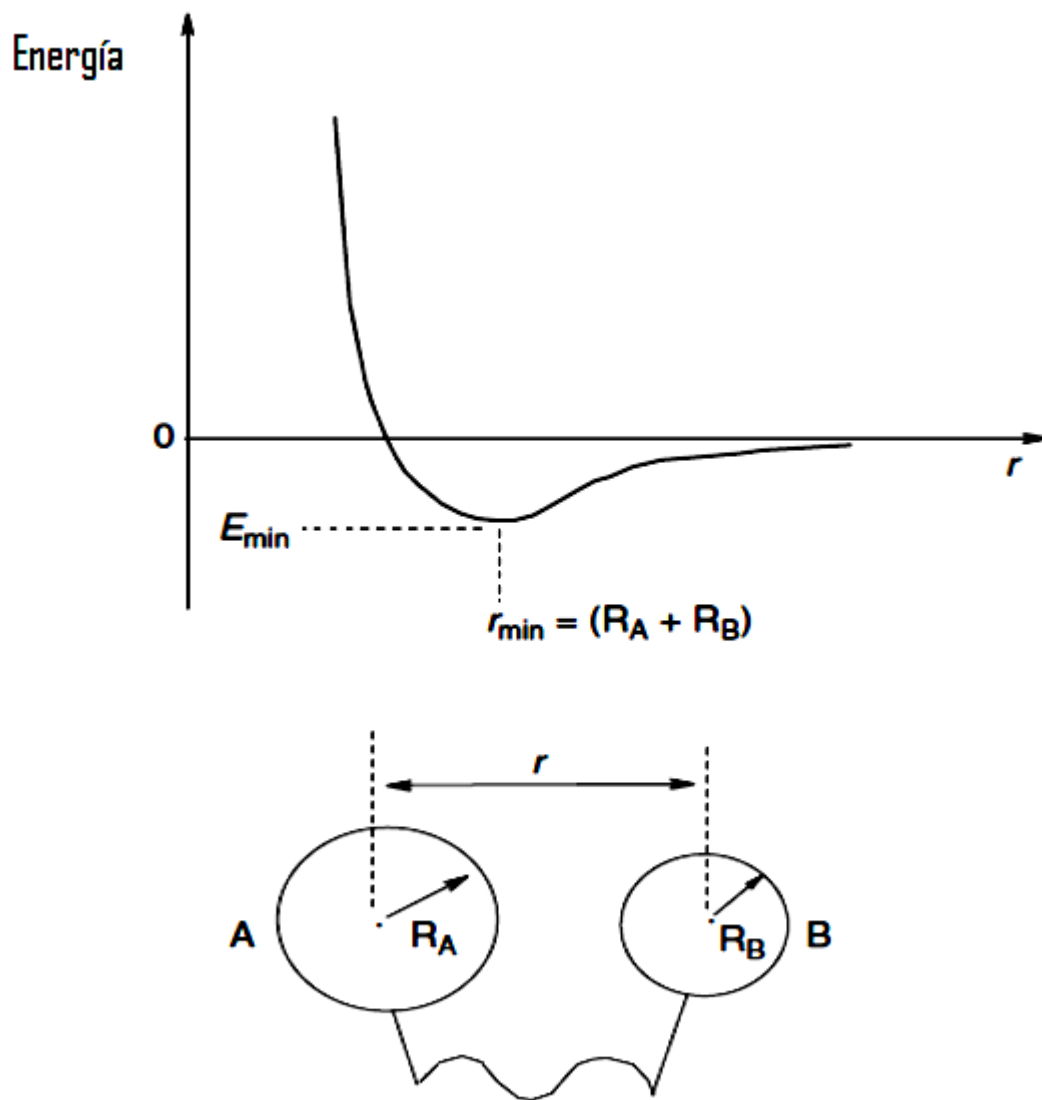


Fig. 6. Variación de la energía de una molécula con respecto a la distancia de separación de átomos o grupos de átomos no enlazados.

Un camino fácil para poder explicar este tipo de interacciones es mediante el potencial Lennard-Jones:

$$E_{\text{no enlazados}} = K_{\text{ne}} \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right]$$

en este potencial r = la distancia entre los centros de los átomos o grupos no enlazados, σ y la K_{ne} serán explicados a continuación.

Esta función reproduce el pequeño pozo en la curva donde los átomos o grupos de átomos se acercan uno al otro (Figura 6), hasta que el aumento en la energía potencial logra acercarlos mutuamente tan cerca como su radio de van der Waals. Si obtenemos que $dE/dr = 0$, encontramos que para la energía mínima en la curva correspondiente al valor de r es $r_{\text{min}} = 2^{1/6}\sigma$, por lo que:

$$\sigma = 2^{-1/6} r_{\text{min}}$$

Si asumimos que este mínimo corresponde con el contacto de van der Waals de los grupos no enlazados, entonces $r_{\text{min}} = (R_A + R_B)$, es la suma del radio de van der Waals del grupo A y B. Así que,

$$2^{1/6}\sigma = (R_A + R_B)$$

por lo tanto

$$\sigma = 2^{1/6}(R_A + R_B) = 0.89 (R_A + R_B).$$

De esta forma σ puede ser calculada desde r_{min} o estimada desde el radio de van der Waals.

Ahora bien si $E = 0$, encontraremos que para este punto sobre la curva $r = \sigma$, por lo que

$$\sigma = r (E = 0),$$

Si escribimos $r = r_{\min} = 2^{1/6}\sigma$, podemos encontrar que

$$E (r = r_{\min}) = (-1/4) K_{ne}, \text{ es decir:}$$

$$K_{ne} = -4E (r = r_{\min}).$$

Por lo que K_{ne} puede ser calculada en el pozo de mínimo de energía.

Con este tipo de ecuaciones se puede manejar un campo de fuerza particular para MM, pero hay muchas otras alternativas, por lo que podemos representar la variación de energía con respecto a la longitud, la variación de interacción entre átomos o grupos de átomos no enlazados, etcétera, por expresiones más complicadas que la presentada para variación de energía debida al estiramiento, doblamiento o atracción/repulsión de átomos no enlazados. Tales cambios tendrán como consecuencia cambios en el campo de fuerza, y por lo tanto estaremos hablando de otra versión de campo de fuerza.

Al proceso de encontrar los valores de las constantes de $K_{\text{estiramiento}}$, l_{eq} , $K_{\text{doblamiento}}$, etcétera, se le conoce como parametrización del campo de fuerza. El grupo de moléculas usadas para la parametrización de un buen campo de fuerza, puede llegar a más de 100, a este grupo de moléculas se le conoce como grupo de entrenamiento (*training set*). Como ejemplo de esta parametrización se puede tomar a la parametrización del término de estiramiento de enlace, este término del campo de fuerza se puede parametrizar con referencia a un experimento (parametrización conocida como empírica), por el uso de cálculos *ab-initio* de alto nivel, cálculos de funcionales de densidad o por la combinación de ambos. Experimentalmente, la $K_{\text{estiramiento}}$ puede ser obtenida por el espectro infrarrojo (IR), ya que la frecuencia de

estiramiento de un enlace depende de la constante de fuerza y las masas de los átomos involucradas, l_{eq} puede ser derivado por la difracción de rayos X, difracción electrónica o espectroscopía de microondas⁴⁹.

1.5.2. Campos de fuerza MM+ y AMBER

Dentro de estas versiones de campo de fuerza podemos encontrar el campo de fuerza MM+, el cual está basado en el campo de fuerza MM2 de Allinger y que ha mostrado una gran robustez⁵⁰. El campo de fuerza MM2 desde su lanzamiento ha sido el más usado y aunque los nuevos campos de fuerza pueden trabajar mejor, MM2 siempre permanecerá como una referencia. Este campo de fuerza tiene el grupo de parámetros más diversos por lo que se ha usado en diferentes áreas de investigación.

MM+ es un campo de fuerza que ha sido implementado en el paquete de modelaje molecular de HyperChem, debido a esto y al éxito comercial de HyperChem, este campo de fuerza ha sido muy utilizado durante los últimos años. Como se ha comentado anteriormente MM+ está basado en la forma funcional de MM2, y por lo tanto usa el grupos de parámetros de MM2, por lo que a continuación se discute el campo de fuerza de MM2. El primer término del campo de fuerza que corresponde al estiramiento del enlace tiene como función para calcular el estiramiento a un potencial cúbico, función que es asimétrica y repulsiva a distancias largas. Con respecto al término de doblamiento de ángulo, la función es conocida como de sexto orden. El tercer término que corresponde a la función que calcula la energía debida a los ángulos diedros, se calcula mediante la suma de las funciones de los mínimos correspondientes a la torsión. A continuación viene el término correspondiente a las interacciones no enlazadas, en este término correspondiente a las interacciones no enlazadas, cuando los átomos se encuentran muy cercanos ($r < 1/3 R_{VDW}$), el potencial falla por ir a través de un máximo y por lo tanto fusionará los átomos cercanos. Por lo que las interacciones electrostáticas en MM2 se calculan por el potencial dipolo-dipolo y por lo tanto los cálculos son llevados a cabo por términos de interacción dipolo-dipolo en lugar

de potenciales coulómicos. Aquí μ_i y μ_j son enlaces centrados por momentos dipolo y χ es el ángulo entre estos momentos dipolares; α_i y α_j :

$$E = K_s(r-r_0)^2\{1-2(r-r_0)\} + K_a (\phi - \phi_0)^2\{1 - 7 \times 10^{-8} (\phi - \phi_0)^4\} + [K_{t1}/2 (1 + \cos \theta) + K_{t2}/2 (1 - \cos 2 \theta) + K_{t3}/2 (1 + \cos 3\theta)] + K_{LJ} \{2.9 \times 10^5 \exp(-12.5 r/R_{VDW}) - 2.25 (R_{VDW}/r)^6\} + (\mu_i \mu_j)/(\epsilon_0 r_{ij}^3) \{ \cos \chi - 3 \cos \alpha_i \cos \alpha_j \} \dots \dots \dots \text{Ecuación 1.}$$

La realización de MM2 y el dominio público de este campo de fuerza ha causado el desarrollo de una gran variedad de campos de fuerza a partir de MM2 (como MM+), variantes que pueden manejar desde metales complejados y/o dinámica molecular entre otros.

Por otra parte hay campos de fuerza que han sido desarrollados para calcular geometrías y energías de moléculas grandes como biopolímeros. Uno de los más usados ha sido el campo de fuerza AMBER (por sus siglas en inglés: Assisted Model Building with Energy Refinement). Este campo de fuerza es quizá el más usado para modelar polímeros biológicos como: proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos. Un aspecto importante del modelaje de biopolímeros es el diseño farmacológico de moléculas activas que pueden ajustarse al sitio activo de biomoléculas y servir como fármacos. Por ejemplo, una molécula puede ser diseñada para unirse al sitio activo de una enzima y bloquear la reacción indeseable de esta enzima. Como segundo paso en este largo camino hacia el descubrimiento de un nuevo fármaco, se puede comparar la energía de unión de varias moléculas que sean estérica y electrostáticamente complementarios al sitio activo, y la molécula más acorde a los propósitos de la investigación puede ser sintetizada. El diseño de nuevos fármacos asistido por computadora y el estudio de la relación entre estructura y actividad es una de las áreas más activas de las investigaciones *in silico*.

La combinación lineal de términos independientes para el campo de fuerza AMBER se muestra y discute a continuación (la presentación de este campo de fuerza seguirá el mismo orden con respecto a cómo se presentó el campo de fuerza para MM2).

$$E_{total} = K_E (r - r_0)^2 + K_A (\theta - \theta_{eq})^2 + V_n / 2 \{1 + \cos(n\phi - \Delta)\} + \{ (A_{ij} / r^{12}) - (B_{ij} / r^6) + q_i q_j / \epsilon r_{ij} \} \dots \dots \dots \text{Ecuación 2.}$$

Los campos de fuerza tales como AMBER que están desarrollados para poder manejar biopolímeros como las proteínas son generalmente más simples que los usados para el cálculo de moléculas más pequeñas como MM2 (cálculos que por manejar estas moléculas son más exactos). El primer término, correspondiente al estiramiento de enlace en AMBER, se calcula mediante el potencial harmónico (potencial que es más simple que el cúbico), este potencial sigue la función más simple y simétrica. El doblamiento de ángulo también sigue una función harmónica. El tercer término que calcula el término de torsión o ángulos diedros, en AMBER se calcula mediante el ángulo de torsión (θ) y el ángulo de fase o de compensación (Δ). El cuarto término del campo de fuerza de AMBER correspondiente a las interacciones no enlazadas: se calcula mediante las distancias de átomos no enlazados i y j , sus constantes de parametrización y la suma de su radio de van Der Waals (R_{VDW}). Para este último término al contrario que MM+, el cálculo de las interacciones electrostáticas se calcula por el potencial coulombico⁵¹.

1.6 Justificación del trabajo

El mecanismo de interacción péptido/proteína con los nanocúmulos de carbono aun no ha sido elucidado mediante técnicas experimentales, por lo que se tiene la posibilidad y la necesidad del uso de técnicas computacionales y de manera específica del uso de sistemas de modelaje molecular.

En las simulaciones por computadora realizadas por Basiuk y Bassioux se ha mostrado que existe una remarcada rigidez en los homopéptidos de Glicina y Alanina con una configuración de hélice α y una considerable flexibilidad para homopéptidos con una configuración de hebra β cuando interaccionan con las moléculas del fullereno. En estos trabajos se señaló que el grado en el cambio de conformación observado en la hebra β dependió del aminoácido iniciador y de la longitud del péptido.

Con respecto a lo anterior se piensa que el siguiente paso hacia una descripción más completa de la interacción entre C_{60} y las regulares subestructuras hélice α y hoja β de las proteínas, es observar mediante simulaciones por computadora cómo afecta una molécula de fullereno C_{60} a simples homopéptidos de Valina con diferentes tamaños en configuraciones de hélice α y hebra β . Los homopéptidos de Valina se escogieron para lograr la simplificación del modelo, teniendo en cuenta que ya se habían reportado los homopéptidos de Glicina y Alanina, el siguiente átomo con naturaleza hidrofóbica y con la menor cantidad de átomos asociados a la cadena lateral es Valina.

1.7. Hipótesis

En el sistema modelo simplificado que se escogió para realizar estas simulaciones, que incluye el fullereno C_{60} y los homopéptidos de Valina, se espera que los cambios conformacionales más pronunciados se observen en la hebra β comparándola con la conformación de hélice α .

Es probable que el efecto de C_{60} en relación al aumento de la cadena peptídica sólo se observé dentro de un tamaño de péptido específico; esto es, dentro de un tamaño de cadena peptídica donde puede interaccionar plenamente el fullereno con las cadenas laterales de la secuencia de aminoácidos. Teniendo como antecedente el trabajo de Bassiuk y Bassiuk⁴¹ es probable que esta longitud de cadena peptídica se encuentre dentro los 10 aminoácidos enlazados covalentemente.

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo general

Estudiar como el aumento de la cadena peptídica en simples homopéptidos (hasta un péptido de 20 aminoácidos, empezando con un aminoácido iniciador) derivados de L-valina en una hélice α y hebra β interaccionando no covalentemente con el fullereno C_{60} influencia la geometría y la energía de formación del complejo péptido + C_{60} .

1.8.2 Objetivos específicos

- (1) Construir los modelos de los péptidos con configuración de hélice α y hebra β
- (2) Utilizando MM+ y AMBER lograr la optimización de geometría tanto de los péptidos aislados como en contacto con el fullereno C_{60} .
- (3) Averiguar cómo influye el sitio de contacto en los péptidos con configuración de hélice α y hebra β al interaccionar con el fullereno C_{60} .
- (4) Caracterizar el cambio de energía de formación ΔE en función de n_{Val} .

2. Métodos computacionales

Los cálculos de mecánica molecular se llevaron a cabo usando los campos de fuerza MM+ y AMBER incorporados en HyperChem versión 7.0 (Hypercube, Inc.)⁵² con un gradiente Polak-Ribiere. Este algoritmo es un buen optimizador para propósitos generales, realizando una serie de búsquedas o ciclos en direcciones conjugadas de gradiente. Un valor cuadrático medio (RMS por sus siglas en inglés) de 0.005 kcal/(Å mol), que es una medida del tamaño de distribución y se usa para dar un tamaño del gradiente durante la minimización y así determinar el final del cálculo, cuando el gradiente RMS es menor a 0.005 kcal/mol el cálculo se detiene. Por lo tanto todas las optimizaciones realizadas se detenían en este punto. Otras indicaciones adicionales fueron: para el campo de fuerza MM+, el cálculo de las interacciones electrostáticas no enlazadas se calculaban usando interacciones dipolo, sin *cutoffs*, que es una opción que determina los límites de la distancia para el cálculo de las interacciones no enlazadas; para AMBER, una constante dieléctrica de permitividad de 1, este valor es una aproximación común para cálculos donde no se adicionan moléculas de agua y que por lo tanto las interacciones coulómbicas se dan como $1/r^2$ en lugar de $1/r$ para simular el efecto del solvente, factores de escala de 1-4 átomos con un valor de 0.5, esta opción determina las interacciones electrostáticas y de van der Waals para átomos que están separados por tres enlaces.

El primer paso para la obtención de resultados consistió en la optimización de la geometría de las moléculas peptídicas con las características y campos de fuerza antes mencionados, tanto en conformación de hélice α como de hebra β . Para realizar esta optimización se construyeron diferentes moléculas peptídicas con diferentes cantidades de aminoácidos, empezando con un dipéptido de valina, seguido de un tripéptido, y así sucesivamente hasta la construcción de un péptido con 20 aminoácidos, este mismo procedimiento se siguió tanto para la conformación de hebra β como de hélice α . A partir de esta construcción se continuó con la optimización de estas moléculas; es decir, se realizó una optimización del péptido con 2 aminoácidos de valina en

conformación de hebra β , para después seguir con la optimización del tripéptido, y así sucesivamente hasta concluir con el péptido con 20 aminoácidos. Este mismo proceso se siguió para la conformación de hélice α , obteniéndose cuatro series (2 series para cada campo de fuerza MM+ y AMBER) que contenían a las moléculas peptídicas optimizadas con dos tipos de conformación peptídica que crecían al ritmo de un aminoácido por cada cálculo.

Estas primeras optimizaciones de geometría se utilizaron para asociarles una molécula de fullereno y así obtener los cálculos de energías totales resultantes de la interacción entre los péptidos construidos y la molécula de fullereno. Para la obtención de estas energías totales se realizaron optimizaciones de geometría para cada uno de estos complejos construidos. Los complejos se construyeron colocando la molécula de C_{60} entre dos cadenas laterales de los péptidos optimizados, debido al tamaño del fullereno, éste se puede acomodar entre dos cadenas laterales. De esta manera los cálculos para cada complejo construido tenían como consecuencia n-1 cálculos (donde n indica la cantidad de aminoácidos que conforman el péptido). Aquí el complejo construido con el péptido más largo de 20 aminoácidos tenía como consecuencia 19 cálculos, uno para cada posición de la molécula de fullereno que se encontrará entre dos cadenas laterales (hay que observar que para péptidos con 2 aminoácidos sólo se realizaba un solo cálculo). Estas optimizaciones se realizaron tanto para la configuración de hélice α como para la configuración de hebra β .

Para dar una mejor idea sobre los cambios conformacionales de las moléculas peptídicas al interaccionar con la molécula de C_{60} , se realizaron alineamientos moleculares entre los péptidos optimizados sin interacción con C_{60} y estos mismos péptidos interaccionando con C_{60} . Estos alineamientos se realizaron mediante el programa PyMOL⁵³, que es un visualizador molecular y produce imágenes tanto para moléculas pequeñas como para macromoléculas.

Los cálculos resultantes de las interacciones totales presentaron alta variabilidad en los extremos de los péptidos donde se asociaba la molécula de fullereno. Por el contrario la

asociación de una molécula de C_{60} a la parte central de estos péptidos no presentó variabilidad en comparación con las posiciones de C_{60} en los extremos del péptido. Debido a que no existía una alta variabilidad para estos complejos se les escogió como moléculas representativas de las energías de formación. También es bueno señalar que el trabajo de Bassiuk y Bassiuk⁴¹ en los cálculos correspondientes a Gly y Ala, siempre se colocaba el fullereno aproximadamente en el centro de la cadena peptídica, esto con el objetivo de tener las mismas condiciones de geometría inicial para todos los cálculos.

Hay que subrayar que estas energías de formación calculadas son una medida de estabilidad del sistema. A valores más negativos la estabilidad aumenta.

Las energías de formación $\Delta E_{\text{péptido} + C_{60}}$ (o ΔE por simplicidad) para los complejos construidos entre péptido asociado a una molécula de C_{60} se calcularon con la siguiente fórmula:

$$\Delta E_{\text{péptido} + C_{60}} = E_{\text{péptido} + C_{60}} - (E_{\text{péptido}} + E_{C_{60}})$$

donde $E_{\text{péptido} + C_{60}}$, se refiere a la energía del sistema formado por la molécula de fullereno y el péptido en cuestión; $E_{\text{péptido}}$, a la energía del péptido; y $E_{C_{60}}$, a la del fullereno.

3. Resultados y discusión

Con respecto a los campos de fuerza utilizados AMBER y MM+, se tiene que hacer las siguientes observaciones: AMBER fue diseñado específicamente para cálculos de proteínas y ácidos nucleicos, y por su parte MM+ es un campo universal parametrizado para todos los elementos químicos. Por lo que ninguno de estos campos de fuerza fue diseñado para sistemas de nanocarbono como es el fullereno. Sin embargo, MM+ es aplicado para química orgánica más que otros campos de fuerza como AMBER, los cuales se enfocan en proteínas y ácidos nucleicos.

El protocolo computacional para MM+ está diseñado para encontrar parámetros adecuados para el campo de fuerza; es decir, HyperChem substituye valores por default cuando MM+ falla en encontrar un parámetro apropiado del campo de fuerza. Consecuentemente esperamos observar ciertas diferencias entre los resultados de cálculo entre AMBER y MM+.

Un factor importante que complicó los cálculos presentes, comparando con los previos obtenidos por los péptidos de Gly y Ala⁴¹ es una alta movilidad conformacional del residuo isopropilo en la cadena lateral de Val. Esto crea un gran número de mínimos locales sobre la superficie de energía potencial para un complejo de péptido + C₆₀ y hace que su búsqueda consuma mucho más tiempo, comparado con el caso de Gly y Ala (sin mencionar que se duplicó la longitud máxima de los péptidos en estudio). Además, los mínimos locales pueden estar muy cerca uno de otro, lo cual causa notables variaciones en los resultados de los cálculos (geometrías y energías de los complejos) dependiendo de dónde exactamente la molécula de C₆₀ es posicionada en la geometría de entrada. Considerando este último factor uno debería notar que en los cálculos de Gly y Ala, siempre se colocaba el fullereno aproximadamente en el centro de la cadena peptídica para tener las mismas condiciones de geometría inicial. El presente trabajo se adhirió a la misma metodología; sin embargo, se estudió en detalle el efecto de la posición del C₆₀ en contra de toda la cadena peptídica sobre la energía calculada y la geometría de los complejos de péptido+C₆₀.

