

M M M M M M M M M M M M M M M M  
M M M M M M M M M M M M M M M M  
M M M M M M M M M M M M M M M M



UNIVERSITAT POLITÈCNICA  
DE CATALUNYA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA  
DE CATALUNYA

E.T.S.E.I.B.

Departament  
d'Enginyeria  
Química

# **SIMULACIÓN DE ESTRUCTURAS Y PROPIEDADES DE POLIAMIDAS HELICOIDALES**

Memoria presentada por David Zanuy Gómara  
para optar al grado de Doctor en Ciencias  
Químicas.

Trabajo realizado en el Departament  
D'Enginyeria Química de la UPC, bajo la  
dirección del Dr. Carlos Alemán Llansó.

T  
01/120

Barcelona, Marzo de 2001



T 01/120  
140035-283

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral ha podido ser realizada gracias a la colaboración, la ayuda y, en muchos casos, al soporte moral de muchas personas a las cuales quiero expresar mi gratitud.

En primer lugar, y de forma muy especial, quisiera mencionar a la persona que ha hecho posible que yo haya podido llegar a este punto en vida profesional, mi director de tesis, el Dr. Carlos Alemán Llansó. Todo lo que actualmente sé relacionado con la investigación científica se lo debo a él. Trabajar a su lado me ha permitido encontrar ese eslabón invisible existente entre los conocimientos teóricos y su aplicación como herramienta de trabajo. Sus consejos y su extrema vitalidad, han hecho que el sueño de mi infancia sea una realidad. Poder dedicar mi vida al conocimiento. Sin ninguna duda, trabajar a su lado ha sido un placer y un honor. Gracias por todo, “jefe”.

A continuación quisiera agradecer al Dr. Sebastián Muñoz Guerra, Catedrático del Departament d'Enginyeria Química de la UPC, por haberme dado la posibilidad de trabajar en su grupo de investigación, proporcionándome los medios materiales para poder realizar esta memoria.

Debo mencionar con especial cariño al Dr. Dino Ferro, quien me acogió en su grupo de investigación durante unos meses en Milano. Con él pude obtener una parte importante de los resultados que presento en esta memoria y con él compartí el tópico de que la realidad depende del punto de vista en que se quiera ver.

Del resto de las personas que me han acompañado en estos últimos años creo que podría escribir una memoria entera acerca de ellos. Aún así, no querría dejarles sin su pequeño momento de gloria. Primeramente, quisiera agradecer al Dr. León (Salvi o Tore, según el momento) su apoyo, ayuda y amistad durante los años que compartimos despacho y jefe. Al mismo tiempo, no puedo olvidarme del señor Amador, el gran olvidado en todas las tesis, sin el cual seríamos carne del arduo trabajo infraestructural (fotocopias y demás), así como de la señora Conchi, la supersercretaria, siempre dispuesta a conseguirte esa caja de disquetes o ese necesario “boli bich”. También

quisiera agradecer a todos aquellos compañeros del Departamento que ha sido “víctimas” de mi compulsiva adicción a la cafeína, por compartir conmigo en el Bar algún momento de su preciado tiempo: el señor Iñaki, la señora Herranz, la señorita Encarna y, en los últimos meses, la señorita Cèlia Prieto. Y tampoco no puedo olvidarme de todos los damnificados por la comida de nuestro Bar, don Atxón Martínez de Iarduya, doña “Margarita, Margarita” Morillo (sí, ya lo sé, Marga para los amigos), el senyor Jordi Bou Serra, doña Àngels Campillo y don Xavier Vidal. Una mención a parte se merecen dos personas que, muy a pesar mío, se han convertido en amigas mías: el sargento más divertido y encantador de Sta. Coloma de Gramanet, Celia Regaño, y el impresentable bebedor de cerveza don Darwin Kint. Ambos hacen bueno el dicho de dime con quien vas y te diré lo que no debes ser. Finalmente, desearía recordar al resto de los compañeros y compañeras que han compartido parte de su vida aguantando mis “neuras”.

Pero como el trabajo no lo es todo en la vida, aunque a veces haya llegado a dudarlo, quiero también agradecer el apoyo y la amistad que me ha ofrecido todo el elenco de personas que conforman mi “otra vida”. Quiero empezar por la tropa con la que comparto la mayoría de mis jornadas golfas: “en Cesc, en Mauri, en Joan, en Jordi, en Marc, la Coralí i la Carol” (pensando en ellos no puedo escribir en español). Sin ellos, la vida sería demasiado aburrida. Pero, de forma más dispersa, existen otras personas a las que también tengo mucho que agradecer: a mi amiga Anita, a los hermanos Villaseñor (don Ferran el “místico - politólogo” y doña Paloma, la chica más dura al Oeste del Ter), al “Ferran vell” o la visión etanólica del anochecer, a mi prometida Charito (ya falta menos, querida), a la Martona y sus “sisters”, las más dulces tentaciones de la noche barcelonesa y, finalmente, al señor Defize, el mejor amigo del primo Jim.

Y, como no, a mis progenitores. Sin ellos no lo habría conseguido. Ambos han sido mi sustento y mi guía. Gracia por aguantar al “curcó” de vuestro hijo.

Me olvidaba. Este trabajo ha podido ser realizado gracias a la ayuda económica concedida por el Ministerio de Educación y Cultura por medio de una beca del Programa de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Cultura. Ya está dicho.



“... Hey, mamma, look at me!  
I’m gonna way to the promised land,  
I’m gonna highway to Hell!!!”

Bon Scott, 1979

A mi tío Jack, por tantas lúcidas veladas.



## ABREVIATURAS

AMI	<i>Austin Model I</i>
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i>
CD	<i>Circular Dichroism</i>
CCB	<i>Contunuum Configurational Bias</i>
CHAMP'93	<i>Conformational (Hyper)Analysis Milan Package, versión 1993.</i>
CLOA	Combinación Lineal de Orbitales Atómicos
DFT	<i>Density Functional Theory</i>
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
DZ	base Doble Zeta
FF	<i>Force Field</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infra Red</i>
GTO	<i>Gaussian Type Orbital</i>
GEMOX	<i>GEneración de MOdelos moleculares compatibles con datos de difracción de rayos X</i>
HF	<i>Hartree-Fock</i>
IR	Infra Rojo
MC	<i>Monte Carlo</i>
MD	<i>Molecular Dynamics</i>
MEP	<i>Molecular Electrostatic Potential</i>
MPn	<i>Møller-Plesset de orden n</i>
nATMA	<i>n-AlquilTrimetilAmonio</i>
NDDO	<i>Neglect of Diatomic Differential Overlap</i>
NMR	<i>Magnetic Nuclear Ressonance</i>
NPT	Formalismo isobárico-isométrico
NVT	Formalismo canónico
OA	Orbitales Atómicos
OM	Orbitales Moleculares
ORD	<i>Optical Rotatory Dispersion</i>
PAALA-n	Poli( $\alpha$ -n-alquil- $\beta$ -L-asparto)
PGGA	<i>Poly(<math>\gamma</math>-glutamic) acid</i>

---

<b>PGDGA</b>	<i>Poly(<math>\gamma</math>-D-glutamic) acid</i>
<b>PAAG-2</b>	<i>Poli(<math>\alpha</math>-etil-<math>\gamma</math>-glutamato)</i>
<b>PAAG-<i>n</i></b>	<i>Poli(<math>\alpha</math>-<i>n</i>-alquil-<math>\gamma</math>-glutamato)</i>
<b>PABG</b>	<i>Poli(<math>\alpha</math>-bencil-<math>\gamma</math>-glutamato)</i>
<b>PABDG</b>	<i>Poli(<math>\alpha</math>-bencil-D-<math>\gamma</math>-glutamato)</i>
<b>PAB(D,L)G</b>	<i>Poli(<math>\alpha</math>-bencil-D,L-<math>\gamma</math>-glutamato)</i>
<b>PCSP</b>	<i>Prediction of the Crystalline Structure of Polymers</i>
<b>PCM</b>	<i>Polarizable Continuum Model</i>
<b>PMP</b>	<i>Poly(4-methyl-1-pentene)</i>
<b>RMN</b>	<i>Resonancia Magnética Nuclear</i>
<b>SAXD</b>	<i>Small-Angle X-ray Diffractogram</i>
<b>SCF</b>	<i>Self-Consistent Field</i>
<b>STO</b>	<i>Slater Type Orbital</i>
<b>TZ</b>	<i>base Triple Z</i>
<b>UV</b>	<i>Ultra Violet</i>
<b>WAXD</b>	<i>Wide-Angle X-ray Diffractogram</i>

**ÍNDICE**

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>I.1. Aplicaciones de los materiales poliméricos</b>	<b>3</b>
<b>I.2. Relación entre estructura y propiedades</b>	<b>5</b>
<b>I.2.1. La estructura de los polímeros</b>	<b>6</b>
<b>I.2.2. Caracterización de la estructura de los polímeros</b>	<b>7</b>
<b>I.3. La simulación computacional en química de polímeros</b>	<b>9</b>
<b>I.3.1. Determinación de la estructura cristalina</b>	<b>10</b>
<b>I.3.2. Predicción de propiedades macroscópicas</b>	<b>11</b>
<b>I.3.3. Limitaciones de las simulaciones computacionales en polímeros</b>	<b>14</b>
<b>II. MÉTODOS</b>	<b>17</b>
<b>II.1. Métodos Cuánticos</b>	<b>19</b>
<b>II.1.1. Métodos ab initio</b>	<b>20</b>
<b>II.1.2. Métodos semiempíricos</b>	<b>23</b>
<b>II.1.3. Métodos basados en la teoría del funcional de la densidad</b>	<b>24</b>
<b>II.2. Métodos Clásicos: Mecánica Molecular</b>	<b>25</b>
<b>II.2.1. Cálculo de la energía en un campo de fuerzas</b>	<b>26</b>
<b>II.2.1.1. Campo de fuerzas Amber</b>	<b>27</b>
<b>II.2.1.2. Campo de fuerzas de Allinger: MM2</b>	<b>30</b>
<b>II.3. Métodos de simulación basados en la mecánica clásica</b>	<b>32</b>
<b>II.3.1. Estrategias para la simulación de sistemas cristalinos</b>	<b>32</b>
<b>II.3.1.1. Determinación de la conformación molecular: el programa <i>Gemox</i></b>	<b>33</b>
<b>II.3.1.2. Estudio del empaquetamiento cristalino</b>	<b>34</b>
<b>II.3.1.2.1. El programa <i>PCSP</i></b>	<b>34</b>



II.3.1.2.2. <i>El programa CHAMP 93</i>	35
II.4. <i>Minimización de la energía</i>	36
II.5. <i>Dinámica Molecular</i>	37
II.6. <i>Monte Carlo</i>	39
II.7. <i>Métodos de simulación de sistemas en disolución</i>	41
III. <b>OBJETIVOS</b>	47
IV. <b>ESTUDIOS CONFORMACIONALES DEL ÁCIDO POLI(<math>\gamma</math>-GLUTÁMICO) (PGGA)</b>	49
IV.1. <i>Obtención del polímero de origen natural</i>	51
IV.2. <i>Estructura del poli(<math>\gamma</math>-glutámico)</i>	52
IV.2.1. <i>Estructura en estado sólido</i>	53
IV.2.2. <i>Conformación en disolución acuosa</i>	53
IV.3. <i>Análisis comparativo del isómero constitucional del ácido poli(<math>\gamma</math>-glutámico): el ácido poli(<math>\alpha</math>-glutámico)</i>	56
IV.4. <i>Objetivos específicos</i>	58
IV.5. <i>“On the helical conformation of un-ionized poly(<math>\gamma</math>-glutamic acid)”</i>	59
IV.6. <i>“A microscopic view of a helical poly(<math>\gamma</math>-peptide): Molecular dynamics simulation of 20-residue un-ionized poly(<math>\gamma</math>-glutamic acid) in water”</i>	71
IV.7. <i>“Poly(<math>\gamma</math>-glutamic acid) in aqueous solution: Molecular dynamics simulations of 10- and 20-residues chains at different temperatures”</i>	81
IV.8. <i>“Molecular Modeling of the <math>\alpha</math>-Helix Conformation of Homopeptides Constituted of <math>\alpha</math>-L-Glutamic acid”</i>	111
IV.9. <i>Conclusiones parciales</i>	121
V. <b>ESTRUCTURA DE LOS POLI(<math>\alpha</math>-ALQUIL-<math>\gamma</math>-GLUTAMATO)S</b>	123
V.1. <i>Obtención de los poli(<math>\gamma</math>-glutamato)s</i>	125
V.2. <i>Estructura de los poli(<math>\gamma</math>-glutamato)s</i>	126

V.2.1. <i>Estructura de ésteres obtenidos mediante síntesis química</i>	127
V.2.2. <i>Ésteres derivados del ácido poli(<math>\gamma</math>-glutámico) de biosíntesis</i>	128
V.2.2.1. <i>Poli(<math>\alpha</math>-benzil-<math>\gamma</math>-glutamato). Relación entre estructura y la proporción de enantiómero</i>	129
V.2.2.2. <i>Poli (<math>\alpha</math>-alquil-<math>\gamma</math>-glutamato). Ésteres de alquilo lineales y ramificados.</i>	131
V.2.2.2.1. <i>Grupos alquilo lineales cortos y ramificados</i>	131
V.2.2.3. <i>La forma cristalina III: modelos propuestos</i>	132
V.3. <i>Objetivos específicos</i>	135
V.4. <i>“Crystal Structure of Poly(<math>\alpha</math>-benzyl-<math>\gamma</math>-glutamate) of Microbial Origin”</i>	137
V.5. <i>La forma II del poli(<math>\alpha</math>-etil-<math>\gamma</math>-glutamato)</i>	173
V.5.1. <i>Métodos</i>	173
V.5.2. <i>Resultados</i>	174
V.6. <i>“A computation study of poly(<math>\alpha</math>-ethyl-<math>\gamma</math>-glutamate): Application of force-field calculations to determine the crystal structure of form III”</i>	179
V.7. <i>Conclusiones parciales</i>	209

## VI. ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES Y LAS PROPIEDADES CONFORMACIONALES DE LOS COMPLEJOS POLIELECTROLITO-TENSIOACTIVO DERIVADOS DE POLIPÉPTIDOS. 211

VI.1. <i>Auto asociación.</i>	213
VI.1.1. <i>Complejos polielectrolito – tensioactivo.</i>	214
VI.1.2. <i>Estequiometría de los complejos.</i>	214
VI.2. <i>Complejos polielectrolito-tensioactivo derivados de polipéptidos.</i>	216
VI.2.1. <i>Conformación en disolución.</i>	216
VI.2.2. <i>Estado sólido. Conformación y estructura.</i>	217
VI.2.2.1. <i>Conformación de las cadenas de polipéptido.</i>	218
VI.2.2.2. <i>Conformación de las cadenas laterales del tensioactivo.</i>	218
VI.2.2.3. <i>Estructura supramolecular. Organización bifásica.</i>	219

<b>VI.3. Nuevos complejos estequiométricos basados en el ácido poli(<math>\gamma</math>-glutámico) de biosíntesis</b>	220
<b>VI.3.1. Estructura de los complejos PGGA-nATMA en estado sólido.</b>	222
<b>VI.4. Objetivos Parciales</b>	225
<b>VI.5. "A quantum mechanical study of the ionic interactions in model compounds of poly-electrolite-surfactant complexes derived from polypeptides"</b>	227
<b>VI.6. "Binding in Complex Ionic Systems: Anticooperative Effects in Systems Stabilized by Electrostatic Interactions"</b>	239
<b>VI.7. "A Molecular Dynamics Study in Chloroform Solution of the Stoichiometric Complex Formed by Poly(<math>\alpha</math>,L-glutamate) and Octyltrimethylammonium"</b>	265
<b>VI.8. Complejos autoasociados derivados del PGGA</b>	303
<b>VI.9. Conclusiones parciales</b>	317
<b>VII. ESTRUCTURA DE LOS POLI(<math>\alpha</math>-ALQUIL-<math>\beta</math>-L-ASPARTATO)S CON GRUPOS ALQUILO LARGOS</b>	319
<b>VII.1. Polímeros tipo peine</b>	321
<b>VII.2. Polímeros tipo peine derivados de polipéptidos con cadenas laterales alquílicas</b>	322
<b>VII.2.1. Poli(<math>\gamma</math>-alquil-<math>\alpha</math>-L-glutamato)s</b>	323
<b>VII.2.2. Transiciones de fase de los Poli(<math>\gamma</math>-alquil-<math>\alpha</math>-L-glutamato)s con una longitud de cadena alifática igual o superior a 10 átomos de carbono</b>	324
<b>VII.3. Poli (<math>\alpha</math>-alquil-<math>\beta</math>-L-aspartato)s</b>	325
<b>VII.3.1. Estructura de los poli(<math>\alpha</math>-alquil-<math>\beta</math>-L-aspartato)s con grupos alquilo lineales</b>	325
<b>VII.3.2. Transiciones de fase en los PAALA-n con <math>n \geq 12</math></b>	326
<b>VII.3.3. Microestructura de la fase B en PAALA-n con <math>n \geq 12</math></b>	327
<b>VII.4. Objetivos Parciales</b>	331
<b>VII.5. "On the structure of phase A of comblike poly(<math>\alpha</math>-alkyl-<math>\beta</math>-L-aspartate)s: a molecular modelling study"</b>	333
<b>VII.6. Estudio de la transición de fase B <math>\rightarrow</math> C en el PAALA-18</b>	343
<b>VII.7. Conclusiones parciales</b>	357

**VIII. SOLUBILIDAD DE GASES EN MATRICES POLIMÉRICAS**

	359
<b>VIII.1. <i>El movimiento de un gas dentro una matriz polimérica</i></b>	361
<b>VIII.1.1. <i>Modelo de absorción dual</i></b>	363
<b>VIII.1.2. <i>Aproximación a una disolución ideal. Ley de Henry</i></b>	363
<b>VIII.1.3. <i>Cálculo del exceso de potencial químico</i></b>	364
<b>VIII.2. <i>Limitaciones de las simulaciones a nivel atómico para el cálculo de la solubilidad</i></b>	365
<b>VIII.2.1. <i>Cálculo de la energía de interacción entre un gas y la matriz del polímero</i></b>	365
<b>VIII.2.2. <i>Implicaciones de la constitución del sistema. La fase amorfa</i></b>	366
<b>VIII.2.3. <i>Cálculo del potencial químico mediante el método de inserción de la partícula de prueba</i></b>	368
<b>VIII.3. <i>Solubilidad de gases en polímeros cristalinos. La fase cristalina</i></b>	369
<b>VIII.4. <i>Objetivos parciales</i></b>	373
<b>VIII.5. <i>“Crystalline Poly(4-methyl-1-pentene): Structure and Solubility of Gas Molecules”</i></b>	375
<b>VIII.6. <i>“Molecular simulations of gas solubilities in cristalline poly(<math>\alpha</math>-alkyl-<math>\beta</math>-L-aspartate)s”</i></b>	413
<b>VIII.7. <i>“On the phase B of comblike poly(<math>\alpha</math>-alkyl-<math>\beta</math>-L-aspartate)s. A simulation of the solubility of small penetrants”</i></b>	425
<b>VIII.8. <i>“Permeation properties of the estereoregular nylon-3 analog, Poly(<math>\alpha</math>-n-hexyl-<math>\beta</math>-L-Aspartate)”</i></b>	439
<b>VIII.9. <i>Conclusiones Parciales</i></b>	481
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	483
<b>X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	489



## **I. INTRODUCCIÓN**



## I. INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad el ser humano ha utilizado materiales poliméricos de origen natural para satisfacer algunas de sus necesidades. Buenos ejemplos son la goma arábica, la lana, el algodón, la celulosa y, más recientemente, el caucho natural. Sin embargo, la extensa utilización de los polímeros como materiales de uso cotidiano no tuvo lugar hasta que se desarrollaron los polímeros sintéticos.

A pesar de su rápida y basta expansión, su descubrimiento y auge son relativamente recientes. Su origen puede fecharse en los trabajos de Staudinger, en la década de 1920 a 1930, en los que se introduce por primera vez la idea de una cadena covalente macromolecular. Esta hipótesis fue demostrada definitivamente durante los años cuarenta, con la preparación del *nylon* y el caucho artificial. En las décadas de los cincuenta y los sesenta se desarrollan las reacciones de polimerización, así como, su posterior aplicación a escala industrial, marcando el inicio de la utilización generalizada de los polímeros. Es desde ese momento, y en especial durante las tres últimas décadas del siglo XX, cuando los materiales poliméricos, debido a su bajo coste y su alta fiabilidad, han ido sustituyendo a otros materiales usados tradicionalmente, como son la madera, los metales o los materiales cerámicos.

### I.1. Aplicaciones de los materiales poliméricos

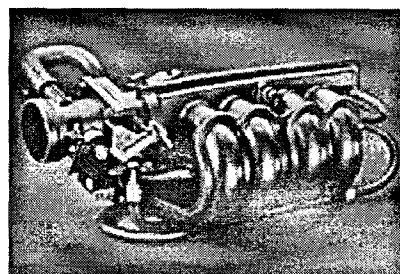
Intentar sintetizar las aplicaciones de los polímeros en la sociedad actual resultaría un trabajo casi imposible. En el mundo contemporáneo los materiales poliméricos han copado casi todos los ámbitos del desarrollo y elaboración de productos manufacturados. Sin embargo, se puede obtener una visión muy generalizada de sus aplicaciones ateniéndose a un criterio meramente económico. Así, en la industria del plástico es muy común dividir los polímeros en dos grandes grupos en función del valor del material fabricado: los llamados *commodities* ("polímeros de comodidad", o sea baratos) y los llamados *high performance* ("de altas prestaciones", es decir, caros) (Sáiz y Riande, 1998).



Los polímeros denominados *commodities* se caracterizan por obtenerse a partir de materias primas baratas y, tanto por su naturaleza química como por el uso al que se destinan, no requieren un procesado costoso. Los productos resultantes, debido a su bajo coste, pueden ser utilizados para una infinidad de aplicaciones poco específicas, y que supuestamente nos proporcionan una vida más confortable. Ejemplos típicos de este tipo de materiales son los embalajes plásticos, las bolsas, las botellas o las fibras textiles (Figura I.1a).



(a)



(b)

**Figura I.1.** (a) Ejemplo de aplicaciones de los polímeros tipo *commodities*: como embalajes o depósitos (b) Ejemplo de aplicación de un polímero de altas prestaciones: los colectores de motores de automoción.

Por el contrario, los polímeros de altas prestaciones son materiales diseñados con vistas a unas aplicaciones muy específicas y generalmente difíciles de conseguir. Esto hace que las materias primas utilizadas y, especialmente, el procesado, encarezcan notablemente el producto final. Ejemplos típicos son los polímeros conductores, semiconductores, fotoconductores, las fibras de alta resistencia, los materiales compuestos, las membranas usadas para la potabilización del agua y los materiales de aplicación biomédica (Figura I.1b).

La sociedad tecnológica actual demanda materiales cada vez más complejos para ser utilizados en aplicaciones muy exigentes. Sin embargo, desarrollar materiales de gran especificidad conlleva todavía un gran derroche de medios debido a varios factores. De entrada, el proceso seguido para desarrollar un nuevo material es complejo: la plasmación de una idea nueva no siempre es viable, puesto que debe traducirse en productos que puedan ser sintetizados. Una vez que se ha obtenido el nuevo material

debe ser caracterizado minuciosamente para poder certificar su utilidad o, al menos, para poder obtener nueva información que posibilite el refinado de aquellas propiedades que tengan un interés potencial. A pesar de ello, y puesto que *a priori* es inviable optimizar todas las propiedades físicas que determinarán su uso final, debe comprobarse que el nuevo polímero cumpla todos requisitos específicos propios de la aplicación a la que se quiera destinar. Este procedimiento implica llevar a cabo un proceso constante de ensayo y error, el cual hace que el desarrollo de nuevos polímeros sintéticos no solo necesite gran cantidad de recursos humanos sino que, a su vez, conlleve un alto coste temporal.

Un buen ejemplo de la gran dificultad que dicho desarrollo implica ha sido expuesto recientemente por Elvira y colaboradores (1999). Estos autores describen en detalle la gran cantidad de condiciones que deben cumplirse para poder emplear los materiales poliméricos en un campo tan concreto como es la medicina reconstructiva.

## **I.2. Relación entre estructura y propiedades**

Debido a las dificultades expuestas en el apartado anterior, se está produciendo un cambio en como se enfoca el desarrollo de un nuevo material polimérico. Es cada vez más habitual intentar obtener información sobre las propiedades que un material podrá tener antes de ser sintetizado o procurar obtener el máximo de información sobre dichas propiedades sin recurrir sistemáticamente a los ensayos experimentales. Este hecho es básicamente una consecuencia de dos factores diferentes: los avances en la comprensión de la estructura de los materiales y la introducción de los métodos de simulación computacional para estudiar y predecir las propiedades de los materiales.

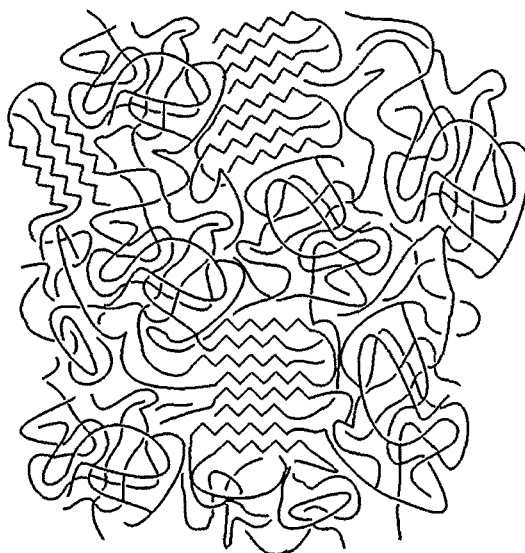
Las propiedades de un material están directa o indirectamente ligadas a su estructura molecular. Es decir, son una consecuencia de la estructuración de las moléculas que constituyen un determinado material y, en muchos casos, son un reflejo de los procesos dinámicos que se dan a escala molecular. Entender y racionalizar la estructura molecular de un material debe permitir comprender el origen de sus propiedades físicas. Al mismo tiempo, poder estudiar cómo la estructura de un material condiciona el movimiento de los átomos y moléculas que lo forman, debe conducir a la

comprensión de la influencia que algunos factores externos, tales como la presión o la temperatura, ejercen sobre sus propiedades observables (Colmenero, 2000).

Es lógico entender, en consecuencia, porque el estudio de la relación entre la estructura y las propiedades de un polímero se está convirtiendo en uno de los campos que más interés despierta, tanto en la investigación base como en la investigación aplicada.

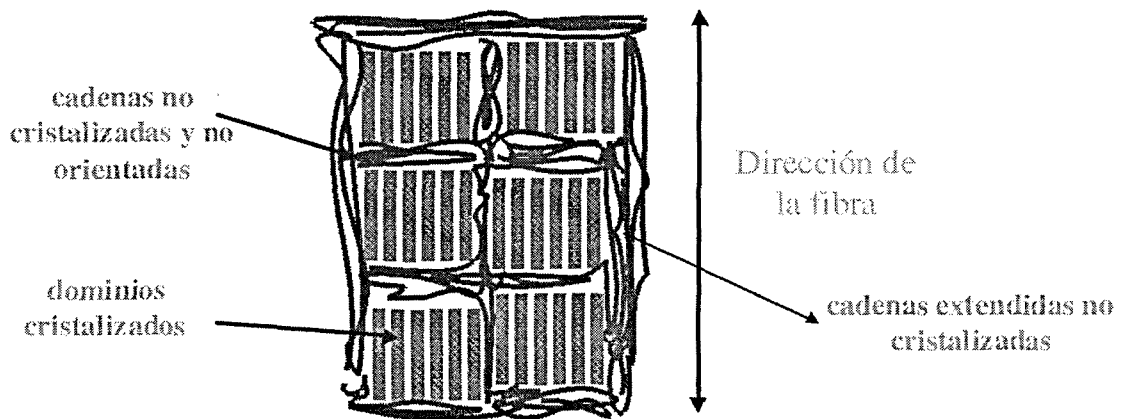
### I.2.1. La estructura de los polímeros

La determinación de la estructura de un material polimérico se ve limitada de entrada por su propia constitución. Su naturaleza macromolecular hace que este tipo de materiales no estén estructurados en una sola fase (Flory, 1969). La organización molecular de los polímeros puede ser explicada sobre la base de un modelo de diferentes dominios estructurales, dónde se alternan zonas cristalizadas con zonas aparentemente desestructuradas, de apariencia vítrea (Figura I.2). Sin embargo, esta descripción general, depende mucho del tipo de polímero que se tenga en cuenta, ya que en función de la constitución y del tratamiento al que haya sido sometido, la cristalinidad puede oscilar entre valores cercanos al 95% a valores imperceptibles (en polímeros amorfos).