3.1. Resultados de cálculos por MM+

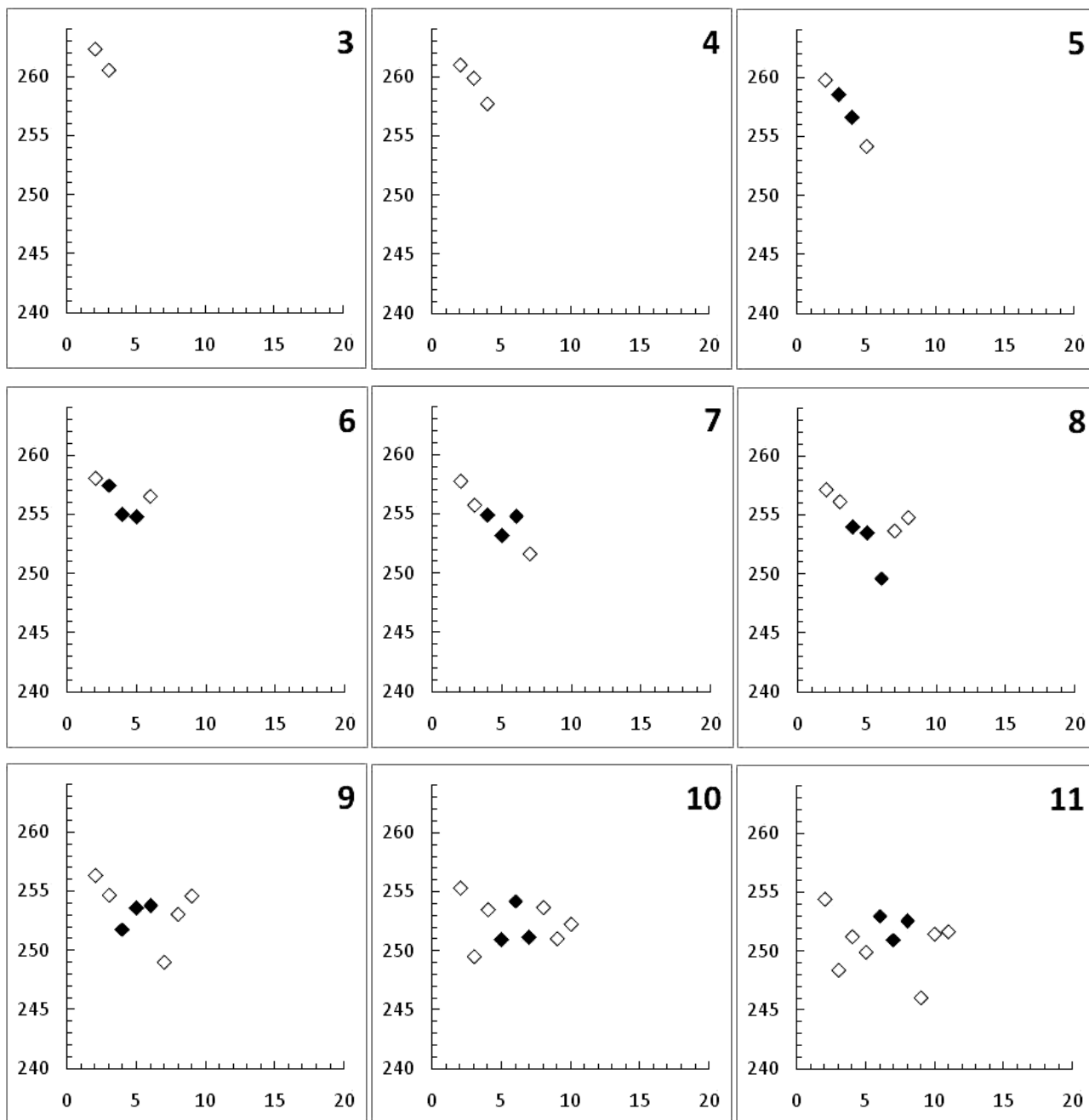
3.1.1. Hebra β

Los resultados que se presentan en la Figura 7 muestran las gráficas obtenidas de las energías totales de los complejos no covalentes entre los péptidos de valina en una conformación β y la molécula de fullereno obtenidas mediante el campo de fuerza MM+. En estas gráficas (y en las demás correspondientes a energía total) el eje x corresponde a la posición del fullereno con respecto al péptido y el eje y muestra las energías totales de los complejos entre fullerenos y péptidos en una conformación de hebra β . Estos péptidos fueron construidos con una conformación de hebra β desde 3 aminoácidos unidos covalentemente formando un tripéptido hasta un péptido Val₁₁. Las posiciones que toma el fullereno con respecto al péptido de valina van desde el aminoácido en la posición 2 del péptido comenzando a partir del amino terminal hasta la última posición del péptido que se encuentra junto al carboxilo terminal.

Los resultados muestran energías totales de 262.5 y 260.5 kcal/mol para los complejos formados entre un tripéptido y un fullereno colocado en la segunda y tercera posición respectivamente. La energía para un tetrapéptido de valina y la molécula de fullereno colocada a lo largo del péptido no cambia apreciablemente con respecto a las energías totales del complejo del tripéptido, pero existe una disminución mayor a 5 unidades entre el primer complejo del tripéptido, el cual corresponde a una posición más cercana al grupo amino terminal y el último complejo de tetrapéptido que se encuentra más cercano al carboxilo terminal, donde la energía tiene un valor de 257.7 kcal/mol. El mismo comportamiento se observa en el pentapéptido, donde la energía más baja y por ende el complejo más estable se encuentra en la posición donde el fullereno es más cercano al carboxilo terminal del pentapéptido, observándose una energía de 254.2 kcal/mol. Esta energía no cambia drásticamente, sino de forma gradual para las posiciones del fullereno a lo largo de los péptidos Val₆, Val₇, Val₈ y Val₉. En el decapeptido las energías disminuyen hasta valores de 251 kcal/mol en una posición cercana al carboxilo terminal, lo cual se repite para el péptido Val₁₁, registrando valores

de 251.6 kcal/mol. Si se realiza una comparación de estas energías totales de formación entre el tripéptido y este último péptido Val₁₁ en la misma posición cercana al carboxilo terminal se observaran más de 11 kcal/mol de diferencia.

El eje "y" de todas las graficas se titula: Energías totales, E (kcal/mol)



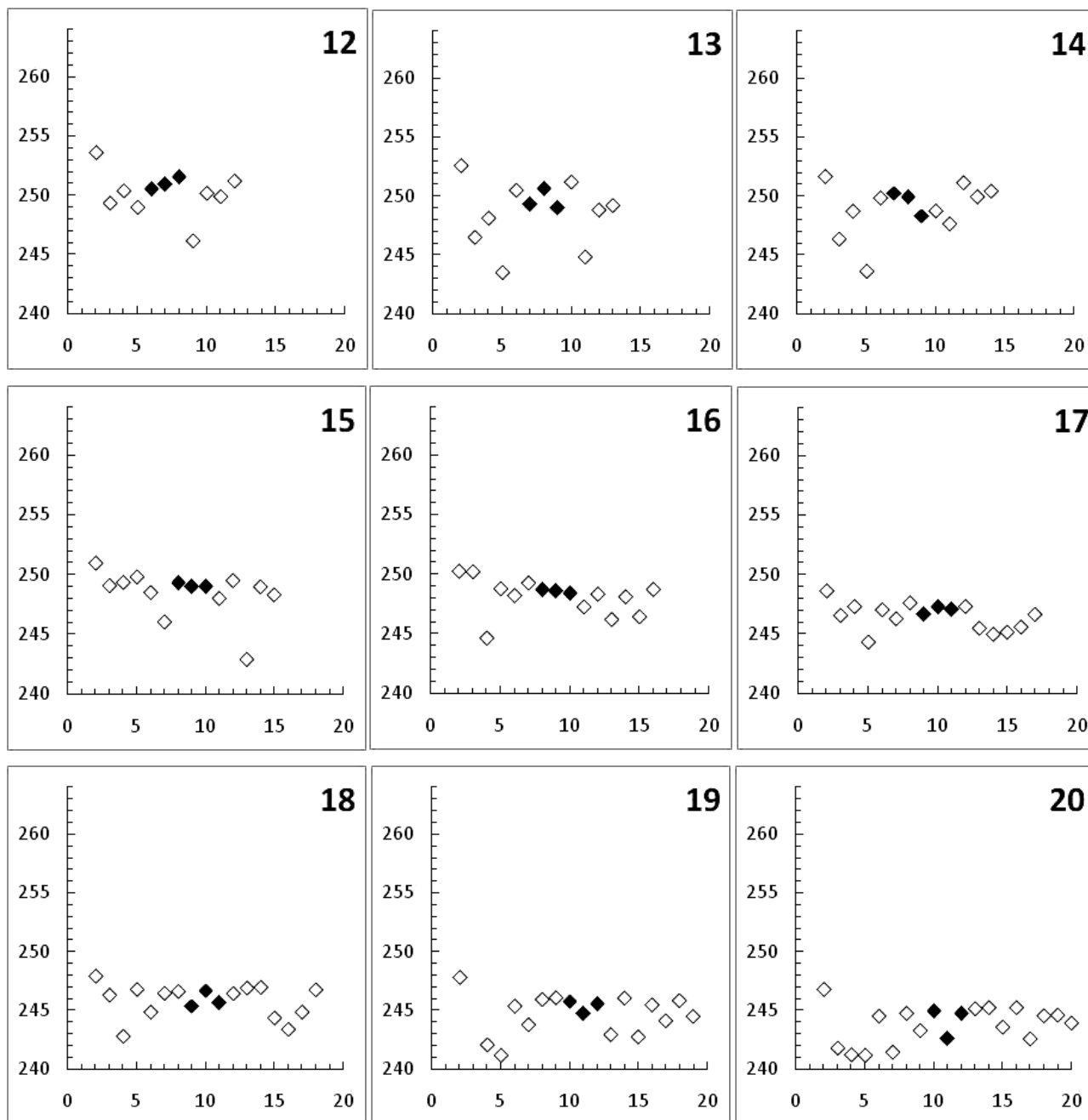
El eje "x" de todas las gráficas se titula: Posición del fullereno con respecto al péptido de valina.

Figura 7. Energías totales de los primeros 9 complejos (de Val_3+C_{60} a $Val_{11}+C_{60}$) en conformación de hebra β utilizando MM+. Las E se dan en función de la posición de C_{60} con respecto al péptido de valina. Los residuos de valina fueron enumerados desde el amino terminal. Los puntos marcados en negro indican menores variaciones en la parte central comparándolas con las partes extremas del péptido.

Los siguientes valores de energía que pertenecen a los complejos entre los péptidos Val₁₂ hasta péptidos Val₂₀ y la molécula de C₆₀ muestran la misma tendencia de los complejos anteriores (Figura 8). Por ejemplo si se considera a Val₁₃ complejoado con el fullereno en la posición más cercana al carboxilo terminal, se obtiene un valor de 249.2 kcal/mol lo que corresponde a una diferencia de 2 unidades de energía total menor con respecto a Val₁₁+C₆₀. Esta tendencia de obtener energías más bajas se mantiene conforme se alarga el péptido, observándose una energía de 246.6 kcal/mol y disminución de 3 unidades, en el fullereno asociado a la posición más cercana del carboxilo terminal en Val₁₇ con respecto a Val₁₁. Finalmente la energía más baja es para el complejo formado con el fullereno asociado cercanamente al carboxilo terminal de Val₂₀ con una energía de 243.9 kcal/mol. Estas energías indican que la interacción más fuerte para estos complejos es la posición más cercana de la molécula de fullereno al carboxilo terminal de los péptidos.

La tendencia general de las energías totales de los complejos formados es disminuir conforme el fullereno es asociado cercanamente al carboxilo terminal y al aumento del número de aminoácidos que forman al péptido. Este tipo de comportamiento probablemente puedes ser asociado a la naturaleza de las interacciones creadas entre el péptido y el fullereno, teniendo en cuenta que se pueden crear interacciones dipolo-dipolo. Es claro que debido al carácter hidrófobo de los aminoácidos de valina estos no forman dipolos permanentes, pero debido a la cantidad de átomos que se suman conforme crece el péptido, la molécula peptídica podría adquirir cierta naturaleza dipolar, creándose una carga más negativa hacia la punta del carboxilo terminal del péptido. En este momento el péptido podría crear interacciones de corto alcance con la molécula de fullereno para mantenerse unidas mediante fuerzas de dispersión, generalmente conocidas como fuerzas de van der Waals.

El eje "y" de todas las graficas se titula: Energías totales, E (kcal/mol)



El eje "x" de todas las gráficas se titula: Posición del fullereno con respecto al péptido de valina.

Figura 8. Energías totales de los 9 complejos restantes (de $Val_{12}+C_{60}$ a $Val_{20}+C_{60}$) en conformación de hebra β utilizando MM+. Las E se dan en función de la posición de C_{60} con respecto al péptido de valina. Los residuos de valina fueron enumerados desde el amino terminal. Los puntos marcados en negro indican menores variaciones en la parte central comparándolas con las partes extremas del péptido.

Un punto importante que se observa en las gráficas de las Figuras 7 y 8 es la gran variabilidad de valores de energía al colocar el fullereno cerca del extremo amino o carboxilo, las diferencias en valores de energía total E son muy inestables, en algunos casos de 10 kcal/mol como es el ejemplo de Val₁₃+C₆₀ y Val₁₄+C₆₀; sin embargo, las energías se estabilizan en la posición central del péptido. Esta estabilidad permite tener resultados fiables para el cálculo de ΔE y se ejemplifica por los tres puntos centrales en negro de cada gráfica, donde las variaciones son tan pequeñas como 1-2 kcal/mol.

Debido a que no existe una gran diferencia de energía entre los diferentes complejos se sugiere desde este momento que la presencia del fullereno no afectará sustancialmente la conformación de los péptidos, teniéndose en cuenta que un efecto pronunciado de cambio de conformación podría tener asociado una energía de interacción alta (es decir energías totales cercanas a cero o negativas) que sobresaliese al comparar un complejo con otro, algo que no se muestra desde estas gráficas de energía de interacción total. Sin embargo, sería lógico esperar cambios conformacionales en las geometrías optimizadas de los complejos asociados con los cambios de energía antes mencionados. Lo cual puede observarse en la Figura 9, donde se presenta al péptido Val₁₃ y su correspondencia entre la geometría optimizada con las variaciones de energía total en los extremos amino y carboxilo. Sí se coloca la molécula del fullereno cerca del extremo amino o carboxilo se observa un doblamiento de la hebra β , especialmente en la posición 3-5, 11 y 12. Al contrario, cuando el fullereno se coloca cerca del centro de la hebra β , como en la posición 6-9, la geometría del péptido no exhibe alteraciones drásticas.

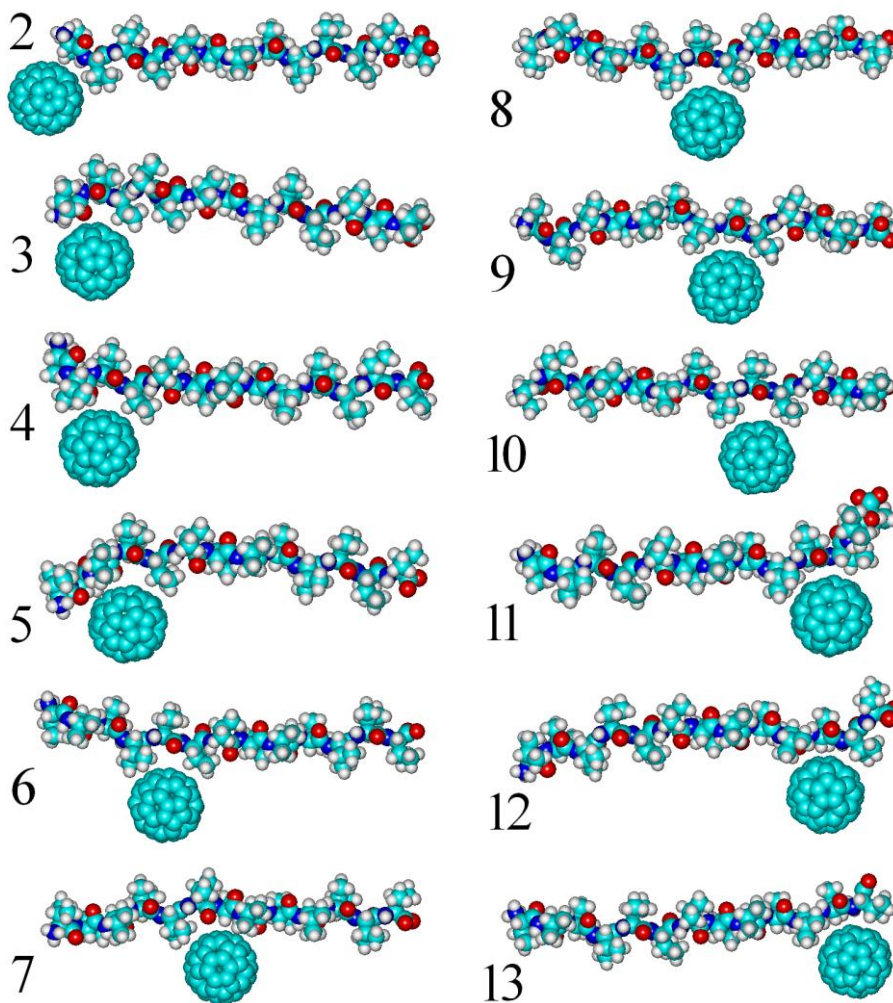


Figura 9. Efecto de la posición del fullereno sobre la geometría de la cadena peptídica (hebra β) del péptido con 13 valinas.

Para dar una idea más completa de los cambios de conformación se realizaron alineamientos entre los péptidos sin interacción con la molécula de fullereno y estos mismos péptidos asociados con la molécula de fullereno. La Figura 10 muestra los alineamientos realizados mediante el programa conocido como PyMOL. En esta Figura, la molécula peptídica optimizada sin interaccionar con C_{60} se muestra en color rojo y el complejo optimizado se muestra en color azul.

Los alineamientos muestran una relación estrecha con las energías totales presentadas en la Figura 8. En el primer alineamiento (identificado con el número 2) de la Figura 10 se observa que no existen cambios de conformación bruscos para el péptido Val₁₃, puesto que el péptido del complejo se alinea bien con el péptido no complejo. La energía total de este complejo es la más alta para toda la serie del complejo Val₁₃+C₆₀ (Figura 8), teniéndose que la posición de un C₆₀ cerca del amino terminal no induce energías totales más estables que en comparación con los otros complejos. Esta energía total corresponde con el cambio conformacional, puesto que no se observan que existan doblamientos bruscos de la secuencia de aminoácidos de la molécula peptídica complejada.

Para los siguientes alineamientos 3, 4 y 5 se observa que los péptidos complejados y sin complejar no se alinean como en el alineamiento 2, teniéndose el mayor doblamiento del péptido complejo en el alineamiento 5. Este cambio conformacional corresponden con las energías totales de la Figura 8, donde se observa energías mucho menores para Val₃+C₆₀ y Val₅+C₆₀ que con respecto a Val₂+C₆₀. Las energías totales corresponden con las imágenes del alineamiento, donde se observan las mayores desviaciones de la secuencia de aminoácidos para los péptidos de Val₃+C₆₀ y Val₅+C₆₀ con respecto al péptido sin complejar.

Los alineamientos 6, 7, 8, 9 y 10 no presentan desviaciones bruscas de secuencia de aminoácidos de los péptidos complejados con respecto al péptido sin complejar. Estos pequeños cambios conformacionales corresponden con las energías totales de la Figura 8. En la Figura 8 se observa que estos complejos no tienen disminuciones importantes de energía total con respecto a Val₂+C₆₀, por lo que tampoco se esperaría que existieran grandes cambios de conformación.

El alineamiento 11, muestra una característica importante: el cambio conformacional del péptido complejo es tan grande que el extremo del péptido tiende a desviarse en contra del fullereno, comportamiento que no se había presentado en los trabajos anteriores realizados por Basiuk y Bassiouk⁴¹. Probablemente este péptido se

comporta de esta manera porque las cadenas laterales al interactuar con más fuerza con C_{60} inducen que la secuencia de aminoácidos evite “abrazar” al C_{60} .

Finalmente los alineamientos 12 y 13 corresponden con las energías totales mostradas en la Figura 8 puesto que las energías totales no tienen energías bajas con respecto al complejo Val_2+C_{60} , tampoco se tienen cambios de conformación pronunciados.

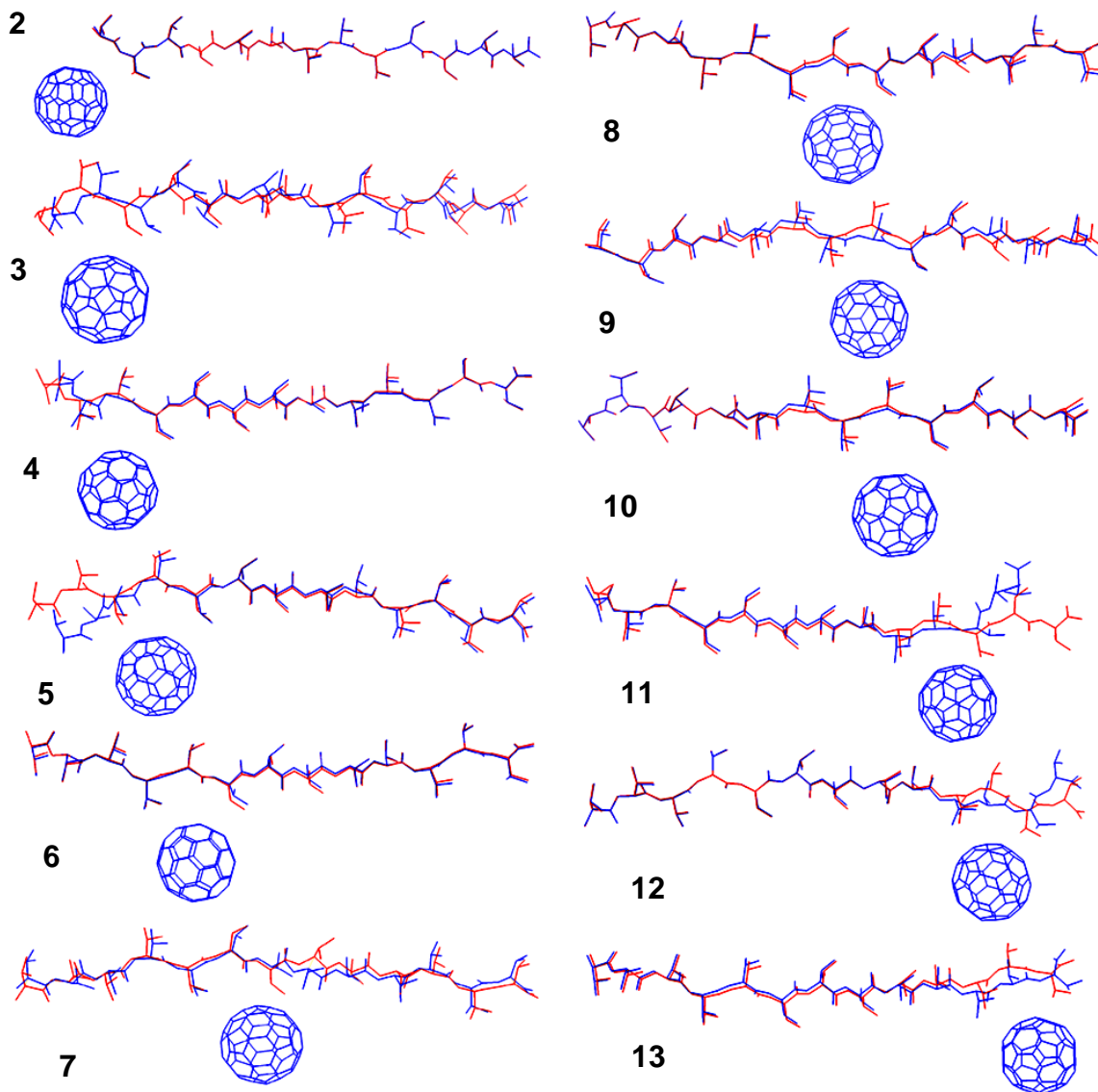


Figura 10. Alineamiento entre la moléculas peptídicas (Val_{2,3,...,13}) optimizadas sin interactuar con C₆₀, mostradas en color rojo y los complejos optimizados (Val_{2,3,...,13}+C₆₀) mostrados en color azul. Configuración de hebra β . Alineamiento realizado con PyMOL.