**Figura I.2.** Representación esquemática del modelo más aceptado de organización molecular para un material polimérico semicristalino. La organización de las cadenas del polímero se caracteriza por presentar dominios de organización cristalina (en rojo), rodeados por dominios de estructuración amorfa (en azul) donde la conformación de las moléculas de polímero se asimila a un ovillo estadístico.

Tal como se ha comentado en el apartado anterior las propiedades de un material son consecuencia de su estructura. Un buen ejemplo de la estrecha relación estructura - propiedad puede encontrarse en el comportamiento mecánico de las fibras. Su resistencia a la tracción se relaciona directamente con su estructuración: cuando se obtiene una fibra sintética, se está orientando la mayor parte de sus cadenas en la dirección de la fibra (Figura I.3). Este factor induce a que el material obtenido presente una elevada resistencia a la deformación en dicha dirección. Esta propiedad física es la que permite, por ejemplo, uno de los usos más populares de las fibras de *nylon*, los hilos de pescar.



**Figura I.3.** Representación esquemática de la orientación adoptada por las cadenas de polímero en una fibra polimérica. Nótese como los diferentes microcristales se orientan uniaxialmente, proporcionando al sistema su resistencia mecánica característica.

### I.2.2. Caracterización de la estructura de los polímeros

Debido a las características estructurales de los materiales poliméricos, la caracterización de su estructura debe centrarse en uno de sus dos tipos de organización: la fase amorfa o la fase cristalina.

La caracterización de los dominios amorfos de un polímero es un punto especialmente complejo debido al tamaño del sistema, a la falta de regularidad conformacional y, especialmente, al grado más o menos elevado de movimientos moleculares (Colmenero et al., 1998). Las técnicas clásicas de caracterización estructural resultan poco adecuadas para el estudio de estos dominios puesto que dichas

técnicas normalmente suministran información promediada de un conjunto de movimientos parámetros de naturaleza similar. Un ejemplo clásico de este tipo de limitación lo encontramos en el uso de la difracción de neutrones, que es la técnica más ampliamente empleada para el estudio de sistemas amorfos. Los datos obtenidos mediante esta técnica muestran únicamente la probabilidad de encontrar dos átomos a una determinada distancia (*función de distribución radial*). Sin embargo, no permiten discernir el tipo de estructuración que induce la aparición de dicha distribución de distancias.

La microestructura de los materiales cristalinos se estudia habitualmente mediante técnicas experimentales basadas en el fenómeno de difracción de ondas electromagnéticas. La técnica más ampliamente utilizada para el estudio de cristales es la difracción de rayos X, puesto que esta radiación presenta una longitud de onda de un orden de magnitud similar al de las distancias interatómicas (Alexander, 1969). Dicha técnica permite obtener información estructural de un sistema regular con un grado de detalle que puede llegar a la escala atómica. Sin embargo, el uso de esta metodología se ve especialmente limitado por las propiedades de las muestras utilizadas. Es decir, el tamaño del cristal, los defectos estructurales o la falta de orientación de los especímenes (como es el caso del polvo cristalino) afectan de forma muy notable a la cantidad y la calidad de la información que se puede obtener. Al mismo tiempo, el efecto de los movimientos moleculares debidos a las condiciones en las que se encuentra el sistema estudiado (temperatura y presión) influyen de forma significativa en la calidad de los datos que se pueden obtener mediante el uso de la difracción de rayos X. En la práctica, el grado máximo de resolución que se alcanza mediante esta técnica queda casi reservado al estudio de cristales constituidos por moléculas inorgánicas o orgánicas de tamaño reducido.

A medida que la constitución química del sistema a estudiar se hace más compleja disminuye dramáticamente la posibilidad de obtener cristales de calidad suficiente para obtener una información estructural detallada mediante difracción de rayos X. Por ejemplo, el estudio de la estructura de muchas macromoléculas de origen natural (como proteínas o ácidos nucleicos) puede hacerse especialmente difícil debido a que el tamaño de dichas moléculas impide obtener cristales suficientemente grandes o perfectos. En algunos casos se puede llegar al extremo de que solo sea posible obtener

muestras orientadas en una sola dirección (fibras), perdiéndose gran parte de la información estructural que la difracción de rayos X puede suministrar.

En el caso de los polímeros sintéticos estas limitaciones alcanzan un grado crítico. A pesar de que un polímero puede presentar una estructura microscópica regular, el gran tamaño de las moléculas que lo constituye induce la presencia de dominios amorfos y hacen que en muchos casos no sea posible obtener una información suficientemente detallada para poder resolver su estructura cristalina. A este factor se le suma la imposibilidad de obtener cristales de un tamaño suficiente para emplear las técnicas clásicas de monocristal.

Normalmente se aborda la resolución de la estructura cristalina de polímeros usando muestras de polvo cristalino o, si es factible, muestras orientadas unidireccionalmente (fibras). Puesto que en muchos casos la información que se obtiene por difracción de rayos X es muy limitada, es habitual combinar esta técnica con la difracción de electrones cuando se pueden obtener monocristales pequeños del polímero (Brisse, 1989). Mediante esta técnica se pueden obtener un mayor número de reflexiones y observarse claramente las extinciones sistemáticas. Además, permite calcular las dimensiones de la celda unitaria, pudiéndose establecer el grupo espacial de forma inequívoca. No obstante, es muy frecuente que la información que proporcionan las técnicas de difracción resulte aún insuficiente para determinar la estructura del polímero.

### **I.3. La simulación computacional en química de polímeros**

La aparición de los ordenadores en el mundo de la química es relativamente reciente. Sin embargo, debido al rápido aumento de su potencia, se están convirtiendo en una herramienta de gran valor para el estudio y la comprensión de los sistemas químicos. Su uso se extiende desde la creación de amplias bases de datos a la simulación computacional a escala atómica. Un ejemplo clásico de este auge lo encontramos en el campo de la farmacología. Cada día resulta más habitual abordar el desarrollo de nuevos fármacos usando como punto de partida moléculas cuyas propiedades han sido estudiadas mediante herramientas computacionales.

Dentro de la ciencia de los polímeros, la utilización de algoritmos informáticos ha permitido obtener relaciones empíricas entre la constitución de un material y sus propiedades físicas, haciendo posible la predicción de propiedades para polímeros nuevos. Un buen ejemplo de este tipo de estrategia son los métodos basados en la contribución de grupos. Mediante esta aproximación, el valor de una determinada magnitud física se calcula a partir de un conjunto de parámetros empíricos. Dichos parámetros se definen como una aportación que depende del tipo de unidades químicas que constituyen la unidad repetitiva del polímero (van Krevelen, 1990).

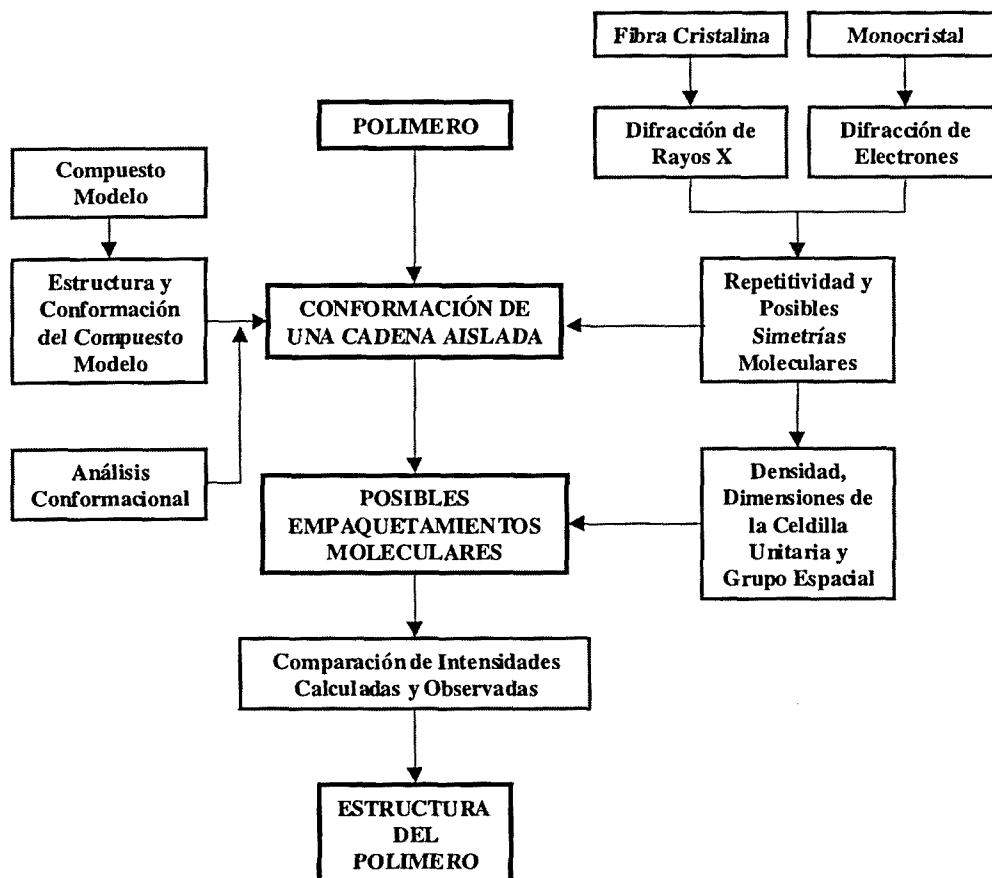
Sin embargo, la utilización más destacable, y en la cual se centrará la presente memoria, es el uso de las simulaciones moleculares. Mediante dicha metodología es posible determinar aquellos parámetros estructurales de los polímeros que no pueden ser obtenidos a partir de técnicas experimentales convencionales. A su vez, el uso de modelos moleculares permite la comprensión de los fundamentos físicos que determinan las propiedades de un material.

### **I.3.1. Determinación de la estructura cristalina**

Tal como ya se ha introducido en el apartado **I.2.2**, la determinación de la estructura cristalina de un polímero puede resultar bastante compleja. Por este motivo, las técnicas de simulación computacional mediante modelos atomísticos se han convertido en un complemento, y en algunos casos una alternativa, a las técnicas tradicionalmente empleadas para estudios estructurales. En concreto, las herramientas computacionales no sólo se emplean para resolver la estructura cristalina de un polímero a partir de una información experimental limitada, sino que además permiten comprender los factores físico - químicos que determinan su estructuración (Wang y Stubbs, 1993).

En consecuencia, la estrategia seguida habitualmente para estudiar la estructura cristalina de un polímero se muestra en la figura **I.4**, y consiste en la combinación de las técnicas de difracción y las de simulación molecular. Así, cuestiones complejas de discernir como son la conformación de las cadenas de polímero (especialmente si es

helicoidal), la posición y orientación de dichas cadenas en la celdilla unidad, etc. pueden estudiarse y resolverse combinando adecuadamente información experimental y teórica.



**Figura I.4.** Diagrama de flujo del procedimiento seguido para establecer la estructura cristalina de un polímero a partir de los datos de difracción rayos X y electrones (información que se representa en los cuadrados rojos), combinados con el uso de metodologías computacionales (información que se representa en los cuadrados azules)

### I.3.2. Predicción de propiedades macroscópicas

De forma muy general las propiedades macroscópicas de los polímeros semicristalinos, pueden dividirse en dos grandes grupos. Aquellas que se derivan de las características de la fase cristalina y las que son inherentes a la fase amorfa del material. A pesar de que esta generalización no resulta muy realista, puesto que las propiedades de un material son un reflejo de todo el conjunto de su estructura, según la naturaleza química del sistema estudiado y del grado de cristalinidad que presente cada polímero, se puede asumir que las propiedades de éste dependen básicamente de la forma de



estructuración predominante. Esta aproximación, en muchos casos, resulta muy válida y es de gran utilidad para llevar a cabo simulaciones computacionales.

Una vez establecida cual es la fase estructural que determina la propiedad de interés, debe seleccionarse la metodología apropiada para llevar a cabo la simulación. Dicha selección depende de la naturaleza de los procesos físicos que se quieran estudiar. Si se quiere obtener información sobre propiedades relacionadas con la estructura electrónica de las moléculas de un material (como por ejemplo la reactividad química o la conductividad eléctrica) deben utilizarse métodos basados en la mecánica cuántica. Sin embargo, este tipo de metodología tiene un alto coste computacional y, generalmente, solo puede utilizarse en sistemas constituidos por un número reducido de átomos. Este factor hace que en el campo de la química macromolecular su aplicación sea muy limitada.

A pesar de dicha limitación, hay que tener en cuenta que muchas de las propiedades de interés tecnológico no provienen de reorganizaciones en la estructura electrónica. Esto implica que se puedan emplear modelos alternativos a la mecánica cuántica para describir la estructura de una macromolécula. La alternativa más habitual es el uso de modelos clásicos para describir la estructuración de un material (*mecánica molecular*). En este contexto las moléculas se describen como un conjunto de esferas unidas por resortes. Mediante estos modelos es posible reproducir, por medio de parámetros ajustados, los efectos energéticos relacionados con las fuerzas de enlace y las interacciones entre átomos del sistema no enlazados.

Mediante esta visión alternativa se pueden simular, por ejemplo, muchas de las propiedades que derivan de la estructura cristalina de un polímero. Esto es debido a que dichas propiedades están relacionadas con las interacciones físicas que determinan la cohesión del cristal, el efecto de las cuales, se puede reproducir mediante la mecánica molecular. Un ejemplo clásico lo encontramos en la predicción de las propiedades mecánicas de fibras poliméricas. Usando simulaciones computacionales se han calculado las constantes elásticas del polietileno a partir del conocimiento de su estructura cristalina (Tabla I.1).

**Tabla I.1.** Comparación de los valores observados y calculados para las constantes elásticas del polietileno ortorrómbico. Los valores se dan en GPa.

Método usado	$C_{11}$	$C_{22}$	Autores
Medidas ultrasónicas	8.4		Choy and Leung, 1985
Difracción de neutrones	11.5		Twisteton et al., 1982
Simulación teórica	13.3	11.2	Lacks and Rutkedgem, 1994
Simulación teórica	12.6	12.4	Sorensen et al., 1988
Simulación teórica	14.3	12.2	Tashiro et. al., 1978
Simulación teórica	7.99	9.92	Weiner et al., 1986
Simulación teórica	8.1	9.9	León et al., 1999

Por otro lado, es posible estudiar los movimientos atómicos que se dan en la estructura de un polímero, así como, el efecto que ejerce la temperatura sobre los mismos. Utilizando modelos clásicos y resolviendo las ecuaciones de Newton (*dinámica molecular*), puede simularse la evolución a lo largo del tiempo de la estructura de un material. De estas simulaciones se puede extraer información sobre algunas magnitudes termodinámicas como la entropía o la capacidad calorífica (Sorensen et al., 1988).

Un caso extremo es abordar el estudio los cambios estructurales que determinan el proceso de fusión de la fase cristalina. Por medio de este tipo de simulaciones puede conseguirse una buena visión de los factores físicos que determinan la cohesión de dicha fase (Sumpter et al., 1990).

Muchas propiedades de interés en un polímero son un promedio de la influencia de todas las microestructuras que lo constituyen. En estos casos resulta de gran utilidad el uso de métodos estadísticos. De ellos, el más ampliamente usado es el método Monte Carlo, mediante el cual es posible simular una organización estadística, ya que la posición de los átomos en cada nueva estructura generada se obtiene al azar.

Un ejemplo de propiedad que responde al patrón descrito es la solubilidad de gases ligeros en un polímero amorfo. La simulación de esta propiedad se basa en explorar un número suficientemente grande de estructuras que permita describir satisfactoriamente la fase amorfa del material. A pesar de la dificultad que ello implica,

la mayoría de los trabajos realizados hasta el momento destacan por la precisión de los datos obtenidos, tal como queda reflejada en la siguiente tabla (Fukuda, 2000):

**Tabla I.2.** Comparación entre la solubilidad experimental y la calculada para diferentes gases de baja densidad. Los resultados se exponen como valores relativos a la solubilidad del metano en dicho polímero ( $S/S_{CH_4}$ )

Penetrante estudiado	$S/S_{CH_4}^{exp. a}$	$S/S_{CH_4}^{calc. b}$
CH <sub>4</sub>	1.0	1.0
Ar	0.505	0.688
O <sub>2</sub>	0.42	0.376
N <sub>2</sub>	0.21	0.219
C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	6.7	9.49
C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>	18.8	22.7
CO <sub>2</sub>	2.3	1.63

<sup>a</sup> Michaels and Bixler, 1961

<sup>b</sup> Fukuda, 2000

Junto con la precisión de los datos calculados, la información que dichas simulaciones han aportado ha permitido incrementar la comprensión de los mecanismos que rigen la difusión de partículas de gas dentro de matrices poliméricas (Gusev et al., 1994). Este es un punto de especial interés tecnológico puesto que la predicción de la permeabilidad de gases en polímeros sintéticos a partir de la estructura molecular puede permitir el diseño de membranas selectivas o de materiales aislantes, dos tipos de materiales de gran valor industrial.

### I.3.3. Limitaciones de las simulaciones computacionales en polímeros

Las simulaciones moleculares permiten la exploración de la dinámica de los polímeros, así como la comprensión de las relaciones estructura - propiedades. Sin embargo, aún existen importantes limitaciones para la extrapolación de los resultados obtenidos a sistemas reales (van Gusteren y Berendsen, 1990). Básicamente se pueden resumir en:

- *Tamaño del sistema simulado*: el grado de realismo que se puede alcanzar en las simulaciones está limitado al número de átomos del sistema que se pueda utilizar. Cuanto más grande sea este, más cerca se está de tener en cuenta todas las interacciones moleculares que determinan aquellas propiedades que se quieran estudiar, pero mayor es el coste computacional. Debe llegarse a un compromiso entre la posibilidad de alcanzar una correcta representación del sistema y un tiempo de simulación razonable.

Debido a la naturaleza macromolecular de los polímeros es difícil obtener con seguridad una representación fiable de la estructura molecular, puesto que en muchos casos la relación estructural entre muchas cadenas de polímero es la clave para interpretar muchas de sus propiedades físicas. En este contexto el estudio de la fase cristalina presenta muchas ventajas, puesto que al ser un sistema ordenado y regular, se puede estudiar un cristal a pequeña escala usando condiciones periódicas de contorno y extrapolar el comportamiento del sistema simulado a la totalidad del material.

- *La calidad de modelo molecular*: este es un punto que se comentará extensamente en el capítulo de métodos, pero de forma general se puede decir que cuanto más riguroso es el fundamento teórico sobre el que se realiza una simulación, mayor es el coste computacional y menor es el tamaño del sistema que se puede simular. Se debe valorar cuales son los factores físicos que modulan las propiedades que se desean estudiar, para así establecer el tipo de simplificación teórica necesaria para abordar una simulación con garantías de que los resultados obtenidos sean representativos de la realidad. Por este motivo, la comparación de los resultados teóricos con datos experimentales se hace aún imprescindible para seleccionar la metodología más adecuada en cada caso.

A pesar de las limitaciones expuestas, el aumento de la potencia de los ordenadores y un conocimiento cada vez más detallado del comportamiento molecular permite presagiar que el diseño de polímeros con propiedades específicas, sobre la base de su constitución y estructura, está cada vez más próximo.



## **II. MÉTODOS**



## II. MÉTODOS

En la presente memoria se han utilizado diferentes estrategias computacionales para abordar el estudio atomístico de materiales poliméricos. Todas las metodologías empleadas se basan en el cálculo de la energía del sistema simulado. Sin embargo, deben diferenciarse dos grandes subgrupos en función del formalismo teórico empleado: los métodos basados en la mecánica cuántica y los basados en la mecánica clásica. El formalismo cuántico se caracteriza por su rigurosidad y por su elevado coste computacional. Esta última característica restringe considerablemente el tamaño de los sistemas que puede ser estudiados. El formalismo clásico, menos riguroso, permite ser aplicado a sistemas de tamaño considerable, resultando muy útil para el estudio de macromoléculas.

### II.1. Métodos Cuánticos.

Dentro del formalismo de la mecánica cuántica (MQ), un sistema queda descrito por su función de onda ( $\Psi$ ). La función de onda incluye toda la información del sistema y puede ser obtenida a partir de la resolución de la ecuación de Schrödinger en su forma no dependiente del tiempo (ecuación 1), es decir, encontrando las funciones propias del operador hamiltoniano ( $\hat{H}$ ).

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (1)$$

Para la mayoría de los sistemas químicos de interés, las dificultades que comporta la resolución de esta ecuación hace necesaria la aplicación de toda una serie de aproximaciones. La primera de ellas es la aproximación de Born-Oppenheimer, en la que se consideran por separado el movimiento de los núcleos y el de los electrones. El resto de las aproximaciones que pueden ser utilizadas, dan lugar a las diferentes metodologías cuánticas existentes.

#### II.1.1. Métodos ab initio.



Su principal característica es abordar la resolución de un sistema químico de la forma más rigurosa posible. Es decir, no se recurre a ninguna información de tipo empírico. Así, el hamiltoniano electrónico del sistema queda expresado según la ecuación:

$$\begin{aligned} \hat{H}_e(R_{N_n}; r_{N_e}) = & -\sum_{A=1}^{N_n} \frac{1}{2m_A} \nabla_A^2 + \sum_{A=1}^{N_n} \sum_{B>A}^{N_n} \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} - \sum_{i=1}^{N_e} \frac{1}{2} \nabla_i^2 \\ & - \sum_{i=1}^{N_e} \sum_{j=1}^{N_n} \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^{N_e} \sum_{j=1}^{N_e} \frac{1}{r_{ij}} \end{aligned} \quad (2)$$

Por otra parte la función de onda  $\Psi$  se expresa como una combinación lineal de determinantes antisimétricos  $\{\phi\}$  de *spin* - orbitales monoelectrónicos ortogonalizados  $\{\chi\}$  correspondientes a las posibles excitaciones del espacio activo, siendo  $C_L$  la contribución de cada determinante a la función de onda:

$$\Psi(R_{N_n}; r_{N_e}) = \sum_L C_L \phi_L(\chi_1, \chi_2, \dots, \chi_{N_e}) \quad (3)$$

$$\phi_L(\chi_1, \chi_2, \dots, \chi_{N_e}) = \bar{A} |\chi(\chi_1), \chi(\chi_2), \dots, \chi(\chi_{N_e})| \quad (4)$$

Dentro de la teoría de orbitales moleculares (OM) los *spin* - orbitales se pueden expresar como una combinación lineal de una serie de funciones de base  $\{\gamma\}$  centradas en los núcleos atómicos de la forma expresada en la ecuación 5 (aproximación CLOA, Combinación Lineal de Orbitales Atómicos).

$$\chi_i = \sum_{\mu} C_{\mu,i} \gamma_{\mu} \quad (5)$$

De los diferentes métodos *ab initio*, destacan los basados en la aplicación del principio variacional. Uno de gran aplicación es el método Hartree-Fock (HF) o teoría del campo autoconsistente (*Self Consistent Field*, SCF) (Szabo y Ostlund, 1982), que ha sido utilizado en la presente memoria. En este método se emplea una función de onda monodeterminantal como aproximación al estado fundamental del sistema. La

interacción de cada uno de los electrones con todos los demás se considera de forma promediada, lo que supone la no inclusión de los efectos de correlación electrónica.

Así, cuando se quiere abordar el cálculo de propiedades en que la correlación electrónica pueda tener cierta importancia, se hace necesaria la aplicación de otros métodos más sofisticados, tales como la interacción de configuraciones o los métodos perturbativos.

En la presente memoria se ha aplicado el método de Møller y Plesset (Møller y Plesset, 1934) para incluir los efectos de la correlación electrónica. Dicho método se basa en la teoría de las perturbaciones de Rayleigh y Schrödinger (Bates, 1961). En dicha teoría, el hamiltoniano de un sistema ( $\hat{H}$ ) se describe como la suma de dos términos: el hamiltoniano sin perturbar ( $\hat{H}^0$ ) y una perturbación ( $\hat{V}$ ) (ecuación 6)

$$\hat{H} = \hat{H}^0 + \hat{V} \quad (6)$$

En el método de Møller y Plesset, el hamiltoniano sin perturbar corresponde al utilizado en el método HF, mientras que dentro de la perturbación se incluyen los efectos de correlación electrónica. Dentro del desarrollo de la teoría perturbativa, se introduce un hamiltoniano generalizado ( $\hat{H}_\lambda$ ) (ecuación 7) donde  $\lambda$  es un parámetro adimensional que varía entre 0 y 1.

$$\hat{H}_\lambda = \hat{H} + \lambda \hat{V} \quad (7)$$

La función de onda ( $\Psi_\lambda$ ) y la energía ( $E_\lambda$ ) correspondientes al sistema descrito por el hamiltoniano  $\hat{H}_\lambda$  pueden expresarse por una serie de potencias según las ecuaciones 8 y 9, respectivamente:

$$\Psi_\lambda = \Psi^{(0)} + \lambda \Psi^{(1)} + \lambda^2 \Psi^{(2)} + \dots \quad (8)$$

$$E_\lambda = E^{(0)} + \lambda E^{(1)} + \lambda^2 E^{(2)} + \dots \quad (9)$$

Donde los términos  $\Psi^{(n)}$  son la corrección de orden  $n$  de la función de onda asociada al número de sustituciones de *spin* - orbitales ocupados virtualmente, y los términos  $E^{(i)}$  corresponden a las diferentes correcciones de la energía. La energía HF es la suma de los términos  $E^{(0)}$  y  $E^{(1)}$ , de manera que las correcciones para la correlación electrónica empiezan en el segundo orden (MP2). El grado de correlación que se considera da lugar a los diferentes órdenes en que se valora la energía de correlación (MP2, MP3, MP4, ...).

El tipo de funciones de base, así como su número, afectará de manera clave a la calidad del resultado que se obtenga. Una posibilidad es utilizar funciones con la forma de las soluciones de la ecuación de Schrödinger que se obtienen para un átomo hidrogenoide (con un sólo electrón), las cuales se denominan funciones de Slater (STO). En la práctica, las funciones de base se construyen, por razones de eficiencia computacional, como combinaciones de funciones gaussianas (GTO). Mediante este formalismo cada función de base se define como una combinación lineal fija (contracción de funciones GTO (primitivas)). Los exponentes y los coeficientes son escogidos para que dicha contracción dé aproximadamente una STO.

De esta forma se puede describir la función de onda mediante diferentes tipos de base. Si se asigna una sola función de base (como combinación lineal de funciones gaussianas) a cada OA, se tiene una base mínima. Las funciones denominadas doble Z (DZ) y triple Z (TZ) son aquellas que incluyen dos o tres funciones de base por cada OA, respectivamente. En las bases denominadas *split-valance*, los orbitales correspondientes a los electrones internos quedan descritos con una sola función de base y los de valencia con dos o más. Habitualmente se incluyen funciones adicionales (las denominadas funciones de polarización y funciones difusas) para mejorar la descripción de la densidad electrónica en las regiones más alejadas de los núcleos.