Ya mostrados los resultados de energía total y de geometría optimizada, se siguió a obtener los cálculos para las energías de formación y graficar ΔE contra n_{Val} en esta serie de hebra β (Tabla 1 y Figura 11). Para esto, se seleccionaron los tres puntos

centrales marcados en negro en la Figura 7 y 8: ya que son estos puntos los que varían menos en energía y geometría. Aquí se observa que los valores de ΔE tienden a disminuir, llegando a un mínimo en Val₇+C₆₀ donde el valor de $\Delta E = -11.7$ kcal/mol, para después incrementar encontrando un máximo en Val₁₆+C₆₀ donde el $\Delta E = -7.79$ kcal/mol y finalmente decrece hasta el péptido más largo Val₂₀ con un valor de $\Delta E = -10.41$ kcal/mol, valor que no es más bajo comparado con Val₇+C₆₀.

Tabla 1. Energías de formación ΔE (en kcal/mol) para complejos de aminoácido/péptidos + fullereno (conformación hebra β) calculadas con campo de fuerza MM+.

Complejo	ΔE kcal/mol	Complejo	ΔE kcal/mol
Val + C ₆₀	- 4.50	Val ₁₁ + C ₆₀	- 9.70
Val ₂ + C ₆₀	- 6.68	Val ₁₂ + C ₆₀	- 9.17
Val ₃ + C ₆₀	- 6.47	Val ₁₃ + C ₆₀	- 8.60
Val ₄ + C ₆₀	- 7.93	Val ₁₄ + C ₆₀	- 8.41
Val ₅ + C ₆₀	- 10.29	Val ₁₅ + C ₆₀	- 8.41
Val ₆ + C ₆₀	- 10.93	Val ₁₆ + C ₆₀	- 7.79
Val ₇ + C ₆₀	- 11.71	Val ₁₇ + C ₆₀	- 8.44
Val ₈ + C ₆₀	- 10.33	Val ₁₈ + C ₆₀	- 8.10
Val ₉ + C ₆₀	- 9.25	Val ₁₉ + C ₆₀	- 9.28
Val ₁₀ + C ₆₀	- 7.82	Val ₂₀ + C ₆₀	-10.41

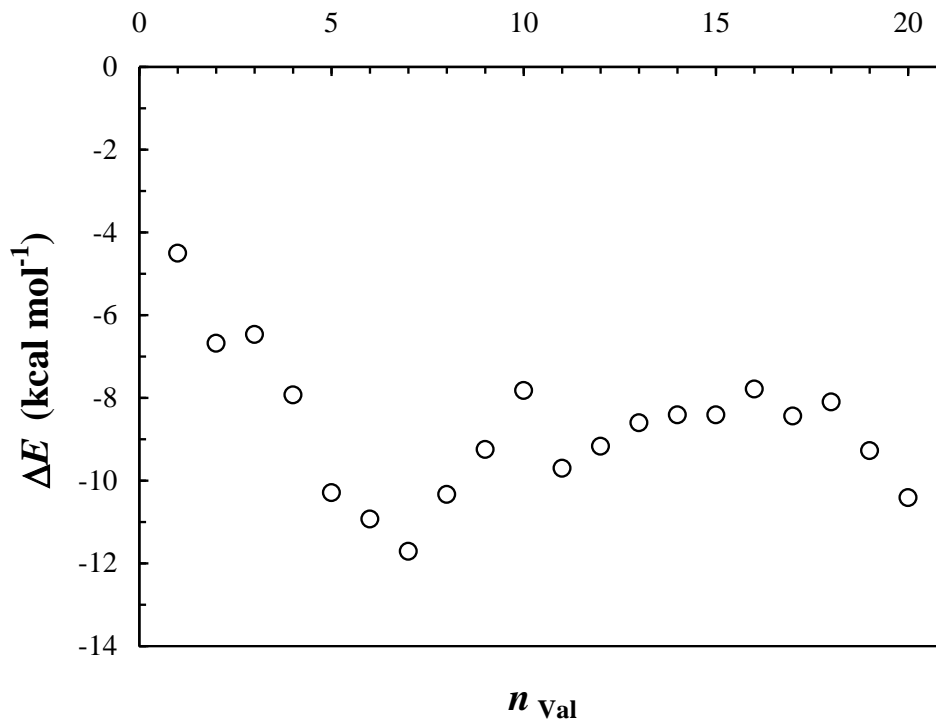


Figura 11. Energías de formación ΔE (en kcal/mol) para complejos de aminoácido/péptidos + fullereno (conformación hebra β) calculadas con campo de fuerza MM+.

En general los resultados para la hebra β de péptidos de valina muestran una rigidez alta y la estructura de la hebra no se adapta a la forma esférica del fullereno a excepción de $\text{Val}_7+\text{C}_{60}$ donde los valores ΔE son los más bajos de la serie. Estos cambios conformacionales son análogos a los cálculos realizados por Basiuk y Bassiouk⁴¹ para péptidos de alanina y en consecuencia se diferencian de los péptidos de glicina ($n_{\text{Gly}}=1-6$); los cuales presentan un doblamiento pronunciado dado la sensación de “abrazo” por parte del péptido al C_{60} . En la Figura 12 se muestra los dos ejemplos más ilustrativos para el tri y heptapéptido, donde para el complejo de $\text{Val}_3+\text{C}_{60}$ no hay un cambio grande de su geometría, pero no es así cuando se observa al complejo $\text{Val}_7+\text{C}_{60}$ (cuya energía de formación es la más baja de toda la serie), donde se muestra que se forma una curvatura en el lugar más cercano al fullereno, lo cual cambia al aumentar el largo del péptido: como se muestra en el complejo $\text{Val}_{12}+\text{C}_{60}$ no

existe curvatura, debido al aumento de rigidez de la hebra β al interactuar con el fullereno. Este último comportamiento concuerda con la idea que se tiene sobre el efecto de C_{60} en relación al aumento de la cadena peptídica; esto es, el efecto del C_{60} deja de ser visible para tamaños de cadena peptídica más largos que 10 aminoácidos enlazados covalentemente, el péptido en $Val_{12}+C_{60}$ no cambia drásticamente su conformación ni su energía de formación alcanza valores negativos comparables a Val_7+C_{60} , por lo que se sugiere que la molécula de fullereno no tiene efectos grandes sobre secuencias de aminoácidos más largos que Val_{10} .

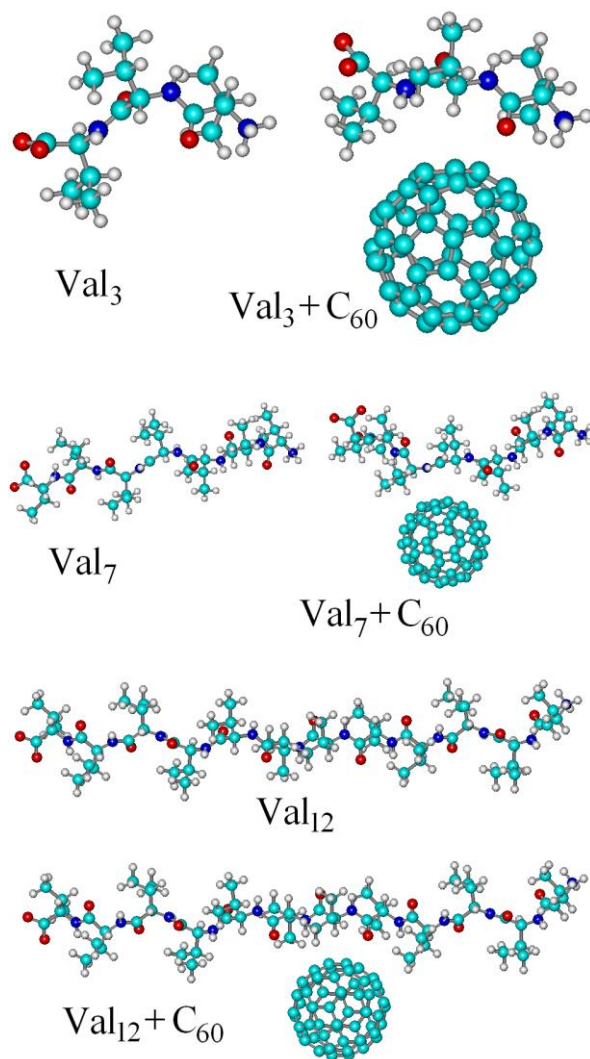


Figura 12. Cambios conformacionales en la hebra β de péptidos de valina interactuando con fulerenos. Los cambios son más grandes para el péptido Val₇, menores para Val₃ y casi indetectables para Val₁₂.

La Figura 13 muestra los alineamientos de las moléculas peptídicas sin complejar y sus correspondientes complejos Val_{3,7,12}+C₆₀. Estos alineamientos identifican el cambio conformacional más pronunciado para el complejo Val₇+C₆₀, lo cual corresponde con la energía de formación representada por la Tabla 1 y la Figura 11. Esta energía es la más negativa indicado una mayor estabilidad de los complejos simulados para una conformación de hebra β calculados con MM+. Los 2 complejos restantes Val₃+C₆₀ y

Val₁₂+C₆₀ muestran que en péptidos pequeños y largos, los cambios conformacionales simulados no son tan pronunciados, teniéndose una secuencia de aminoácidos similar a la secuencia de aminoácidos no complejada. Los cambios conformacionales corresponden con las energías de formación tanto para Val₃+C₆₀ como Val₁₂+C₆₀, en ambos complejos se observa que las energías de formación se mantienen a valores negativos alejados a los de Val₇+C₆₀, y por lo tanto sus cambios conformacionales no son tan pronunciados en comparación con Val₇+C₆₀.

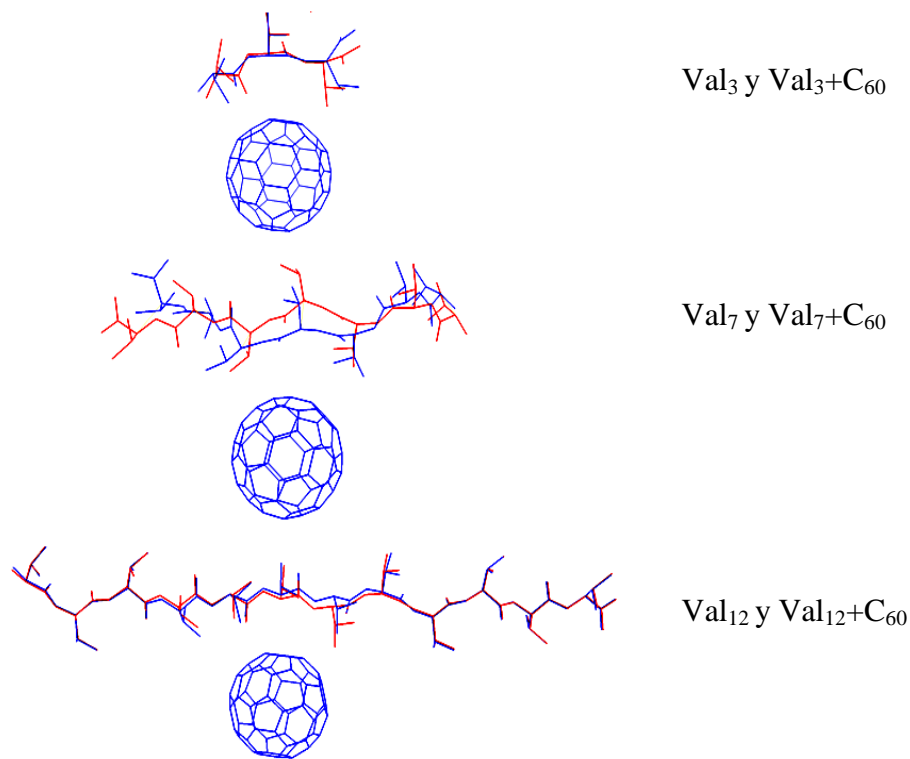


Figura 13. Alineamiento entre las moléculas peptídicas (Val_{3,7,12}) optimizadas sin interactuar con C₆₀, mostradas en color rojo y los complejos optimizados (Val_{3,7,12}+C₆₀), mostrados en color azul. Configuración de hebra β . Alineamiento realizado con PyMOL.

3.1.2. Hélice α

A continuación se muestran los resultados para la serie que corresponde a la interacción entre fullereno y la conformación de péptidos de valina en una hélice α , estos al igual que para la conformación β , se llevaron a cabo con el campo de fuerza MM+.

La Figura 14 contiene las gráficas de las energías totales de los complejos entre el fullereno y los diferentes péptidos que van desde el tripéptido hasta el péptido Val₁₁. El primer complejo (tripéptido y fullereno en la segunda posición a partir del amino terminal) de la hélice α muestra una energía total de 259.2 kcal/mol, energía menor a la mostrada por el mismo complejo pero con una conformación de hebra β (262.5 kcal/mol), la cual disminuye al colocar el fullereno en una posición cercana al carboxilo terminal; posición donde la energía es de 258 kcal/mol. La disminución de energía para estos complejos de diferentes conformaciones hebra β y hélice α , podría deberse a la existencia de interacciones más fuertes entre los residuos de valina y las moléculas de fullereno para una hélice α (hay que tener en cuenta que desde este momento los residuos de valina empiezan a dirigirse fácilmente hacia fuera de la hélice α) que en comparación con una conformación de hebra β , induciendo una mayor estabilidad al complejo y por ende una menor energía total con respecto a la hebra β . Por otra parte, es probable que la disminución de 1 unidad entre las posiciones cercanas al amino y carboxilo terminal sea debida a que en la posición cercana al carboxilo las atracciones de van der Waals son más fuertes que las repulsiones producidas entre el fullereno y esta misma posición en péptidos más largos, ya que a diferencia de la hebra β , en una hélice α sí se logra formar un dipolo permanente. Este dipolo permanente de la hélice α tenderá a repelerse con la carga negativa del dipolo-inducido del fullereno y por lo tanto puede provocar que el complejo sea menos estable y tenga energías totales más altas. Estas energías mayores (que implicarían complejos menos estables) en la posición cercana al carboxilo terminal con respecto al amino terminal se observan después del complejo formado por el tetrapéptido y la molécula de fullereno; es decir, en el péptido (Val₅) donde se forma el primer enlace de hidrógeno. De la misma

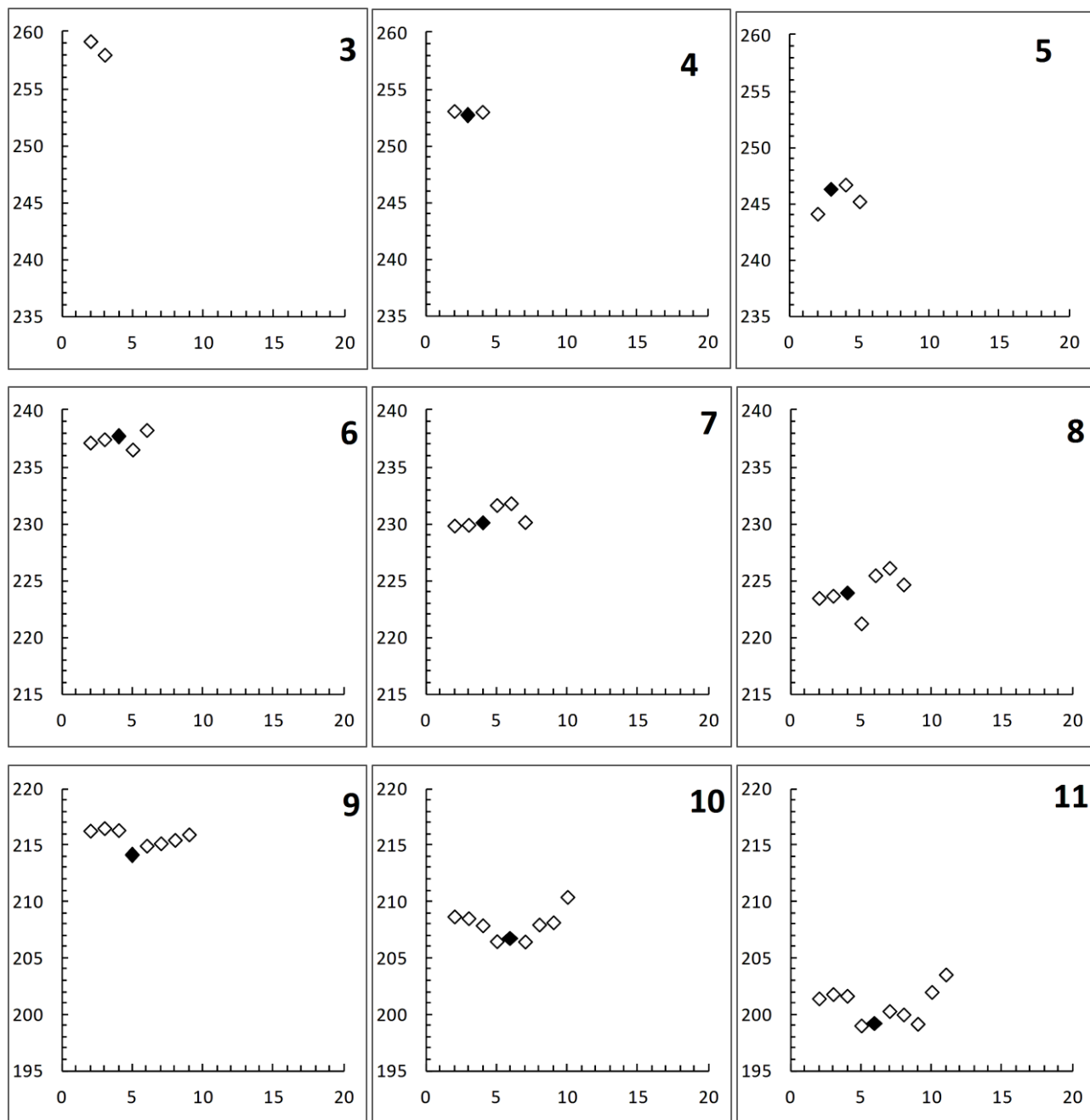
manera las energías totales de péptidos más grandes aumentan en una posición cercana al carboxilo terminal.

Ahora bien revisando la energía del tetrapéptido en la posición cercana al carboxilo terminal se tiene una energía de 253 kcal/mol, por lo que la energía ha disminuido 6 unidades comparando con el tripéptido con una energía de 259.2 kcal/mol, diferencia que podría deberse a que existe una mayor interacción entre fullereno y los residuos de isopropil dirigidos hacia fuera de la hélice α . Las energías para ambas posiciones del fullereno con respecto a su posición en el tetrapéptido son iguales a 253 kcal/mol, lo que podrían indicar que la interacción con el fullereno no contribuye con una mayor estabilidad al complejo si se cambiara su posición. Los siguientes complejos son aun más estables con respecto a su tamaño, teniendo una disminución de hasta 9 unidades, por ejemplo el pentapéptido tiene energías de 244.1 y 246.3 kcal/mol, en las posiciones cercanas al amino y carboxilo terminal, respectivamente. Este pentapéptido, ya ha formado el primer puente de hidrógeno intracatenario y por lo tanto su configuración es más estable en comparación con la del tetrapéptido y tripéptido. En este péptido, Val₅, se observa que la energía del complejo es mayor cuando el fullereno es más cercano al carboxilo que en otra posición, esta menor fuerza de interacción podría deberse a que la naturaleza de la hélice α es formar un dipolo permanente, teniendo como resultado una carga negativa en el extremo carboxilo terminal del péptido, carga que repelerá la carga negativa del fullereno antes comentada. Esto último podría tener como consecuencia una menor estabilidad en las zonas de la hélice α donde existe una carga negativa debida al dipolo permanente, y por el contrario podría existir una menor energía en zonas del péptido donde se pueden dar interacciones hidrófobas o de van der Waals con mayor facilidad, es decir en el centro de los péptidos que contienen los residuos de valina dirigidas hacia el fullereno

La energía total de los complejos restantes se muestra en la Figura 11, donde los complejos con péptidos que van desde Val₆ hasta Val₁₁ disminuyen de energía hasta en 8 unidades entre cada péptido teniendo una energía de formación total tan baja igual a 199 kcal/mol para el péptido de 11 aminoácidos; es decir, una diferencia de 60

kcal/mol entre este complejo y el complejo formado entre el tripéptido y su fullereno correspondiente. En estos complejos también se observa una menor fuerza de interacción de los péptidos complejados en el carboxilo terminal con respecto al amino terminal.

El eje "y" de todas las graficas se titula: Energías totales, E (kcal/mol)



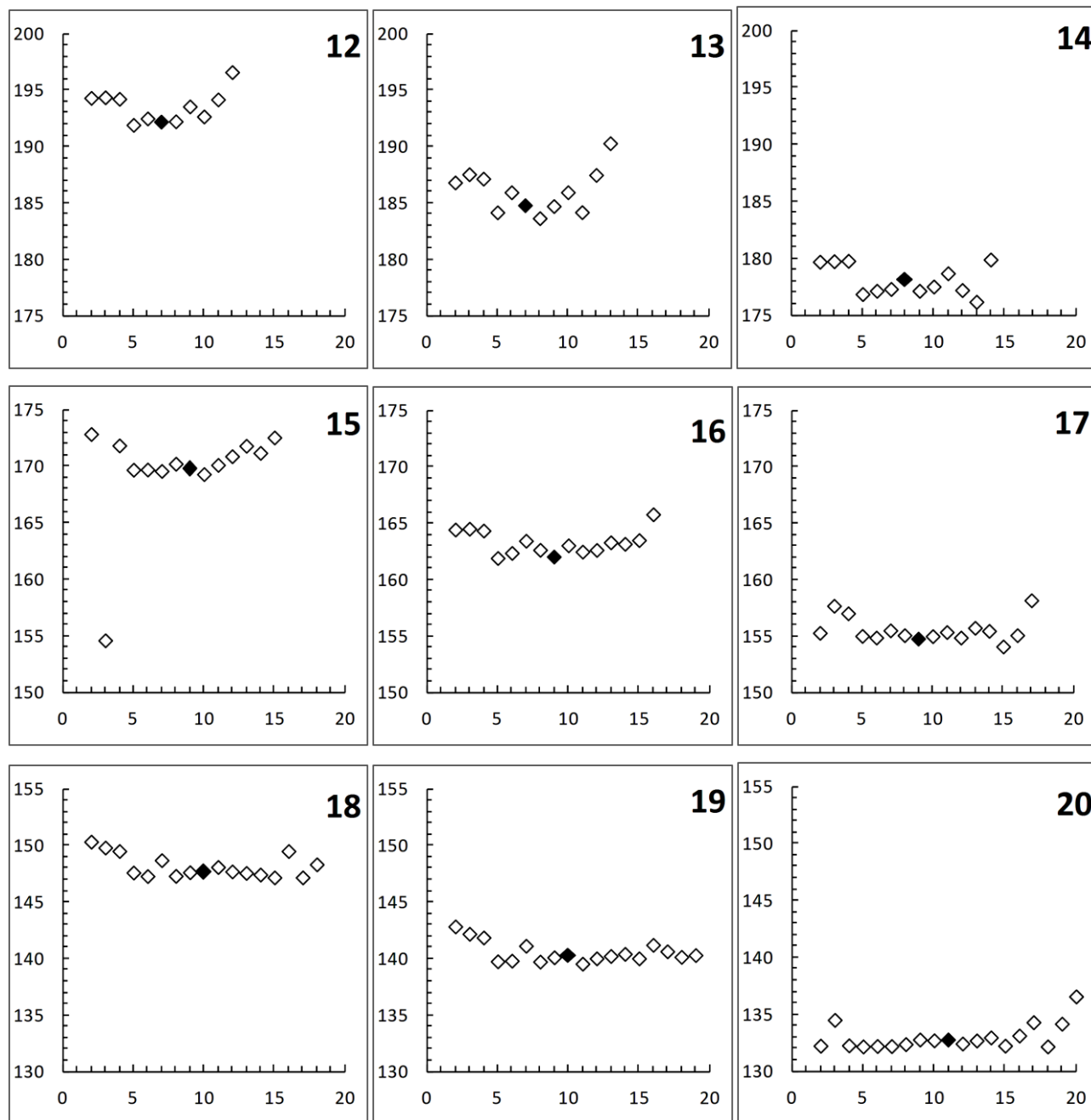
El eje "x" de todas las gráficas se titula: Posición del fullereno con respecto al péptido de valina.

Figura 14. Energías totales de los primeros 9 complejos (de Val₃+C₆₀ a Val₁₁+C₆₀) en conformación de hélice α utilizando MM+. Las E se dan en función de la posición de C₆₀ con respecto al péptido de valina. Los residuos de valina fueron enumerados desde el amino terminal. Los puntos marcados en negro indican menores variaciones en la parte central comparándolas con las partes extremas del péptido.

En la Figura 15 se muestran las energías totales de los complejos entre los péptidos restantes con una configuración de hélice α y la molécula de fullereno. En esta Figura aparecen los péptidos $n_{\text{Val}}=12-20$ complejados con una molécula de fullereno en diferentes posiciones a lo largo del péptido.

La tendencia de la energía total es disminuir conforme crece el péptido teniendo valores de 191.9 kcal/mol para una posición central del fullereno en el péptido Val₁₂ y una energía total de 132.7 kcal/mol para una posición central del fullereno en el complejo Val₂₀. La diferencia entre estos complejos es de casi 60 kcal/mol, algo que concuerda con la cantidad de puentes de hidrógeno intracatenarios que se van sumando en la hélice α conforme aumenta el tamaño del péptido. Aquí también es notable el aumento de energía (que indica un complejo con una menor fuerza de interacción), al situar el fullereno en el extremo del carboxilo terminal de los complejos formados: observándose casi 4 kcal/mol de diferencia en el complejo formado con un péptido de 20 aminoácidos entre una posición central (132.7 kcal/mol) y una en el extremo carboxilo del péptido (136.6 kcal/mol).

El eje "y" de todas las graficas se titula: Energías totales, E (kcal/mol)



El eje "x" de todas las gráficas se titula: Posición del fullereno con respecto al péptido de valina.

Figura 15. Energías totales de los 9 complejos restantes (de Val₃+C₆₀ a Val₁₁+C₆₀) en conformación de hélice α utilizando MM+. Las E se dan en función de la posición de C₆₀ con respecto al péptido de valina. Los residuos de valina fueron enumerados desde el amino terminal. Los puntos marcados en negro indican menores variaciones en la parte central comparándolas con las partes extremas del péptido.

La Figura 15 contiene los resultados de la serie restante correspondiente a la hélice α , y al igual que para la hebra β se puede observar que si el fullereno se coloca cerca de los extremos amino o carboxilo (por ejemplo en los complejos Val₁₃+C₆₀, Val₁₅+C₆₀, Val₁₇+C₆₀ y Val₂₀+C₆₀), los valores de E total varían considerablemente, pero estas variaciones no son tan drásticas como para los péptidos de la hebra β . Debido a que hay valores de E absolutos estables se hace menos difícil escoger los puntos para graficar ΔE . Este comportamiento relativamente uniforme puede ser expandido para sistemas más grandes que contengan enlaces de hidrógeno intramoleculares; por lo que, probablemente una estructura de hélice α aislada, será termodinámicamente más estable y rígida, comparada con una hebra β .

Estos resultados de ΔE se presentan en la Tabla 2 y Figura 16, los datos fueron obtenidos usando los puntos marcados en negro de las Figuras 14 y 15. Aunque no todos los puntos caen perfectamente dentro de la curva, existe evidentemente una tendencia general. La energía de formación para los complejos péptido+C₆₀ gradualmente decrece hasta el deca péptido (vale la pena recalcar que esta parte exhibe similitudes con las gráficas obtenidas para los péptidos de Gly y Ala llevados a cabo con MM+ por Basiuk y Bassiuk⁴¹), para después estabilizarse alrededor de 12-13 kcal/mol, lo que podría implicar que el crecimiento de la cadena peptídica no logra fortalecer más las interacciones con el fullereno, hay que tener en cuenta que este análisis se realiza tomando los resultados de la simulación, por lo que es necesario corroborarlos con observaciones experimentales. Las energías de formación decrecen hasta Val₁₀+C₆₀ ($\Delta E=-12.3$ kcal/mol), esta última energía puede ser comparada con la de Val₇+C₆₀ ($\Delta E=-11.7$ kcal/mol) de la conformación de hebra β (Figura 11), para dar una idea sobre la estabilidad de las configuraciones peptídicas asociadas a C₆₀; sin embargo, debido a que no hay cambios considerables de energía de formación para complejos con péptidos más largos (contrario para el caso de la hebra β : en esta serie después de Val₇+C₆₀ las energías de formación crecen y después disminuyen), se sugiere que probablemente existe un efecto estabilizador de estos complejos a consecuencia de los puentes de hidrógeno intramoleculares de la hélice α , contribuyendo a interacciones intermoleculares más fuertes entre péptidos y fullerenos.

Tabla 2. Energías de formación ΔE (en kcal/mol) para complejos de aminoácido/péptidos + fullereno (conformación de hélice α) calculadas con campo de fuerza MM+.

Complejo	ΔE kcal/mol	Complejo	ΔE kcal/mol
Val + C ₆₀	-4.5	Val ₁₁ + C ₆₀	-13.02
Val ₂ + C ₆₀	-7.18	Val ₁₂ + C ₆₀	-12.70
Val ₃ + C ₆₀	-6.88	Val ₁₃ + C ₆₀	-12.75
Val ₄ + C ₆₀	-7.44	Val ₁₄ + C ₆₀	-12.05
Val ₅ + C ₆₀	-8.56	Val ₁₅ + C ₆₀	-13.04
Val ₆ + C ₆₀	-10.34	Val ₁₆ + C ₆₀	-13.01
Val ₇ + C ₆₀	-10.51	Val ₁₇ + C ₆₀	-12.87
Val ₈ + C ₆₀	-10.19	Val ₁₈ + C ₆₀	-12.59
Val ₉ + C ₆₀	-10.59	Val ₁₉ + C ₆₀	-12.46
Val ₁₀ + C ₆₀	-12.6	Val ₂₀ + C ₆₀	-12.35

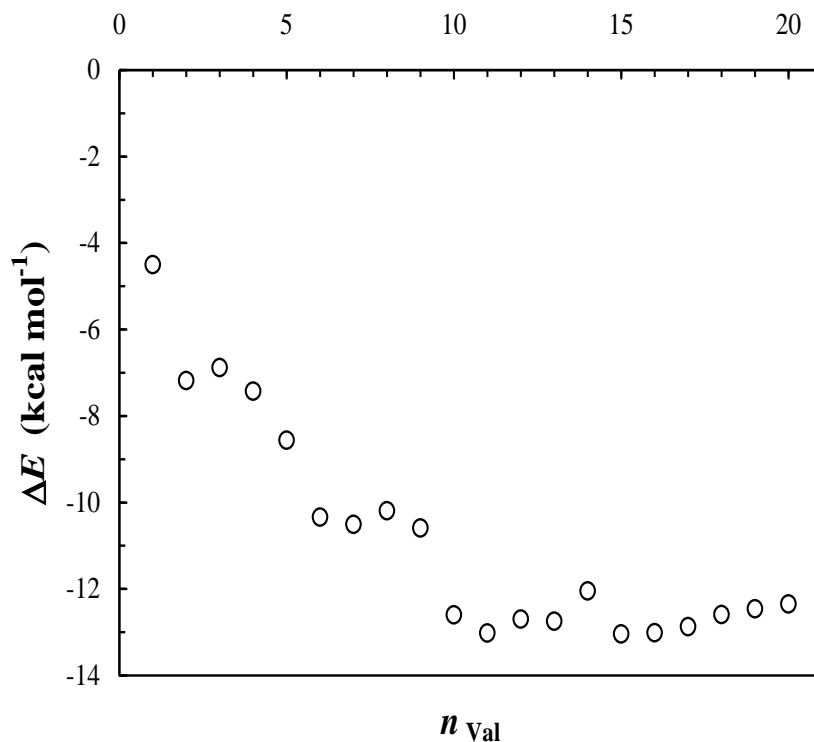


Figura 16. Energías de formación ΔE (en kcal/mol) para complejos de aminoácido/péptidos + fullereno (conformación hélice α) calculadas con campo de fuerza MM+.

Esta sugerencia puede ser apoyada por el análisis comparativo de las geometrías optimizadas para péptidos en su estado libre y complejados con el fullereno. En la mayoría de los casos estos cambios conformacionales pueden ser detectados cuando se analizan las distancias y ángulos interatómicos. De este análisis se encontró sólo un caso significativo para el cambio conformacional para la Val₇ (Figura 17). Donde la secuencia de aminoácidos de este péptido se dobla hasta un ángulo que le permite tener mejores contactos con el fullereno. Aquí la distancia C-C seleccionada incrementa dramáticamente desde 6.27 hasta 9.61 Å, lo cual muestra que ha habido un cambio conformacional significativo en el péptido.

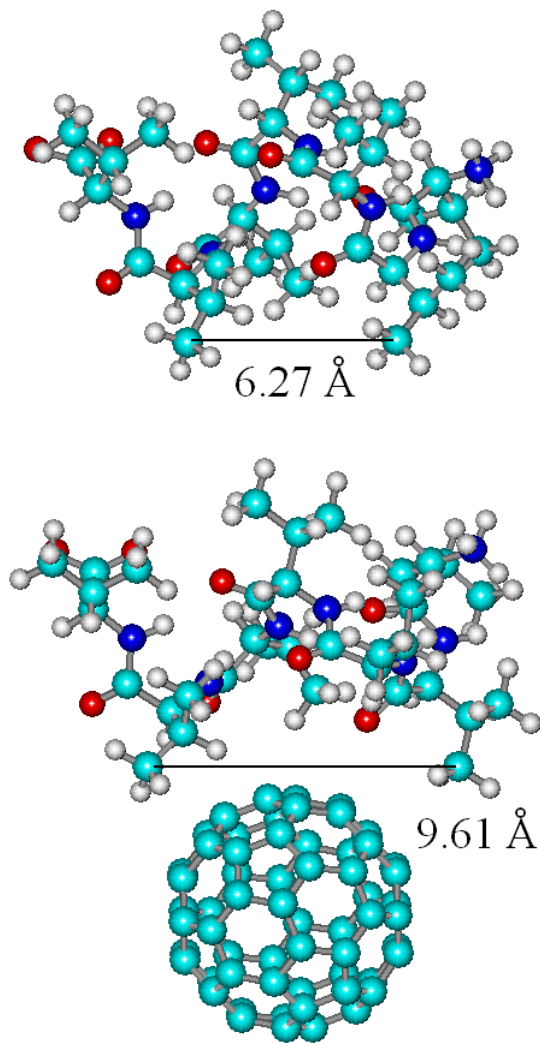


Figura 17. El único ejemplo que muestra un cambio conformacional considerable en péptidos de valina dentro de una hélice α . El péptido formado por 7 valinas sin complejar parte de arriba y complejado con fullereno parte de abajo.

La Figura 18 muestra los reajustes de las secuencias de aminoácidos para los péptidos Val₇ y Val₁₆ al asociarse con una molécula de fullereno. En esta Figura se observa un cambio conformacional total de la secuencia de aminoácidos, no existe ningún punto del complejo Val₇+C₆₀ y Val₁₆+C₆₀ que se sobreponga con algún punto del péptido Val₇ o Val₁₆ sin complejarse, toda la secuencia de aminoácidos del complejo Val₇+C₆₀ y Val₁₆+C₆₀ cambió para alcanzar un reajuste que interactúe más estrechamente con la molécula C₆₀. Las energías de formación de los complejos corresponden con sus cambios conformacionales, observándose una energía negativa menor de Val₇+C₆₀ con respecto a Val₁₆+C₆₀, que es el complejo que tiene la energía de formación más negativa de toda la serie (Tabla 2 y Figura 16) y los cambios de conformación más pronunciados, tal y como se muestra en la Figura 18.

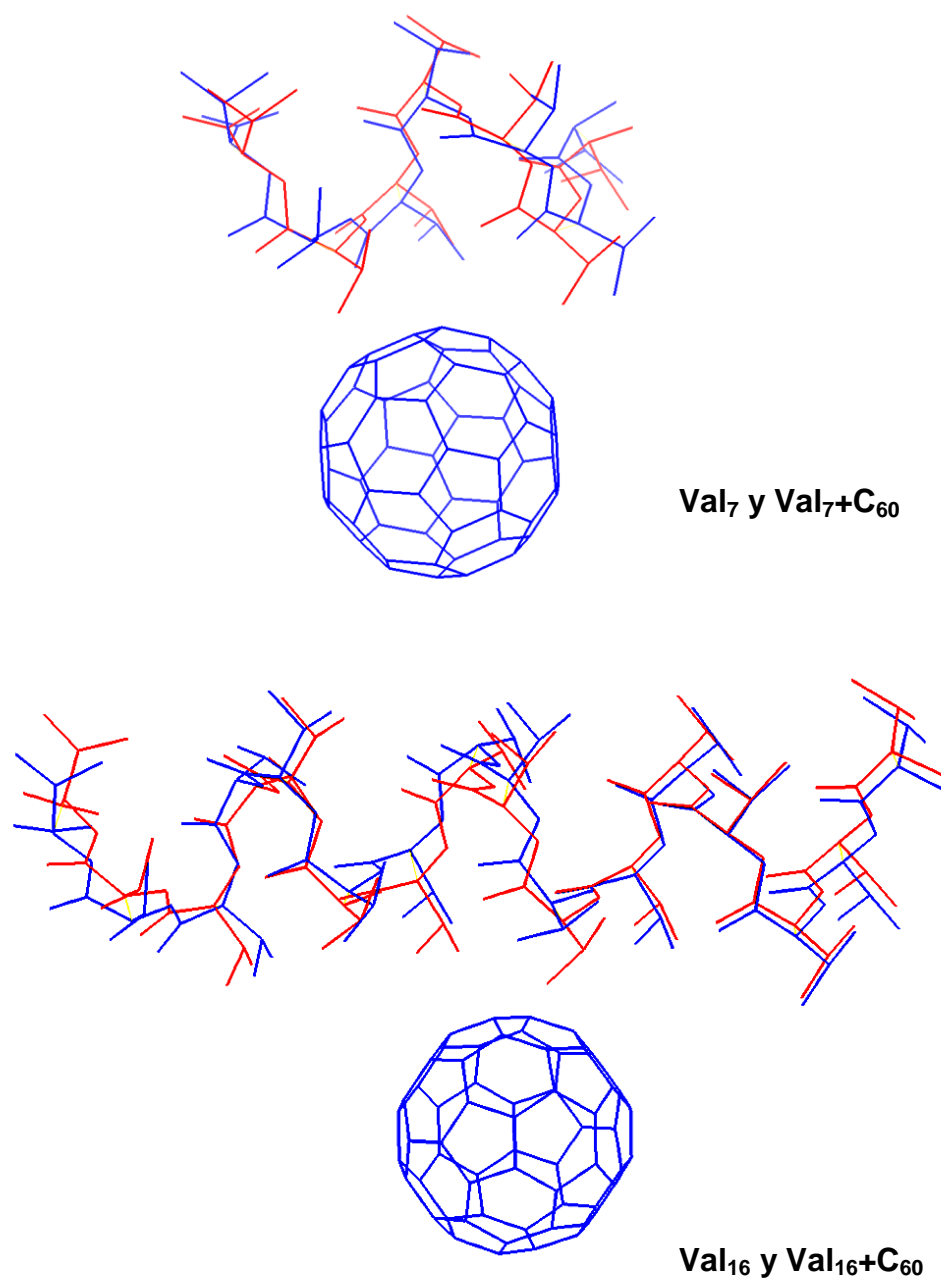


Figura 18. Alineamiento entre las moléculas peptídicas (Val₇ y Val₁₆) optimizadas sin interactuar con C₆₀, mostradas en color rojo y los complejos optimizados (Val₇+C₆₀ y Val₁₆+C₆₀), mostrados en color azul. Configuración de hélice α . Alineamiento realizado con PyMOL.

3.2 Resultados de cálculos por AMBER

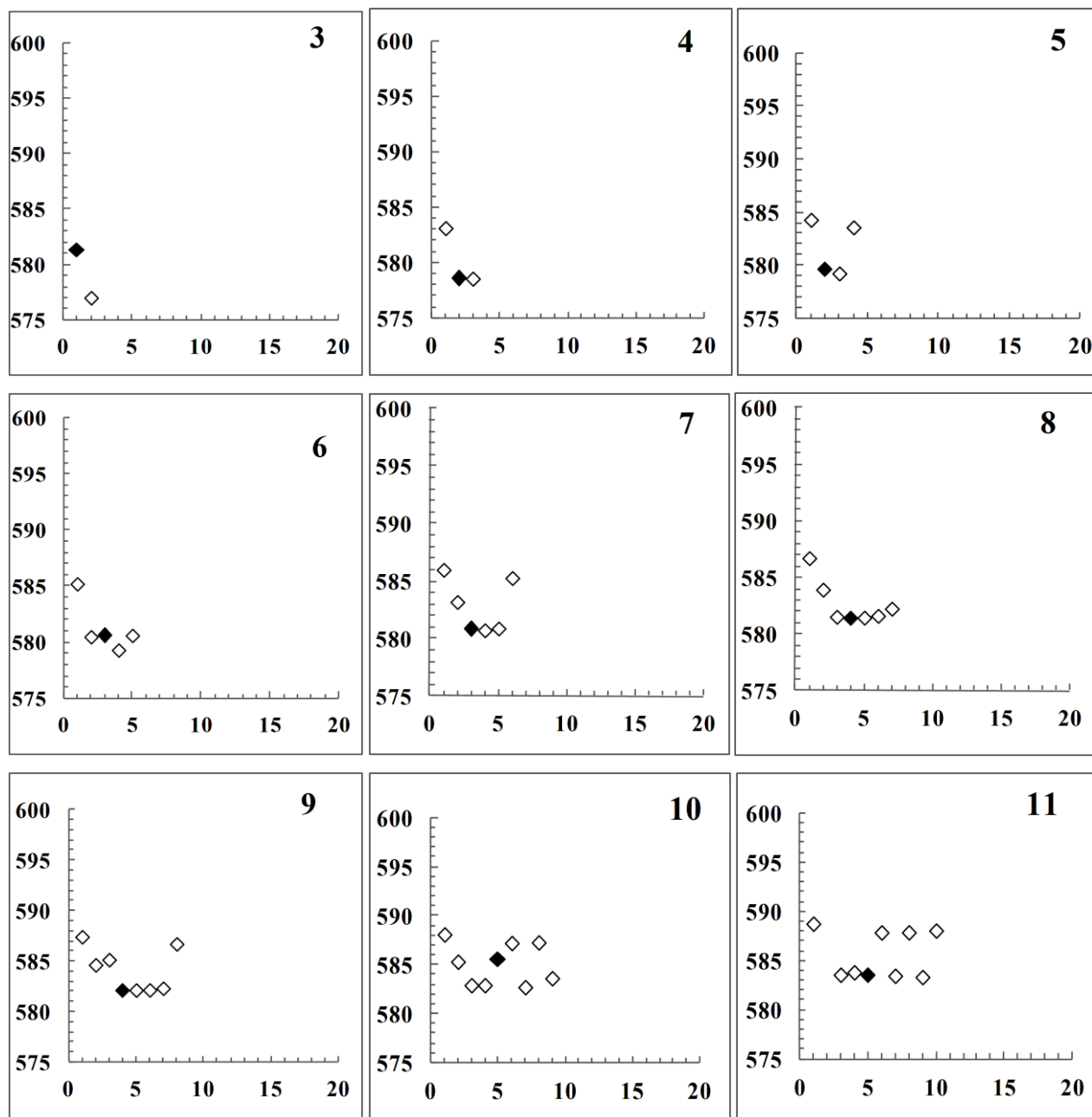
3.2.1. Hebra β

El otro campo de fuerza utilizado fue AMBER, el cual produjo de manera general resultados menos homogéneos comparados con los resultados obtenidos por el campo de fuerza MM+. Para empezar, las energías totales de los complejos entre los péptidos de valina y el fullereno presentan variaciones más significativas dependiendo de donde se coloque al fullereno.

La Figura 19 muestra las gráficas correspondientes a las energías totales de los complejos formados entre péptidos de diferente tamaño (desde Val₃ hasta Val₁₁) en conformación de hebra β y la molécula C₆₀. Las energías totales de estos complejos que fueron calculadas mediante el campo de fuerza AMBER son muy diferentes a las mostradas por el campo de fuerza MM+. En principio estas energías no disminuyen conforme crece el péptido a diferencia de lo que sucedía con el campo de fuerza MM+; sino al contrario la energía total tiende a aumentar desde una energía total de 581.3 kcal/mol para Val₃+C₆₀ con la posición del fullereno más cercana al amino terminal, a una energía de 583.1 kcal/mol para Val₄+C₆₀, hasta 584.3 kcal/mol para Val₅+C₆₀. La tendencia se mantiene para los complejos posteriores con respecto a su complejo antecesor, hasta encontrar una energía total de 588 kcal/mol en Val₁₁+C₆₀, lo que corresponde a un aumento de 7 kcal/mol en comparación con Val₃+C₆₀.

En AMBER como en MM+ también se observa que la energía total de los complejos con configuración de hebra β disminuye en las posiciones donde el fullereno se encuentra cercano al carboxilo terminal con respecto a otras posiciones del mismo péptido. Por lo que se podría asociar esta disminución de energía a una mejor interacción por las fuerzas de van der Waals entre el fullereno y esta posición del péptido.