Las bases de tipo *split-valance* de uso más extendido corresponden al esquema K-M1G, desarrolladas por el grupo de Pople. En este esquema, K designa el número de funciones gaussianas contraídas para representar las funciones de base de los electrones de las capas internas, y M indica el número de primitivas contraídas para generar funciones de base de los electrones de la capa de valencia. En este trabajo se han

utilizado las bases 6-31G(d) (Hariharan y Pople, 1973) y 6-311G(d,p) (Frich et al., 1984)

### II.1.2. Métodos semiempíricos.

Los métodos semiempíricos han sido desarrollados para reducir el coste computacional de los cálculos cuánticos y permitir su aplicación a sistemas químicos de gran tamaño. Todos ellos parten de la teoría HF e introducen diversas simplificaciones en la expresión del hamiltoniano, que son compensadas por la inclusión de una serie de parámetros empíricos. Estos parámetros son ajustados para reproducir datos experimentales o cálculos cuánticos ab initio, de manera que muy a menudo incluyen de forma indirecta efectos de correlación electrónica. Entre las simplificaciones más destacables se encuentra el uso de una base mínima para los electrones de valencia, así como, el uso de una unidad denominada *core* en la que se incluyen los electrones internos y el núcleo.

En esta memoria se ha aplicado el método semiempírico AM1 (Dewar et al., 1982). Se trata de un método basado en la aproximación denominada NDDO (*Neglect of Diatomic Differential Overlap*), que se desarrolló con la finalidad de solventar las principales limitaciones de métodos semiempíricos anteriores. Entre estas limitaciones se encuentran la tendencia a sobrestimar las repulsiones entre átomos a distancias de van der Waals y la pobre descripción de los puentes de hidrógeno.

La forma en que el método AM1 aborda estos problemas consiste en la introducción de un conjunto de funciones gaussianas adicionales a cada átomo. Éstas funciones permiten modular los efectos de las interacciones de largo alcance y mejorar la descripción de las interacciones no covalentes, sin que ello conlleve un aumento significativo del coste computacional. De esta manera, el método AM1 constituye una herramienta muy útil para el estudio de sistemas de tamaño relativamente grande, en particular para la descripción de sistemas estabilizados por puentes de hidrógeno (Alemán 1994,1995; Casanovas y Alemán, 1994).

### II.1.3. Métodos basados en la teoría del funcional de la densidad

Los métodos que se derivan de la teoría del funcional de la densidad electrónica (*Density Functional Theory, DFT*) se basan en una filosofía diferente a la de los métodos *ab initio*. El estudio de un determinado sistema se aborda a partir de la descripción de la densidad electrónica del mismo, obteniéndose la energía del sistema estudiado a partir de dicha descripción.

El formalismo DFT se sustenta en el teorema de Hohenber-Kohn (Hohenber y Kohn, 1963), en el cual se demuestra la existencia de un funcional de la densidad electrónica que determina la energía del estado fundamental. Sin embargo, este teorema no determina la forma explícita de dicho funcional, siendo la expresión de éste lo que diferencia a los distintos métodos existentes.

Partiendo de esta base, Kohn y Sham (1965) desarrollaron la teoría en la que se basan los métodos DFT: la densidad electrónica de un determinado sistema se representa como la suma del cuadrado de  $N$  *spin*-orbitales monoelectrónicos. Estos orbitales definen un simple determinante de Slater. A partir de esta idea la energía electrónica puede ser calculada como la suma de varios términos:

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}^T + \mathbf{E}^V + \mathbf{E}^J + \mathbf{E}^{XC} \quad (10)$$

Donde  $\mathbf{E}^T$  es la energía cinética,  $\mathbf{E}^V$  contiene los términos de la energía potencial atractiva electrón-núcleo y los términos repulsivos entre núcleos,  $\mathbf{E}^J$  representa la energía de repulsión coulombiana entre electrones y, finalmente,  $\mathbf{E}^{XC}$  es la energía de intercambio-correlación. Todos estos términos energéticos, a excepción de la repulsión núcleo-núcleo, son función de la densidad electrónica,  $\rho$ .

El término  $\mathbf{E}^{XC}$  es el único que no puede ser calculado a partir de esta aproximación, puesto que su formulación matemática es desconocida. Habitualmente este término  $\mathbf{E}^{XC}$  se describe como la suma de un término de intercambio ( $\mathbf{E}^X$ ) y uno de correlación electrónica ( $\mathbf{E}^C$ ) (ecuación 11).

$$\mathbf{E}^{XC}(\rho) = \mathbf{E}^X(\rho) + \mathbf{E}^C(\rho) \quad (11)$$

- *Término de intercambio*: existen básicamente dos formas distintas de abordar el cálculo de la componente de intercambio, usando funcionales que no tengan en cuenta el gradiente de la densidad electrónica (*Local Density Approximation, LDA* (Slater, 1974)) o teniendo en cuenta dicho gradiente (aproximación llamada no local (Becke 1988)).
  
- *Término de correlación*: Igualmente puede ser calculado mediante funcionales locales o no locales que se caracterizan por incluir parámetros ajustados de propiedades físicas medidas o calculadas a nivel ab initio. En la presente memoria se ha usado el funcional no local LYP (Lee et al., 1988).
  
- *Funcionales Híbridos*: El término  $E^{XC}$  puede ser calculado mediante una estrategia alternativa: teniendo en cuenta que la componente de intercambio electrónico representa aproximadamente 90% de  $E^{XC}$ , se puede intentar reproducir de forma más exacta el término  $E^X$ . Para ello, se puede calcular  $E^X$  como una combinación lineal de términos de intercambio electrónico HF y DFT. Es lo que se denomina *funcional híbrido*. El funcional híbrido más usado el de Becke (B3, donde el tres indica el número de términos en que se expresa  $E^X$ ) (Becke, 1993)

Así los diferentes métodos DFT se diferencian por la combinación de los funcionales que se emplean para describir el término  $E^{XC}$ . En la presente memoria se ha usado el método B3LYP, que emplea el funcional LYP para el término de correlación y el funcional híbrido de Becke para el cálculo del término de intercambio.

## II.2 Métodos Clásicos: Mecánica Molecular

Como ya ha sido expuesto en el apartado anterior, la aplicación de los métodos cuánticos se ve limitada por el tamaño de los sistemas que se desee estudiar. Para el estudio de sistemas químicos de gran tamaño los métodos clásicos constituyen una buena alternativa. La aplicación de los formalismos de la física clásica a un sistema químico recibe el nombre de Mecánica Molecular. Dentro de este contexto, la energía de un sistema se evalúa a través de expresiones analíticas clásicas y de parámetros

empíricos que incorporan la información electrónica de forma promediada. El conjunto de expresiones y parámetros utilizados constituye lo que se denomina campo de fuerzas (*Force Field*).

Los parámetros de los campos de fuerzas son ajustados para reproducir resultados experimentales o cálculos mecano-cuánticos, de un determinado colectivo de sistemas químicos. Así, la mayoría de los campos de fuerzas dan resultados especialmente adecuados para familias determinadas de compuestos, en las que se incluyen aquellos compuestos para los cuales se han desarrollado los parámetros del campo de fuerzas. De esta forma existen campos de fuerzas especialmente diseñados para el estudio de polipéptidos y proteínas, para el estudio de ácidos nucleicos o para el estudio de compuestos orgánicos de pequeño tamaño.

### II.2.1 Cálculo de la energía en un campo de fuerzas

Los diversos campos de fuerza existentes se diferencian, de forma general, en el tipo de expresiones y los parámetros que emplean para reproducir la energía del sistema. En general la evaluación de la energía de un sistema se expresa según el esquema indicado en la ecuación 12.

$$E_{total} = E \left\{ \begin{array}{l} \text{términos} \\ \text{enlazantes} \end{array} \right\} + E \left\{ \begin{array}{l} \text{términos} \\ \text{no-enlazantes} \end{array} \right\} \quad (12)$$

Dónde el primer término hace referencia a la interacción entre átomos que están a tres o menos enlaces de distancia, y el segundo incluye la interacción entre átomos que están a mayor distancia. Esta expresión general puede, a su vez, desglosarse en las diferentes contribuciones en que se expresa la energía total:

$$E_{tot} = (E_{stretch} + E_{bend} + E_{tor}) + (E_{elec} + E_{vdw}) \quad (13)$$

Dónde  $E_{stretch}$  y  $E_{bend}$  son las energías asociadas a la distorsión de las distancia y ángulos de enlace (denominados *stretching* y *bending*, respectivamente),  $E_{tor}$  es la energía asociada a rotación entorno de los enlaces químicos (*torsiones*),  $E_{elec}$  y  $E_{vdw}$  son las

energías de interacción electrostática y de van der Waals respectivamente, entre átomos ubicados a tres o más enlaces de distancia.

En la presente memoria se han usado dos campos de fuerzas diferentes: el campo de fuerzas MM2(87) desarrollado por Allinger y colaboradores (Allinger et al., 1988) y el campo de fuerzas AMBER'95, desarrollado por Kollman y colaboradores (Cornell et al., 1995).

### II.2.1.1. *Campo de fuerzas AMBER*

El campo de fuerzas AMBER fue originalmente desarrollado para el estudio de sistemas proteicos. Sin embargo, sucesivas revisiones de la primera versión, fueron incorporando nuevos parámetros para el estudio de ácidos nucleicos.

Se trata de uno de los campos de fuerza más extensamente utilizado debido a la sencillez de las expresiones que utiliza y a la gran cantidad de tipos de átomos parametrizados. Cabe destacar que el campo de fuerzas AMBER ha demostrado ser una herramienta muy adecuada y eficaz para el estudio de diferentes familias de poliamidas (Bella et al., 1992; Navas et al., 1995).

### **Términos de la energía potencial en AMBER**

#### **- Términos enlazantes**

##### *i) Stretching y Bending*

Estos términos ( $E_{stretch}$  y  $E_{bend}$ ) están relacionados con el coste energético que conlleva la distorsión de las distancias y ángulos de enlace respecto a sus valores de equilibrio y se calculan mediante una expresión de tipo armónico.

$$E_{stretch} = K_s (d - d_0)^2 \quad (14)$$

$$E_{bend} = K_b (\theta - \theta_0)^2 \quad (15)$$



Donde  $d$  y  $\theta$  son las distancias y ángulos de enlace,  $d_0$  y  $\theta_0$  los valores de equilibrio, y  $K_s$  y  $K_b$  las constantes de fuerza. Cabe señalar que la aproximación armónica sólo resulta válida para distorsiones pequeñas respecto a los valores de equilibrio.

*ii) Torsión:*

El término de torsión ( $E_{tor}$ ) describe las barreras de rotación entorno a los enlaces químicos. El valor de la energía durante un proceso de rotación alrededor de un enlace presenta una periodicidad con diferentes máximos y mínimos. El campo de fuerzas AMBER describe la energía de torsión mediante una serie de Fourier de periodicidad máxima 3.

$$E_{torsion} = \sum_{i=1}^3 \frac{V_i}{2} (1 + \cos(n\chi - \gamma_i)) \quad (16)$$

Dónde  $V_i$  representa la constante de fuerza de cada término de la función,  $n$  la periodicidad del término,  $\chi$  el ángulo diedro y  $\gamma_i$  el ángulo de fase.

Un caso particular de restricción geométrica es el desplazamiento de un átomo respecto un plano. Este tipo de movimiento está asociado a fenómenos de conjugación de enlaces y, habitualmente, se denomina *torsión impropia*. A pesar poder considerarse como un caso particular de torsión, en el campo de fuerzas de AMBER, la energía de este término también se evalúa mediante una serie de Fourier, pero de periodicidad dos:

$$E_{torsion\ improp} = \frac{V_2}{2} (1 + \cos(2\chi - \gamma_2)) \quad (17)$$

**- Términos no enlazantes**

*i) Término electrostático*

Este término describe las interacciones que se dan entre las distribuciones de carga de las moléculas. La estrategia para evaluar esta contribución energética es asignar cargas puntuales a los átomos del sistema y calcular las energías de interacción ( $E_{\text{elec}}$ ) mediante la expresión de Coulomb:

$$E_{\text{elec}} = \sum_{i,j>i} \frac{q_i q_j}{\epsilon_0 r_{ij}} \quad (18)$$

Dónde  $q_i$  y  $q_j$  son las cargas atómicas,  $r_{ij}$  la distancia entre los átomos  $i$  y  $j$ , y  $\epsilon_0$  es la constante dieléctrica del medio.

- *Estrategia para la obtención de las cargas atómicas:*

En los sistemas estudiados en la presente memoria mediante el campo de fuerzas de AMBER, las cargas atómicas han sido obtenidas a partir de una de las estrategias más usadas dentro del formalismo clásico. Se trata de asignar cargas puntuales centradas en los núcleos atómicos a partir del ajuste del potencial electrostático molecular (*MEP*) mecánico-cuántico y clásico (Orozco y Luque, 1993)

ii) *Término de van der Waals:*

Este término ( $E_{\text{vdW}}$ ) evalúa diversas interacciones de naturaleza no electrostática entre átomos situados a tres o más enlaces de distancia, entre las que se encuentran la energía de dispersión y la de repulsión entre núcleos. La expresión usada para calcular este término energético es la denominada 12-6, que se expresa como:

$$E_{\text{vdW}} = \sum_{i,j>i} \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} \right) - \left( \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \quad (19)$$

Donde  $A_{ij}$  y  $B_{ij}$  son constantes para cada par de átomos y están relacionadas con sus radios de van der Waals y sus durezas químicas, y  $r_{ij}$  es la distancia entre ellos.

Con el objetivo de mejorar la descripción de los puentes de hidrogeno, el campo de fuerzas AMBER no aplica la expresión 12-6 entre los pares de átomos que forman dicha interacción. En este caso la energía del puente de hidrógeno se evalúa mediante una expresión 12-10. A su vez, los radios y durezas de los átomos implicados en este tipo de interacción se han reparametrizado para reproducir las geometrías de puente de hidrógeno en compuestos modelo.

### II.2.2.2. Campo de fuerzas de Allinger: MM2

La filosofía del campo de fuerzas de Allinger MM $n$ , donde  $n$  designa la versión del mismo (en la presente memoria se ha empleado la versión MM2), se basa en conseguir explicar las características conformacionales y los parámetros termodinámicos del mayor número posible de moléculas. Este punto de partida lleva a ecuaciones muy complejas para describir los diferentes términos de la energía potencial.

### Términos de la energía potencial en el campo de fuerzas de Allinger

#### - Términos enlazantes

##### *i) Stretching y Bending*

Las expresiones usadas para los términos de enlace emplean como punto de partida la ecuación de Hooke. Pero a ésta se le añade un término corrector para explicar las estructuras con enlaces muy elongados.

$$E_{stretch} = \frac{K_s}{2} (d - d_0)^2 (1 - C_s (d - d_0)) \quad (20)$$

$$E_{bend} = \frac{K_b}{2} (\theta - \theta_0)^2 (1 - C_b ((\theta - \theta_0)^4)) \quad (21)$$

Donde  $d$  y  $\theta$  son las distancias y ángulos de enlace,  $d_0$  y  $\theta_0$  los valores de equilibrio, y  $K_s$ ,  $K_b$ ,  $C_s$  y  $C_b$  las constantes de fuerza.

*ii) Torsión:*

Las torsiones en el campo de fuerzas MM2 se calculan mediante una expresión análoga a la del campo de fuerzas AMBER (ecuación 16). Sin embargo, las torsiones impropias son tratadas como un caso especial de *bending*, respondiendo a una expresión similar a la de la ecuación 21.

Cabe destacar que, a pesar de que la versión adaptada que se ha usado en la presente memoria no los incluía, el campo de fuerzas de Allinger permite tener en cuenta los términos de acoplamiento *stretching-bending* y *torsión-bending*.

**- Términos no enlazantes**

*i) Término electrostático*

El campo de fuerzas de Allinger calcula este término mediante momentos dipolares de enlace, que son asignados en función de las electronegatividades relativas entre átomos enlazados. Así se puede prescindir del cálculo de las cargas puntuales para cada especie química que se desee estudiar.

$$E_{elec} = F\mu_A\mu_B(\cos\chi - 3\cos\alpha_A\cos\alpha_B)\left(\frac{R^3}{\epsilon_0}\right)^{-1} \quad (22)$$

Donde  $\mu_A$  y  $\mu_B$  son los momentos dipolares de cada uno de los átomos enlazados,  $\chi$  es el ángulo entre los dos vectores  $\mu_n$ ,  $R$  es el vector normal al enlace y,  $\alpha_a$  y  $\alpha_b$  son los ángulos entre los vectores  $\mu_n$  y  $R$ .

*ii) Término de van der Waals:*

La expresión usada para calcular este término energético es la denominada exponencial-6, que se expresa como:

$$E_{vdw} = \sum_{i,j>i} \left( D_{ij} \exp(-Cr_{ij}) - \left( \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \right) \quad (23)$$

Donde  $D_{ij}$ ,  $B_{ij}$  y  $C$  son constantes para cada par de átomos y están relacionadas con sus radios de van der Waals y sus durezas químicas, y  $r_{ij}$  es la distancia entre ellos.

En este campo de fuerzas cuando los átomos forman una interacción de puente de hidrógeno se emplea la misma expresión pero reduciendo la dureza de los átomos implicados.

### II.3. Métodos simulación basados en la Mecánica Clásica

Determinar la energía de un sistema a partir de las expresiones de la mecánica clásica permite la aplicación de diferentes tipos de técnicas teóricas. Estas metodologías pueden describirnos el sistema químico desde un punto de vista estático o dinámico.

#### II.3.1 Estrategias para el estudio de sistemas cristalinos

La determinación de la estructura cristalina de un polímero no es una cuestión simple. Como ya se ha introducido en el capítulo 1.2.2, por su propia naturaleza, la información experimental no resulta ser unívoca. Mediante la descripción energética de un sistema cristalino puede deducirse de forma eficaz la información necesaria para superar las limitaciones experimentales.

En el estudio de sistemas poliméricos cristalinos se parte de la asunción que la estructura adoptada es un mínimo de energía. La energía asociada a un polímero cristalino puede desglosarse en dos contribuciones: la de las interacciones intramoleculares, es decir, aquellas que determinan la conformación adoptada por la cadena de polímero y la de las interacciones intermoleculares, las que corresponden al

empaquetamiento de las cadenas de polímero dentro de la estructura cristalina. Por este motivo generalmente se aborda el estudio energético de los sistemas poliméricos en dos pasos diferenciados. Primeramente se optimiza la conformación molecular y después se busca una óptima ubicación de las cadenas poliméricas dentro del entorno cristalino. Finalmente puede reoptimizarse la conformación de las cadenas de polímero en función del efecto que induce el empaquetamiento sobre la misma.

### **II.3.1.1. Determinación de la conformación molecular: el programa GEMOX**

La obtención de la conformación de una cadena de polímero, *a priori*, no es una tarea sencilla a causa de la complejidad y el tamaño del sistema. La forma más rigurosa sería la exploración sistemática del espacio conformacional para obtener todos los mínimos conformacionales de una determinada molécula. Este tipo de estrategia para sistemas macromoleculares resulta poco viable. En polímeros la forma más eficiente de llevar a cabo esta exploración consiste en aprovechar la información experimental disponible para el sistema que se estudia.

En la presente memoria se ha usado el programa *GEMOX* (GEneración de MOdelos moleculares compatibles con datos de difracción de rayos X) (Navas et al., 1996), el cual ha sido desarrollado en nuestro laboratorio del Departament d'Enginyeria Química de la UPC. Dicho programa permite la construcción de un modelo molecular a partir de la información experimental suministrada por el usuario, sobre el que se realiza una exploración sistemática del espacio conformacional. La eficacia de esta metodología reside en la selección de las estructuras obtenidas y en el algoritmo que emplea para desarrollar la búsqueda sistemática.

El proceso de selección se lleva a cabo en función de la información experimental que se tiene y, a su vez, usando criterios de tipo energético. Esta combinación de criterios queda potenciada, al mismo tiempo, por la estrategia de búsqueda usada: la exploración del espacio conformacional se realiza usando dos pasos de variación distintos. Si las estructuras generadas son energéticamente desfavorecidas o la geometría de las conformaciones obtenidas se aleja de los parámetros conocidos experimentalmente, se utiliza una paso de variación geométrica grande y se rechaza la estructura. En el caso contrario, la exploración se lleva a cabo de una forma más precisa,

mediante el uso de un paso de variación menor. Esta estrategia permite una gran eficacia y un importante ahorro en coste computacional, puesto que únicamente se exploran las conformaciones de interés para el usuario.

El programa *GEMOX* ha sido utilizado en nuestro laboratorio para el estudio de diferentes poli( $\beta$ -amida)s proporcionando resultados muy satisfactorios (López-Carrasquero et al., 1996; García-Alvaraz et al., 1998)

### II.3.1.2. *Estudio del empaquetamiento cristalino*

Una vez obtenida la conformación molecular para una cadena se genera el empaquetamiento cristalino. De forma general se considera una de las cadenas como referencia y a partir de ésta se construye el empaquetamiento en función de la simetría del cristal. Presuponiendo que como punto de partida se conocen experimentalmente las dimensiones de la celdilla cristalina (es decir, los parámetros  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), se debe optimizar las posiciones relativas de las diferentes cadenas dentro de la celda (desplazamientos a lo largo de cualquier de los tres ejes cristalográficos) y la orientación relativa entre cadenas (*setting angle*,  $\theta$ ).

Existe un poco de controversia sobre la influencia del empaquetamiento de las cadenas en la conformación que adoptan. Así, dentro del contexto expuesto hasta el momento, se ha asumido que la conformación molecular no varía de forma sustancial por efecto de las interacciones intermoleculares dentro del cristal. Esta aproximación se ha demostrado válida para muchos cristales poliméricos (Vergelati et al., 1993; Navas et al., 1997; Bermúdez et al. 2000). Sin embargo, en algunos otros casos se ha visto que el empaquetamiento puede comportar importantes cambios en la conformación de las cadenas de polímero (Sorensen et al. 1988; Ferro y Provasoli, 1996).

#### II.3.1.2.1 *El programa PCSP*

Dentro de los métodos usados para estudiar el empaquetamiento cristalino en la presente memoria, destaca el programa PCSP (*Prediction of the Crystal Structure of Polymers*), desarrollado en nuestro laboratorio por León y colaboradores (1999).

Este programa es especialmente útil debido a su simplicidad y, al mismo tiempo, a su gran eficiencia. Partiendo de un modelo de varilla rígida, es decir, sin optimizar la geometría molecular de las cadenas de polímero, permite obtener una rápida y precisa estimación de la energía asociada a un determinado empaquetamiento cristalino.

Únicamente se debe haber determinado previamente la conformación de las cadenas de polímero y, mediante el control de diferentes parámetros de la geometría del cristal (posición relativa entre cadenas y *setting angle*) se puede estimar rápidamente el empaquetamiento preferencial de un cristal estudiado.

Esta metodología ha resultado ser de una gran utilidad para la determinación de la estructura cristalina de diferentes familias de poliamidas alifáticas estudiadas en nuestro grupo de investigación (Bermúdez et al., 2000; León et al., 2000a)

#### II.3.1.2.2. Programa CHAMP 93

Hasta este punto se ha expuesto básicamente el estudio de los cristales de polímero partiendo de la aproximación de que la energía de estos sistemas puede ser calculada como la suma de dos términos independientes, la energía asociada a la conformación y la asociada al empaquetamiento.

En la presente memoria se ha utilizado el programa *CHAMP'93* (*Conformational (Hyper)Analysis Milan Package*). Este programa desarrollado por Ferro y Raggazzi (1993), permite abordar el estudio de cristales en los que dicha aproximación no puede aplicarse. Es decir, en aquellos sistemas en que por su naturaleza química, la conformación de las cadenas de polímero y el empaquetamiento cristalino están estrechamente ligados.

El diseño de este programa permite optimizar la conformación de las cadenas de polímero al mismo tiempo que el empaquetamiento cristalino entre cadenas. Mediante una representación explícita de todos los átomos del sistema, sobre la base de las relaciones de simetría intrínsecas al cristal estudiado, se puede minimizar la energía de todo el sistema. A su vez, es posible estimar mediante esta estrategia efectos derivados



del desorden, los cuales pueden estar asociados a la orientación relativa de cadenas (en sistemas aquirales) o a la conformación de las cadenas laterales (Ferro et al., 1992; Meille et al., 1994; Ferro et al., 1997; Ferro et al., 1998).

### II.3.2. Minimización de la energía

La minimización de la energía es la técnica clásica más sencilla. Básicamente, éste método trata de encontrar una o más conformaciones estables de una molécula, a partir de la minimización de la energía del sistema. Los algoritmos de minimización más empleados son los métodos *steepest-descent* y *conjugate-gradient*, así como la combinación de ambos.

Ésta metodología suele usarse para tres finalidades básicas:

- (i) La obtención de la geometría más estable de un sistema o la disposición espacial más favorable de dos o más moléculas que interaccionan.
- (ii) El cálculo de la energía relativa entre diferentes conformaciones de mínima energía.
- (iii) La obtención de estructuras de partida favorecidas para una simulación de dinámica molecular (ver sección siguiente).

#### - Limitaciones de la minimización de energía en polímeros:

La minimización de energía nos proporciona una visión demasiado estática de los sistemas estudiados, en contraste con lo que se observa experimentalmente, que es un promedio de toda una serie de estructuras. Sin embargo, la principal limitación de esta metodología proviene de la existencia de múltiples mínimos locales alejados del mínimo absoluto, fruto del elevado número de grados de libertad que suelen tener las macromoléculas. Esta limitación puede solventarse en algunos casos partiendo de diferentes estructuras iniciales, esperando que una de ellas esté suficientemente cercana al mínimo energético absoluto. Sin embargo, cuando el número de grados de libertad del sistema es muy elevado, resulta absolutamente inviable.

En la química de polímeros, es frecuente eliminar algunos grados de libertad a partir de la información disponible experimentalmente. De esta manera únicamente deben minimizarse aquellas variables de las que no se tiene información. En el caso del estudio de sistemas cristalinos, como ya ha sido apuntado en la anterior sección, las restricciones de simetría propias del cristal permiten limitar los grados de libertad del sistema estudiando (Alemán et al., 1992; Liao y Boyd, 1990, Ferro et al., 1997; Ferro et al., 1998).

### II.3.3. Dinámica molecular

Mediante la aplicación de las leyes de la mecánica clásica, la dinámica molecular proporciona una descripción del comportamiento de un sistema químico a lo largo del tiempo. La evolución temporal se simula mediante la integración de las ecuaciones de Newton para cada uno de los átomos del sistema:

$$\frac{\partial^2 x_i}{\partial t^2} = \frac{1}{m_i} F_i \quad (24)$$

Dónde  $x_i$  corresponde a las coordenadas cartesianas de cada átomo,  $m_i$  a su masa,  $F_i$  a las fuerzas que actúan sobre el mismo, y  $t$  es el tiempo.

La fuerza  $F_i$  que actúa sobre cada partícula del sistema en un instante de tiempo  $t$  se determina a partir de la primera derivada de la energía potencial. Dicha fuerza da directamente la aceleración de la partícula. A partir de ésta, integrando las ecuaciones del movimiento se puede obtener la velocidad, cuya integral a su vez, proporciona el cambio de posición de un determinado átomo. A partir de las nuevas posiciones y velocidades de cada partícula, se obtienen las energías potencial y cinética del sistema. Aplicando sucesivamente este procedimiento se obtiene lo que se denomina trayectoria, el conjunto de posiciones y velocidades de cada partícula a lo largo del tiempo.