El eje "y" de todas las graficas se titula: Energías totales, E (kcal/mol)

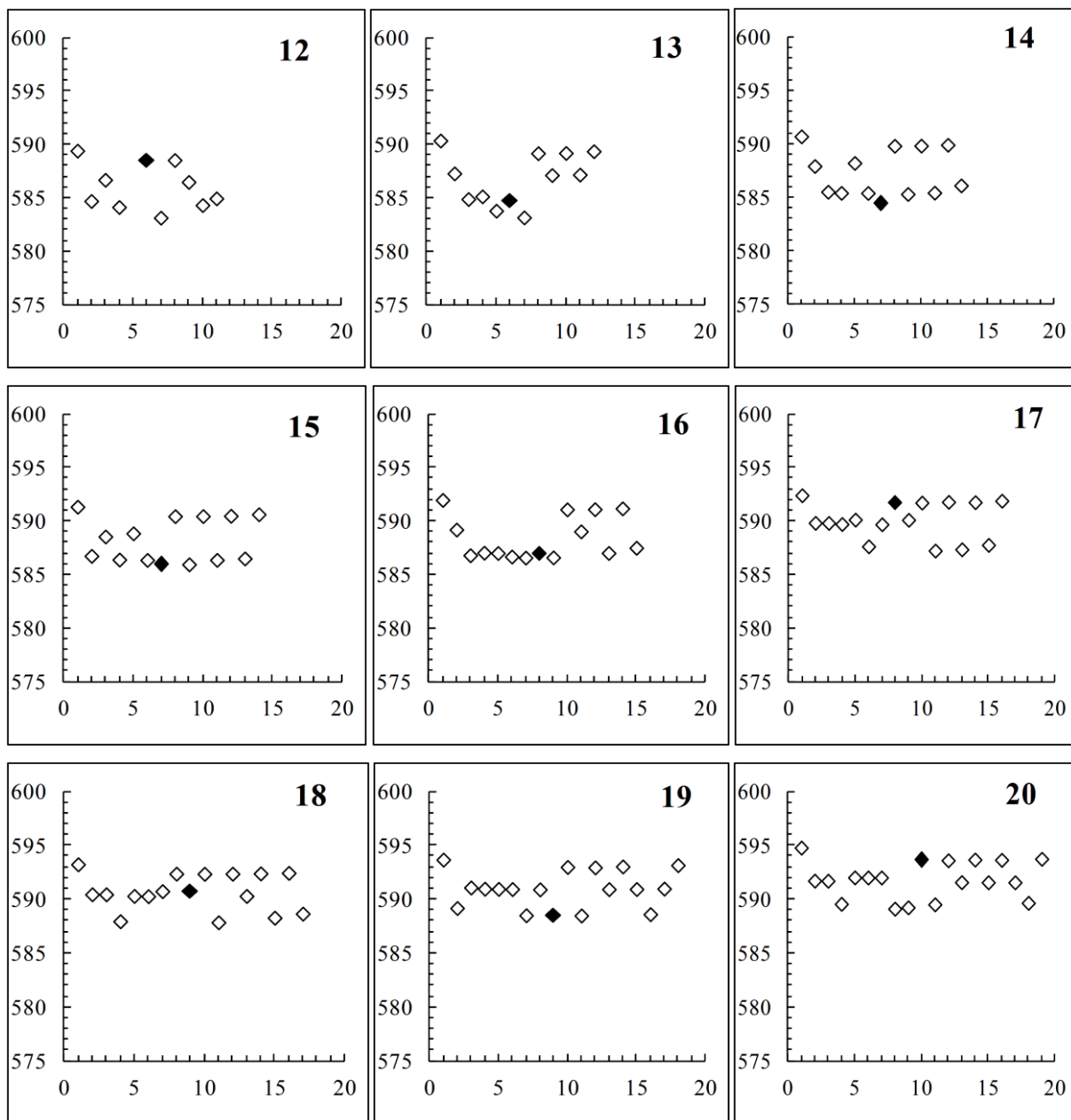


El eje "x" de todas las gráficas se titula: Posición del fullereno con respecto al péptido de valina.

Figura 19. Energías totales de los primeros 9 complejos (de Val_3+C_{60} a $Val_{11}+C_{60}$) en conformación de hebra β utilizando AMBER. Las E se dan en función de la posición de C_{60} con respecto al péptido de valina. Los residuos de valina fueron enumerados desde el amino terminal. Los puntos marcados en negro indican menores variaciones en la parte central comparándolas con las partes extremas del péptido.

En la Figura 20 se muestra las gráficas restantes para la configuración de hebra β . Aquí los valores son muy dispersos. Además las energías en estos complejos siguen aumentando con respecto al tamaño del péptido, desde 589.4 kcal/mol para la posición más cercana del fullereno con respecto al amino terminal del péptido Val₁₂ a una energía total de 594.7 kcal/mol para la misma posición del fullereno pero complejoado con un péptido Val₂₀.

El eje "y" de todas las gráficas se titula: Energías totales, E (kcal/mol)



El eje "x" de todas las gráficas se titula: Posición del fullereno con respecto al péptido de valina.

Figura 20. Energías totales de los 9 complejos restantes (de Val₃+C₆₀ a Val₁₁+C₆₀) en conformación de hebra β utilizando AMBER. Las E se dan en función de la posición de C₆₀ con respecto al péptido de valina. Los residuos de valina fueron enumerados desde el amino terminal. Los puntos marcados en negro indican menores variaciones en la parte central comparándolas con las partes extremas del péptido.

Todos los cálculos de AMBER que se produjeron, fueron menos homogéneos comparados con los obtenidos con el campo de fuerza MM+. En particular, para los complejos de la hebra β , se observa que las variaciones de E más grandes no sólo se dan en los extremos amino y carboxilo sino que también en medio de la cadena peptídica. Esto adjudicado principalmente al tipo de campo de fuerza utilizado, ya que AMBER fue diseñado para el manejo de moléculas biológicas tales como el ADN o las proteínas, sin incluir parámetros de cálculo para otras moléculas tales como los fulerenos. Además de no contar con mecanismos que permitan encontrar parámetros por *default* adecuados para el campo de fuerza como lo hace el campo de fuerza MM+.

A pesar de estas variaciones para la configuración de hebra β , se utilizaron las mismas condiciones consideradas para el análisis de los resultados de MM+, por lo que se seleccionaron los puntos medios de la Figura 19 y 20 marcados en negro para realizar la curva de ΔE contra n_{val} , cuyos resultados se muestran en la Tabla 3 y Figura 21. Aquí hay dos tendencias evidentes: la primera es parecida a los cálculos de MM+ (Figura 11), donde la energía de formación primero decrece rápidamente, pero sólo lo hace hasta el péptido Val₄, en comparación con MM+ que lo hace hasta el péptido Val₇, para después estabilizarse alrededor de 14-15 kcal/mol. Aunque algunos puntos salen de estos rangos se aprecia una tendencia.

Tabla 3 Energías de formación ΔE (en Kcal/mol) para complejos de aminoácido/péptidos + fullereno (conformación hebra β) calculadas con campo de fuerza AMBER.

Complejo	ΔE Kcal/mol	Complejo	ΔE Kcal/mol
Val + C ₆₀	-5.50	Val ₁₁ + C ₆₀	-14.60
Val ₂ + C ₆₀	-9.18	Val ₁₂ + C ₆₀	-10.20
Val ₃ + C ₆₀	-9.27	Val ₁₃ + C ₆₀	-14.60
Val ₄ + C ₆₀	-13.90	Val ₁₄ + C ₆₀	-15.60
Val ₅ + C ₆₀	-13.99	Val ₁₅ + C ₆₀	-14.70
Val ₆ + C ₆₀	-13.95	Val ₁₆ + C ₆₀	-14.29
Val ₇ + C ₆₀	-14.50	Val ₁₇ + C ₆₀	-10.19
Val ₈ + C ₆₀	-14.59	Val ₁₈ + C ₆₀	-11.80
Val ₉ + C ₆₀	-23.60	Val ₁₉ + C ₆₀	-14.67
Val ₁₀ + C ₆₀	-11.82	Val ₂₀ + C ₆₀	-10.19

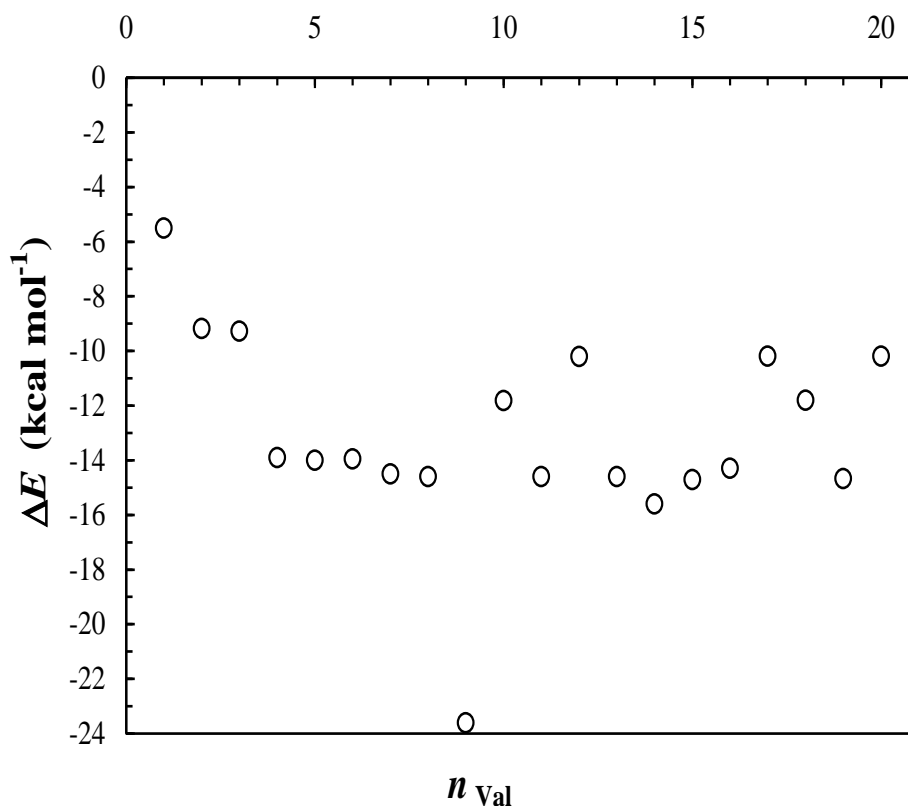


Figura 21. Energías de formación ΔE (en Kcal/mol) para complejos de aminoácido/péptidos + fullereno (conformación hebra β) calculadas con campo de fuerza AMBER.

Vale la pena mencionar que en los cálculos de los complejos de glicina y alanina para la hebra β calculados con AMBER realizados por Basiuk y Bassiouk⁴¹, los valores de ΔE decrecían gradualmente hasta los decapeptidos, la cadena más larga considerada en ese trabajo. Esta diferencia entre series de aminoácidos podría deberse a la presencia del grupo isopropilo de los residuos de valina, el cual limita la flexibilidad de la cadena peptídica. Ahora bien, sí se hace una comparación de las geometrías de los péptidos de valina con sus análogos de glicina y alanina, se puede observar que no hay tendencia a “abrazar” a la molécula de fullereno. Lo cual se observa en el análisis de conformación mostrado en la Figura 22 donde el fullereno toma la posición central de

cada uno de los 20 péptidos construidos, observándose que existe un ligero doblamiento para los péptidos Val₃ y Val₅, así como para péptidos más largos $n_{\text{Val}}=9, 10, 14,$ y $16-18$, donde existe un doblamiento mayor que en comparación con los otros péptidos. El cambio conformacional del péptido Val₁₃ merece una atención especial; ya que es donde existe el mayor doblamiento del péptido hasta adquirir una forma en “V”. En esta figura también se observa que para los péptidos $n_{\text{Val}}=8,11,12,15$ y 19 hay un acercamiento de los grupos isopropil de los aminoácidos cercanos al fullereno lo que provoca un alejamiento de los extremos del péptido, sin un cambio notable en la curvatura de los péptidos.

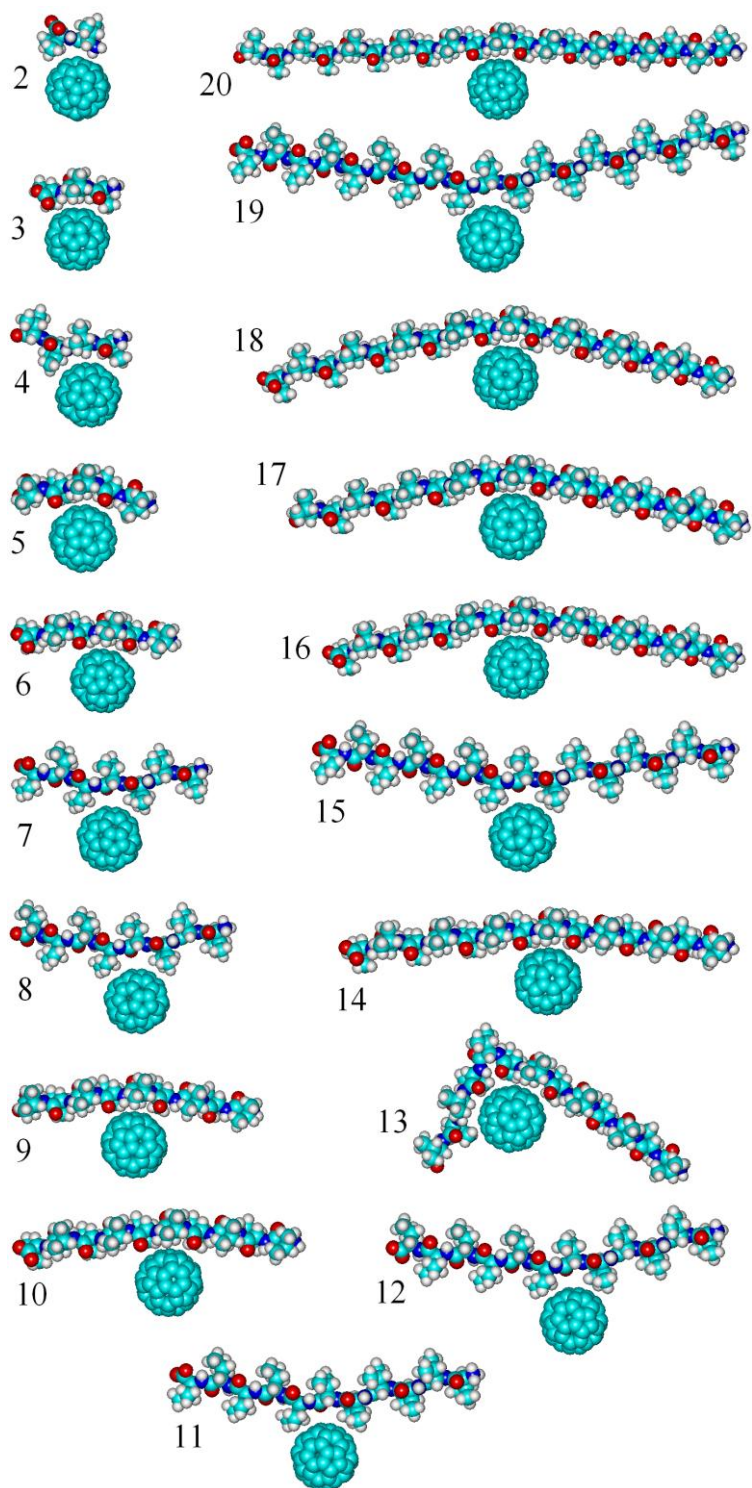


Figura 22. Cambios conformacionales de la hebra β para los 19 péptidos de valina complejados con un fullereno en la parte central del péptido. Las geometrías fueron optimizadas con AMBER.

La Figura 23 muestra los cambios conformacionales de los péptidos Val_{2,3,...,20} al complejarse con la molécula de fullereno. Esta Figura muestra que los péptidos Val₂ y Val₃ asociados a C₆₀ no tienen un cambio de conformación importante, mientras que los péptidos de los complejos Val₄+C₆₀, Val₅+C₆₀,..., Val₈+C₆₀ tienden acercarse a la molécula de fullereno induciendo un cambio conformacional en la secuencia de aminoácidos. El complejo Val₉+C₆₀ muestra la energía de formación más negativa de toda la serie lo cual corresponde con el mayor acercamiento del péptido a la molécula de C₆₀. El péptido correspondiente a Val₁₀+C₆₀ muestra que el acercamiento de este péptido es menor a Val₉+C₆₀, lo que podría implicar que las interacciones del complejo Val₉+C₆₀ son más fuertes que en comparación con Val₁₀+C₆₀. Hay que tener en cuenta que a partir de estos complejos las energías de formación varían grandemente una con respecto a la otra, además de no guardar ninguna tendencia. Los cambios conformacionales para los péptidos de Val_{11,12}+C₆₀ no son muy grandes; sin embargo, al contrario de lo que se venía observando desde el trabajo de Bassiuk y Bassiouk⁴¹ la secuencia de aminoácidos se curva en dirección opuesta al fullereno evitando “abrazar” a esta molécula. Está característica presentada para el campo de fuerza AMBER podría indicar que los caminos seguidos para llegar a la minimización de energía donde interviene una molécula de C₆₀ no sean los adecuados, esto debido a su alta variabilidad y que no se presenta una tendencia como con el campo de fuerza MM+. Hay que tener en cuenta que los péptidos sólo crecen un aminoácido a la vez; esto es, las diferencias que podrían existir entre un complejo y otro no tendrían que ser tan grandes, tanto en energía de formación como en los cambios conformacionales. Además, no hay correspondencias entre algunas energías de formación y cambios conformacionales, por ejemplo: sí tomamos la energía de formación de Val₉+C₆₀, observamos que es muy negativa, $\Delta E = -23.60$ kcal/mol, pero su cambio conformacional no corresponde con esta energía tan negativa comparando con los demás complejos, mientras que para Val₁₃+C₆₀ la energía de formación es de $\Delta E = -14.60$ kcal/mol, energía que no es comparable con Val₉+C₆₀, pero su cambio conformacional es el más grande de todo el trabajo.

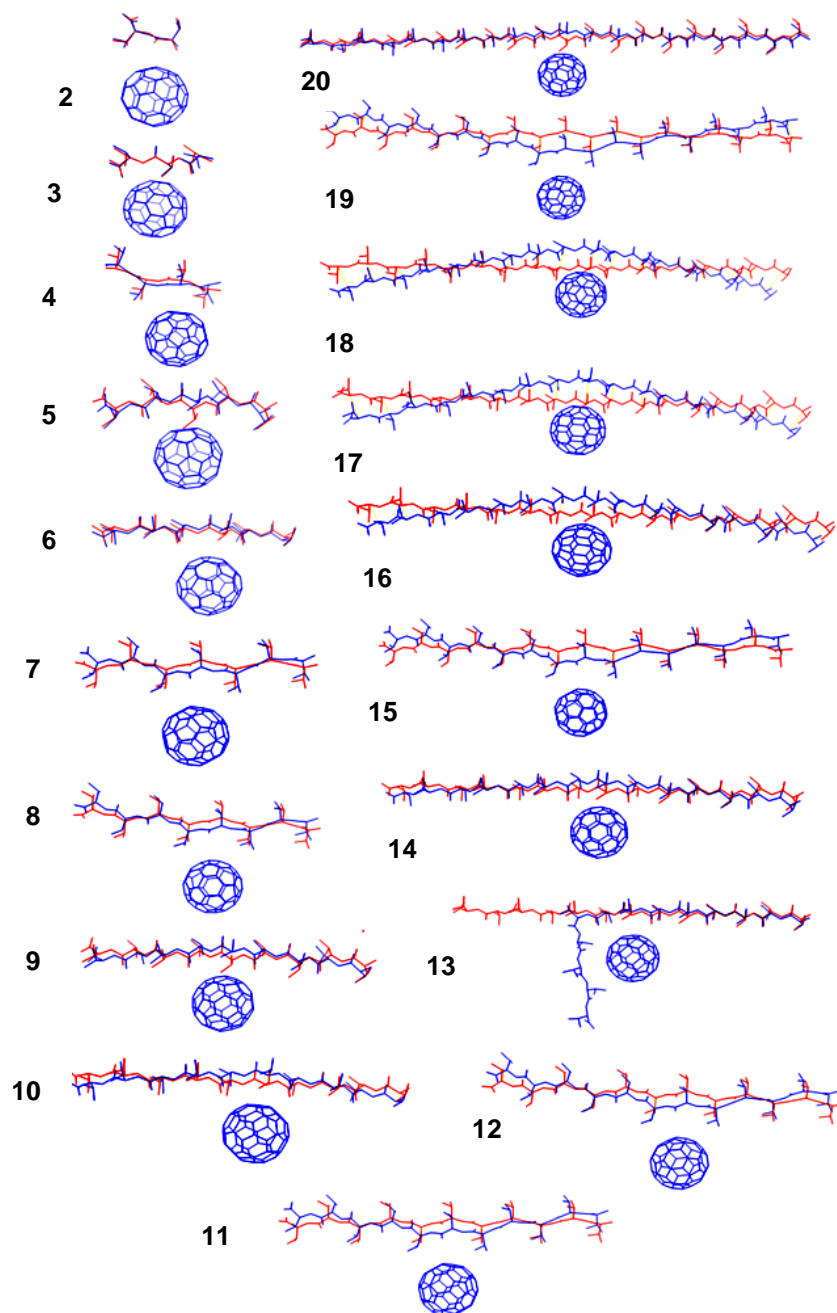


Figura 23. Alineamiento entre las moléculas peptídicas ($\text{Val}_{2,3,\dots,20}$) optimizadas sin interactuar con C_{60} , mostradas en color rojo y los complejos optimizados ($\text{Val}_2+\text{C}_{60}$, $\text{Val}_3+\text{C}_{60}, \dots, \text{Val}_{20}+\text{C}_{60}$), mostrados en color azul. Configuración de hebra β . Alineamiento realizado con PyMOL.

3.2.2. Hélice α

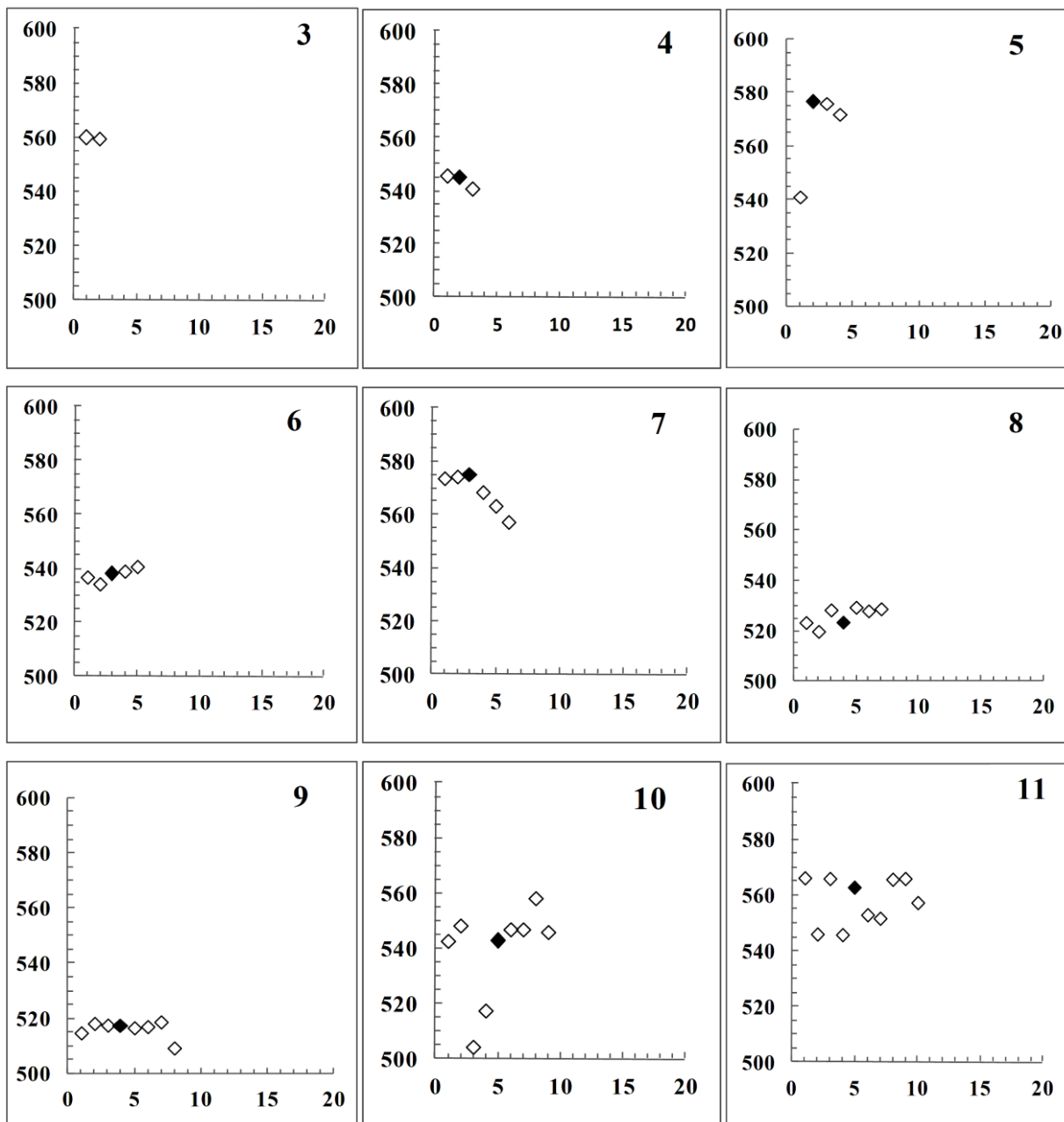
La Figura 24 muestra variaciones en la energía total de los complejos formados entre la molécula del fullereno en diferentes posiciones con respecto a los diferentes péptidos (desde el péptido Val₃ hasta el péptido Val₁₁) con una conformación de hélice α . Las variaciones son muy altas y no siguen una tendencia entre un complejo y el siguiente. Por ejemplo, si tomamos a Val₃+C₆₀ observamos que las energías entre las dos posiciones existentes son muy parecidas, pero al aumentar un aminoácido al péptido la diferencia entre una posición cercana al amino terminal (545.7 kcal/mol) con respecto a una cercana al carboxilo terminal (540.8 kcal/mol), tiene una diferencia que llega a ser de 5 kcal/mol e implicaría que la posición del carboxilo terminal es más estable, por lo que se esperaría que en el siguiente complejo se tuviera una energía total menor en esta misma posición; sin embargo, para este complejo Val₅, las diferencias son de hasta 30 kcal/mol entre estas mismas posiciones, una cercana al amino terminal con 540.9 kcal/mol y otra cercana al carboxilo con 571.8 kcal/mol, lo que implica que para este complejo la posición más estable es la cercana al amino terminal. Esta característica antagónica se muestra visualmente en las gráficas correspondientes a la Figura 24 (obsérvese los complejos antes mencionados) donde se muestra que las energías del amino terminal en algunos casos son más estables que las del carboxilo terminal, como en el tetrapéptido de valina, lo cual cambia para otros complejos como Val₅+C₆₀ donde la energía total del complejo con una posición más cercana al carboxilo terminal es menos estable que la del amino terminal.

Estas inadecuaciones también se presentan para las energías totales con respecto al aumento del tamaño del péptido. Por ejemplo se tiene una disminución de al menos 14 kcal/mol, entre el complejo Val₃+C₆₀ con una posición del fullereno cercana al amino terminal que tiene una energía total de 559.8 kcal/mol y el complejo Val₄+C₆₀ con una energía de 545.7 kcal/mol para la misma posición. Esta tendencia a disminuir en energía se mantiene hasta el péptido Val₆ llegando a un valor de energía igual a 536.8 kcal/mol (en la misma posición del fullereno con respecto al péptido), pero al agregar otro aminoácido al péptido la energía crece hasta 573.6 kcal/mol, energía que

corresponde al complejo Val₇+C₆₀. Este aumento no se mantiene para los complejos siguientes, ya que la energía total regresa a valores de 523.2 kcal/mol y 514.7 kcal/mol para los complejos Val₈+C₆₀ y Val₉+C₆₀ respectivamente. Aun más, en los últimos complejos existe otro pico de energía mostrándose un valor de 542.7 kcal/mol para Val₁₀+C₆₀ y 566.2 kcal/mol para Val₁₁+C₆₀ y su molécula de fullereno en la posición más cercana al amino terminal.

Las variaciones correspondientes a los complejos formados entre los péptidos con una hélice α y la molécula del fullereno podrían deberse al tipo de campo de fuerza, el cual como se ha comentado no fue diseñado para realizar cálculos para la molécula de fullereno.

El eje "y" de todas las graficas se titula: Energías totales, E (kcal/mol)



El eje "x" de todas las gráficas se titula: Posición del fullereno con respecto al péptido de valina.

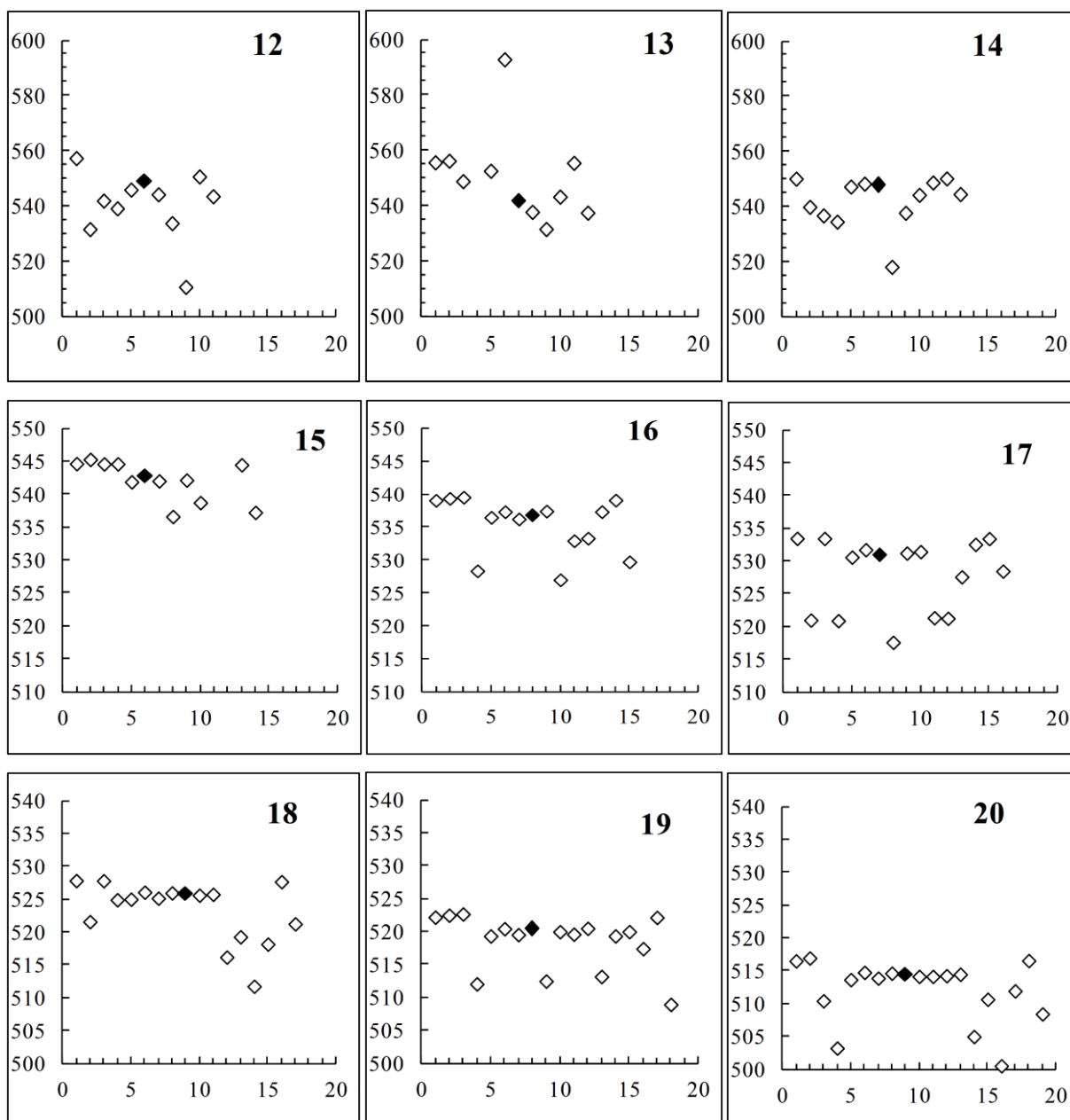
Figura 24. Energías totales de los primeros 9 complejos (de Val₃+C₆₀ a Val₁₁+C₆₀) en conformación de hélice α utilizando AMBER. Las E se dan en función de la posición de C₆₀ con respecto al péptido de valina. Los residuos de valina fueron enumerados desde el amino terminal. Los puntos marcados en negro indican menores variaciones en la parte central comparándolas con las partes extremas del péptido.

Las energías totales correspondientes a los complejos restantes muestran una tendencia hacia una menor energía total desde el primer hasta el último complejo presentados en la Figura 25. Teniéndose un valor de 557.3 kcal/mol para el complejo con Val₁₂, valor que disminuye a 555.6 kcal/mol para un complejo con Val₁₃. Los siguientes valores también disminuyen de manera progresiva, obteniéndose un valor de 516.5 kcal/mol para Val₂₀+C₆₀ con la molécula del fullereno en la posición más cercana al amino terminal.

Las energías totales indican que los complejos aumentan en estabilidad conforme se aumenta la cantidad de aminoácidos en el péptido. Indicio que podría apoyar los cálculos realizados con MM+ y la lógica de interacción entre un péptido con mayor cantidad de aminoácidos creando más enlaces de hidrógeno. Sin embargo, no hay que olvidar que los primeros complejos tuvieron grandes variaciones unos respecto de otros, debido a que este campo de fuerza no cuenta con parámetros para las moléculas de fullerenos, además de tener términos de cálculo más sencillos que MM+.

La disminución de energía también se observa en los complejos donde la posición del fullereno es más cercana al carboxilo terminal de cada péptido. En el complejo formado por el fullereno y un péptido Val₁₂, la energía de formación con una posición cercana al amino terminal es de 557.3 kcal/mol, valor que disminuye con respecto a la posición carboxilo terminal la cual es de 543.5 kcal/mol. En el siguiente complejo Val₁₃+C₆₀, se tiene la misma tendencia disminuyendo desde un valor de energía total igual a 555.6 kcal/mol a una energía total de 537.4 kcal/mol. Esta tendencia se mantiene durante toda la serie teniendo valores de energía total de 516.5 kcal/mol que bajan a una energía de 508.4 kcal/mol para el último complejo con Val₂₀. Con la información anterior se sugiere que este comportamiento no concuerda con las energías totales presentadas para el campo de fuerza MM+, ni con el comportamiento químico que se esperarían en relación a disminuir en energía total con respecto a una posición cercana al amino terminal, ya que en la posición del carboxilo habría repulsión entre moléculas y consecuentemente complejos menos estables.

El eje "y" de todas las graficas se titula: Energías totales, E (kcal/mol)



El eje "x" de todas las gráficas se titula: Posición del fullereno con respecto al péptido de valina.

Figura 25. Energías totales de los 9 complejos restantes (de Val₃+C₆₀ a Val₁₁+C₆₀) en conformación de hélice α utilizando AMBER. Las E se dan en función de la posición de C₆₀ con respecto al péptido de valina. Los residuos de valina fueron enumerados desde el amino terminal. Los puntos marcados en negro indican menores variaciones en la parte central comparándolas con las partes extremas del péptido.

La alta variabilidad de energías totales presentadas por este campo de fuerza, sugiere que AMBER es un campo de fuerza limitado en comparación con MM+ para el cálculo de energía total entre el fullereno y los péptidos de valina y en consecuencia es muy probable que existan resultados de cálculos de energía de formación inadecuados.

Las energías de formación ΔE en función de los complejos péptido+C₆₀ con una configuración de hélice α , calculada con el campo de fuerza AMBER, fueron graficadas seleccionando los puntos centrales (en negro) de la Figura 25. Los resultados de la grafica muestra pocos puntos similares a su contraparte obtenidos mediante MM+ (Figura 13) para el mismo sistema de hélice α y son mostrados en la Tabla 4 y Figura 26. Esta curva presenta cuatro puntos que están por debajo del grupo principal, lo cual es contrario a MM+, donde todos los puntos guardan una misma tendencia; sin embargo, se puede observar que las energías de formación primero decrecen (su valor absoluto incrementa), para estabilizarse después del complejo Val₁₀+C₆₀ cerca de las 16 kcal/mol. Hay que observar que la molécula de fullereno no crea ningún cambio apreciable en el cambio conformacional y la energía de formación de los complejos más largos a Val₁₀, por lo que se sugiere que el tamaño del péptido en el cual el fullereno puede causar algún efecto importante podría ser por debajo de los 10 aminoácidos de valina asociados covalentemente.

Tabla 4. Energías de formación ΔE (en Kcal/mol) para complejos de aminoácido/péptidos + fullereno calculadas con campo de fuerza AMBER.

Complejo	ΔE Kcal/mol	Complejo	ΔE Kcal/mol
Val + C ₆₀	-5.50	Val ₁₁ + C ₆₀	-16.45
Val ₂ + C ₆₀	-9.28	Val ₁₂ + C ₆₀	-20.81
Val ₃ + C ₆₀	-9.58	Val ₁₃ + C ₆₀	-26.93
Val ₄ + C ₆₀	-9.57	Val ₁₄ + C ₆₀	-15.71
Val ₅ + C ₆₀	-8.88	Val ₁₅ + C ₆₀	-15.84
Val ₆ + C ₆₀	-10.50	Val ₁₆ + C ₆₀	-15.44
Val ₇ + C ₆₀	-14.66	Val ₁₇ + C ₆₀	-29.09
Val ₈ + C ₆₀	-14.99	Val ₁₈ + C ₆₀	-15.13
Val ₉ + C ₆₀	-11.48	Val ₁₉ + C ₆₀	-14.42
Val ₁₀ + C ₆₀	-28.33	Val ₂₀ + C ₆₀	-15.59

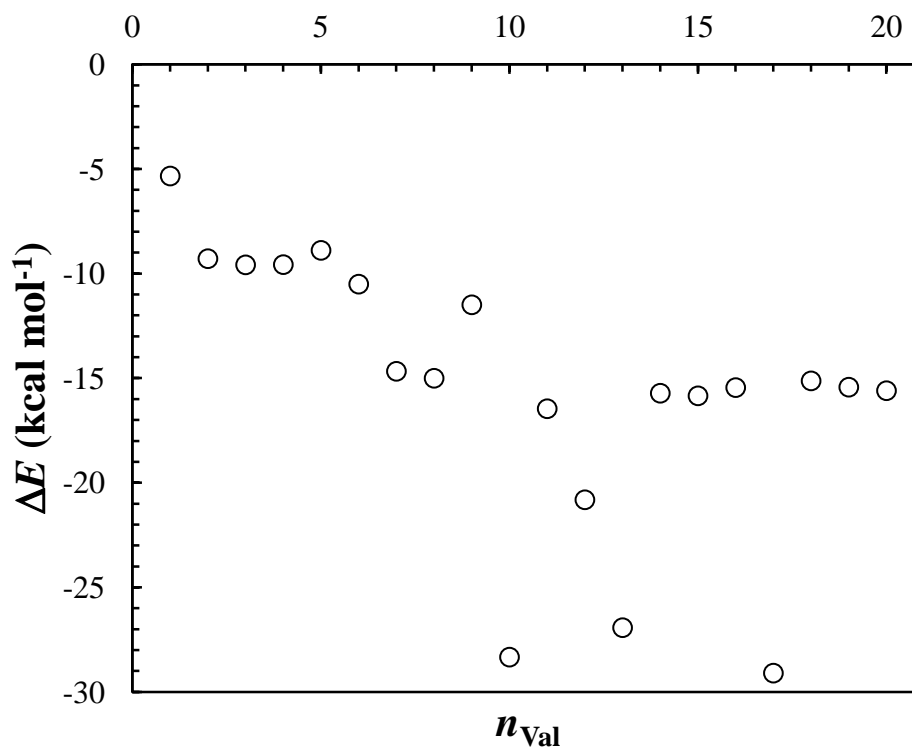


Figura 26. Energías de formación ΔE (en kcal/mol) para complejos de aminoácido/péptidos + fullereno (conformación hélice α) calculadas con campo de fuerza AMBER.

El análisis de la geometrías optimizadas de los complejos péptido+C₆₀, muestran en la mayoría de los casos que las geometrías no experimentan cambios conformacionales notables a excepción de cinco péptidos complejados con fullereno, estos son los correspondientes $n_{\text{Val}} = 7, 10, 12, 13$ y 16 , como ejemplo en la Figura 27 se muestran los cambios más representativos de estos cinco péptidos que corresponde a los péptidos Val₇ y Val₁₃, los cuales logran hacer el mejor contacto con el fullereno.

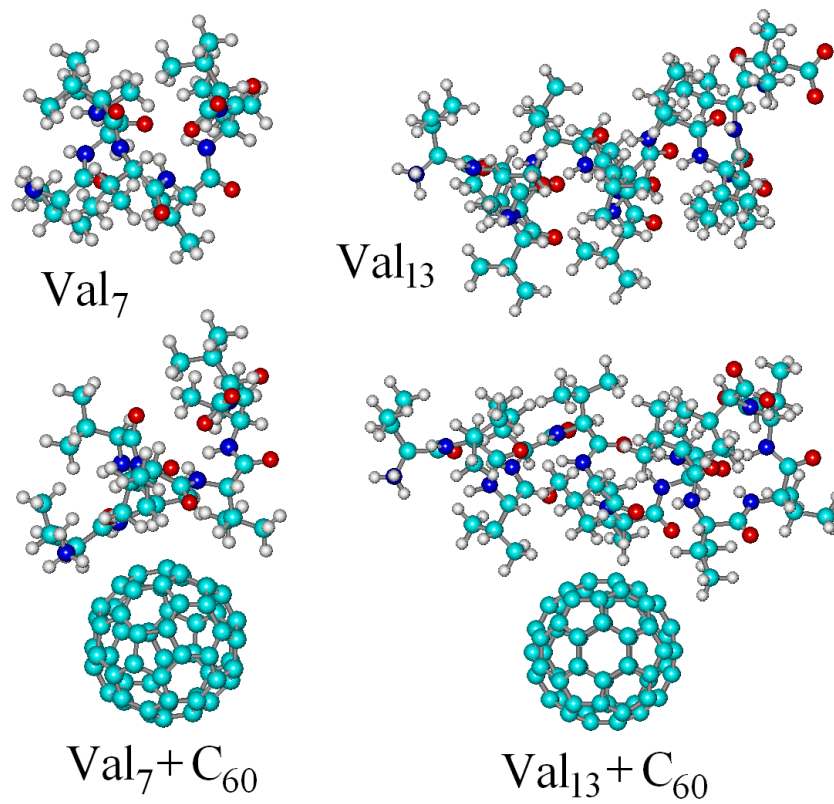


Figura 27. Cambio conformacional más representativo para los complejos entre los péptidos de la hélice α interactuando con el fullereno. Las geometrías fueron optimizadas con el campo de fuerza AMBER.

La Figura 28 muestra los alineamientos de los péptidos Val₇ y Val₁₃ y sus respectivos complejos. Los cambios conformacionales para ambos péptidos son totales, donde podemos observar que ningún punto del péptido del complejo se superpone a algún punto del péptido sin complejar. Aquí los cambios conformacionales si corresponden con las energías de formación, puesto que la energía de formación de Val₁₃+C₆₀ es una de las energías más negativas y por lo tanto es posible que tenga asociado un cambio conformacional grande con respecto al cambio conformacional de Val₇+C₆₀, donde este complejo tiene una energía de formación menos negativa y por ende menos estable que Val₁₃+C₆₀.

Hay que tener en cuenta que en esta serie también existen algunos puntos que salen de la tendencia central y que no pueden compararse con los demás complejos de la serie porque sus energías son muy negativas. Estas variaciones presentadas por AMBER, sugieren que no existe un buen tratamiento para el cálculo de la interacción entre una molécula de fullereno y un péptido de valina.

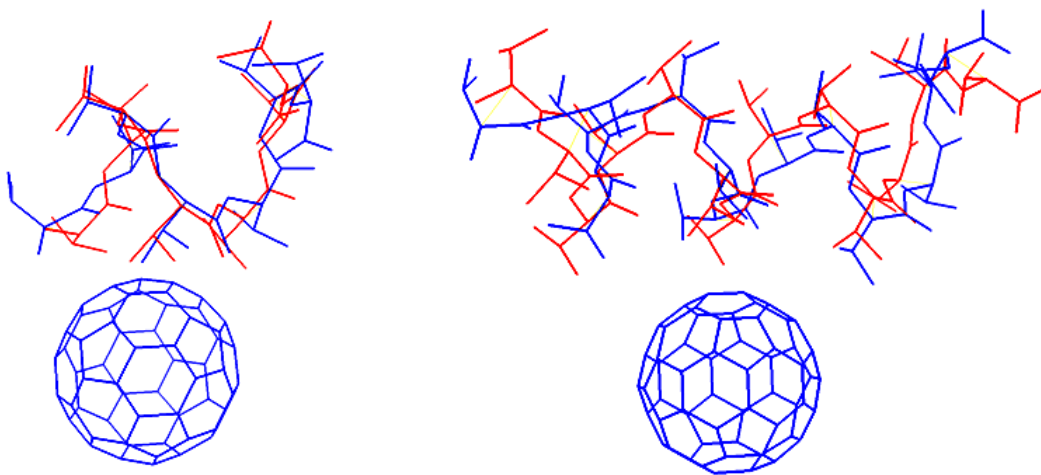


Figura 28. Alineamiento entre las moléculas peptídicas (Val_{7,13}) optimizadas sin interaccionar con C₆₀, mostradas en color rojo y los complejos optimizados (Val₇+C₆₀, Val₁₃+C₆₀), mostrados en color azul. Configuración de hélice α . Alineamiento realizado con PyMOL.

4. Conclusiones

Las simulaciones realizadas mostraron que los valores de E total calculada de los complejos exhiben una variabilidad considerable que depende de donde se coloca la molécula del fullereno. Para MM+, sí el fullereno es colocado cerca del amino o carboxilo terminal, las diferencias de E total eran muy variables entre las posiciones vecinas; sin embargo, estas se estabilizan si el fullereno se posiciona en la parte central del péptido. En AMBER el comportamiento de las E totales tienen variaciones aun mayores, pero se escogió colocar al fullereno en la parte central y así tener condiciones similares para los dos campos de fuerza en relación al cálculo de las energías de formación.

Para las curvas de energía de formación ΔE se observa que también depende del tipo de conformación del péptido, es decir, si se trata de una hélice α o hebra β y el campo de fuerza utilizado. En donde MM+ muestra que los valores de ΔE tienden a decrecer llegando a un mínimo en el péptido con 7 valinas ($\Delta E = -11.71$ kcal/mol), y después incrementa hasta el péptido con 16 valinas y decrece hasta el péptido con 20 valinas. Los casos restantes exhiben características comunes, donde las energías de formación decrecen hasta estabilizarse en un rango de 12-16 kcal/mol.

Los cambios conformacionales simulados sugieren que los la geometría de los péptidos es muy estable y rígidos (no cambian su conformación al estar interaccionando con el fullereno). Sólo en algunos casos se observaron grandes cambios conformacionales, donde las cadenas peptídicas tienden a adquirir un mejor contacto con la molécula de fullereno. En general, este trabajo sugiere que una hebra β formada de homopéptidos de Val es más flexible en comparación con una hélice α al asociarse con una molécula de fullereno.

5. Perspectivas

Todos los cálculos mostrados fueron realizados al vacío; por lo que, en un sistema real se tendrá que ajustar estas condiciones a algún solvente como agua. En este sentido se sugiere realizar estos cálculos en agua, que es el solvente más común para los péptidos de este trabajo y para cualquier sistema donde intervengan moléculas biológicas.

La dinámica molecular de estas interacciones es una buena herramienta para lograr conocer la relación entre estructura, movimiento y función, ya que estas dinámicas moleculares nos dan idea de cómo se darían las interacciones entre la molécula de fullereno y el péptido a través del tiempo, puesto que ninguna molécula es estática y siempre tiende a moverse.

Debido a que este trabajo es teórico es necesario realizar una investigación experimental y corroborar los datos teóricos que el modelaje molecular proveyó. Una técnica que permitiría ver los cambios conformacionales sería Resonancia Magnética Nuclear, la cual permite conocer qué átomos están interaccionando y si existe algún cambio en la conformación de los aminoácidos.