La integración de las ecuaciones del movimiento se realiza mediante métodos numéricos en los que se recurre a un paso de integración,  $dt$ . Dicho paso ha de ser lo suficientemente corto para poder simular los movimientos de más alta frecuencia del sistema, que suelen ser las vibraciones de los enlaces. En consecuencia, el paso de

integración resulta ser del orden del femtosegundo. De aquí se deriva uno de los principales inconvenientes de esta técnica, ya que la mayoría de los procesos tienen lugar a escalas de tiempo del orden del nanosegundo o incluso mayores.

Tal como ya se ha avanzado anteriormente, la estructura de partida para iniciar una dinámica molecular proviene de una minimización de energía. La velocidad inicial para cada partícula del sistema se asigna de forma aleatoria considerando una distribución de Maxwell-Boltzmann a aproximadamente 10-50 K. Los primeros pasos de la simulación constituyen lo que se denomina período de equilibrado, durante el cual las propiedades del sistema no se mantienen constantes. Las energías, coordenadas y velocidades generadas durante el equilibrado no son utilizadas para el análisis posterior del sistema.

La duración del equilibrado es variable y muy dependiente del sistema simulado, siendo generalmente del orden de 100 picosegundos. La finalización del período de equilibrado se determina en función de la evolución temporal de una determinada variable del sistema. La más usualmente utilizada es la energía potencial. Cuando el parámetro usado como referencia no presenta variación apreciable se da por finalizado el equilibrado y empieza la simulación propiamente dicha.

Una de las grandes ventajas que presenta la dinámica molecular es la cantidad de condiciones en las que se puede simular un determinado sistema. Las variables que pueden tenerse en cuenta en una simulación de dinámica molecular son la presión, el volumen y la temperatura del sistema simulado, así como la inclusión de efectos del entorno. Es decir, puede simularse el comportamiento conformacional de una molécula en el vacío, dentro de un determinado empaquetamiento cristalino o en disolución. En la presente memoria las simulaciones realizadas presentan una característica en común, todas ellas han sido realizadas a temperatura constante.

La visión dinámica del sistema que proporciona esta metodología hace que pueda ser utilizada para describir procesos que tienen lugar a escalas de tiempo pequeños y para realizar exploraciones del espacio conformacional en sistemas moleculares complejos. Por estos motivos constituye uno de los métodos más utilizados en simulaciones de sistemas poliméricos (León et al., 2000b).

### II.3.4. Monte Carlo

El método de Monte Carlo constituye una alternativa a la dinámica molecular para definir trayectorias moleculares. Este método se caracteriza por generar una serie de microestructuras del sistema estudiado, cada una de las cuales es aceptada o rechazada según un determinado criterio de probabilidades. En el caso de sistemas químicos, dicho criterio se basa en consideraciones de tipo energético.

El formalismo de Monte Carlo más simple es el denominado algoritmo de Metropolis (Metropolis et al., 1953) en que la generación de nuevas microestructuras tiene lugar de forma aleatoria, asegurándose la reversibilidad microscópica del muestreo (Allen y Tildesley, 1989; Binder, 1986; Valeau y Whittington, 1977). La probabilidad de aceptar una nueva microestructura ( $P_{ac}$ ), es decir de aceptar el paso de un estado “viejo” a uno de “nuevo”, se establece según siguiente el criterio:

$$P_{ac} = \min(1, \exp(-\beta[U_{nuevo} - U_{viejo}])) \quad (25)$$

Dónde  $\beta=(kT)^{-1}$ , siendo  $k$  la constante de Boltzmann, y  $U$  la energía potencial de la microestructura correspondiente.

En los sistemas químicos cada nueva microestructura se obtiene moviendo uno o más átomos del sistema (generalmente las coordenadas internas de torsión), donde la energía se calcula a partir de las expresiones de un campo de fuerzas.

#### **Programa MC-PCSP. Algoritmos avanzados para sistemas poliméricos**

En sistemas químicos muy densos, las técnicas de dinámica molecular y Monte Carlo encuentran graves dificultades para realizar exploraciones eficientes del espacio conformacional. La razón básica se halla en el hecho que los movimientos de los átomos dentro de una determinada microestructura se encuentran muy dificultados por los impedimentos estéricos con el resto de los átomos del sistema, con lo que generar nuevas microestructuras susceptibles de ser aceptadas es bastante improbable.

En la presente memoria se han estudiado diversos sistemas poliméricos cristalinos mediante el programa MC-PCSP desarrollado en nuestro laboratorio por León y colaboradores (2001). Este programa basa su gran eficiencia en el uso del algoritmo *Configurational-bias Monte Carlo* (CBMC) (Siepmann, 1990; Frenkel et al., 1991; Siepmann y Frenkel, 1992; de Pablo et al., 1992). El procedimiento empleado por este método para obtener las nuevas microestructuras se basa en generar movimientos por reconstrucción. Es decir, se selecciona una cadena al azar y se corta en una posición aleatoria. Seguidamente, dicha cadena se reconstruye enlace a enlace, considerando diferentes posiciones posibles (un total de  $N_s$ ) y se elige una de ellas con una probabilidad proporcional al factor de Boltzmann normalizado ( $W_i$ , según ecuación 26)

$$W_i = \frac{\exp(-\beta U_i)}{\sum_{k=1}^{N_s} \exp(-\beta U_k)} \quad (26)$$

De esta manera las posiciones energéticamente más favorecidas tienen una mayor probabilidad de ser elegidas. La reversibilidad microscópica se asegura mediante un criterio apropiado de aceptación, tal como se expresa en la siguiente ecuación:

$$P_{ac} = \min \left( 1, \frac{W_{cadena}^{viejo} P_{nuevo}}{W_{cadena}^{nuevo} P_{viejo}} \right) \quad (27)$$

Donde el peso de la parte reconstruida de la cadena se da como el producto de los pesos de los segmentos individuales (ecuación 28)

$$W_{cadena} = \prod_i W_i \quad (28)$$

El método CBMC ha sido ampliamente aplicado, destacando su uso en la determinación de propiedades termodinámicas de equilibrio (Leontidis et al., 1995; Widmann et al., 1995; de Pablo et al., 1993a), potenciales químicos de polímeros (de Pablo et al., 1992; Frenkel y Smit, 1992), equilibrios de fase en fluidos alquílicos largos (Laso et al., 1992; Siepmann et al., 1993; Frenkel y Mooij, 1994) y solubilidades de moléculas pequeñas en matrices poliméricas (de Pablo et al., 1993b).

Cabe destacar que el método CB ha sido utilizado para el estudio de sistemas constituidos por alcanos lineales de tamaño medio (de Pablo et al., 1992; Leontidis et al., 1994). Además, dicho método se ha empleado con éxito en el estudio de las propiedades conformacionales de tioles de alquilo unidos por un extremo de la cadena a una superficie plana (Siepmann y McDonald, 1992). Este último punto tiene una especial relevancia puesto que convierte el método CB en una potente herramienta para poder estudiar diferentes propiedades de polímeros tipo *Comb-like* que presenten cadenas laterales alquílicas unidas a cadenas poliméricas rígidas (León et al., 2000c).

#### II.4. Métodos de simulación de sistemas en disolución

Muchos de los sistemas químicos estudiados mediante métodos de simulación presentan sus propiedades de interés cuando se encuentran en disolución. Por este motivo, poder simular el efecto del disolvente sobre los sistemas investigados se ha convertido en uno de los mayores retos de la química teórica.

Independientemente del formalismo usado, ya sea cuántico o clásico, y de forma muy general, las metodologías desarrolladas hasta el momento para simular un sistema en disolución pueden dividirse en dos categorías: modelos discretos de disolvente y modelos continuos.

##### (i) *Modelos discretos.*

Usando este modelo el disolvente se trata explícitamente, permitiendo la descripción microscópica de la estructura tanto del soluto como del disolvente, así como las interacciones específicas que se den entre las moléculas de ambas especies.

##### (ii) *Modelos continuos.*

Describen el disolvente como un medio dieléctrico continuo con capacidad de interactuar con las moléculas de soluto.

La aplicación del modelo discreto dentro de la descripción cuántica de un sistema químico presenta una gran limitación. En la práctica únicamente pueden ser simuladas un número muy limitado de configuraciones de soluto rodeado por un pequeño número de moléculas de disolvente. A pesar de ello, permiten describir de forma precisa las modificaciones en la estructura electrónica del soluto inducidas por las interacciones específicas con las moléculas de disolvente.

Por el contrario, las simulaciones basadas en el uso de campos de fuerza, permiten el cálculo de sistemas con un gran número de moléculas de disolvente y configuraciones de soluto. La mayor limitación que presenta este tipo de simulación es que el efecto del disolvente sobre las propiedades electrónicas del soluto no puede ser descrito mediante potenciales empíricos. Una estrategia usada para solventar dicha limitación que ha dado resultados excelentes es el uso de métodos híbridos (Field et al., 1990; Gao, 1994): el soluto es tratado mediante una descripción clásica mientras que las interacciones del disolvente con el soluto se describen a nivel cuántico.

Dentro del formalismo de la mecánica cuántica, los modelos continuos permiten incorporar los efectos del disolvente sobre la estructura electrónica del soluto, pero a cambio de desestimar la descripción microscópica del disolvente en las zonas vecinas al soluto. De los métodos basados en un modelo dieléctrico continuo de disolvente, los llamados *Self-Consistent Reaction Field* (SCRF) han sido los que más atención han despertado. Los diferentes métodos existentes prestan una especial atención a la determinación de la contribución electrostática de la energía libre de solvatación ( $\Delta G_{\text{sol}}$ ). Esta contribución se evalúa asumiendo que el medio dieléctrico infinito reacciona con la distribución de carga del soluto, generando un campo de reacción que a su vez interacciona con el soluto. Las principales diferencias entre los diferentes métodos SCRF existentes se encuentran en: la descripción de la interfase soluto-disolvente, la definición del campo de reacción y en la evaluación de las contribuciones no electrostáticas en  $\Delta G_{\text{sol}}$  (Luque et al., 1996a).

A pesar de las ventajas que se derivan de emplear el formalismo cuántico, los modelos continuos no permiten describir detalladamente las interacciones específicas entre el soluto y el disolvente. Por ejemplo, la influencia que puede ejercer la formación de puentes de hidrógeno entre las moléculas de disolvente y del soluto sobre las

propiedades electrónicas de este último no puede ser evaluada. Por este motivo recientemente ha aumentado el uso de modelos híbridos (continuo/discreto) de disolvente. Así se representa de forma explícita el soluto y un número determinado de moléculas de disolvente, rodeándose todo el sistema por un medio dieléctrico continuo (Aleman, 1999)

### Método PCM

En la presente memoria el método de solvatación utilizado en cálculos cuánticos ha sido una versión del método PCM (*Polarizable Continuum Model*), desarrollado por Tomasi y colaboradores y adaptada al hamiltoniano AM1 por Orozco y Luque (Luque et al., 1993). Este método, evalúa la energía libre de solvatación ( $\Delta G_{sol}$ ) dividiendo el proceso de transferencia del soluto desde la fase gas a la disolución en tres etapas:

- (i) Formación de la cavidad del soluto en el interior del disolvente.
- (ii) Generación de una entidad de van der Waals en el interior de dicha cavidad.
- (iii) Asignación de la distribución de cargas del soluto dentro de la entidad generada.

Así la energía libre de solvatación se expresa como:

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{cav} + \Delta G_{vdw} + \Delta G_{ele} \quad (29)$$

Donde  $\Delta G_{cav}$  es el trabajo reversible involucrado en la construcción de la cavidad,  $\Delta G_{vdw}$  es el trabajo involucrado en la generación de la entidad de van der Waals y  $\Delta G_{ele}$  representa la interacción entre la distribución de carga del soluto y el campo de reacción generado por el soluto en el disolvente.

El término de cavitación se obtiene aplicando la teoría de la partícula escalada de Pierotti (1976). La contribución de van der Waals (Ecuación 30) se calcula a partir de una relación lineal con el área de la superficie molecular (Bachs et al., 1994; Orozco y Luque, 1994; Luque et al., 1996b).



$$\Delta G_{vdW} = \sum_i \xi_i S_i \quad (30)$$

Donde  $\xi_i$  es la dureza del átomo  $i$  y  $S_i$  es la porción de superficie molecular correspondiente al átomo  $i$ . La dureza de los diferentes átomos en agua y  $\text{CCl}_4$  se representa mediante parámetros previamente determinados (Bachs et al., 1994; Orozco y Luque, 1994; Luque et al., 1996b).

Finalmente, la interacción electrostática entre soluto y disolvente se determina a través del formalismo SCRF mencionado en el apartado anterior. Dentro este formalismo, el disolvente se describe como un medio dieléctrico continuo que reacciona frente la distribución de cargas del soluto, generando un campo de reacción. La interacción electrostática entre soluto y disolvente se introduce como un operador de perturbación ( $\hat{V}_R$ ) sobre el hamiltoniano del soluto:

$$\left( \hat{\mathbf{H}}^0 + \hat{V}_R \right) \Psi = E \Psi \quad (31)$$

Dónde  $\hat{\mathbf{H}}^0$  es el hamiltoniano del soluto en vacío.

El operador de perturbación se describe como la distribución de carga ( $\sigma(s)$ ) en la superficie de la cavidad del soluto (ecuación 32). Para su cálculo, la superficie del disolvente se divide en  $M$  elementos  $S_i$  suficientemente pequeños como para considerar que la distribución de carga ( $\sigma(S_i)$ ) en su interior es constante. Esto hace que sea posible encontrar  $\hat{V}_R$  en términos de cargas puntuales ( $q_i$ ) en la superficie de la cavidad, las cuales se obtienen resolviendo la correspondiente ecuación de Laplace.

$$\hat{V}_R = \int_s \frac{\sigma(s)}{|r_0 - r|} dS = \sum_{i=1}^M \frac{\sigma(S_i) S_i}{|r_0 - r|} = \sum_{i=1}^M \frac{q_i}{|r_0 - r|} \quad (32)$$

### **III. OBJETIVOS**



### III. OBJETIVOS

En esta memoria se han investigado diferentes aspectos relacionados con la estructura y la solubilidad de gases en algunos polímeros desarrollados en nuestro grupo de investigación. Concretamente, los sistemas estudiados a lo largo de esta Tesis Doctoral han sido:

- El ácido poli( $\gamma$ -glutámico).
- El poli( $\alpha$ -benzil- $\gamma$ -glutamato).
- Algunos ésteres alquílicos del ácido poli( $\gamma$ -glutámico).
- Los complejos estequiométricos poli( $\alpha$ -glutamato)-octiltrimetilamonio y poli( $\gamma$ -glutamato)-octiltrimetilamonio.
- Los poli( $\alpha$ -alquil- $\beta$ -L-aspartato)s con grupos alquilo de tamaño corto, medio y largo.

Específicamente los objetivos perseguidos han sido:

1) Proponer un modelo para la conformación helicoidal del ácido poli( $\gamma$ -glutámico) no ionizado, y estudiar el efecto de diferentes factores tales como el disolvente, la temperatura y el tamaño molecular en su estabilidad.

2) Estudiar la estructura cristalina, elaborando un modelo atomístico, de algunos de los poli( $\gamma$ -glutamato)s derivados del PGGA de biosíntesis:

- poli( $\alpha$ -bencil- $\gamma$ -glutamato): formas I y II
- poli( $\alpha$ -etil- $\gamma$ -glutamato): formas II y III

3) Investigar la naturaleza de la interacción electrostática característica de los complejos estequiométricos polipéptido - tensioactivo mediante diferentes compuestos modelo.

4) Caracterizar estructuralmente los complejos esquiométricos constituidos por tensioactivos del tipo alquiltrimetilamonio y los homopolímeros derivados del ácido glutámico, el ácido poli( $\alpha$ -glutámico) y el ácido poli( $\gamma$ -glutámico).

5) Obtener un modelo dinámico para las fases A y C del poli( $\alpha$ -octadecil- $\beta$ -L-aspartato), el cuál permita estudiar sus principales características estructurales. Los resultados serán comparados con los obtenidos anteriormente para la fase B del mismo polímero.

6) Desarrollar una estrategia teórica capaz de evaluar la solubilidad de gases simples en polímeros con estructuras ordenadas. Esta metodología servirá para estimar la solubilidad de diferentes gases en polímeros desarrollados en nuestro grupo de investigación.

**IV. RESULTADOS:  
ESTUDIOS CONFORMACIONALES DEL ÁCIDO  
POLI( $\gamma$ -GLUTÁMICO)**



## IV. ESTUDIOS CONFORMACIONALES DEL ÁCIDO POLI( $\gamma$ -GLUTÁMICO)

Desde un punto de vista químico, uno de los aspectos más destacables de los organismos procariontes es la gran diversidad de biopolímeros que aparecen en sus estructuras celulares. El ácido poli( $\gamma$ -glutámico), abreviado PGGA (Figura IV.1), es un polipéptido soluble en agua sintetizado por diversas especies bacterianas del género *Bacillus*, como el componente principal de su cápsula celular (Troy, 1982).

Constitucionalmente el PGGA es un *nylon 4* substituido en el carbono 4 con un grupo carboxilo. Éste punto resulta esencial para comprender el interés suscitado por dicho polímero en los últimos años como posible sustituto de las fibras obtenidas mediante poliamidas convencionales (como por ejemplo el *nylon 6* y el *nylon 66*). Así, el PGGA presenta importantes ventajas sobre las poliamidas convencionales: puede obtenerse mediante biosíntesis y es biodegradable. Ello ha conducido a diferentes grupos de investigación al estudio de fibras y filmes de ésteres derivados del PGGA de biosíntesis (Gross et al., 1995, Kubota et al., 1992).

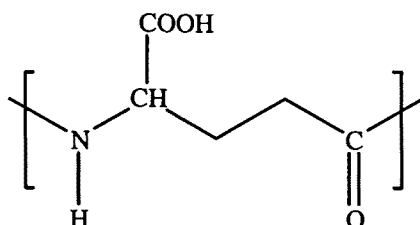


Figura IV.1. Representación esquemática del ácido poli( $\gamma$ -glutámico)

### IV.1. Obtención del polímero de origen natural

A pesar de que los primeros estudios realizados sobre la obtención de este polímero datan de los años 50, no ha sido hasta los años 90 que se ha intensificado la investigación para la optimización del proceso de biosíntesis (Birrer et al., 1994;



Borbély et al., 1994; Goto y Kinuoka, 1992; Kubota et al., 1993). En dichos trabajos las cepas usadas corresponden a las especies *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis*.

El gran problema que presenta el PGGA de origen natural es su constitución química a nivel enantiomérico. A excepción de la especie *Bacillus anthracis*, el resto de los organismos capaces de sintetizarlo producen polímeros constituidos por mezclas enantioméricas, dónde el enantiómero L siempre está en menor proporción.

El uso de *Bacillus anthracis* fue prohibido debido a su alta peligrosidad, ya que es el causante de la enfermedad letal conocida como *Antrax*. Es, de hecho, uno de los primeros organismos que entraron a formar parte de los arsenales de armas biológicas de las grandes potencias militares. Sin embargo, estudios sistemáticos acerca de la influencia del medio de cultivo en la constitución química del polímero han logrado controlar la proporción de enantiómero L. Así, se ha demostrado que aumentando la concentración de  $Mn^{2+}$  en el medio, se consigue reducir la proporción de dicho enantiómero desde un 45 % a un 5%, tanto en *Bacillus licheniformis* (Cromwick y Gross 1995; Pérez-Camero et al., 1999) como en *Bacillus subtilis* (Gross et al., 1995).

## IV.2. Estructura del ácido poli( $\gamma$ -glutámico)

La capacidad para adoptar estructuras secundarias regulares no es una propiedad exclusiva de los polipéptidos constituidos por  $\alpha$ -aminoácidos. El estudio de nuevos materiales constituidos por  $\omega$ -aminoácidos ha mostrado como dichos sistemas también pueden adoptar conformaciones helicoidales. Esto ha servido a su vez, como punto de partida para el diseño de compuestos químicos sintéticos capaces de mimetizar las propiedades conformacionales de determinados productos biológicos.

La determinación de la conformación del PGGA es, en este contexto, un punto de gran interés para el posterior desarrollo de nuevos materiales con propiedades conformacionales específicas, ya que se trata de un polímero constituido por  $\gamma$ -aminoácidos. Sin embargo, se han realizado pocos estudios sobre la conformación del PGGA en disolución y sobre su estructura en estado sólido, en contraste con la gran cantidad de trabajos realizados sobre sus métodos de obtención.

#### IV.2.1. Estructura en estado sólido

En estado sólido únicamente están reportados estudios preliminares de fibras y filmes de PGGA mediante técnicas de difracción de rayos X y RMN de  $^{13}\text{C}$  (Gross, 1994). Las muestras analizadas correspondían a polímeros de biosíntesis con una composición de enantiómero L variable (del 10 al 35 %).

Los resultados del análisis mediante RMN apuntaban hacia una marcada complejidad estructural, para cualquiera de las diferentes proporciones de enantiómero L. A pesar de estos resultados, la difracción de rayos X de todas las muestras, independientemente de la proporción de enantiómero L, daba los mismos espaciados. Estos datos sugirieron que los dominios conformacionales estaban constituidos por segmentos de polímero homquirales.

#### IV.2.2. Conformación en disolución acuosa.

Las técnicas usadas para establecer la conformación del PGGA en disolución acuosa han sido, generalmente, poco precisas y han llevado a interpretaciones contradictorias.

Como poliácido orgánico que es, las conformaciones que puede adoptar el PGGA dependen del grado de ionización que presente, es decir, del pH de la disolución estudiada. Parece estar bien establecido que a pH básico, con las cadenas laterales totalmente ionizadas, el polímero se comporta como un polielectrolito rígido, sin una estructura secundaria definida (Edelhoeh y Batmeman, 1957; Balasubramian et al., 1973; Crescenzi et al., 1996).

A pesar de ello, existe un trabajo realizado con técnicas espectroscópicas (IR) y técnicas de dispersión de la luz (*Optical Rotatory Dispersion, ORD*), donde se propone que el polímero ionizado podría presentar una conformación parecida a las hojas  $\beta$  de los poli( $\alpha$ -aminoácidos). Las posibles repulsiones entre cargas negativas se verían minimizadas por la mayor distancia entre grupos carboxilo en comparación al ácido

poli( $\alpha$ -glutámico), y a las interacciones de estos grupos con los cationes presentes en la disolución (Marlborough, 1973).

La conformación del PGGA en medio ácido (no ionizado) es la que más controversia ha suscitado. Mediante ORD y estudios viscosimétricos Edelhoeh y Batmeman (1957) estudiaron el efecto del pH sobre la conformación del polímero, llegando a concluir que dicha conformación no era regular, a pesar de que las medidas de viscosidad de las muestras apuntaban a una estructura más compacta que la esperada para un ovillo estadístico. El supuesto acortamiento en la distancia extremo - extremo del polímero estudiado, fue atribuido a una cierta predisposición de los monómeros del polímero a interactuar de forma inespecífica entre ellos, como consecuencia de una deficiente solvatación por parte del agua. A su vez, con este modelo conformacional, tampoco se pudo justificar las discontinuidades que presentaban las curvas de valoración en el rango de luz visible usado para los ensayos de ORD.

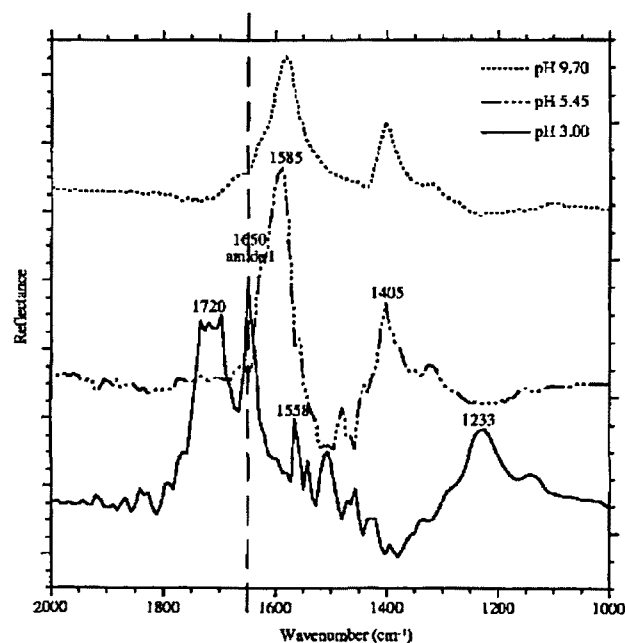
Posteriormente Rydon (1964), únicamente mediante estudios de ORD, llegó a conclusiones opuestas. Amplió el rango de luz visible utilizada en los análisis y dio explicación a las ambigüedades en las curvas de valoración presentadas por Edelhoeh y Batmeman. A partir de sus datos, por analogía con estudios realizados en poli( $\alpha$ -aminoácidos), Rydon interpretó los cambios en el espectro de ORD en función del pH como una transición conformacional hélice - ovillo, proponiendo una conformación helicoidal para el PGGA en disolución acuosa ácida. Analizando las posibles combinaciones de aceptor - dador de puente de hidrógeno y teniendo en cuenta las restricciones estéricas que podía presentar por su constitución, postuló que dicha conformación tenía que corresponder a hélices del tipo  $3_{17}$  o  $3_{19}$ . Dichas conclusiones parecieron ser refrendadas por estudios de espectroscopía realizados por Marlborough (1973).

Sin embargo estos, resultados no se vieron confirmados en trabajos posteriores, hechos también mediante técnicas espectroscópicas, dónde se concluía que el PGGA en medio ácido no presentaba conformación definida. Balasubramian et al. (1973) interpretaron los datos de ORD y de dicroísmo circular (CD) de forma contraria a la que Rydon sugirió. Los cambios en la dispersión de la luz y en el espectro de CD en función del pH fueron interpretados como efectos derivados de la ionización de las cadenas

laterales del polímero, y no como cambios conformacionales asociados a una transición hélice - ovilleo.

A pesar de esta interpretación, Balasubramian et al. (1973) admitieron la existencia de cierta regularidad conformacional para la forma no ionizada, debido a que detectaron las mismas discontinuidades en el espectro de ORD que ya observaron Edelhoeh y Batmeman (1957). Este hecho les llevó a proponer que el PGGGA en disolución ácida presentaba una organización supramolecular mediante interacciones no específicas entre diferentes cadenas de polímero. Esta hipótesis, a su vez, podía explicar los datos de viscosidad obtenidos hasta ese momento.

Muy recientemente He et al. (2000) usando técnicas de espectroscopía (UV, FTIR y ATR) han estudiado diferentes aspectos estructurales y conformacionales del PGGGA, relacionados con el posible uso de este polímero como quelante de metales pesados. Estos autores han investigado mediante espectroscopía de infrarrojo los cambios conformacionales que se dan en el PGGGA en función de la variación del pH, siguiendo los desplazamientos de las bandas de absorción de las diferentes componentes vibracionales de los grupos amida (Figura IV.2).



**Figura IV.2.** Espectro de ATR-FTIR para el PGGGA en función de pH de la muestra, a concentración de polímero de 5 mM y una fuerza iónica de 0.01 M de NaCl (He et al., 2000).

De esta manera, han descrito como a pH ácido y para concentraciones pequeñas de polímero, dichas bandas aparecen en las mismas posiciones que en la hélice  $\alpha$  de los polipéptidos. A medida que el pH de la disolución aumenta, dichas bandas se desplazan hacia posiciones cercanas a las que aparecen en conformaciones tipo hojas  $\beta$ . Finalmente, a pHs en los que el grado de ionización está en torno del 40% de las cadenas laterales, los datos de FTIR indican la aparición de conformaciones irregulares.

De forma análoga han estudiado el efecto de la concentración de iones  $U^{4+}$  en el medio sobre las preferencias conformacionales del PGGA, describiendo como a medida que aumenta la concentración de iones en el medio, el polímero tiende a perder su conformación helicoidal para dar estructuras de tipo hojas  $\beta$ . Resultados similares se han obtenido del estudio de la influencia de la concentración de polímero sobre la conformación adoptada. A medida que la disolución se hace más concentrada, las interacciones entre cadenas de polímero aumentan dando lugar a estructuras laminares.

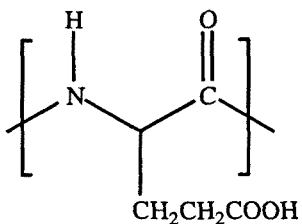
Así, en este último trabajo se concluye que el PGGA en disolución acuosa presenta diferentes tipos de conformación en función de las condiciones del medio. La conclusión más destacable es la presencia de una conformación helicoidal similar a la hélice  $\alpha$  en medio ácido.

### **IV.3 Análisis comparativo del isómero constitucional del ácido poli( $\gamma$ -glutámico): El ácido poli( $\alpha$ -glutámico)**

El ácido poli( $\alpha$ -glutámico), abreviado PAGA, es el isómero constitucional del PGGA y su estructura química es análoga a la de los polipéptidos naturales (Figura IV.3)

Al igual que el PGGA, la conformación del PAGA depende del grado de ionización que presentan los grupos carboxilo de sus cadenas laterales. El efecto de la ionización de las cadenas laterales ha sido estudiado mediante técnicas potenciométricas y espectroscópicas. Las curvas de valoración obtenidas mediante potenciometría permitieron observar transiciones conformacionales en función de la concentración de protones en el medio (Olander et al., 1968; Holtzer et al., 1996). Así mismo, el

seguimiento de los cambios asociados al estado de ionización del polímero mediante CD muestran conformaciones y estados de agregación diferentes en función de la temperatura y del pH (Holtzer et al., 1996).



**Figura IV.3.** Representación esquemática del ácido poli( $\alpha$ -glutámico).

Cuando el polímero está totalmente ionizado se asume que forma un ovillo estadístico mientras que en su forma no ionizada se ha detectado mayoritariamente conformación de hélice  $\alpha$ . Dicha conformación ha sido descrita tanto en estado sólido (Keith et al., 1969) como en disolución acuosa ácida (Holtzer et al., 1996). Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se describe en detalle la topología de la hélice  $\alpha$  adoptada.

#### IV.4 Objetivos

El objetivo general de este capítulo es estudiar las propiedades conformacionales del PGGA en disolución acuosa. Este objetivo se ha desglosado en los siguientes puntos que se detallan a continuación:

1) Obtener un modelo atómico de la conformación helicoidal adoptada por el PGGA no ionizado en disolución acuosa. El modelo que se proponga debe ser compatible con los datos experimentales de espectroscopía reportados hasta el momento.

2) Estudiar en detalle el comportamiento dinámico de la hélice del PGGA en disolución acuosa. Mediante este estudio se pretende explicar los posibles reajustes estructurales que pueda inducir el disolvente sobre el modelo inicialmente propuesto, así como confirmar su estabilidad.

3) Investigar la influencia que ejerce la temperatura y el tamaño de la cadena polimérica en la estabilidad de la hélice propuesta para el PGGA.

4) Establecer una comparación entre la conformación helicoidal de PGGA y la de su isómero constitucional, el PAGA. Para ello se deberá analizar en detalle las características particulares de la hélice  $\alpha$  adoptada por el PAGA.

**IV.5. “On the helical conformation of un-ionized poly( $\gamma$ -D-glutamic acid”**

Zanuy, D.; Alemán C.; Muñoz-Guerra, S. *Int. J. Biol. Macromol.*, **1998**, *23*, 175-184.





## On the helical conformation of un-ionized poly( $\gamma$ -D-glutamic acid)

David Zanuy, Carlos Alemán \*, Sebastián Muñoz-Guerra

*Departament d'Enginyeria Química, Universitat Politècnica de Catalunya, ETSEIB, Diagonal 647, Barcelona E-08028, Spain*

Received 30 November 1997; received in revised form 1 April 1998; accepted 1 April 1998

### Abstract

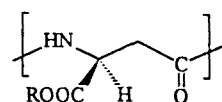
The conformational preferences of the naturally occurring poly( $\gamma$ -D-glutamic acid) in the un-ionized state were investigated using a combination of molecular dynamics and quantum mechanical calculations. Results indicated that a left-handed helix with 19-membered ring hydrogen bonds set between the CO of the amide group  $i$  and the NH of amide group  $i + 3$  is the most stable conformation for this poly( $\gamma$ -amino acid). Weak intramolecular interactions between the oxygens of the carboxyl side groups and the NH of the backbone amide groups were detected. They are assumed to be responsible for the unexpected handedness exhibited by the helix with regards to the stereochemistry of the compound. © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Proteins and nucleic acids are unique in being able to adopt well-defined folding patterns, and in consequence, to perform highly selective functions. Among synthetics, poly( $\alpha$ -amino acid)s have been traditionally considered the only polymers capable to form stable secondary structures with features similar to those found in proteins. The design of new polymers with predictable folding properties but composed of building blocks other than natural  $\alpha$ -amino acids is an emerging field to which great efforts are being devoted [1–3]. Accordingly, a sustained research on the conformational behavior of poly( $\alpha$ -alkyl  $\beta$ -L-aspartate)s has been carried out in our laboratory during the last decade [4–11]. Our results have shown that these L-aspartic acid deriving poly( $\beta$ -amino acid)s generate stable helical structures analogous to the ubiquitous  $\alpha$ -helix. Last year two other independent laboratories [12,13] demonstrated that  $\beta$ -amino acid oligomers are capable of folding like  $\alpha$ -amino

acids giving rise to a sort of helical arrangements very close to those previously reported for poly( $\beta$ -L-aspartate)s.

Poly( $\alpha$ -alkyl  $\beta$ -L-aspartate)s may be envisaged as nylon 3 derivatives with an alkoxy carbonyl group attached to the backbone  $\beta$ -carbon of the repeating unit.



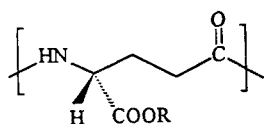
A variety of helical arrangements differing in the symmetry of the helix are known for this family of poly( $\beta$ -amino acid)s, all of them with hydrogen bonds intramolecularly set between either every third or every fourth amide group. 13/4 and 4/1 right-handed helices are by far the most frequent structures. Other folding patterns occasionally found are those consisting of 16/5 and 17/4 helices [10,11]. The conformational parameters of all these helices have been precisely determined using a combination of energy calculations and LALS refinements against X-ray data. What is particularly noticeable in this family of polymers

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 4016680; fax: +34 93 4016600; e-mail: aleman@eq.upc.es

is the high propensity that they show to form stable  $\alpha$ -helix-like structures in spite of the presence of the additional methylene in the main chain.

Investigation of poly( $\gamma$ -amino acid)s constitutes a further step in the search for  $\alpha$ -helix-like forming polymers different from poly( $\alpha$ -amino acid)s. In these compounds, the amide groups in the main chain become separated by three carbon atoms. Therefore the conformational flexibility is even greater than in their poly( $\beta$ -amino acids) homologues and formation of compact folding patterns should be expected to be more difficult. Some years ago, the structure of poly( $\alpha$ -benzyl  $\gamma$ -L-glutamate) and poly( $\alpha$ -methyl  $\gamma$ -L-glutamate) was investigated in our group by both X-ray diffraction and electron microscopy [14]. These studies showed that these polymers also form rather stable helical structures reminiscent of the  $\alpha$ -helix. Very recently FTIR and NMR studies of  $\gamma$ -amino butyric acid oligomers revealed that secondary structures stabilized by nearest neighboring hydrogen bonds are favored in these compounds [15].

Returning to our earlier investigations on poly( $\gamma$ -glutamate)s, we want to report now on the conformation of poly( $\gamma$ -D-glutamic acid), abbreviated PGDGA. This compound is a naturally occurring poly( $\gamma$ -amino acid) synthesized as a slime layer by a variety of members of the genus *Bacillus* [16]. Although in most of cases the natural product is composed of a mixture of D- and L-glutamic acid enantiomers, the specie *B. anthracis* is distinct in producing the optically pure D-enantiomorph polymer [17]. By analogy with poly( $\beta$ -aspartate)s, poly( $\gamma$ -glutamic acid) and poly( $\gamma$ -glutamate)s should be considered nylon 4 derivatives with the carboxyl side group attached to the fourth backbone carbon atom.



The structure of PGDGA in solution has been extensively investigated by a variety of methods [18–22]. Results revealed considerable differences depending on the degree of ionization of the polymer. Whereas the un-ionized acid is reported to possess a helical conformation, the ionized salt behaves like in the random coil state. Rydon has put forward two possible arrangements for the

helical form of PGDGA on the basis of optical rotatory dispersion experiments, both of them stabilized by intramolecular hydrogen bonds [22]. However no atomistic model of the helical conformation of PGDGA has been described so far in spite of the biological and structural significance of this polymer.

In this work we have used energy calculations including both force-field and quantum mechanical methods to discern the conformation preferred by un-ionised PGDGA. For this purpose all possible helical conformations of the polymer compatible with the hydrogen bonding schemes proposed by Rydon [22] were comparatively analyzed by using molecular dynamics (MD) simulations. On the other hand, the conformational preferences of the side chain were determined through quantum mechanical calculations at both *ab initio* Hartree-Fock (HF) and density functional theory (DFT) levels.

## 2. Methods

### 2.1. Molecular models

Molecular models according to the two hydrogen bond schemes proposed by Rydon for un-ionized PGDGA, which are schematically indicated in Fig. 1, were built. These schemes correspond to helices with 17- and 19-membered ring hydrogen bonds set between amide groups  $i$  and  $i+3$ . Whereas the 17-helix has the hydrogen bonds running from NH to carbonyl in the C-terminal direction, the 19-helix form them from carbonyl to NH in the same backbone direction. Other helical arrangements composed of 12- and 14-membered ring hydrogen bonds set between amide groups  $i$  and  $i+2$ , as indicated in Fig. 1, were also considered. In addition, both right (R) and left (L) handed helices may be conceived for each arrangement. All these possibilities were examined by energy calculations.

### 2.2. Force-field parametrization

Charges for the  $\gamma$ -glutamic acid residue as well as acetyl and *N*-methyl amide terminal groups were determined by fitting the AM1 molecular electrostatic potential (MEP) computed for the dipeptide ( $\text{CH}_3\text{-CO-NH-CHCOOH-CH-CH}_2\text{-CO-NH-CH}_3$ ) to a set of atomic centered charges

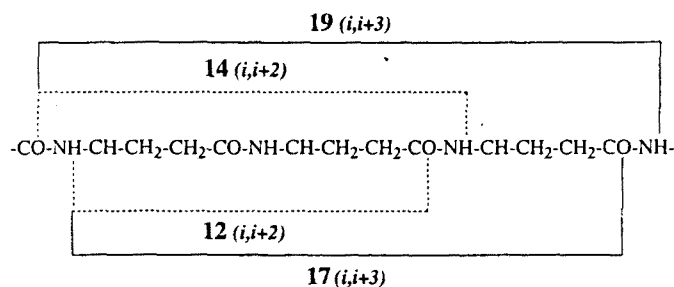


Fig. 1. Hydrogen-bonding schemes compatible with the helical conformations of un-ionized poly(-D-glutamic acid).

[23,24]. For this purpose around 7000 MEP points were computed. Moreover, as charges are dependent on conformation [25] they were computed for the most relevant minimum energy conformations of the dipeptide. These were obtained from geometry optimizations at the AM1 level of conformers generated from rotations of the backbone dihedral angles. Finally the charges evaluated for the different conformations were averaged weighting them according to the Boltzmann formula.

### 2.3. Conformational search

A preliminary search for the helical conformations compatible with the hydrogen bonding schemes provided by Rydon was performed using the GEMOX computer program [26]. This is a computational method based on a corrected grid search algorithm which was designed to generate all the molecular arrangements sterically allowed for a system with a given helical symmetry and an approximate estimation of the axial repeat length. The reliability of the GEMOX methodology has been previously checked in the analysis of other helical polyamides [10,26]. A detailed description of the computational strategy used by GEMOX for the conformational search is provided in Ref. [26].

### 2.4. Force-field simulations

MD simulations for the right handed 17-, 19- and 14-helices and left-handed 17-, 19-, and 12-helices were performed using the simulation package AMBER 3.0 Rev. A [27]. The starting geometry for each arrangement was taken from the conformational search performed with GEMOX. Simulations were done on PGDGA chains composed of 18 residues and blocked at their ends with acetyl and *N*-methylamide groups. All the simulations

were carried out in the gas-phase. This approach has been proved to be enough for studying qualitatively the relative stability of helices in non-polar environments [28,29]. Simulations were performed using a non-bonded cutoff of 12 Å and a dielectric constant of 1.0. Bond distances and angles were constrained to the equilibrium values using the SHAKE algorithm [30]. Prior to MD simulations the structures were relaxed with 300 steps of steepest descent minimization followed by 80 ps of MD, in which hydrogen bonding distances were restrained at force constants of 50 kcal/mol·Å<sup>2</sup>. After this, restraints were relaxed along 30 ps of MD by slowly removing the force constants. The systems thus obtained were used as starting points for the simulations of 500 ps with a 2 fs step. Coordinates were stored at every 500 time steps.

### 2.5. Quantum mechanical calculations

To disclose the conformational preferences of the side group for the most favored helical arrangement of PGDGA, the dihedral  $\chi_1$  (see Fig. 2) was scanned in steps of 20° between 0 and 360°. Calculations were performed at both HF and DFT levels using the standard 6-31G(d) (d functions of C, N and O atoms) basis set [31]. DFT calculations were carried out with the B3-LYP [32] hybrid functional, for which gradient corrections are introduced using the Becke's three-parameter functional [33] and the non-local correlation is provided by the Lee, Yang and Parr (LYP) [34] functional. A dipeptide model was considered, which was initially optimized at each level of theory while fixing the backbone dihedral angles to the average values provided by MD simulations. Then, the side chain dihedral angle was rotated in steps of 20° and the energy of the system evaluated.

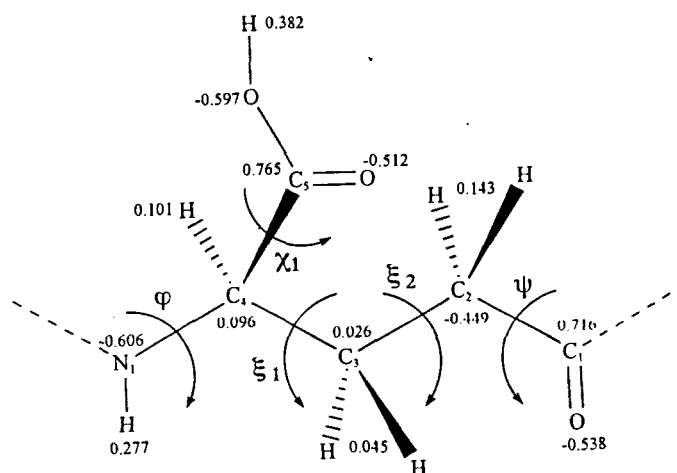


Fig. 2. Schematic representation of the monomeric unit of PGDGA. The atomic charges and torsion angles are indicated.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Force-field parametrization

The molecular geometries of a set of 25 different starting conformations for the  $\gamma$ -glutamic acid dipeptide were optimized at AM1 level. Table 1 shows the backbone dihedral angles and relative energies for the six conformers of lowest energy. It should be noted that the two central dihedral angles retain a near *trans* conformation in all cases. The semiempirical AM1 wavefunctions calculated for each geometry were used to compute the electrostatic charges. These charges were weighted according to the Boltzmann populations and the resulting values are displayed in Fig. 2. The  $\beta$ -carbon atom, i.e. C<sub>3</sub> in Fig. 2, appeared to be the most sensitive to conformation showing a range of variation in charge from  $-0.0283$  to  $0.0928$  electrostatic units (e.u.).

A comparison with the atomic charges previously reported for  $\alpha$ - and  $\beta$ -amino acids [8,35]

reveals considerable dissimilarities in some atoms. First, atomic charges on the amide group are larger for  $\gamma$ -glutamic acid than for both coded  $\alpha$ -amino acids and  $\alpha$ -alkyl  $\beta$ -L-aspartamyl residues. This seems to be a consequence of the electronic effects exerted by the side group, which increases the polarity of the molecule by electron donation towards the amide group. On the other hand, the  $\alpha$ -carbon of the  $\gamma$ -glutamic acid, i.e. C<sub>2</sub> in Fig. 2, has a large negative atomic charge ( $-0.449$  e.u.). This value is consistent with that found for  $\alpha$ -alkyl  $\beta$ -L-aspartamyl residues, for which a value of  $-0.442$  e.u. was obtained at the same level of theory [8].

#### 3.2. Conformational search

A complete survey of molecular models compatible with the 17- and 19-helices proposed by Rydon has been performed. For this purpose all the helical conformations with a helix symmetry of  $3.0 \pm 0.50$  residues per turn were generated and their steric energies calculated. Atomic charges parametrized in the previous section were used to compute the electrostatic term, whereas the van der Waals parameters were taken from the AMBER libraries [36]. Seven and nine models were feasible for the 17- and 19-helices, respectively. The lowest energy models for the R and L arrangements of each helix were selected as starting conformations for MD simulations. Furthermore, two new helical arrangements were found acceptable for PGDGA in the conformational search. These were the right-handed 14-helix and the left-

Table 1  
Energies (in kcal mol) and backbone angles (in degrees) for the six minima of lowest energy of  $\gamma$ -glutamic acid dipeptide

Conf. #	$\phi$	$\xi_1$	$\xi_2$	$\psi$	$\Delta E$
I	-115.2	166.5	177.7	157.9	0.0
II	-127.7	164.2	175.4	-73.5	0.1
III	-116.2	159.9	175.4	69.4	0.2
IV	-126.8	158.3	179.6	-177.4	0.2
V	-124.2	163.2	179.4	-70.6	0.2
VI	-111.2	166.2	176.4	70.7	0.3

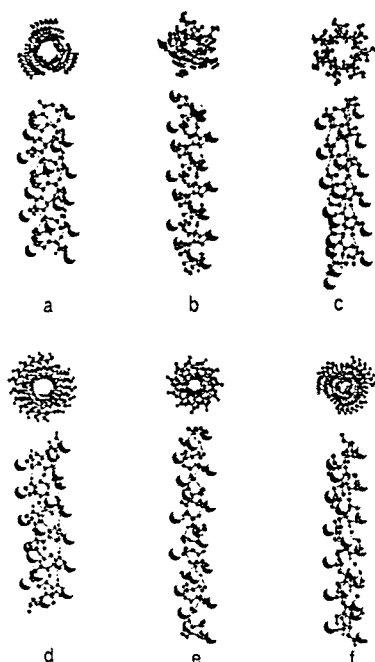


Fig. 3. Axial and equatorial projections of the 17-R (a), 17-L (b), 19-R (c), 19-L (d), 14-R (e) and 12-L (f) helices of PGDGA.

handed 12-helix indicated in Fig. 1. These helices are stabilized by intramolecular hydrogen bonds set between the amide groups  $i$  and  $i+2$ . Three and four models were generated for the 14- and 12-helices respectively. Although these two conformations were not investigated by Rydon, we have considered them in our MD simulation analysis. A schematic view of the most stable model generated by GEMOX for each type of helix is displayed in Fig. 3.

### 3.3. MD simulations

MD simulations led to a fast destabilization of the 14-R- and 12-L- helices with all the hydrogen bonds disappearing after a few ps (10–15 ps). In both cases the regular helices evolved towards unfolded structures replacing the amide ... amide hydrogen bonds by interactions between main chain amide and carboxyl side groups. Inspection of the structures obtained from restrained MD simulations revealed that amide...amide hydrogen bonds are strained in the 12-L-helix with hydrogen-acceptor distances and donor-hydrogen-acceptor angles being about 2.25 Å and 100° respectively. When the hydrogen bond restraints were removed, such

parameters tended to increase leading to unfolded structures. Regarding the 14-R-helix, a similar behavior was found for the hydrogen bonds, but in this case carboxyl groups placed on every third residue are stacked at a distance of about 4.5 Å giving rise to an additional unstabilizing interaction. After relaxation this distance tends to increase up to about 6.5 Å contributing to the rapid disruption of the amide...amide hydrogen bonds.

The progress of the MD simulations for the 17- and 19-helices was followed by the variation taking place in hydrogen bonds distribution, as plotted in Fig. 4. It is shown that the number of amide...amide hydrogen bonds decreases during the MD simulation for the 17-R-, 17-L- and 19-R-helices. In these three helices the first broken hydrogen bonds were those located at the central part of the chain. Inspection to the final structures indicated that the 17-L-helix unfolded, whereas the 17-R- and 19-R-helices remained in a folded structure. For the 17-R-helix a large number of amide...amide hydrogen bonds were broken during the first 250 ps of simulation giving place mainly to backbone...side chain interactions between residues  $i$  and  $i-1$ . On the other hand, for the 19-R-helix a half of the amide...amide hydrogen bonds disappeared after 60 ps. In this case, the initial hydrogen bonds are also replaced by backbone...side chain interactions between residues  $i$  and  $i-2$ . All these results are easily reproducible as shown by repeated observations in independent simulations.

Finally, the 19-L-helix remained stable along the MD simulations (Fig. 4). It should be noted that about 70% of hydrogen bonds are retained after 500 ps of simulation trajectory. Furthermore, these hydrogen bonds are consecutive along the helix confirming the stability of the structure. A more vivid illustration of the conformational stability of the 19-L-helix is achieved by looking at the evolution of the backbone dihedral angles during the MD simulation process (Fig. 5). The average values were estimated by considering only the 12 central residues in order to avoid terminal effects. The averaged backbone dihedral angles and hydrogen bond parameters for the time ranges: 0–200, 200–400, 400–500 and 0–500 ps are listed in Table 2. Regardless the complication that provides a static picture of a helical conformation, results displayed in Fig. 6 and Table 2 clearly indicate that the 19-L-helix remains near from the equilibrium values along all the trajectory. Fig. 6 shows the

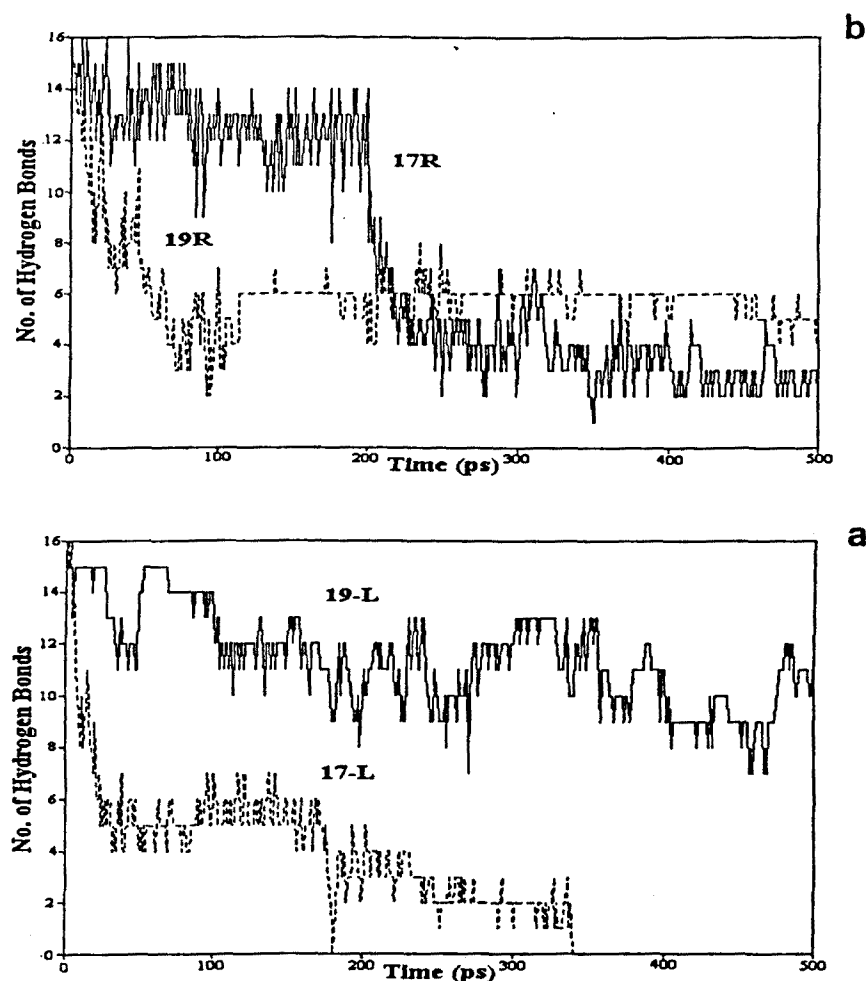


Fig. 4. Number of backbone N-H...O=C hydrogen bonds found in MD simulations for the: (a) 17-R and 19-R-helices; and (b) 17-L- and 19-L-helices.

19-L-helix model used as starting point in the MD simulation and the final structure resulting at the end of the trajectory. Note that the morphology and topology of the two structures are very close, even although a small rearrangement of the backbone dihedral angles has occurred along the MD simulation. On the other hand, on the basis of the Dreiding models built for the 19-L- and 17-L-helices of PGDGA, Rydon [22] concluded that the former is a little less satisfactory than the latter since the  $\beta$  and  $\gamma$ -hydrogen atoms are almost eclipsed. Our MD simulations indicate that PGDGA residues are enough flexible to overcome such unfavorable interactions by a small changes in the backbone dihedral angles, leading to the stabilization of the 19-L-helix.

The present simulations indicate that the 19-L-helix with the hydrogen bonding scheme displayed in Fig. 1 is the favored conformation for PGDGA. This is a striking feature since the spatial orientation of the side group in a poly( $\gamma$ -peptide) made of  $\alpha$ -amino acids in D configuration is opposite to that occurring in the poly( $\alpha$ -peptide) made of the same units and therefore a right-handed helix should be expected. However, the spatial proximity of the side carboxyl group to the main chain may allow weak backbone...side chain electrostatic interactions that can be thought to be responsible for the stabilization of the left-handed helix over the right-handed in PGDGA. This point will be further discussed in the following section.

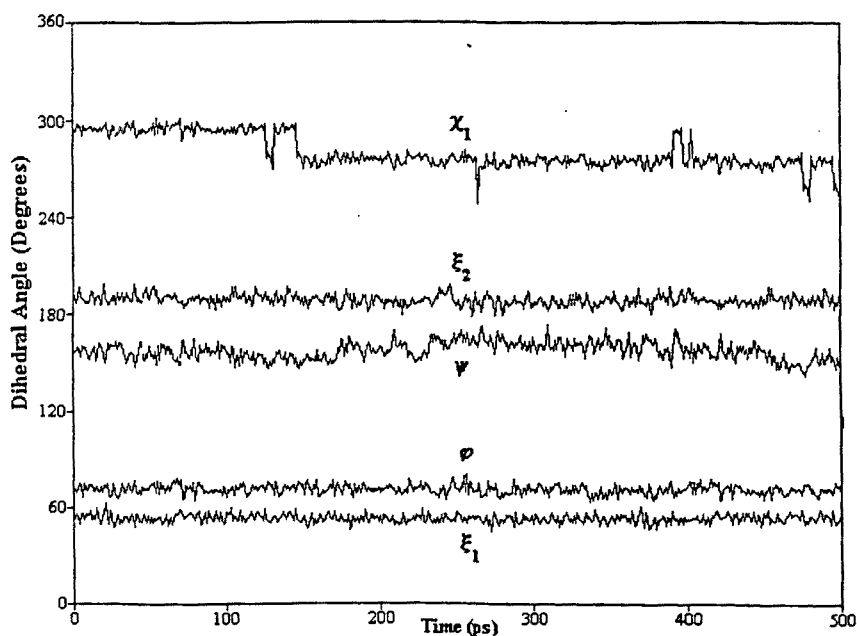


Fig. 5. Evolution of the dihedral angles through the MD simulation for the 19-L-helix.