Interaction of L-Valine Homopeptides with Fullerene C₆₀

Vladimir A. Basiuk* and Alfredo Cruz Gregorio

*Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México,
Circuito Exterior C.U., 04510 México D.F., México*

In this theoretical study, we addressed the issue of peptide interactions with fullerene C₆₀. The peptides of choice were zwitterionic L-valine (Val) homopeptides up to 20 residues-long, in both α helix and β strand conformations, for comparison. The computational methods were the AMBER and MM+ force fields. The values of calculated total energy of peptide + C₆₀ complexes exhibited considerable variability depending on where exactly the C₆₀ molecule is positioned in the input geometry. In MM+ calculations, if fullerene was placed close to either the N or the C terminus in the input geometry, the differences in E values were rampant between the neighboring points; however, the energies generally stabilized within 1–2 kcal mol⁻¹ if the C₆₀ position turned to be close to the central Val residues of the chain. In AMBER calculations, the behavior of calculated energies was even less homogeneous. To standardize the initial geometry conditions, we placed the fullerene molecule approximately against the center of peptide chain. The shape of the $\Delta E - n_{\text{Val}}$ curves obtained depends on peptide type (α helix vs. β strand) and the force field employed. In MM+ calculations of β strand Val peptides, ΔE values had a trend to decrease (that is, the absolute values of ΔE increase), coming to a minimum at $n_{\text{Val}} = 7$ ($\Delta E = -11.71$ kcal mol⁻¹), then to increase producing a local maximum at $n_{\text{Val}} = 16$ ($\Delta E = -7.79$ kcal mol⁻¹), and to decrease again until the longest Val₂₀ studied in this work. The three other cases (MM+ for α helix, AMBER for both β strand and α helix) exhibited common features, where the formation energy first decreased then stabilized at about 12–16 kcal mol⁻¹. The geometry of Val peptides was generally very rigid and stable, and only in a few cases we observed conformational changes, where peptide chains tended to acquire a better contact with fullerene molecule.

Keywords: Valine, Peptides, Fullerene C₆₀, Interaction, Molecular Mechanics.

1. INTRODUCTION

The knowledge of how the nanoscale environment influences the structure and function of proteins and peptides is indispensable for the design and fabrication of new bio-nanohybrids and biocompatible nanomaterials for a wide spectrum of biomedical applications.^{1–16} Among all nanomaterials, carbon nanoclusters such as fullerenes and carbon nanotubes are of particular importance due to their prospective applications in pharmacology (drugs, gene and drug delivery systems, photosensitizers in photodynamic therapy, contrast agents in magnetic resonance imaging, among others), in the design of biosensors, tissue engineering, etc.^{1, 3, 15, 16}

In both chemical and biochemical terms, the interaction of carbon nanoclusters with peptides and proteins is an extremely complex process, because of a high

molecular weight and structural features of the interacting components. Proteins and higher-molecular-weight peptides exhibit enormous structural diversity, functionality and conformational flexibility, which grossly complicates understanding their behavior in the nanoscale environment. Even though no covalent bonds form upon simple contact between their molecules and carbon nanoclusters under physiological conditions, dramatical conformational changes can take place in the polypeptide backbone, resulting in a partial to complete loss of the biochemical function. This effect can be considered as positive (for example, HIV protease inhibition^{17, 18} and β -amyloid peptide aggregation in the context of Alzheimer's disease^{19, 20}) or negative (cellular delivery of proteins, enzyme-based biosensors, etc.), depending on the targeted application. Also, it is interesting to mention that in some particular cases an enhancing effect of carbon nanoclusters on enzyme stability was found in strongly denaturing environment,¹⁴ which can be evidently beneficial for the

*Author to whom correspondence should be addressed.

development of diagnostics, sensors and drug delivery vehicles.

Despite of crucial importance of the knowledge of how the positive (spherical in the case of fullerenes, and tubular in the case of carbon nanotubes) curvature can modify the protein/peptide structure and functionality, the exact molecular mechanisms are extremely difficult to study, especially experimentally. In such complex cases, scientists often appeal to theoretical tools to aid the experiment. Nevertheless, a number of reports, dealing with theoretical treatment of the model systems including fullerene derivatives and carbon nanotubes interacting with proteins and peptides, is not large. Among them, one should mention molecular dynamics simulations of the HIV-1 protease interacting with lead fullerene-based inhibitor (diphenyl C₆₀ alcohol) in three protonated states, which revealed the binding mechanism and active site structure.¹⁷ Molecular docking simulations were used in order to theoretically predict two potent fullerene analogues as anti-HIV drugs.¹⁸ According to other molecular dynamics simulations,²⁰ the interaction of low molecular weight oligomers of the Alzheimer's amyloid- β peptide spanning residues with single-walled carbon nanotubes (SWNTs) results in nanotube-induced β -barrel formation, thus suggesting carbon nanotubes as a prospective new type of therapeutic agent to retard/prevent fibrillation processes. In one more theoretical report,²¹ the interaction between SWNTs and model peptides was studied by both molecular mechanics (MM) and electronic structure theory (including density functional theory, DFT) calculations; the calculated results correlated well with experimental observations of relative binding affinity.

In our previous study²² we addressed the choice of model molecular system for more systematic theoretical studies of protein interactions with carbon nanoclusters. In particular, we suggested to account for different structural features in protein molecules, such as alpha helixes (or α helixes) and beta pleated sheets (or β sheets, which are composed of single β strands). These two types of structural arrangement represent very different ways of saturating all the hydrogen bond (H-bond) donors and acceptors in the peptide backbone, and thus exhibit different stability and conformational rigidity; consequently, one can expect that the general patterns of α helix and β sheet interaction with carbon nanoclusters are not the same. For example, since for a given amino acid sequence, the α helical peptide would contain a larger number of intramolecular H-bonds as compared to the corresponding β strand, the former should be more thermodynamically stable and structurally rigid when interacting with carbon nanoclusters. In order to verify this, we compared the changes in geometry and energy for simple homopeptides (up to decapeptides, starting with the parent amino acid) derived from glycine and *L*-alanine, arranged into α helix and β strand and interacting non-covalently with

fullerene C₆₀. The computational techniques employed included two DFT functionals (BLYP general gradient approximation and VWN local density approximation) and two force fields (AMBER and MM+). BLYP produced in a number of cases positive energies of the amino acid/peptide + C₆₀ complex formation, as well as strongly overestimated intermolecular separations, whereas VWN calculations produced reasonable and consistent values, which are preferable to be taken as a reference to compare with the results obtained with other computation techniques. Of the two force fields used, AMBER produced stronger interactions in terms of binding energies and complexation-induced conformational changes in peptide molecules, whereas the results of MM+ calculations were in much closer agreement with the data obtained by VWN DFT. The general trend in which all the calculation techniques employed coincided was a remarkable rigidity of α helical peptides and a considerable flexibility of their β strand counterparts, when interacting with C₆₀ molecule.

In the present report, we further theoretically explore the issue of peptide interactions with fullerene C₆₀. The peptides of choice are *L*-valine (*L*-Val; hereafter, Val for brevity) homopeptides (in zwitterionic form), in both α helix and β strand conformations, for comparison. On one hand, we extended the peptide length studied to 20 Val residues; on the other hand, this made DFT calculations hardly feasible, and the theoretical methods were limited to the force fields AMBER and MM+.

2. COMPUTATIONAL DETAILS

The molecular mechanics calculations were carried out using the MM+ and AMBER force fields incorporated in HyperChem version 7.0 (from Hypercube, Inc.),²³ with Polak-Ribiere gradient algorithm and a root mean square gradient of 0.005 kcal/(Å mol). Other settings were: for MM+, bond dipoles to describe electrostatic interactions, no cutoffs; for AMBER, constant dielectric permittivity of 1, 1–4 scale factors of 0.5 for both electrostatic and van der Waals interactions, no cutoffs.

Formation energies $\Delta E_{\text{Val}n+\text{C}_{60}}$ (or ΔE for simplicity) for the amino acid/peptide complexes with C₆₀ were calculated according to the following formula:

$$\Delta E_{\text{Val}n+\text{C}_{60}} = E_{\text{Val}n+\text{C}_{60}} - (E_{\text{Val}n} + E_{\text{C}_{60}})$$

where E is the corresponding absolute energy, and $n = 1 \div 20$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The force fields employed in the present study were AMBER and MM+. While AMBER was specifically designed for protein and nucleic acid computations, MM+ is a universal force field parameterized for all chemical elements. None of these two methods (likewise other

widely used force fields) was designed for the curved graphene sheet systems, such as fullerenes and carbon nanotubes. Nevertheless, MM+ is meant to apply to general organic chemistry more than other common force fields (including AMBER), which all focus on proteins and nucleic acids. The computation protocol includes a default scheme such that when MM+ fails to find a suitable force field parameter, HyperChem substitutes a default value.²⁴ Consequently, we expected to observe certain differences between the results of AMBER and MM+ calculations.

An important factor complicating the present calculations, as compared to our previous work on Gly and Ala peptides,²² is a high conformational mobility of the isopropyl side-chain in Val. This creates a large number of local minima on the potential energy surface for a peptide + C₆₀ complex, and makes their search much more time-consuming, as compared to the case of Gly and Ala (not to mention the duplicated maximum length of the peptides studied). In addition, the local minima might be very close to each other, which can cause notable variations in the calculated results (geometries and energies of the complexes) depending on where exactly the C₆₀ molecule is positioned in the input geometry. Regarding the latter factor, one should note that in the calculations of Gly and Ala complexes,²² we always placed fullerene approximately against the center of peptide chain to standardize

the initial geometry conditions. In the present work, we generally adhere to the same methodology, however found it necessary to study in detail the effect of C₆₀ position against peptide chain on the calculated energy and geometry of the peptide + C₆₀ complexes.

Figure 1 shows representative plots (starting from Val₁₂ + C₆₀ complex) demonstrating the effect of C₆₀ molecule position against the peptide chain (β strand) on the total energy of peptide + C₆₀ complex, as calculated with MM+ force field. It is evident that if fullerene is placed close to either the amino (N) or the carboxyl (C) terminus, the differences in E values are rampant between the neighboring points, in some cases of ca. 10 kcal mol⁻¹ (for example, for Val₁₃ + C₆₀ and Val₁₄ + C₆₀). However, the energies generally stabilize when the C₆₀ position turns to be close to the central Val residues of the peptide chain. This can be exemplified by the three central points marked in black in each graph, where the energy variations become as small as 1–2 kcal mol⁻¹.

It would be logic to expect visible conformational changes in the optimized complex geometries, in accordance with the above changes in energy values. Indeed, as it can be seen from Figure 2, the trend is in line with the energy variations. Placing C₆₀ molecule close to the termini (either N or C) gives rise to local bending of the β strand, which is especially clearly seen in the case of

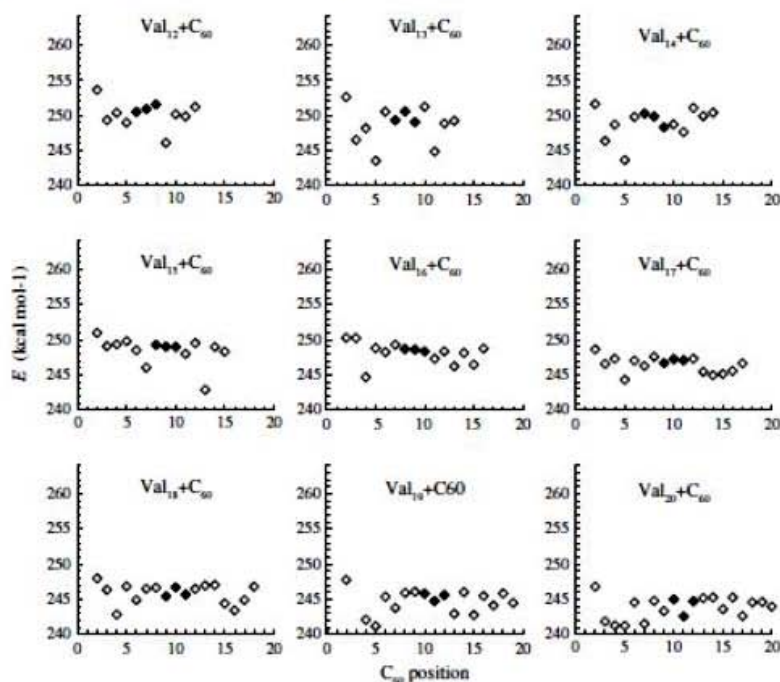


Fig. 1. The effect of C₆₀ molecule position against the peptide chain (β strand) on the total energy of peptide + C₆₀ complex, as calculated with MM+ force field. Val residues were numbered starting with the N-terminus.

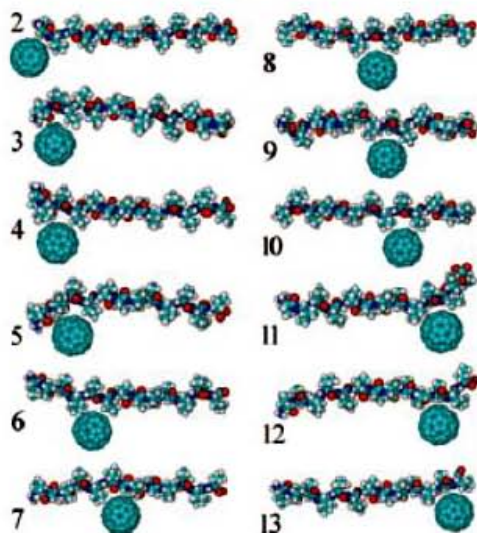


Fig. 2. The effect of C₆₀ molecule position against the peptide chain (β strand) on the conformation of Val₁₃+C₆₀ peptide. Geometries were optimized with MM+ force field. Val residues were numbered starting with the N-terminus, and the numbers indicate against what Val residue C₆₀ molecule was placed.

positions 3–5, 11 and 12 (that is, when fullerene contacts with Val residues Nos. 3–5, 11 and 12). At the same time, when C₆₀ is placed closer to the chain center, for example at the positions 6–9, the peptide geometry does not exhibit so drastic alterations.

To calculate formation energies and to plot ΔE versus n_{Val} (Fig. 3) in MM+ calculations for the β -strand Val series, we selected the central data points of the three ones marked in black in Figure 1 (that is, where the energy variations become as small as 1–2 kcal mol⁻¹). We observed some similarity to the MM+ results obtained

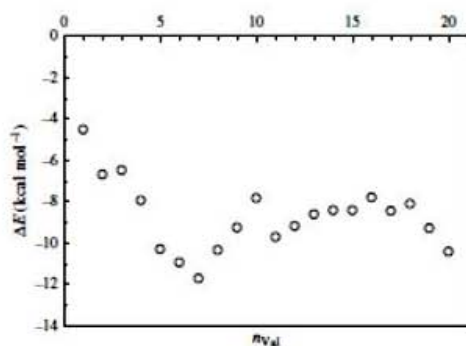


Fig. 3. Plot of formation energy ΔE , calculated with MM+ force field, versus the number of Val residues n_{Val} in amino acid/peptide + C₆₀ complexes (β strand peptide conformation).

for the β -strand Gly series, where the $\Delta E - n_{\text{Gly}}$ curve exhibited an evident minimum at $n_{\text{Gly}} = 6$.²² In the present case, first, ΔE values have a trend to decrease (that is, the absolute values of ΔE increase), coming to a minimum at $n_{\text{Val}} = 7$ ($\Delta E = -11.71$ kcal mol⁻¹), then to increase producing a local maximum at $n_{\text{Val}} = 16$ ($\Delta E = -7.79$ kcal mol⁻¹), and to decrease again until the longest Val₂₀ studied in this work. At the same time, the corresponding $\Delta E = -10.41$ kcal mol⁻¹ does not reach yet the lowest value of -11.71 kcal mol⁻¹ obtained for $n_{\text{Val}} = 7$.

Short (up to $n_{\text{Gly}} = 6$) glycine β -strand peptides were found to 'embrace' the fullerene molecule, according to the optimized MM+ geometries, whereas the analogous alanine peptides did not show such an effect.²² In this regard, β strand Val peptides are more similar to Ala peptides. Only in a few cases we observed notable conformational changes. In Figure 4, one can see two most illustrative examples for Val tri and heptapeptide, which adapt to some degree to the spherical curvature of C₆₀. (Note that

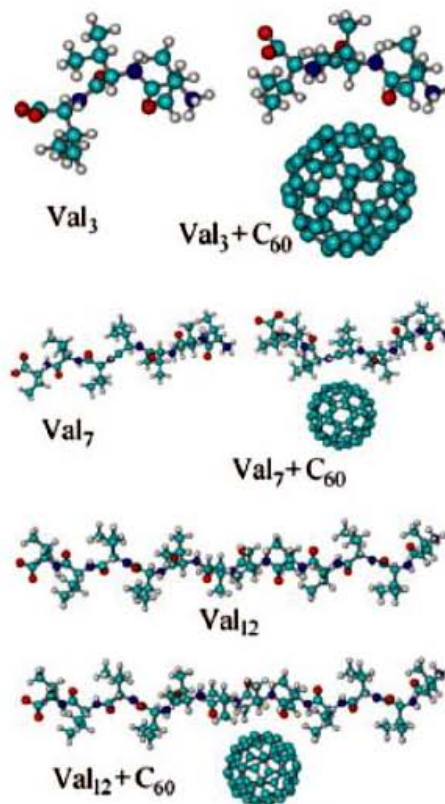


Fig. 4. Illustrative examples of conformational changes in β -strand Val peptides when interacting with C₆₀ molecule. Geometries were optimized with MM+ force field. The changes are considerable for Val₃, visible for Val₇, and undetectable for Val₁₂.

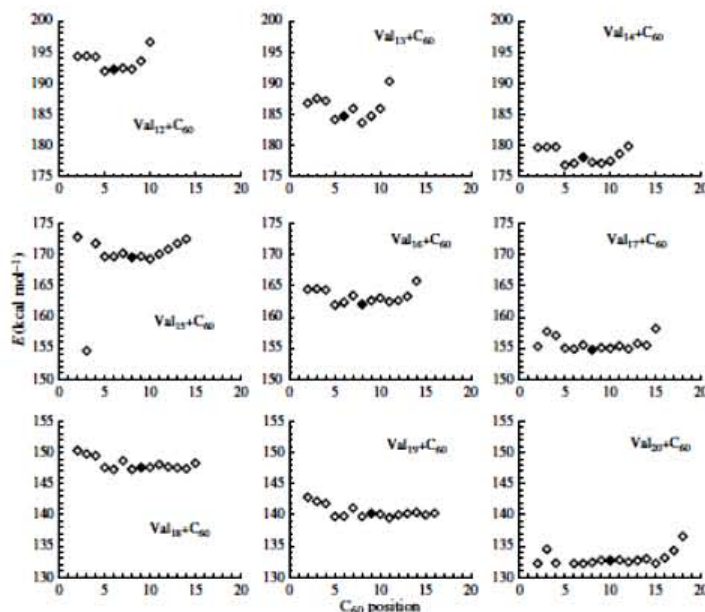


Fig. 5. The effect of C₆₀ molecule position against the peptide chain (α helix) on the total energy of peptide + C₆₀ complex, as calculated with MM+ force field. Val residues were numbered starting with the N-terminus.

it is the latter complex Val₇ + C₆₀ whose formation energy is the lowest one of all the ΔE values calculated; Fig. 3.) Most peptides, however, exhibit a remarkable rigidity, such as that of Val₁₂ (Fig. 4).

A detailed analysis of the effect of C₆₀ molecule position against the peptide chain on the total MM+ energy of peptide + C₆₀ complex was further performed for the α helix series. The most representative results (again, starting from Val₁₂ + C₆₀ complex) are shown in Figure 5.

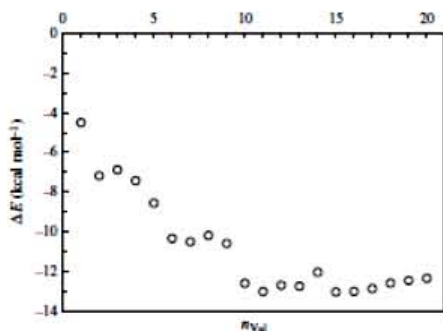


Fig. 6. Plot of formation energy ΔE , calculated with MM+ force field, versus the number of Val residues n_{Val} in amino acid/peptide + C₆₀ complexes (α helix peptide conformation).

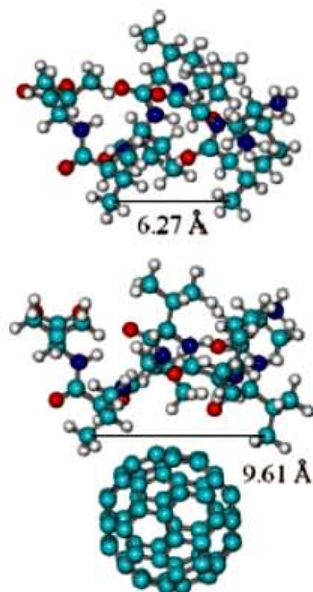


Fig. 7. The only example found of considerable conformational changes in α -helix Val peptides, Val₇, when interacting with C₆₀ molecule. Geometries were optimized with MM+ force field.

In several cases (for example, for $n_{\text{Val}} = 13, 15, 17, 20$) one can see that when fullerene is placed close to either the N or the C terminus, the E values may vary considerably between the neighboring points, although generally these variations are not that rampant as for the β strand peptides (Fig. 1). Furthermore, the range of stabilized E values is, as a whole, much wider than in the previous case, so that their choice for plotting ΔE versus n_{Val} is less critical. This relatively uniform behavior can definitely be explained by more extended system of intramolecular hydrogen bonds, and correspondingly more rigid and thermodynamically stable structure of a lone α helix as compared to a lone β strand.

The $\Delta E - n_{\text{Val}}$ plot presented in Figure 6 was obtained by using the data points marked in black in Figure 5; it would not look very different if neighboring E values were used instead to calculate formation energies ΔE . Despite of not all the data points perfectly fit into a curve, there is an evident general trend. The formation energy for peptide + C_{60} complexes gradually decrease up to the decapeptide ($n_{\text{Val}} = 10$; this part exhibits some similarity to the plots obtained for Gly and Ala peptides in our previous MM+ calculations²²), and then stabilize around 12–13 kcal mol⁻¹. In other words, after Val₁₀, further growth of the peptide chain does not give rise to stronger

interactions with fullerene. The formation energy is comparable to that of β strand conformer Val₆ + C_{60} (Fig. 3), however the fact that it does not considerably change for longer peptides (contrary to the case of β strand) suggests a stabilizing effect of intramolecular H bonds in α helical peptides, contributing stronger into the ΔE values than the intermolecular interactions between peptides and fullerene. This supposition can be supported by the comparative analysis of optimized geometries for peptides in their free state and in peptide + C_{60} complexes. In most cases, only subtle conformational changes can be detected when analyzing in detail interatomic distances and angles. We found only one example of evident conformational changes, which is Val₇ (Fig. 7). The backbone of this peptide unfolds to a degree allowing for better (larger surface) contact with C_{60} molecule. The selected C–C distance dramatically increases from 6.27 to 9.61 Å, thus serving as a good illustration for the above effect.

All the AMBER calculations undertaken produced, as a whole, less homogeneous results as compared to the data obtained with MM+ force field. To begin with, the total energies of peptide + C_{60} complexes presented more significant variations depending on where exactly fullerene molecule was positioned against the peptide chain. In particular, for β strand conformers (Fig. 8; representative

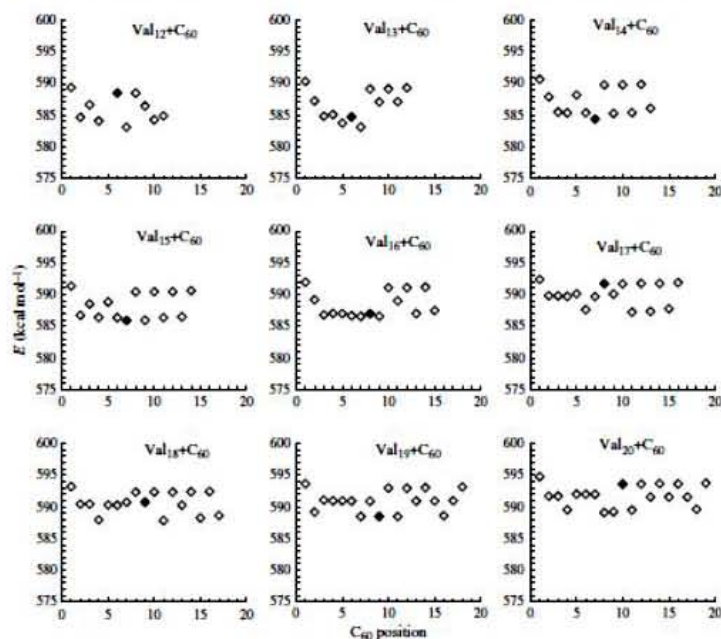


Fig. 8. The effect of C_{60} molecule position against the peptide chain (β strand) on the total energy of peptide + C_{60} complex, as calculated with AMBER force field. Val residues were numbered starting with the N-terminus.

plots starting from Val₁₂ + C₆₀ complex) in most cases the rampant variations in E values (along with variations in the optimized peptide geometries, similar to those exemplified in Fig. 2, or sometimes even more dramatic; not shown) were observed not only close to the N and C terminal Val residues, but also in the middle of peptide chain. Therefore, just to use the same conditions as for the analysis of MM+ results, to plot ΔE versus n_{Val} (Fig. 8) we selected the middle data points (marked in black in Fig. 8). The resulting graph is shown in Figure 9. There are two evident trends. As in the case of MM+ calculations (Fig. 3), the formation energy first decreases (i.e., its absolute value increases). However, this decrease is more rapid and stops at $n_{\text{Val}} = 4$, (whereas the minimum in Fig. 3 corresponds to $n_{\text{Val}} = 7$). Then, starting with Val₄, ΔE values stabilize around 14–15 kcal mol⁻¹. Even though a few points jump above and one is below the majority, this trend is obvious. It is worth to mention that in our previous calculations on β strand conformers of Gly and Ala homopeptides,²² ΔE values almost gradually decreased up to decapeptides, the longest chains considered in that work.

This difference apparently has to do with the presence of bulky α -isopropyl group in Val residue, which limits flexibility of the peptide backbone. When comparing the AMBER geometries of β strand Val peptides in their fullerene complexes (Fig. 10) with those for their Gly and Ala analogues,²² one can see that there is no trend for Val peptides to 'embrace' C₆₀ molecule. Some bending of the peptide chain toward fullerene can be detected for Val₃ and Val₅, as well as, which is more curious, for longer peptides with n_{Val} of 9, 10, 14, and 16–18. An extreme case of folding is Val₁₃ + C₆₀. On the other hand, the peptides with $n_{\text{Val}} = 8, 11, 12, 15, 19$ turn their terminal parts away from fullerene. Only Val₂₀ remains straight in the fullerene complex, without notably changing its conformation as compared to that of the isolated peptide.

In the last series of calculations, the energies of interaction of α -helix valine peptides with C₆₀ molecule were

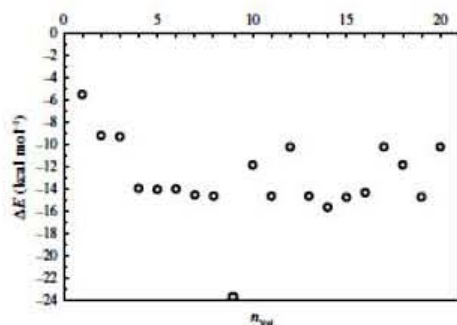


Fig. 9. Plot of formation energy ΔE , calculated with AMBER force field, versus the number of Val residues n_{Val} in amino acid/peptide + C₆₀ complexes (β strand peptide conformation).

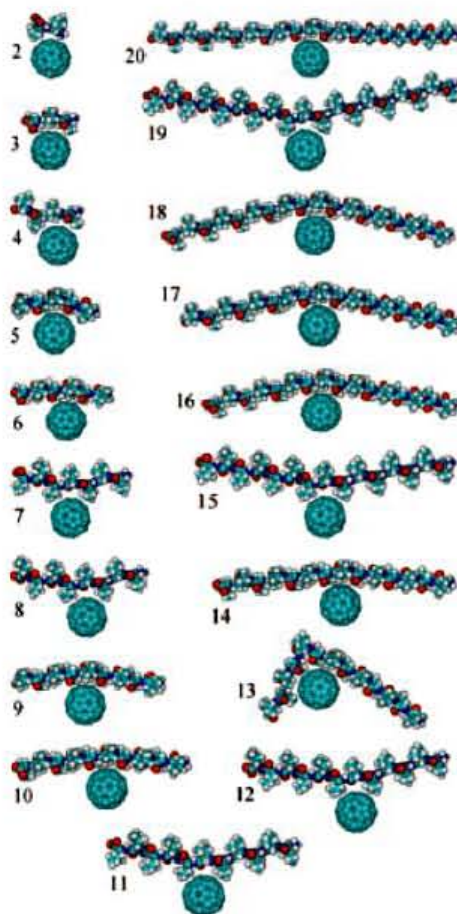
Interaction of L-Valine Homopeptides with Fullerene C₆₀

Fig. 10. Conformations of β strand Val peptides in their complexes with C₆₀. Geometries were optimized with AMBER force field. The numbers correspond to n_{Val} .

calculated with AMBER force field. The effect of fullerene position against peptide chain on the total energy of peptide + C₆₀ complex (Fig. 11; plots starting from Val₁₂ + C₆₀ complex) represents an intermediate case between the plots shown in Figures 1 and 5, on one hand, and in Figure 8, on the other hand. As in the latter series of AMBER results for β strand peptides, for a few peptides (for example, Val₁₃, Val₁₄ and Val₁₇) rampant changes in E values may be observed at any fullerene position. On the contrary, in two examples of Val₁₈ and Val₂₀, there is an extended region around the center of peptide chain where the total energy varies very insignificantly.

The dependence of formation energy ΔE , calculated with AMBER force field, versus the number of Val

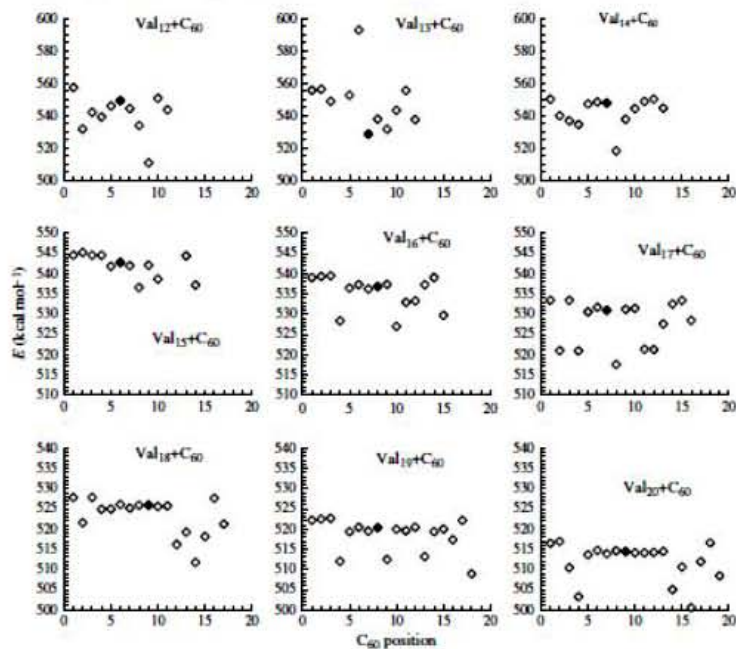


Fig. 11. The effect of C_{60} molecule position against the peptide chain (α helix) on the total energy of peptide + C_{60} complex, as calculated with AMBER force field. Val residues were numbered starting with the N-terminus.

residues n_{Val} in amino acid/peptide + C_{60} complexes for α helix peptide conformation (Fig. 12) was plotted by selecting the central (black) data points in Figure 11. The resulting plot most closely resembles its counterpart obtained by MM+ calculations on the same α helix systems (Fig. 5). The curve-fitting is worse than in the latter case, with four data points found considerably below the main group. Nevertheless, one can see a trend that the formation energy

first decreases (its absolute value increases), then stabilizes after $n_{\text{Val}} = 10$ at about 16 kcal mol^{-1} .

An analysis of the optimized geometries of peptide + C_{60} complexes showed that in most cases the geometry

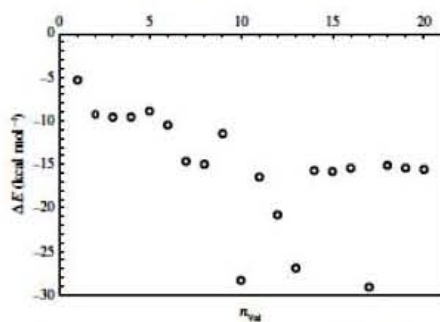


Fig. 12. Plot of formation energy ΔE , calculated with AMBER force field, versus the number of Val residues n_{Val} in amino acid/peptide + C_{60} complexes (α helix peptide conformation).

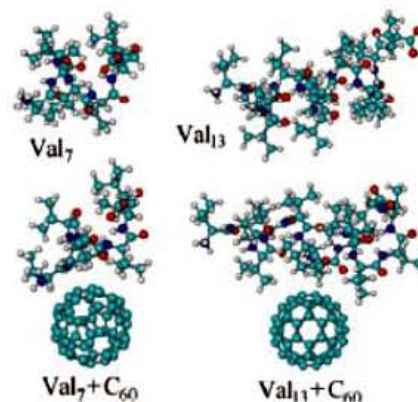


Fig. 13. Examples of significant conformational changes in α -helix Val peptides when interacting with C_{60} molecule. Geometries were optimized with AMBER force field. Other similar examples (not shown) are Val₁₀, Val₁₂ and Val₁₆.

does not undergo notable alterations. Significant conformational changes were detected for five peptides only, with $n_{\text{Val}} = 7, 10, 12, 13$ and 16 , as exemplified for Val₇ + C₆₀ and Val₁₃ + C₆₀ in Figure 13, where peptide chains tend to acquire a better contact with fullerene molecule.

4. CONCLUSIONS

The results presented in this study can be summarized as follows:

(1) The values of calculated total energy of peptide + C₆₀ complexes exhibit considerable variability depending on where exactly the C₆₀ molecule is positioned in the input geometry. In MM+ calculations, if fullerene is placed close to either the amino (N) or the carboxyl (C) terminus in the input geometry, the differences in E values are rampant between the neighboring points; however, the energies generally stabilize within 1–2 kcal mol⁻¹ if the C₆₀ position turns to be close to the central Val residues of the peptide chain. In AMBER calculations, the behavior of calculated energies is even less homogeneous. To standardize the initial geometry conditions, we suggest placing the fullerene molecule approximately against the center of peptide chain.

(2) The shape of the $\Delta E - n_{\text{Val}}$ curves obtained depends on peptide type (α helix vs. β strand) and the force field employed. In MM+ calculations of β strand Val peptides, ΔE values have a trend to decrease (that is, the absolute values of ΔE increase), coming to a minimum at $n_{\text{Val}} = 7$ ($\Delta E = -11.71$ kcal mol⁻¹), then to increase producing a local maximum at $n_{\text{Val}} = 16$ ($\Delta E = -7.79$ kcal mol⁻¹), and to decrease again until the longest Val₂₀ studied in this work. The three other cases (MM+ for α helix, AMBER for both β strand and α helix) exhibit common features, where the formation energy first decreases then stabilizes at about 12–16 kcal mol⁻¹.

(3) In both MM+ and AMBER calculations, the geometry of Val peptides is generally very stable and rigid, similarly to that of α helix Gly and Ala peptides studied previously.²² Only in a few cases we observed significant conformational changes, where peptide chains tend to acquire a better contact with fullerene molecule. β Strand peptides are more flexible, as it was indeed observed for Gly and Ala peptides,²² which 'embrace' C₆₀ to adapt to its spherical curvature. However, this was found to be very uncommon for their valine analogues, which only slightly bend toward fullerene, or sometimes even to opposite direction.

Acknowledgments: Financial support from the National Autonomous University of Mexico (UNAM; grant

DGAPA-IN100610), and from the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACyT, grant 127299) is greatly appreciated. The authors acknowledge DGSCA UNAM for computer resources.

References

1. F. Cataldo and T. Da Ros (eds.), *Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes*, Springer, Netherlands (2008).
2. C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 4128 (2001).
3. R. Bakry, R. M. Vallant, M. Najam-Ul-Haq, M. Rainer, Z. Szabo, C. W. Huck, and G. K. Bonn, *Int. J. Nanomedicine* 2, 639 (2007).
4. I. Lynch and K. A. Dawson, *Nano Today* 3, 40 (2008).
5. S. S. Karajanagi, A. A. Vertegel, R. S. Kane, and J. S. Dordick, *Langmuir* 20, 11594 (2004).
6. M. Lundqvist, I. Sethson, and B.-H. Jonsson, *Langmuir* 20, 10639 (2004).
7. P. Nednoor, M. Capaccio, V. G. Gavalas, M. S. Meier, J. E. Anthony, and L. G. Bachas, *Bioconjugate Chem.* 15, 12 (2004).
8. A. A. Vertegel, R. W. Siegel, and J. S. Dordick, *Langmuir* 20, 6800 (2004).
9. R. Hong, N. O. Fischer, A. Verma, C. M. Goodman, T. Emrick, and V. M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.* 126, 739 (2004).
10. P. Roach, D. Farrar, and C. C. Perry, *J. Am. Chem. Soc.* 128, 3939 (2006).
11. P. Asuri, S. S. Karajanagi, H. Yang, R. S. Kane, and J. S. Dordick, *Langmuir* 22, 5833 (2006).
12. P. Asuri, S. S. Karajanagi, J. S. Dordick, and R. S. Kane, *J. Am. Chem. Soc.* 128, 1046 (2006).
13. S. Linse, C. Cabaleiro-Lago, W.-F. Xue, I. Lynch, S. Lindman, E. Thulin, S. E. Radford, and K. A. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 8691 (2007).
14. P. Asuri, S. S. Karajanagi, A. A. Vertegel, J. S. Dordick, and R. S. Kane, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7, 1675 (2007).
15. C. Salvador-Morales, E. V. Basiuk, V. A. Basiuk, M. L. H. Green, and R. B. Sim, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 8, 2347 (2008).
16. C. Salvador-Morales, M. L. H. Green, and R. B. Sim, *Chemistry of Carbon Nanotubes*, edited by V. A. Basiuk and E. V. Basiuk, American Scientific Publishers, Stevenson Ranch, CA (2008), Vol. 3, Chap. 1, p. 1.
17. V. S. Lee, P. Nimmanpipug, O. Aruksakunwong, S. Promsri, P. Sompornpisut, and S. Hannongbua, *J. Mol. Graphics Model.* 26, 558 (2007).
18. S. Durlagi, C. T. Supuran, T. A. Strom, N. Doostdar, M. K. Kumar, A. R. Barron, T. Mavromoustakos, and M. G. Papadopoulos, *J. Chem. Inf. Model.* 49, 1139 (2009).
19. J. E. Kim and M. Lee, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 576 (2003).
20. Z. Fu, Y. Luo, P. Derreumaux, and G. Wei, *Biophys. J.* 97, 1795 (2009).
21. S. de Miranda Tomásio, and T. R. Walsh, *Mol. Phys.* 105, 221 (2007).
22. V. A. Basiuk and M. Bassiok, *J. Comput. Theor. Nanosci.* 8, 243 (2011).
23. <http://www.hyper.com/>.
24. HyperChem® Computational Chemistry, Hypercube, Inc. (2002), Chap. 11, p. 214.

Received: 15 June 2011. Accepted: 19 July 2011.

8. Referencias.

1. F. Cataldo y T. Da Ros, Eds., *Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes*; Springer, Netherlands (2008).
2. C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 4128 (2001).
3. R. Bakry, R. M. Vallant, M. Najam-ul-Haq, M. Rainer, Z. Szabo, C. W. Huck, y G. K. Bonn, *Int. J. Nanomedicine* 2, 639 (2007).
4. I. Lynch and K. A. Dawson, *NanoToday* 3, 40 (2008).
5. S. S. Karajanagi, A. A. Vertegel, R. S. Kane, and J. S. Dordick, *Langmuir* 20, 11594 (2004).
6. M. Lundqvist, I. Sethson, and B.-H. Jonsson, *Langmuir* 20, 10639 (2004).
7. P. Nednoor, M. Capaccio, V. G. Gavalas, M. S. Meier, J. E. Anthony, and L. G. Bachas, *Bioconjugate Chem.* 15, 12 (2004).
8. A. A. Vertegel, R. W. Siegel, and J. S. Dordick, *Langmuir* 20, 6800 (2004).
9. R. Hong, N. O. Fischer, A. Verma, C. M. Goodman, T. Emrick, and V. M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.* 126, 739 (2004).
10. P. Roach, D. Farrar, and C. C. Perry, *J. Am. Chem. Soc.* 128, 3939 (2006).
11. P. Asuri, S. S. Karajanagi, H. Yang, R. S. Kane, and J. S. Dordick, *Langmuir* 22, 5833 (2006).

12. P. Asuri, S. S. Karajanagi, J. S. Dordick, and R. S. Kane, *J. Am. Chem. Soc.* 128, 1046 (2006).
13. S. Linse, C. Cabaleiro-Lago, W.-F. Xue, I. Lynch, S. Lindman, E. Thulin, S. E. Radford, and K. A. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 8691 (2007).
14. P. Asuri, S. S. Karajanagi, A. A. Vertegel, J. S. Dordick, and R. S. Kane, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7, 1675 (2007).
15. C. Salvador-Morales, E. V. Basiuk, V. A. Basiuk, M. L. H. Green, and R. B. Sim, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 8, 2347 (2008).
16. C. Salvador-Morales, M. L. H. Green, and R. B. Sim, in *Chemistry of Carbon Nanotubes*, edited by V. A. Basiuk and E. V. Basiuk, American Scientific Publishers, Stevenson Ranch CA (2008), Vol. 3, Chap. 1, p. 1.
17. J. Han, *Carbon nanotubes science and applications*, editado por M. Mayyappan CRC press, Capitulo 1, p. 1 (2005).
18. S.M. Dresselhaus, G. Dresselhaus, P. C. Eklund, *Science of fullerenes and carbon nanotubes*, Academic Press, Capitulo 1, p. 2 (1996).
19. H. W. Kroto, J R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, R. E. Smalley, *Nature*, 318, 162 (1985).
20. H. W. Kroto, *Nature*, 329, 529 (1987).
21. A. Hirsh, *Synthesis*, 1995, 895 (1995).
22. K. Aschberger, H. Johnston H., V. Stone, R. Aitken, L. Tran, S. Hankin, S. Peters, F. Christensen, *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 58, 455 (2010).

23. S. Yamago, H. Tokuyama, E. Nakamura, K. Kikuchi, S. Kananishi, K. Sueki, H. Nakahara, S. Enomoto, F. Ambe, *Chem. Biol.* 2, 385 (1995).
24. G. Baker, A. Gupta, M. Clark, B. Valenzuela, L. Staska, S. Harbo, J. Pierce, J. Dill, *Toxicol. Sci.* 101 (1), 122 (2008).
25. X. Xia, N. Monteiro-Riviere, J. Riviere, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 242, 29 (2010).
26. J.G. Rouse, J. Yang, A.R. Barron, N.A. Monteiro-Riviere, *Toxicol. In Vitro* 20, 1313 (2006).
27. S. Kato, H. Aoshima, Y. Saitoh, N. Miwa, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 104, 483 (2009).
28. S. Kato, H. Aoshima, Y. Saitoh, N. Miwa, *J. Photochem. Photobio. B.* 98, 99 (2010).
29. H.H. Chen, C. Yu, T.H. Ueng, S. Chen, B.J. Chen, K.J. Huang, L.Y. Chiang. *Toxicol. Pathol.* 26, 143 (1998).
30. R. Bullard-Dillard, K.E. Creek, W.A. Scrivens, J.M. Tour, *Bioorg. Chem.* 24 (4), 376, 1996.
31. N. Gharbi, M. Pressac, M. Hadchouel, H. Szwarc, S.R. Wilson, F. Moussa, *Nano Lett.* 5, 2578 (2005).
32. K. Fujita, Y. Morimoto, A. Ogami, T. Myojyo, I. Tanaka, M. Shimada, W.N. Wang, A. Hocquet, M. Langgård, *J. Mol. Model.* 4, 94 (1998).
33. J. Roberts, A. Wielgus, W. Boyes, U. Andley, C. Chignell, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 228, 49 (2008).

34. E.J. Park, H. Kim, Y. Kim, J. Yi, K. Choi, K. Park, *Toxicol. Appl., Pharmacol.* 244, 226 (2010).
35. B.F. Erlanger, B.X. Chen, M. Zhu, L. Brus, *Nano Lett.* 1, 465 (2001).
36. V. S. Lee, P. Nimmanpipug, O. Aruksakunwong, S. Promsri, P. Sompornpisut, and S. Hannongbua, *J. Mol. Graphics Model.* 26, 558 (2007).
37. S. Durdagi, C. T. Supuran, T. A. Strom, N. Doostdar, M. K. Kumar, A. R. Barron, T. Mavromoustakos, and M. G. Papadopoulos, *J. Chem. Inf. Model.* 49, 1139 (2009).
38. J. E. Kim and M. Lee, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 576 (2003).
39. Z. Fu, Y. Luo, P. Derreumaux, and G. Wei, *Biophys. J.* 97, 1795 (2009).
40. S. de Miranda Tomásio and T. R. Walsh, *Mol. Phys.* 105, 221 (2007).
41. V. A. Basiuk and M. Bassioui, *J. Comput. Theor. Nanosci.* 8, 243 (2011).
42. D. Srivastava, *Carbon nanotubes science and applications*, editado por M. Meyyappan, CRC press (2005), Cap. 2, p. 25.
43. F.H. Westheimer, J.E. Mayer, *J Chem Phys.* 14, 733 (1946).
44. T.L. Hill, *J. Chem Phys.* 14, 465 (1946).
45. E.M. Engler, J.D. Andose, PvR. Schleyer, *J. Am Chem Soc.* 95, 8005 (1973).
46. J.E. Williams, P.J. Stang, PvR. Schleyer, *Ann Rev Phys Chem.* 19, 531(1968).

47. U. Burkert, N.L. Allinger, *Molecular mechanics*, ACS Monograph 177. American Chemical Society, Washington, DC (1982).
48. N.L. Allinger, *Advances in physical organic chemistry*, editado por V. Gold, D. Bethell, Academic, New York, vol 13, *Calculation of molecular structures and energy by force methods* (1976).
49. E. Lewars, *Computational Chemistry Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics*, Springer, 2^a edición, 45 (2011).
50. A. Hocquet y M. Langgård. An Evaluation of the MM+ Force Field, *Journal of Molecular Modeling*, 3, 94 (1998).
51. W.D. Cornell, P. Cieplak, C.I. Bayly, I.R. Gould, K.M. Merz, D.M. Ferguson, D.C. Spellmeyer, T. Fox, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, *J Am Chem Soc.* 117, 5179 (1995).
52. <http://www.hyper.com/>
53. <http://www.pymol.org/>