### 3.4. QM calculations

The conformational preferences of the side chain in the 19-L-helix were explicitly investigated using QM calculations. Thus, an energy analysis at

Table 2  
Averaged backbone dihedral angles (in degrees) and hydrogen bonding geometries (distances in Å and angles in degrees) with their S.E. for the 19-L-helix calculated for different time ranges

Parameter	0–200 ps	200–400 ps	400–500 ps	0–500 ps
$\phi$	71.7 ± 9.6	70.5 ± 10.6	70.7 ± 10.6	71.0 ± 10.2
$\epsilon_1$	53.5 ± 9.3	52.8 ± 9.4	52.3 ± 12.0	53.0 ± 10.0
$\epsilon_2$	189.6 ± 13.3	187.4 ± 16.2	187.7 ± 23.6	188.4 ± 17.0
$\nu$	155.7 ± 23.3	161.9 ± 28.7	168.1 ± 37.4	160.6 ± 29.1
d(H...O)	2.04 ± 0.24	2.06 ± 0.28	2.04 ± 0.31	2.05 ± 0.27
$\angle$ N-H...O	156.4 ± 12.5	151.6 ± 23.2	151.5 ± 19.3	153.5 ± 18.9

both HF 6-31G(d) and B3-LYP 6-31G(d) levels of theory was performed by rotating the dihedral angle  $\chi_1$  in steps of 20°. For this purpose an optimized D-glutamic acid dipeptide model with the backbone dihedral angles fixed to the average values displayed in Table 2, was used. The rotational profiles obtained using the two computa-

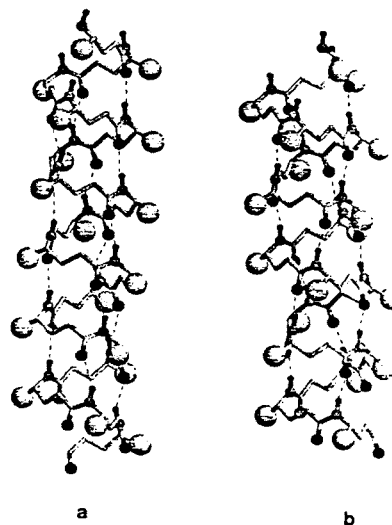


Fig. 6. Schematic view of the 19-L-helix conformation and the beginning (a) and at the end (b) of the MD simulation. The lateral groups have been substituted by a single sphere.



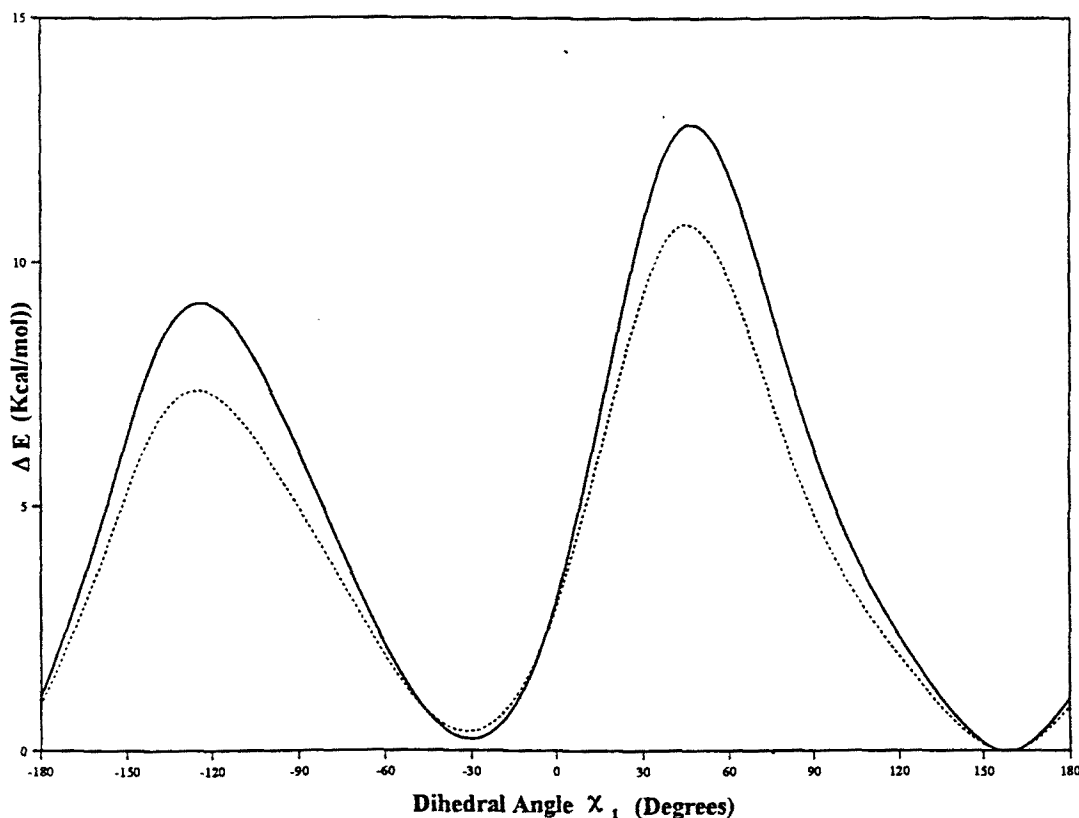


Fig. 7. Energy profiles for the rotation of the  $\chi_1$  dihedral angle computed at both HF (—) and DFT (---) levels of theory.

tional methods are displayed in Fig. 7. The lowest energy rotamers were located at  $\chi_1 = 155^\circ$  and  $\chi_1 = -30^\circ$ , the latter being 0.4 kcal/mol less stable at both HF 6-31G(d) and B3-LYP/6-31G(d) levels. The barrier between the two minima was located at  $\chi_1 = -120^\circ$ , being of 12.1 and 10.1 kcal/mol at the HF 6-31G(d) and B3-LYP/6-31G(d) levels, respectively.

The effect of the conformational preferences of  $\chi_1$  resulting from the previous energy analysis on the stability of the 19-L helix was examined by investigating the interaction between the side groups being at the minimum distance to each other, i.e. those attached to every fourth residue, when both concerted rotation (the two side chains rotating simultaneously) and unconcerted rotation (one side chain fixed at the minimum value of energy and the other rotating freely) for the two groups are considered. In both cases the modifications introduced in the energy profile were about 1–2 kcal/mol in energy and less than 10 in the position of the minima. These results suggest that interactions between the side groups of different

residues are very weak, and therefore side chains are allowed to reach the lowest energy conformation.

Fig. 8 shows the variation of the distances between the hydrogen atom of the amide group and both the carbonyl and alkoxy oxygen atoms of the side chain, abbreviated  $d(\text{H}\dots\text{O}=\text{C})$  and  $d(\text{H}\dots\text{O}-\text{C})$  respectively, with the torsional angle  $\chi_1$ . Note that the minimum values of such distances correspond to the two rotation energy minima respectively. Thus, for  $\chi_1 = 155^\circ$  and  $\chi_1 = -30^\circ$  the distances between the amide and carboxyl oxygen atoms are  $d(\text{H}\dots\text{O}=\text{C}) = 2.99 \text{ \AA}$  and  $d(\text{H}\dots\text{O}-\text{C}) = 2.79 \text{ \AA}$ . A similar type of interaction was observed in poly( $\beta$ -L-aspartate)s [9,37] and in certain poly( $\alpha$ -L-aspartate)s [38]. Although such electrostatic interactions are rather weak they provided a satisfactory explanation for the unusual helix sense adopted by these polymers. The fact that a similar situation is found in the present work makes understandable the left handedness displayed by PGDGA and corroborates previous interpretation of the phenomena. A detailed view of the back-

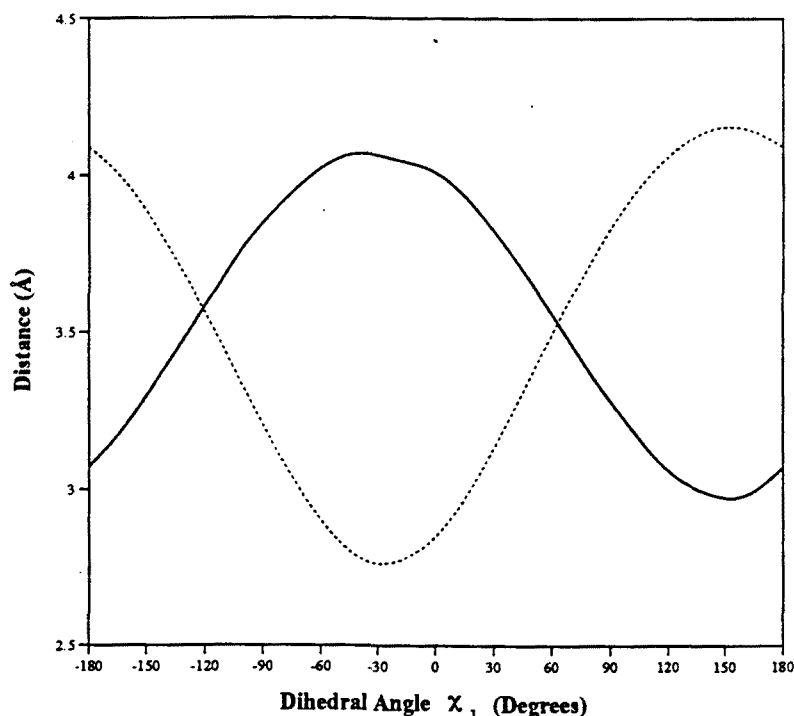


Fig. 8. Variation of the N-H...O=C-O (—) and N-H ... O=C=O(- -) distances with the torsional angle  $\chi_1$ .

bone amide...carboxyl side group interaction in the 19-L helix of PGDGA is shown in Fig. 9.

#### 4. Conclusions

The conformational preferences of un-ionized PGDGA have been systematically investigated using a combination of GEMOX, MD and QM calculations. The stability of the different helical conformations proposed by Rydon [22] on the basis of optical rotatory dispersion data have been evaluated. Results indicate that the right-handed 19-helix is the most stable conformation for un-ionised PGDGA. This structure is stabilized by intramolecular hydrogen bonds set between the CO of the amide groups  $i$  and the NH of the amide groups  $i + 3$ . Regarding the stereochemistry of PGDGA the left arrangement adopted by the helix is contrary to expectations. Weak intramolecular interactions between side carboxylic oxygens and the NH of the backbone amide group are responsible for the relatively high stability of the left handed helix. Energy profiles for both

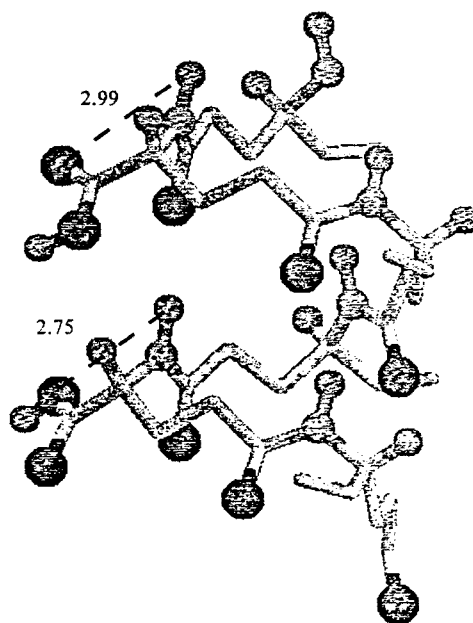


Fig. 9. Detailed view of the backbone...side chain interactions in the 19-L helix of PGDGA. The lateral groups have been substituted by a single sphere with the exception of the two residues in which the N-H...O=C-O and N-H...O=C=O distances are indicated.

concerted and unconcerted rotations of nearest side groups on the helix attached to different residues reveal that the interactions between them are almost negligible allowing the existence of stable backbone...side chain interactions.

### Acknowledgements

This work was supported by DGICYT with grant No. PB96-0490. D.Z. acknowledges the support of the Ministry of Education of Spain for the award of a scholarship. Authors are indebted to the Centre de Supercomputació de Catalunya for computational facilities.

### References

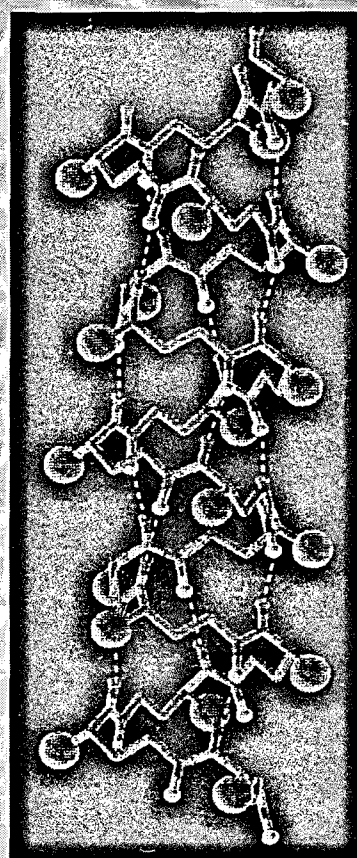
- [1] Balaran P. *Curr Opin Struct Biol* 1992;2:845.
- [2] Alemán C, Roca R, Luque FJ, Orozco M. *Proteins Struct Funct Genet* 1997;28:83.
- [3] Yoshikawa E, Fournier MJ, Mason TL, Tirrell DA. *Macromolecules* 1994;27:5471.
- [4] Fernández-Santín JM, Aymamí J, Rodríguez-Galán A, Muñoz-Guerra S, Subirana JA. *Nature (London)* 1984;311:53.
- [5] Muñoz-Guerra S, Fernández-Santín JM, Alegre C, Subirana JA. *Macromolecules* 1989;22:1540.
- [6] Bella J, Alemán C, Fernández-Santín JM, Alegre C, Subirana JA. *Macromolecules* 1992;25:5225.
- [7] López-Carrasquero F, Alemán C, García-Álvarez M, Martínez de Ilarduya A, Muñoz-Guerra S. *Macromol Chem Phys* 1995;196:253.
- [8] Navas JJ, Alemán C, López-Carrasquero F, Muñoz-Guerra S. *Macromolecules* 1995;28:4487.
- [9] Alemán C, Navas JJ, Muñoz-Guerra S. *J Phys Chem* 1995;99:17653.
- [10] López-Carrasquero F, García-Álvarez M, Navas JJ, Alemán C, Muñoz-Guerra S. *Macromolecules* 1996;29:8449.
- [11] García-Álvarez M, León S, Alemán C, Campos JL, Muñoz-Guerra S. *Macromolecules* 1998;31:124.
- [12] Apella DH, Christianson LA, Karle IL, Powell DR, Gellman SH. *J Am Chem Soc* 1996;118:13071.
- [13] Seebach D, Overhand M, Kühle FNM, Mastinoni B, Obere L, Hommel U, Widmer H. *Helv Chim Acta* 1996;79:913.
- [14] Puiggal J, Muñoz-Guerra S, Rodríguez-Galán A, Alegre C, Subirana JA. *Makromol Chem Macromol Symp* 1988;20 21:167.
- [15] Dado GP, Gellman SH. *J Am Chem Soc* 1994;116:1054.
- [16] Thorne CB, Gómez CG, Noyes HE, Housewright RD. *Bacteriol* 1954;68:307.
- [17] Bruckner V, Ivanovics X. *Z Physiol Chem* 1937;247:281.
- [18] Marlborough DI. *Biopolymers* 1973;12:1083.
- [19] Balasubramanian D, Klaita CC, Kovacs J. *Biopolymer* 1973;12:1089.
- [20] Balasubramanian D. *Biopolymers* 1974;13:407.
- [21] Crescenzi V, Dentini M. *ACS Symp Ser* 1996;627:221.
- [22] Rydon HN. *J Chem Soc* 1964:1328.
- [23] Alemán C, Luque FJ, Orozco M. *J Comput Aided Mc Des* 1993;7:721.
- [24] Alhambra C, Luque FJ, Orozco M. *J Comput Chem* 1994;15:12.
- [25] Reynolds CA, Essex JW, Richards WG. *J Am Chem Soc* 1992;114:9075.
- [26] Navas JJ, Alemán C, Muñoz-Guerra S. *Polyme* 1996;37:2589.
- [27] Singh UC, Werner P, Caldwell J, Kollman PA. *AMBE* 3.0. Rev A (revised by Seibel), 1986.
- [28] Knopp B, Jung B, Wortmann F-J. *Macromol Theor Simul* 1997;6:1.
- [29] Zhang L, Herman J. *J Am Chem Soc* 1994;116:1191.
- [30] Ryckaert J-P, Ciccotti G, Berendsen HRC. *J Comput Phys* 1977;23:327.
- [31] Hariharan PC, Pople JC. *Chem Phys Lett* 1972;16:21.
- [32] Stephens PJ, Devlin FJ, Chabalowski CF, Frish MJ. *Phys Chem* 1994;98:1623.
- [33] Becke AD. *Phys Rev A* 1988;38:3098.
- [34] Lee C, Yang W, Paw RG. *Phys Rev B* 1993;37:785.
- [35] Cornell WD, Cieplak P, Bayly CI, Gould IR, Merz KJ Jr., Ferguson DM, Spellmeyer DC, Fox T, Caldwell JV, Kollman PA. *J Am Chem Soc* 1995;117:5179.
- [36] Weiner SJ, Kollman PA, Nguyen DT, Case DA. *J Comput Chem* 1986;7:230.
- [37] Navas JJ, Alemán C, Muñoz-Guerra S. *J Org Chem* 1996;61:6849.
- [38] León S, Alemán C, Muñoz-Guerra S. *Macromol* 1997;30:6662.

**IV. 6. “A microscopic view of helical poly( $\gamma$ -D-glutamic) acid in water”,**

Zanuy, D.; Alemán C.; Muñoz-Guerra, S. *Macromol. Theo. Sim.* **2000**, *9*, 543-549.



**Full Paper:** We present a molecular dynamics study of the helical conformation of the naturally occurring poly( $\gamma$ -D-glutamic acid) in the un-ionized state. The study was conducted in both aqueous solution and gas-phase considering a 20 residue polypeptide. The results indicated that the left-handed helix with 19-membered ring hydrogen bonds set between the CO of the amide group  $i$  and the NH of amide group  $i + 3$  is very stable in aqueous solution. This conformation was recently proposed for this poly( $\gamma$ -amino acid) from a conformational search study. A detailed picture of the most relevant structural details of the helical conformation of poly( $\gamma$ -D-glutamic acid) is provided.



Model conformation of the PGDGA. Note, it consists of a left-handed helix with hydrogen bonds set between the CO of the amide group  $i$  and the NH of the amide group  $i + 3$ . The lateral groups have been substituted by a single sphere.

## A microscopic view of a helical poly( $\gamma$ -peptide): Molecular dynamics simulations of a 20-residue un- ionized poly( $\gamma$ -D-glutamic acid) in water

Dedicated to Prof. Dr. Oskar Friedrich Olaj on the occasion of his 65<sup>th</sup> birthday

David Zanuy, Carlos Alemán,\* Sebastián Muñoz-Guerra

Departament d'Enginyeria Química, E.T.S. d'Enginyers Industrials de Barcelona, Universitat Politècnica de Catalunya, Diagonal 647, Barcelona E-08028, Spain  
E-mail: aleman@eq.upc.es

### Introduction

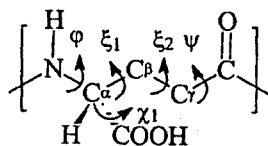
From a number of X-ray diffraction,<sup>[1–5]</sup> NMR<sup>[3,6]</sup> and theoretical<sup>[2,7–9]</sup> studies we had concluded that polymers built from substituted  $\beta$ -amino acid adopt helical conformations similar to the  $\alpha$ -helix typical of poly( $\alpha$ -amino acid)s and proteins. More specifically, we have investigated

poly( $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -L-aspartate)s, a family of poly( $\beta$ -peptide)s with an alkoxycarbonyl group stereoregularly attached to the  $\beta$ -carbon of the repeating unit. Right-handed helices containing between three and four residues per turn with hydrogen bonds set between every third or every fourth residue have been described for these compounds in both

the solid state and solution depending on the size and shape of the alkyl side group. On the other hand, two independent research groups<sup>[10,11]</sup> have shown that small  $\beta$ -oligopeptides are also able to form stable helices similar to those described for poly( $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -L-aspartate)s.

Some years ago the structure of two poly( $\gamma$ -amino acid)s, i.e. the poly( $\alpha$ -benzyl- $\gamma$ -L-glutamate) and the poly( $\alpha$ -methyl- $\gamma$ -L-glutamate) was investigated in our group by both X-ray and electron diffraction methods<sup>[12]</sup>. These studies showed that such compounds also form helical conformations reminiscent of the  $\alpha$ -helix. An almost identical helical conformation was recently found for a small  $\gamma$ -hexapeptide by Seebach and co-workers.<sup>[13]</sup> Returning to our earlier investigations in poly( $\gamma$ -peptide)s we are carrying out experimental and theoretical studies to determine the suitability of substituted  $\gamma$ -amino amino acids to stabilize helical conformations. The most typical poly( $\gamma$ -amino acid) is the poly( $\gamma$ -glutamic acid) (PGGA), which is naturally produced as a slime layer by a variety of members of the genus *Bacillus*.<sup>[14]</sup> Preliminary work indicated that a variety of esters derived from this poly( $\gamma$ -amino acid) also adopt a  $\alpha$ -helix-like conformation.<sup>[15]</sup>

The structure of PGGA has been widely investigated in solution by a variety of methods.<sup>[16-19]</sup> The results revealed that in dilute aqueous solution, and for pH < 7, the un-ionized acid adopts a stable helical arrangement stabilized by intramolecular hydrogen bonds. In a very recent molecular modeling study, we proposed an atomistic model for the helical conformation of un-ionized PGGA<sup>[20]</sup> that is fully compatible with the optical rotatory dispersion experiments reported by Rydon.<sup>[19]</sup> Thus, we found that the poly( $\gamma$ -D-glutamic acid) (PGDGA) form a left-handed helix with 19-membered ring hydrogen bonds set between the CO of the amide group  $i$  and the NH of the amide group  $i + 3$  (Fig. 1).



PGDGA

In this work, we present molecular dynamics (MD) simulation studies on the helical conformation of a 20-residue un-ionized PGDGA in both gas-phase and aqueous solution at room temperature. The simulations in aqueous solution will provide the most interesting model of such helical polymer since experimental studies are usually done in this environment.<sup>[16-19]</sup> The overall of the results has allowed to obtain a complete dynamical picture of this new helical conformation as well as to characterize some relevant structural details.

## Methods

All simulations were performed using the AMBER 3.0 Rev.A simulation package<sup>[21]</sup> in conjunction with the AMBER 89 force field.<sup>[22]</sup> Electrostatic parameters were taken from a previous work.<sup>[20]</sup> Bond lengths were constrained to their standard values using the SHAKE algorithm.<sup>[23]</sup> The compound studied, PGDGA<sub>20</sub>, is an oligomer composed of 20 residues and blocked at the N-terminus with an acetyl group and at the C-terminus by a *N*-methylamide group.

The initial set of atomic coordinates for the helix PGDGA<sub>20</sub> were taken from our previous molecular modeling study,<sup>[20]</sup> which were then minimized *in vacuo*. The resulting structure was centered in a rectangular cell of TIP3P<sup>[24]</sup> water to produce periodic boxes of dimensions 45.0 × 23.7 × 24.6 Å<sup>3</sup>, containing 2 118 water molecules. Both the solvent and the helix in this initial box were relaxed via 2000 steps of steepest descent minimization. This was followed by 25 ps of NVT (constant volume and temperature)-MD during which the temperature was brought to 300 K with the helix fixed. After this, the energy of the system was equilibrated for 75 ps of NVT-MD during which both the solute and the solvent were allowed to move freely. The resulting structure was the starting point for 1000 ps NVT-MD at 300 K. On the other hand, the MD simulation in the gas-phase, i.e. without explicit water molecules and a dielectric constant of 1, was performed by raising the temperature from 0 to 300 K along 25 ps of MD. This was followed by 25 ps of MD for equilibration. The resulting structure was the starting point for 1000 ps MD at 300 K.

Residue-based cutoffs were applied at 10 Å, i.e. if two residues or a residue and a water molecule have any atoms within 10 Å, the interaction between the entire pair is evaluated. A numerical integration time step of 1 fs was used for all the calculations. The nonbonded pair list was updated every 25 steps. The MD trajectories were saved every 1000 steps (1-ps interval) for subsequent analysis of the resulting helical conformations.

## Results and discussion

The progress of the MD simulations in aqueous solution and gas-phase environments, which will be denoted MD-aq and MD-gp respectively, can be followed by the root mean square deviations (rmsd) of the PGDGA atoms from the initial model structure, i.e. that proposed in our previous molecular modeling study (Fig. 1).<sup>[20]</sup> Fig. 2 plots the rmsd deviations of the main-chain atoms (N, C<sup>α</sup>, C<sup>β</sup>, C<sup>γ</sup> and C) involved in both all the residues and the 15 central residues as a function of the simulation time for the MD-aq and MD-gp trajectories. This gives a picture of the overall differences between the initial model of PGDGA (Fig. 1) and each of the conformations saved sequentially from the trajectory.

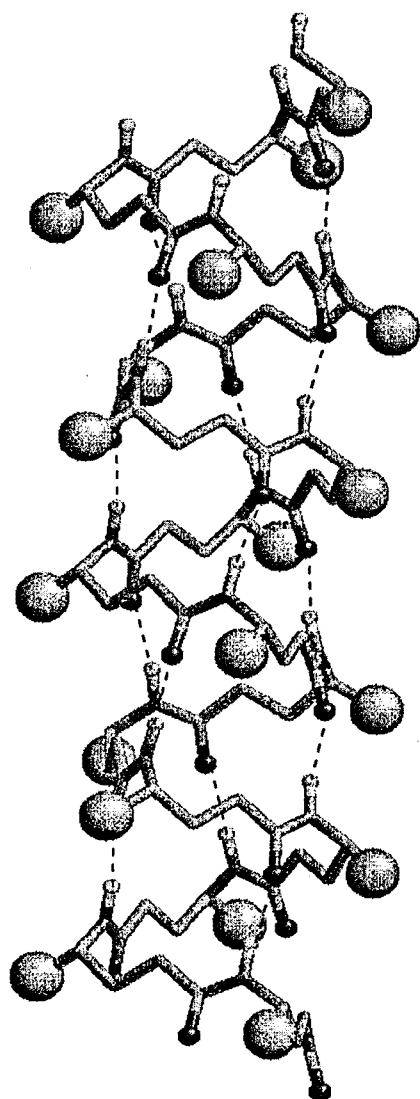


Fig. 1. Model conformation of the PGDGA. Note, it consists of a left-handed helix with hydrogen bonds set between the CO of the amide group  $i$  and the NH of the amide group  $i + 3$ . The lateral groups have been substituted by a single sphere.

Fig. 2a shows that in the MD-aq simulation the structures of PGDGA<sub>20</sub> are close to the initial model structure, the average rmsd along the simulation being  $2.68 \pm 0.38$  Å. However, the most noticeable feature is that the central 15 residues present a very small rmsd, the average value being  $0.76 \pm 0.11$  Å. Furthermore, the value of the rmsd for these residues is quite stable in the simulation indicating that only small rearrangements occur along the trajectory. These results indicate that in aqueous solution the central part of the helix presents very small fluctuations whereas the two tails present relatively larger fluctuations, especially the C-terminal one. To obtain an atomistic picture of this trend, we show in

Fig. 3a schematic representation of the structures extracted at times 150, 300, 500, 750 and 1000 ps from the MD-aq trajectory. As indicated by the rmsd, in MD-aq simulation the core of the PGDGA<sub>20</sub> keeps the same basic structure along the whole trajectory whereas the tails are partially frayed. Indeed, a complete unfolding of the chain-ends should be expected at a large time-scale.

The increase of the rmsd for the MD-gp simulation (Fig. 2b) indicates a distortion of the conformation from the initial model structure. Comparison between the rmsd considering the whole PGDGA<sub>20</sub> with that obtained for the 15 central residues indicates a fast unfolding of the tails. For the first 400 ps the central helix domain is considerably close to the initial model structure, the rmsd being in general smaller than 1.5 Å. Then, a compaction of the structure, i.e. a reduction of the end-to-end distance, accompanies the increase of rmsd from 425 to 600 ps. This compact structure remains stable enough to live until the end of the simulation. Fig. 4 illustrates the unfolding of the initial model structure along the MD-gp trajectory.

Fig. 5 compares the MD-aq and MD-gp trajectories of the fractional hydrogen bonds between the two backbone amide groups, which are relative to 18 initial hydrogen bonds of the model structure. The criteria used to define a hydrogen bonding interaction were that the O...H distance was less than 2.5 Å and the  $\langle \text{N-H}\dots\text{O} \rangle$  angle was larger than 135°. The presence of such interactions is a sensitive indicator of the helical conformation. It is worth noting that in aqueous solution the amide...amide hydrogen bonds remain practically intact after 100 ps of simulation. Furthermore, more than the 60% of the hydrogen bonds are retained at the end of the simulation pointing out that the helix conformation of PGDGA is remarkably stable in solution. Conversely, in the gas-phase more than the 70% of the initial interactions were broken during the first 500 ps of MD simulation. Then, the remaining helical domain disappears and only about 20% of the hydrogen bonding interactions are preserved at the end of the simulation.

We have used the MD-aq simulation to provide a description of the most important structural characteristics of the helix of PGDGA. Fig. 6 shows the radius of gyration ( $R_G$ ) of the helix as a function of the simulation time for both the PGDGA<sub>20</sub> and the 15 central residues. The  $R_G$  provides a measure of the size and compactness of the molecule. Considering the full model peptide, the  $R_G$  grows from 9.4 Å to 12.0 Å during the simulation. This elongation of the structure accompanies the increase of the rmsd from the initial model (Fig. 2a) and must be associated to the fraying of the tails. On the other hand, the  $R_G$  for the 15 central residues provides a more realistic description of the helix conformation of PGDGA. Thus, the  $R_G$  of the central core oscillates near its initial value during the whole simulation, the average value



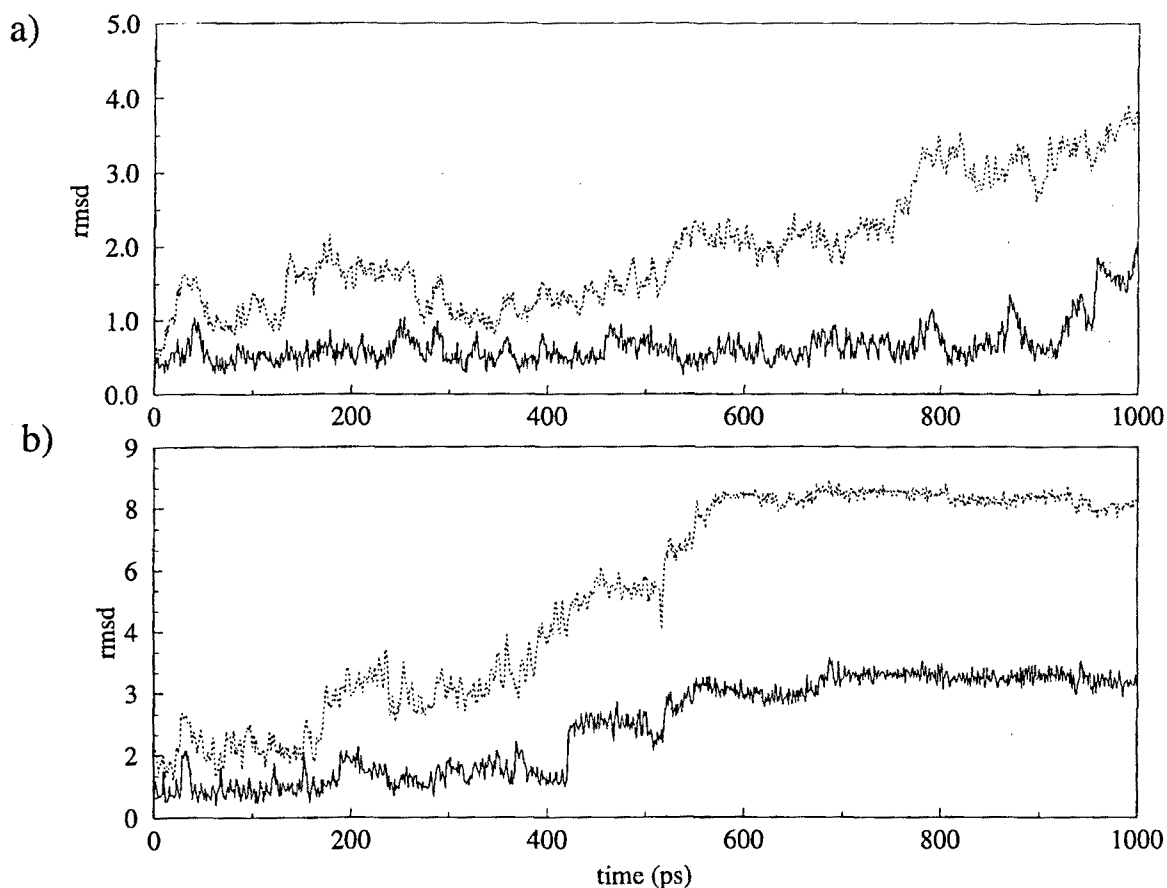


Fig. 2. Plots of the root mean square deviation (rmsd; in Å) of the main-chain atoms involved in all the residues (dashed line) and the 15 central residues (solid line) during both the MD-aq (a) and MD-gp (b) simulations.

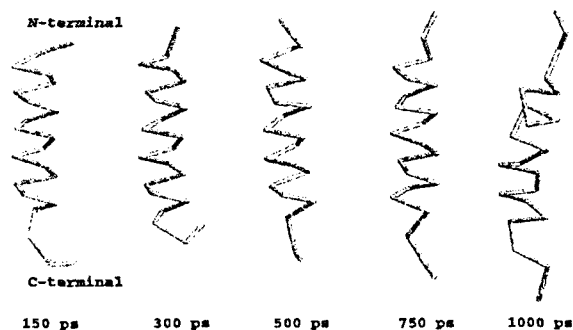


Fig. 3. Ribbon snapshots of the PGDGA<sub>20</sub> during the MD-aq simulation.

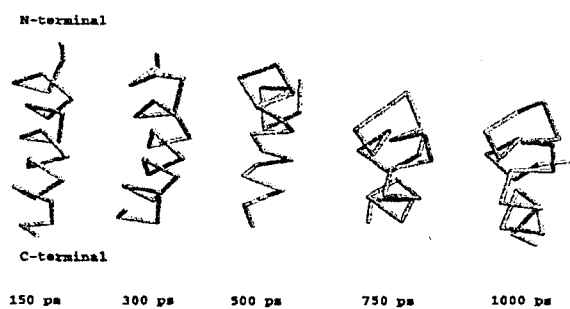


Fig. 4. Ribbon snapshots of the PGDGA<sub>20</sub> during the MD-gp simulation.

being  $7.24 \pm 0.12$  Å. This value is very close to that expected for a typical helix containing 15 residues of alanine ( $\approx 7$  Å).<sup>[25]</sup> This striking result indicates that the helical conformation of PGDGA is very similar in size and shape to the typical helices of polypeptides constituted by  $\alpha$ -amino acids.

Fig. 7 plots the evolution of the backbone dihedral angles averaged for the 15 central residues during the

MD-aq simulation process. The small fluctuations of the dihedral angles clearly illustrate the stability of the structure. As it can be seen, the helical conformation of PGDGA can be described by a regular sequence of two consecutive dihedral angles in *gauche*<sup>+</sup> ( $\varphi$  and  $\chi_1$ ) followed by another two consecutive dihedral angles in *trans* ( $\chi_2$  and  $\psi$ ). Indeed, this conformational pattern allows to explain the great similarity in size and shape

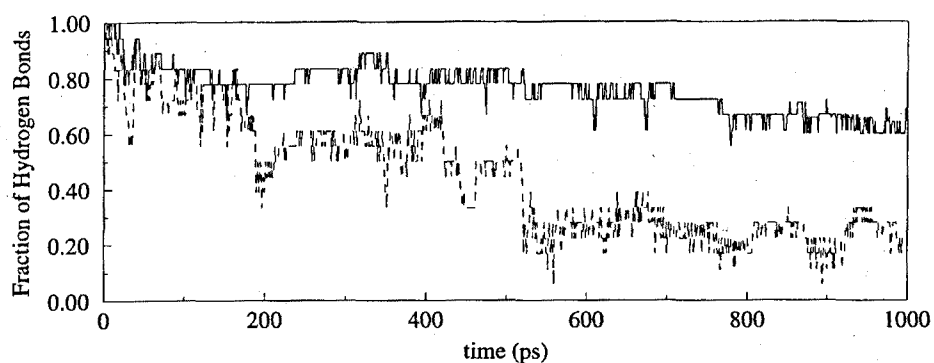


Fig. 5. Trajectories of the fraction of the hydrogen bonds between the amide groups  $i$  and  $i + 3$  in the MD-aq (solid line) and MD-gp (dashed line) simulations of PGDGA<sub>20</sub>.

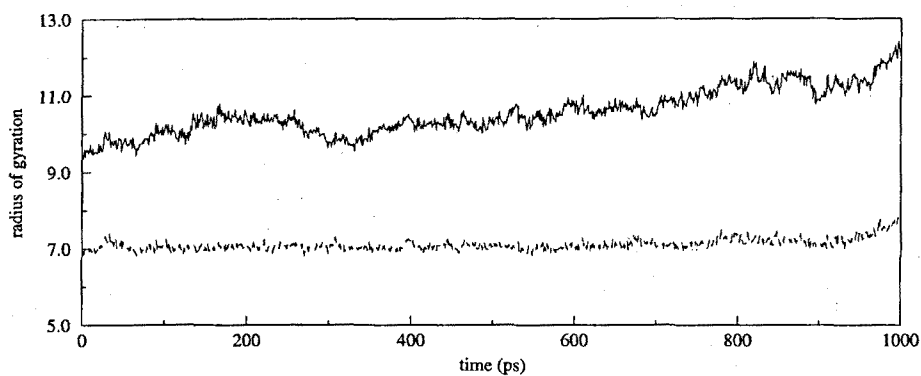


Fig. 6. Trajectories of the radius of gyration for both the PGDGA<sub>20</sub> (solid line) and the 15 central residues (dashed line) in the MD simulation.

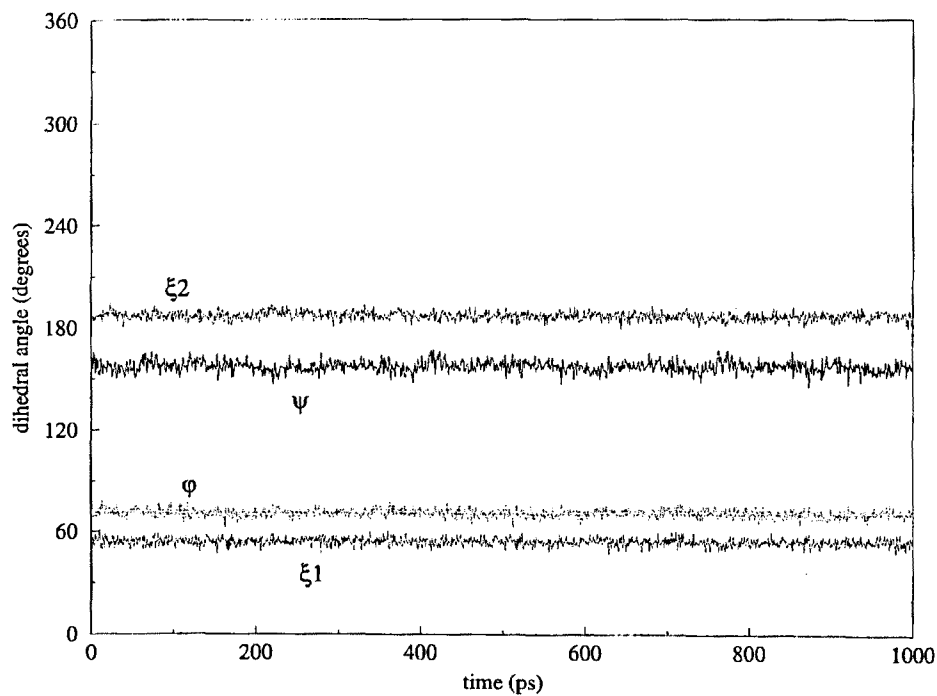


Fig. 7. Evolution of the dihedral angles through the MD-aq simulation for the 15 central residues of PGDGA<sub>20</sub>.

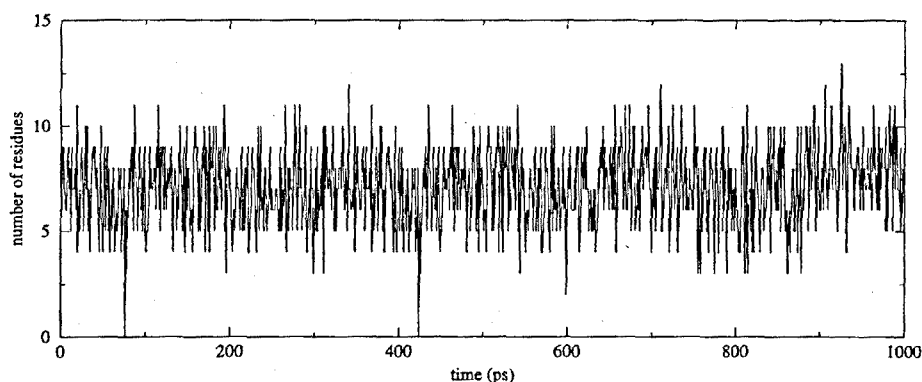


Fig. 8. Number of residues in the central part of the helix with either  $\chi_1 = -155^\circ \pm 20^\circ$  or  $\chi_1 = -30^\circ \pm 20^\circ$  during the MD-aq simulation.

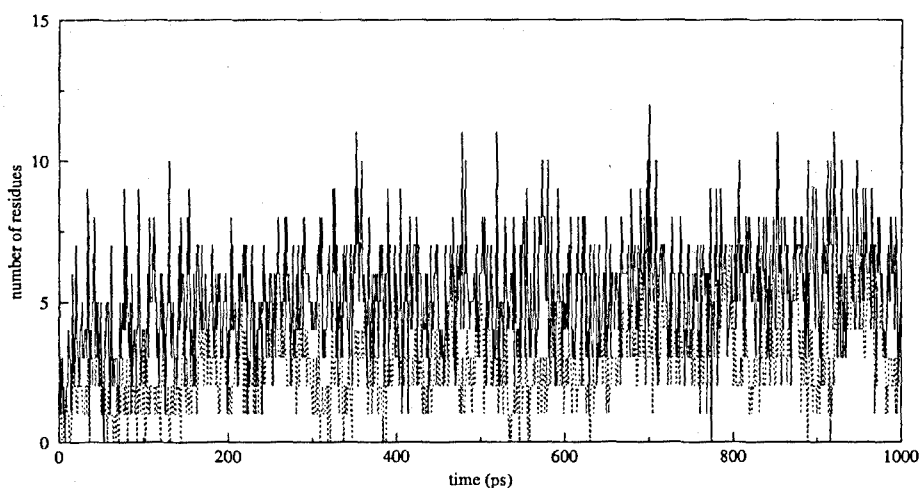


Fig. 9. Number of intra- (solid line) and inter-residue (dashed line) interactions between the backbone amide group and the side chain oxygen atoms found in the 15 central residues during the MD-aq simulation.

between the helical conformation of PGDGA and those found in poly( $\alpha$ -amino acid)s. Accordingly, the helical conformations of the latter involve two consecutive dihedral angles in *gauche*<sup>\*</sup> ( $\varphi$  and  $\psi$ ).

In our previous work on PGDGA we found from ab initio HF/6-31G(d) and B3LYP/6-31G(d) calculations that the lowest energy rotamers for the side chain are located at  $\chi_1 = 155^\circ$  and  $\chi_1 = -30^\circ$ , the latter being about 0.4 kcal/mol less stable than the former.<sup>[19]</sup> These rotamers allow an intra-residue interaction between the hydrogen atom of the amide group and the oxygen atoms of the acid side group, i.e. with the carbonyl and alkoxy oxygen atoms for  $\chi_1 = 155^\circ$  and  $\chi_1 = -30^\circ$ , respectively. These conformational preferences are partially preserved in our MD-aq simulations. Fig. 8 shows the number of residues of the central core with either  $\chi_1 = 155^\circ \pm 20^\circ$  or  $\chi_1 = -30^\circ \pm 20^\circ$  as a function of the simulation time. As it can be seen about 8 of 15 central residues retain the

arrangements predicted from ab initio quantum mechanical calculations. Moreover, the intra-residue interaction discussed above is essentially found in these residues. Fig. 9 displays the number of intra-residue interactions between the backbone amide group and the oxygen atoms of the side chain found in the 15 central residues. This interaction is present throughout the simulation, being found in about 6 of the 15 central residues of the helix.

On the other hand, a second type of backbone...side chain interaction was found in some of the remaining residues. This consists in an inter-residue interaction between the backbone amide group and the oxygen atoms of the side chain. This interaction was not considered in our previous quantum mechanical study but as it can be observed in Fig. 9, it is present in about 4 of the 15 central residues. A detailed view of both the intra- and inter-residue backbone...side chain interactions detected in the helix of PGDGA is given in Fig. 10.

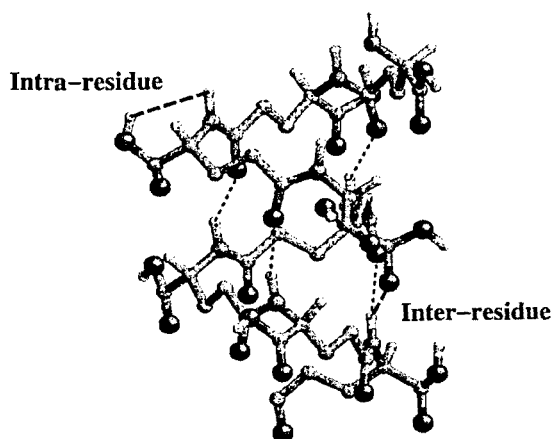


Fig. 10. Detailed view of the intra- and inter-residue backbone...side chain interactions in the helix of PGDGA. The amide...amide interactions are also displayed.

## Conclusions

We have performed MD simulations on un-ionized PGDGA in both aqueous solution and gas-phase at 300 K. This peptide was found in a recent conformational search to adopt a left-handed helix with 19-membered hydrogen bonds set between the CO of the amide group  $i$  and the NH of amide group  $i + 3$ , which is in good agreement with optical rotatory dispersion data. The simulations in aqueous solution show that, in this environment, this helix is not only stable but also very resistant to unfolding. This is in good agreement with experimental data, which indicate that for  $\text{pH} < 7$ , PGDGA chains assume a helical conformation.<sup>[18]</sup> Conversely, the absence of environment induces the unfolding of the helix; this result indicates that the helical conformation is most probably strongly favored for this polymer in polar environments when a dilute solution at room temperature is considered. Detailed analysis of the sequence of structures obtained from the aqueous solution trajectory suggests that the helix of PGDGA is very similar in size and shape to the  $\alpha$ -helix found in poly( $\alpha$ -amino acid)s. On the other hand, the presence of both intra-residue and inter-residue backbone...side chain interactions throughout the simulation provide a permanent stabilization of the helix.

**Acknowledgement:** This work was supported by DGICYT with grant N° PB96-0490. D.Z. acknowledges the support of the Ministry of Education of Spain for the award of a scholarship.

Authors are indebted to the Centre de Supercomputació de Catalunya for computational facilities.

Received: January 10, 2000

Revised: May 2, 2000

- [1] J. M. Fernández-Santín, J. Aymamí, A. Rodríguez-Galán, S. Muñoz-Guerra, J. A. Subirana, *Nature* **1984**, *311*, 53.
- [2] J. J. Navas, C. Alemán, F. López-Carrasquero, S. Muñoz-Guerra, *Macromolecules* **1995**, *28*, 4487.
- [3] F. López-Carrasquero, C. Alemán, M. García-Alvarez, A. Martínez de Ilarduya, S. Muñoz-Guerra, *Macromol. Chem. Phys.* **1995**, *196*, 253.
- [4] F. López-Carrasquero, M. García-Alvarez, J. J. Navas, C. Alemán, S. Muñoz-Guerra, *Macromolecules* **1996**, *29*, 8449.
- [5] M. García-Alvarez, A. Martínez de Ilarduya, S. León, C. Alemán, S. Muñoz-Guerra, *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 4215.
- [6] A. Martínez de Ilarduya, C. Alemán, M. García-Alvarez, F. López-Carrasquero, S. Muñoz-Guerra, *Macromolecules* **1999**, *32*, 3257.
- [7] C. Alemán, J. J. Navas, S. Muñoz-Guerra, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17653.
- [8] C. Alemán, J. J. Navas, S. Muñoz-Guerra, *Biopolymers* **1997**, *41*, 721.
- [9] J. J. Navas, C. Alemán, F. López-Carrasquero, S. Muñoz-Guerra, *Polymer* **1997**, *14*, 3477.
- [10] D. Seebach, M. Overhand, F. N. M. Kühnie, B. Martinoni, L. Oberer, U. Hommel, H. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 913.
- [11] D. Apella, L. A. Christianson, I. L. Karle, D. R. Powell, S. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13071.
- [12] J. Puiggalí, S. Muñoz-Guerra, A. Rodríguez-Galán, C. Alegre, J. A. Subirana, *Makromol. Chem., Macromol. Symp.* **1988**, *20/21*, 167.
- [13] T. Hintermann, K. Gademan, B. Jaun, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 983.
- [14] C. B. Thorne, C. G. Gómez, H. E. Noyes, R. D. Housewright, *J. Bacteriol.* **1954**, *68*, 307.
- [15] S. Muñoz-Guerra, G. Pérez-Camero, J. Melis-Viotti, J. Bou, F. Congregado, *Polym. Prep. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* **1998**, *39*, 138.
- [16] D. I. Marlborough, *Biopolymers* **1973**, *12*, 1803.
- [17] D. Balasubramanian, *Biopolymers* **1974**, *13*, 407.
- [18] V. Crescenzi, M. Dentini, *ACS Symp. Ser.* **1996**, *627*, 221.
- [19] H. N. Rydon, *J. Chem. Soc.* **1964**, 1328.
- [20] D. Zanuy, C. Alemán, S. Muñoz-Guerra, *Int. J. Biomol. Macromol.* **1998**, *23*, 175.
- [21] U. C. Singh, P. Werner, J. Caldwell, P. A. Kollman, *AMBER 3.0 Rev. A* (revised by Seibel, G.) **1986**.
- [22] S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. T. Nguyen, D. A. Case, *J. Comput. Chem.* **1986**, *7*, 230.
- [23] J.-P. Ryckaert, G. Ciccoliti, H. J. C. Berendsen, *J. Comp. Phys.* **1977**, *23*, 327.
- [24] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein, *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926.
- [25] G. A. Artega, *Macromolecules* **1996**, *29*, 7594.



**IV. 7. “Poly( $\gamma$ -glutamic acid) in aqueous solution: Molecular dynamics simulations of 10- and 20-residues chains at different temperatures”**

Zanuy, D.; Alemán C. *Biomacromolecules*

(Aceptado)



**Poly( $\gamma$ -glutamic acid) in aqueous solution:  
Molecular dynamics simulations of 10- and 20-  
residue chains at different temperatures**

**David Zanuy and Carlos Alemán\***

*Departament d'Enginyeria Química, E.T.S.E.I.B., Universitat  
Politécnica de Catalunya, Diagonal 647, Barcelona E-08028,  
Spain*

\* Corresponding author (aleman@eq.upc.es)

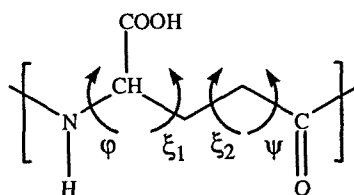


## ABSTRACT

A series of molecular dynamics in aqueous solution have been carried out in order to investigate the effects of the length of the peptide chain and the temperature on the helical conformation of un-ionized poly( $\gamma$ -D-glutamic acid). The results reveal that the helix is not stable for a small number of residues independently of the temperature. On the other hand, the temperature induces a conformational transition from the helical state to the random coil. Analysis of the energy of the whole system indicates that the helix is more stable than the random coil state by about 5 kcal/mol, even although the solvation potential energy is lower in the latter than in the former.

## INTRODUCTION

Poly( $\gamma$ -glutamic acid), abbreviated PGGA, is an exopolymer naturally produced by a variety of species of genus *Bacillus*, like *B. lichenformis* and *B. subtilis*.<sup>1</sup> This poly( $\gamma$ -amino acid) has been extensively investigated in terms of its synthesis, biochemistry and production under different environmental conditions.<sup>2-6</sup>



PGGA can adopt various conformations depending on solution conditions. Thus, as for most charged or polar biological macromolecules, factors like temperature, pH, polymer concentration, molecular weight and ionic strength can change the overall conformation and local structure of PGGA. The influence of these factors has been investigated by a variety of techniques. Results revealed that in aqueous solution at low pH, polymer concentration and ionic strength, the un-ionized PGGA adopts a stable helical arrangement stabilized by intramolecular hydrogen bonds.<sup>7,8</sup> The helical conformation of un-ionized poly( $\gamma$ -D-glutamic acid), denoted PGDGA, was recently investigated by atomic-resolution computer simulations.<sup>9,10</sup> It was found that PGDGA form a left-handed helix with 19-membered ring hydrogen bonds set between the CO of the amide group  $i$  and the NH of the amide group  $i+3$  (Figure 1), this conformation being fully compatible with the optical rotatory dispersion experiments.<sup>9</sup> Furthermore, this helix was predicted to be particularly stable in aqueous solution.<sup>10</sup>

In this work we investigate the influence of both the length of the polymer chain and the temperature on stability of the helical conformation of PGDGA by using molecular dynamics (MD) simulations. For this purpose, MD simulations of 20- and 10-residue chains of un-ionized PGDGA solvated by explicit water molecules were performed at two different temperatures, 300 K and 350 K. The outline of the present paper is as follows. In the next section we briefly describe the theoretical methods used in MD simulations. After this, the results of the four MD simulations are compared. The influence of both the temperature and length of the peptide chain on the dynamics of the helical conformation of PGDGA is discussed. Furthermore, the helix and the random coil states are energetically compared in terms of peptide-peptide (p-p), peptide-water (p-w) and water-water (w-w) interactions.

## **THEORETICAL METHODS**

The systems simulated consisted of 20- and 10-residue PGDGA chains, which were denoted PGDGA<sub>20</sub> and PGDGA<sub>10</sub> respectively, and the surrounding water molecules. The all-atom parametrization of the Amber force-field<sup>11</sup> was used for the PGDGA chains, of which the N-terminus and the C-terminus were acetylated and methyl-amidated, respectively. Electrostatic parameters for the  $\gamma$ -D-glutamic acid residue, which are not included in the Amber libraries, were taken from a previous work.<sup>9</sup> The TIP3P water<sup>12</sup> was used as the water model. PGDGA<sub>20</sub> and PGDGA<sub>10</sub> chains were immersed into a rectangular box of water molecules having a density 1 g/cc, taken from a Monte Carlo equilibrium simulation. The box was truncated so that there were at least an 8 Å distance between any peptide atom and the edge of the box, and water molecules that overlapped the peptide were discarded. The resulting systems for PGDGA<sub>20</sub> and

PGDGA<sub>10</sub> had dimensions of 45.0x23.7x24.6 and 35.7x20.4x20.2 Å<sup>3</sup>, respectively, and contained 731 and 422 water molecules. Periodic boundary conditions were applied using the nearest image convention.

The initial conformation for the PGDGA<sub>20</sub> and PGDGA<sub>10</sub> chains was that proposed on the basis of optical rotatory dispersion experiments and molecular modeling studies.<sup>7,9</sup> This model conformation, which is displayed in Figure 1, consists of a left-handed helix stabilized by intramolecular hydrogen bonds and the following torsional parameters:  $\phi = 71.0^\circ$ ,  $\xi_1 = 53.0^\circ$ ,  $\xi_2 = -171.6^\circ$ ,  $\psi = 160.6^\circ$  and  $\chi_1 = 155.0^\circ$ .

MD simulations of PGDGA<sub>20</sub> and PGDGA<sub>10</sub> were done at 1 atm pressure and at two different temperatures, 300 K and 350 K. We first performed 2000-step energy minimizations of the complete systems, *i.e.* the initial boxes containing the solvent and the PGDGA chains. These were followed by 25 ps of *NVT*-MD (constant volume and temperature MD) during which the temperature was brought to the desired values. During this initial equilibration, the peptides were restrained to the position resulting from the energy minimization with cartesian harmonic restraints. Then, the systems were equilibrated for 75 ps of *NVT*-MD during which both the solute and the solvent were allowed to move freely. After that, we conducted four simulations, PGDGA<sub>20</sub> and PGDGA<sub>10</sub> at 300 K and 350K, consisting of a total of 1000 ps each one.

Residue based cutoffs were applied at 10 Å, *i.e.* if two residues or a residue and a water molecule have any atoms within 10 Å, the interaction between the entire pair is evaluated. The SHAKE algorithm<sup>13</sup> was applied to fix the bond lengths and a numerical integration time step of 2 fs was used for all the simulations. The nonbonded pair list was updated every 25 steps. The

MD trajectories were saved every 1000 steps (1-ps interval) for subsequent analysis.

All the calculations were performed with Amber 4.1. computer program<sup>14</sup> on a SGI indigo2 system with a single R10000 processor at our laboratory.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Helical Conformation of PGDGA.** In order to ascertain the differences between the model helix used as starting point in MD simulations (Figure 1) and the structures sequentially stored along the trajectory, the atom-positional root mean square deviations (rmsd) and both the amount and position of the hydrogen bonds set between the CO of amide  $i$  and the NH of amide  $i+3$  were monitored. Figure 2 shows the rmsd for the backbone atoms (N, C $\alpha$ , C $\beta$ , C $\gamma$  and C) of PGDGA<sub>20</sub> and PGDGA<sub>10</sub> from the model helix as a function of simulation time. The trajectory of the fraction of  $i-i+3$  hydrogen bonds, which is relative to 18 and 9 initial hydrogen bonds possible for PGDGA<sub>20</sub> and PGDGA<sub>10</sub>, respectively, and the spatio-temporal evolution of the hydrogen bonds are shown in Figures 3 and 4. The criteria used to define a hydrogen bond were that the O...H distance was less than 2.5 Å and the <N-H...O angle was larger than 135°. Furthermore, we investigated the possible existence of other types of intrapeptide hydrogen bonds between amide groups close in the space. More specifically, we examined the hydrogen bonds set between the CO of amide group  $i$  and the NH of amide groups  $i+1$ ,  $i+2$  and  $i+4$  as well as those between the NH of amide group  $i$  and the CO of amide groups  $i+1$ ,  $i+2$ ,  $i+3$  and  $i+4$ . In all cases these types of hydrogen bonds were rarely detected. Thus, for a given snapshot the maximum number of intrapeptide hydrogen bonds belonging to a type other than that of the model helix was

three and two for PGDGA<sub>20</sub> and PGDGA<sub>10</sub>, respectively, all of them being short-lived.

It is worth noting that in the MD simulation of PGDGA<sub>20</sub> at 300 K the fluctuations of the helix are small (Figure 2a), the average rmsd along the trajectory being  $2.42 \pm 0.86$  Å. This value decreases to  $1.40 \pm 0.63$  Å for the atoms involved in the 15 central residues. The central part of the helix presents very small fluctuations whereas the fluctuations are larger in the two tails. This is consistent with the evolution of the *i-i+3* hydrogen bonds along the trajectory. Thus, 14 initial hydrogen bonds remain practically intact after 700 ps of simulation, and more than 9 are retained at the end of the simulation (Figure 3a). Figure 4a reveals that the broken hydrogen bonds are essentially located at the tails of the helix, especially on the N-terminus side. The unfolding of the tails is represented in Figure 5a, which shows an atomistic picture of the structures extracted at times 200, 400, 600, 800 and 1000 ps.

On the other hand, Figure 6 shows the evolution of the backbone dihedral angles  $\phi$ ,  $\xi_1$ ,  $\xi_2$  and  $\psi$  along the simulation for the central residue of PGDGA<sub>20</sub>, in which the helix conformation is retained. The conformation of such angles is *gauche*<sup>+</sup>, *gauche*<sup>+</sup>, *trans* and *trans*, respectively, indicating that helical fold of PGDGA is induced by the *gauche*<sup>+</sup>-*gauche*<sup>+</sup> sequence of the dihedral angles  $\phi$  and  $\xi_1$ . This sequence is also present in the  $\alpha$ -helix of poly( $\alpha$ -peptide)s, like poly( $\alpha$ -glutamic) acid,<sup>15</sup> revealing that the insertion, in the  $\alpha$ -carbonyl position, of two CH<sub>2</sub> groups does not introduce significant changes in the helical fold since the dihedral angles associated to them adopt a *trans* conformation. These conformational trends allow to understand the resemblance in both size and shape between the helices of PGDGA and poly( $\alpha$ -glutamic) acid.

The rmsd from the model structure of PGDGA<sub>20</sub> at 350 K increases considerably with respect to that of the same compound at 300 K (Figure 2a). Thus, for the first 400 ps the model structure remains stable, retaining more than 60% of the initial hydrogen bonds (Figure 3a). Indeed, the most remarkable feature along this period of time is the fraying of the N-terminus side (Figure 4b). However, a very fast and complete conformational transition towards an unfolded conformation occurs after 400 ps (Figure 4b). Thus, the rmsd increases from 2.5 Å to more than 7 Å, and the fraction of hydrogen bonds decreases from about 60% to 10% in only 100 ps. This random coil remains for the last 500 ps of simulation, even although along this period nuclei of helix occasionally appeared but soon disappeared. Figure 5b illustrates the unfolding process as well as the helix nucleus formed at 600 and 800 ps.

MD simulations of PADGA<sub>10</sub> at both 300 K and 350 K provided very similar results. Thus, in both cases the initial helical conformation quickly transforms into a random coil state as is indicated by the evolution of both the rmsd (Figure 2b) and the fraction of *i-i+3* hydrogen bonds (Figure 3b). Furthermore, inspection to the spatio-temporal evolutions of such hydrogen bonds in the first 200 ps reveals that the unfolding process starts at the C-terminus side (Figure 4c and 4d). These results indicate that the stability of the helical conformation of PGDGA is strongly influenced by the length of the polypeptide chain. Thus, chains containing only 10 residues are not able to retain a regular secondary structure rapidly evolving towards a random coil-like state.

**Energy Analysis.** The results obtained for PGDGA<sub>20</sub> at 300 K and 350 K indicate that the helix is more stable at room temperature. In order to

explain this feature we have investigated the helix disruption from an energetic point of view using a procedure similar to that employed by Takano and coworkers<sup>16</sup> for polyalanine. For this purpose, we computed the peptide-peptide (p-p), peptide-water (p-w) and water-water (w-w) interactions at the total trajectories. Figure 7a and 8a show the parametric plots between the p-p intramolecular energies and the fraction of the native *i-i+3* hydrogen bonds in the PGDGA<sub>20</sub> chain during the simulations at 300 and 350 K, respectively. The p-p potential energy decreases as more initial hydrogen bonds are retained indicating that this intramolecular energy contribution is more favorable for the helix than for the random coil.

Figures 7b and 8b show the parametric plots between the p-w energies and the ratio of native hydrogen bonds during the two simulations. As expected the fraction of formed hydrogen bonds has a large influence on the strength of such interactions. The p-w energies are considerably more favorable for the random coil than for the helix indicating that the solvation is worse for the latter conformation than for the former one. This is also reflected by the variation of the solvent-exposed surface area of the polar atoms, *i.e.* N, H(-N) and O atoms, which increases with the unfolding of the helix. Thus, this area has been measured to be about  $973\pm 41$  and  $1242\pm 50$  Å<sup>2</sup> for the helix and coil of PGDGA<sub>20</sub>, respectively. The greater solvent-accessibility of the polar groups in the random coil state allows to increase the number of interactions with the surrounding water molecules.

Finally, the w-w energies (Figure 7c and 8c) slowly increase when the fraction of formed hydrogen bonds decreases. This behavior is consistent with the variation of the p-w energy. Thus, the amount of w-w interactions decreases when the number of p-w interactions increases.



The sum of the p-p, p-w and w-w energy changes associated with the helix disruption may be connected with the potential energy change in unfolding the helix. These values were obtained by applying a linear correlation to the parametric plots of Figure 8. The resulting fitted-lines and the energies associated to the conformational change are displayed in Table 1. As it can be seen there is a good correlation between the ratio of formed hydrogen bonds and the different energy terms, the Pearson regression coefficients ( $r$ ) being about 0.7-0.9. This points out the crucial role of the  $i-i+3$  hydrogen bonds in our simulations since they affect not only to the p-p energy term but also to the p-w and w-w ones. A linear correlation was also found for polyalanine.<sup>16</sup>

It is worth noting that the solvation potential, which is estimated from the sum of the p-w and w-w energy changes, favors the random coil by about 218 kcal/mol. On the other hand, the p-p potential energy change predicted from the equation of Table 1 indicates that the helix conformation is 223 kcal/mol more stable than the coil state. According to these values, the energy change that accompanied the helix-coil transition in the MD at 350 K was about 5 kcal/mol, favoring the helix. It should be mentioned that these values should be considered only from a qualitative point of view since the conformational space of the random coil has not been exhaustively explored. However, this complex task is beyond the scope of the present work.

It would be interesting to compare the energetic results of PGDGA with those obtained for other helical peptides. For a 15-residue polyalanine in aqueous solution the energy is lower in the  $\alpha$ -helix state than in the random coil state by 20.4 kcal/mol.<sup>16</sup> This is in agreement with the values obtained by the calorimetric experiment of Scholtz *et al.*<sup>17</sup> (13-19 kcal/mol).

Accordingly, the  $\alpha$ -helix of polyalanine seems to be more stable than the helix of PGDGA in peptides constituted by 15 or 20 residues. This could be attributed to the lower density of amide...amide hydrogen bonds in the latter. Thus, the two additional backbone carbon atoms of the PGDGA residues increase considerably the distance between consecutive hydrogen bonds. On the other hand,  $\gamma$ -peptides constituted by amino acids without polar side groups have been shown to form helical secondary structures more stable than  $\alpha$ -peptides in pyridine and methanol solutions.<sup>18</sup> However, the helices of such  $\gamma$ -peptides are substantially different from that of PGDGA since they contain 14-membered ring hydrogen bonds set between the NH of the amide group  $i$  and the CO of the amide group  $i+2$ . This structural behavior is consistent with that of helical poly( $\beta$ -peptide)s. Thus, the helix conformation of the poly( $\beta$ -peptide)s constituted by amino acids containing polar groups in the side chain, *i.e.* poly( $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -L-aspartate)s, is less stable than the  $\alpha$ -helix of poly( $\alpha$ -peptide)s,<sup>19</sup> but the opposite situation appears when the chain is constituted by  $\beta$ -amino acids without polar side groups.<sup>20</sup>

**Side Chain Conformation of PGDGA.** In order to get a deeper insight into the structure of PGDGA, the conformational preferences of the side chain torsional angle  $\chi_1$  were analyzed. For this purpose population analyses were performed for the four simulations considered in this work, the conformations being grouped in four categories: *gauche*<sup>+</sup> (from 30° to 90°), *trans* (from 150° to -150°), *gauche*<sup>-</sup> (from -90° to -30°) and the remaining conformers. The temporal evolution of the torsional angle distribution for the simulation of PDGDA<sub>20</sub> at 350 K is displayed in Figure 9, which was obtained by analyzing the structures saved each 100 ps. The results provided by the simulations of PGDGA<sub>20</sub> at 300 K and PGDGA<sub>10</sub> at both

300 and 350 K (data not shown) were similar to those displayed in Figure 9, no significant difference being found.

As it can be seen, the *gauche*<sup>-</sup> is the preferred conformation for the PDGDA side chain. Thus, this side chain conformation is clearly the most populated one independently of the backbone arrangement. Furthermore, it becomes the most populated in the first steps of the simulation since the initial *trans* conformation is rapidly changed. The population of *gauche*<sup>+</sup> conformation increases with the unfolding of the helix, being of about 20% in the random coil state. On the other hand, the population of *trans* is almost negligible throughout all the simulation. Finally, the population of *cis* (from -30° to 30°), *skew*<sup>+</sup> (from 90° to 150°) and *skew*<sup>-</sup> (from -150° to -90°), which are grouped under the category of remaining conformers, is not negligible, *i.e.* about 20-30%.

It should be noted that the *gauche*<sup>-</sup> was predicted to be one of the most stable conformations for the  $\chi_1$  dihedral angle of PGDGA.<sup>9</sup> This rotamer allows an intra-residue interaction between the hydrogen atom of the amide group and the alkoxy oxygen atom of the acid side group. On the other hand, it was demonstrated that the helices adopted by some polypeptides constituted by  $\alpha$ - and  $\beta$ -amino acids bearing polar side groups, are partially stabilized by intramolecular interactions between the hydrogen amide atom and the oxygen atoms of the side chain.<sup>21,22</sup> This specific interaction is also present in PGDGA not only in the helical conformation but also in the coil state. Figure 10 shows the number of interactions between the backbone amide groups and the oxygen atoms of the side chain for PGDGA<sub>20</sub> and PGDGA<sub>10</sub> at 300 K. Similar results were obtained from the simulations at 350 K.

With this work we have displayed the effect of both the temperature and length of the peptide on the dynamics of the helical conformation of PGDGA. We have shown that the helix is not stable for a 10-residue peptide independently of the temperature. However, the temperature plays a crucial role on the dynamics of the 20-residue peptide. At room temperature, PGDGA<sub>20</sub> retains the helical conformation throughout the simulation, while at 350 K, the helix spontaneously evolves towards the random coil state. A potential energy analysis indicates that the helix state is less stable than the random coil state, even although the latter is better solvated than the former.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by DGICYT with grant N° PB96-0490. D.Z. acknowledges the support of the Ministry of Education of Spain for the award of a scholarship. Authors are indebted to the Centre de Supercomputació de Catalunya (CESCA) for computational facilities and to Prof. S. Muñoz-Guerra for helpful discussion.

## REFERENCES

- 1.- Thorne, C. B.; Gómez, C. G.; Noyes, H. E.; Housewright, R. D. *J. Bacteriol.* **1954**, *68*, 307.
- 2.- Ko, Y.; Gross, R. A. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *57*, 430.
- 3.- Cromwick, A.-M.; Gross, R. A. *Int. J. Biol. Macromol.* **1985**, *49*, 846.
- 4.- Pérez-Camero, G.; Congregado, F.; Bou, J. J.; Muñoz-Guerra, S. *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *63*, 110.
- 5.- Gardner, J. M.; Troy, F. A. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 6262.
- 6.- Troy, F. A.; Frerman, F. E.; Health, E. C. *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 118.
- 7.- Rydon, H. N. *J. Chem. Soc.* **1964**, 1328.
- 8.- He, L. M.; Neu, M. P.; Vanderberg, L. A. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 1694.
- 9.- Zanuy, D.; Alemán, C.; Muñoz-Guerra, S. *Int. J. Biol. Macromol.* **1998**, *23*, 175.
- 10.- Zanuy, D.; Alemán, C.; Muñoz-Guerra, S. *Macromol. Theory Simul.* **2000**, in press.
- 11.- Weiner, F. J.; Kollman, P. A.; Nguyen, D. T.; Case, D. A. *J. Comput. Chem.* **1986**, *7*, 230.
- 12.- Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926.
- 13.- Ryckaert, J. P.; Ciccoti, G.; Berendsen, H. J. C. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23*, 327.
- 14.- Pearlman, D. A.; Case, D. A.; Caldwell, J. W.; Ross, W. S.; Cheatham, T. E. III; Ferguson, D. M.; Seibel, G. L.; Singh, U. C.; Weiner, P. K.; Kollman, P. A. AMBER 4.1, University of California, San Francisco, 1995.
- 15.- Zanuy, D.; Alemán, C. *Biopolymers* **1999**, *49*, 497.
- 16.- Takano, M.; Yamato, T.; Higo, J.; Suyama, A.; Nagayama, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 605.

- 17.- Scholtz, J. M.; Marquesse, S.; Baldwin, R. L.; York, E. J.; Stewart, J. M.; Santoro, M.; Bolen, D. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 2854.
- 18.- Hintermann, T.; Gademann, K.; Jaun, B.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 983.
- 19.- Martínez de Ilarduya, A.; Alemán, C.; García-Alvarez, M.; López-Carrasquero, F.; Muñoz-Guerra, S. *Macromolecules* **1999**, *32*, 3257.
- 20.- Seebach, D.; Gademann, K.; Schreiber, J. V.; Matthews, J. L.; Hintermann, T.; Jaun, B.; Oberer, L.; Hommel, U.; Widmer, H. *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 2033.
- 21.- León, S.; Alemán, C.; Muñoz-Guerra, S. *Macromolecules* **1997**, *30*, 6662.
- 22.- Alemán, C.; Navas, J.J.; Muñoz-Guerra, S. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17653.

**Table 1.** Energy changes (in kcal/mol) from the helix to the coil state for PGDGA20.

Energy Term <sup>a</sup>	Fitted Line <sup>b</sup>	<i>r</i> <sup>c</sup>	Energy Changed <sup>d</sup>
p-p	$y=-1221.02-2.23x$	0.9	223
p-w	$y=-886.62+3.39x$	0.9	-339
w-w	$y=-7650.20-1.21x$	0.7	121
System			5

<sup>a</sup> p-p, p-w, w-w and system refer to the peptide-peptide, peptide-water, water-water and whole system interactions, respectively.

<sup>b</sup> The fitted lines were obtained by applying a linear correlation to the parametric plots between the energies and the native hydrogen bond ratio as shown in Figure 8; *x* and *y* refer to the ratio of hydrogen bonds and the energy, respectively.

<sup>c</sup> *r* refers to the Pearson regression coefficient.

<sup>d</sup> The energy changes were obtained by applying the fitted lines to the helix (*x*=1) and coil (*x*=0) states.

## CAPTIONS TO FIGURES

**Figure 1.** Equatorial and axial projections of the model conformation of PGDGA.

**Figure 2.** Backbone atom-positional root-mean square deviation (rmsd) from the model conformation of PGDGA as a function of simulation time for PGDGA<sub>20</sub> (a) and PGDGA<sub>10</sub> (b) at 300 (solid line) and 350 K (dashed line).

**Figure 3.** Trajectory of the fraction of *i-i+3* type hydrogen bonds in PGDGA<sub>20</sub> (a) and PGDGA<sub>10</sub> (b) at 300 (solid line) and 350 K (dashed line). An hydrogen bond was considered as formed when the O...H distance was less than 2.5 Å and the <N-H...O angle was larger than 135°.

**Figure 4.** Spatio-temporal evolution of *i-i+3* type hydrogen bonds for: (a) PGDGA<sub>20</sub> at 300 K, (b) PGDGA<sub>20</sub> at 350 K, (c) PGDGA<sub>10</sub> at 300 K, and (d) PGDGA<sub>10</sub> at 350 K. Note that the residue number, *i*, denotes the *i*th residue with the acceptor oxygen.

**Figure 5.** Ribbon snapshots representing equally spaced intervals over the 1000 ps of the PGDGA<sub>20</sub> simulations at 300 (a) and 350 K (b). The N-terminus is at the top of the figure.

**Figure 6.** Evolution of the backbone dihedral angles for the central residue of PGDGA<sub>20</sub> through the MD simulation at 300 K.

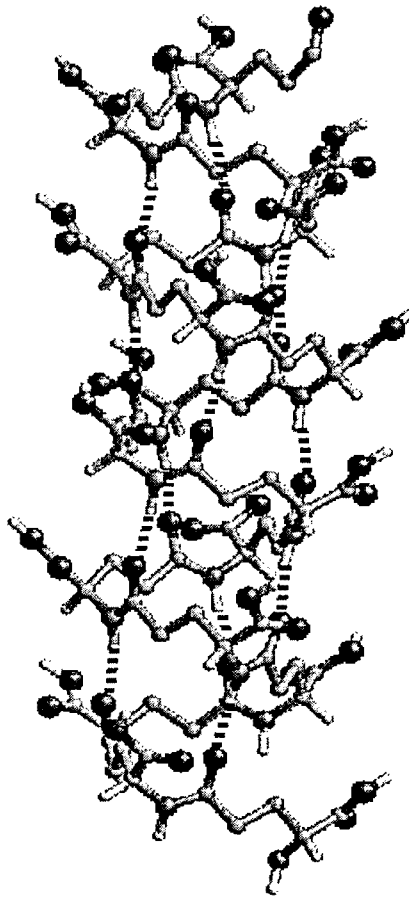
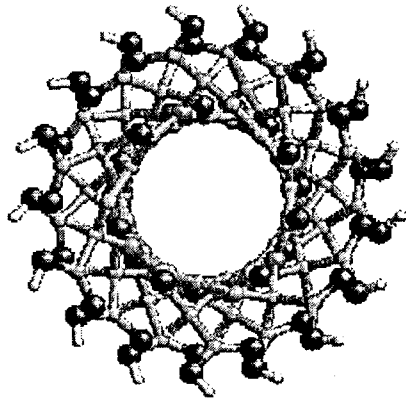


**Figure 7.** The parametric plots between the (a) peptide-peptide (p-p), (b) peptide-water (p-w) and (c) water-water (w-w) energies and the ratio of  $i$ - $i+3$  hydrogen bonds in the PGDGA<sub>20</sub> chain during the simulation at 300 K.

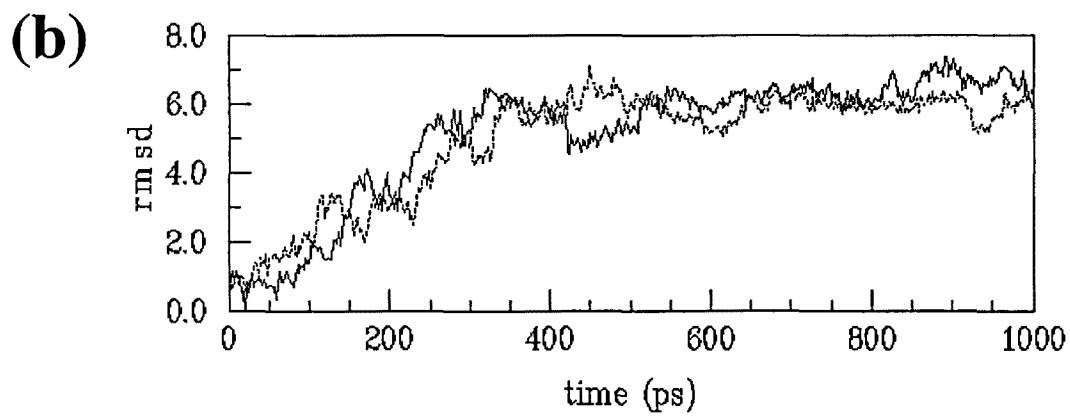
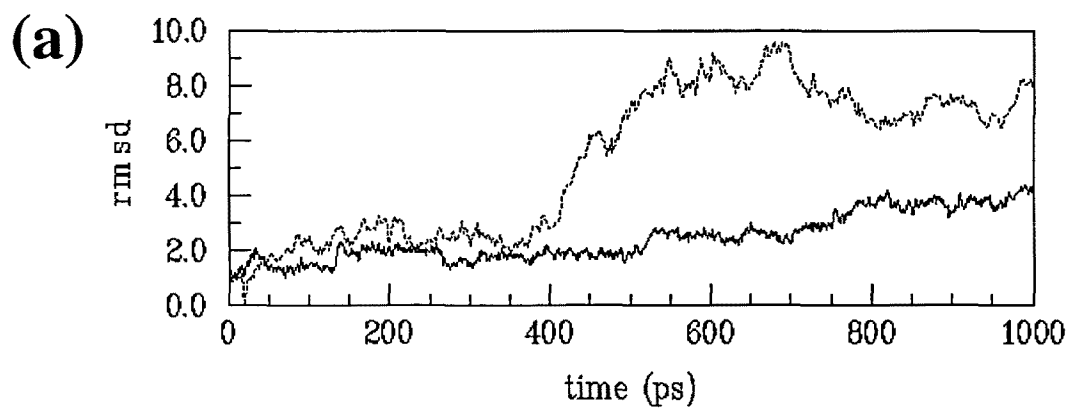
**Figure 8.** The parametric plots between the (a) peptide-peptide (p-p), (b) peptide-water (p-w) and (c) water-water (w-w) energies and the ratio of  $i$ - $i+3$  hydrogen bonds in the PGDGA<sub>20</sub> chain during the simulation at 350 K.

**Figure 9.** Temporal evolution of the distribution for the torsional angle  $\chi_1$  in the simulation of PDGDA<sub>20</sub> at 350 K. The population analyses have been performed each 100 ps. The four categories considered, in the order displayed in the figure from bottom to top, are: *trans*, *gauche*<sup>+</sup>, *gauche*<sup>-</sup> and the remaining conformers.

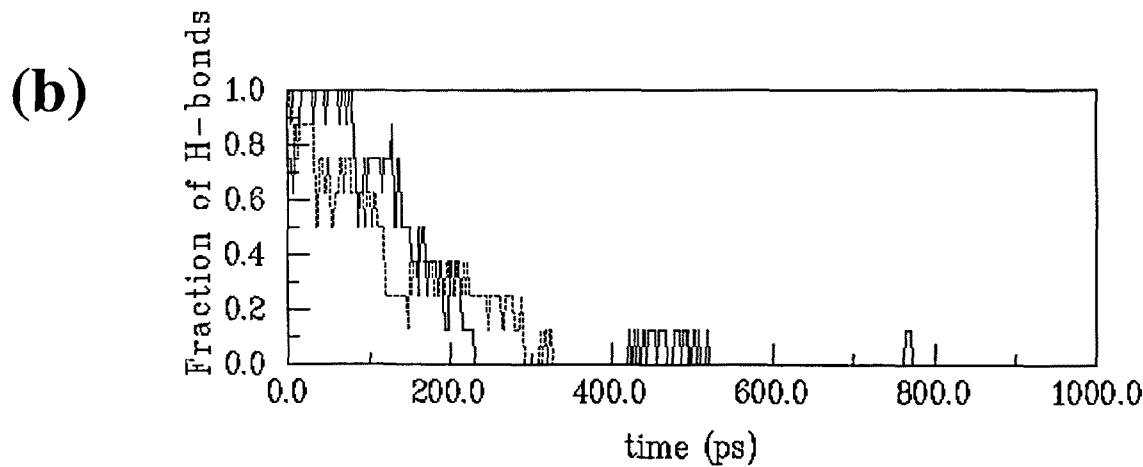
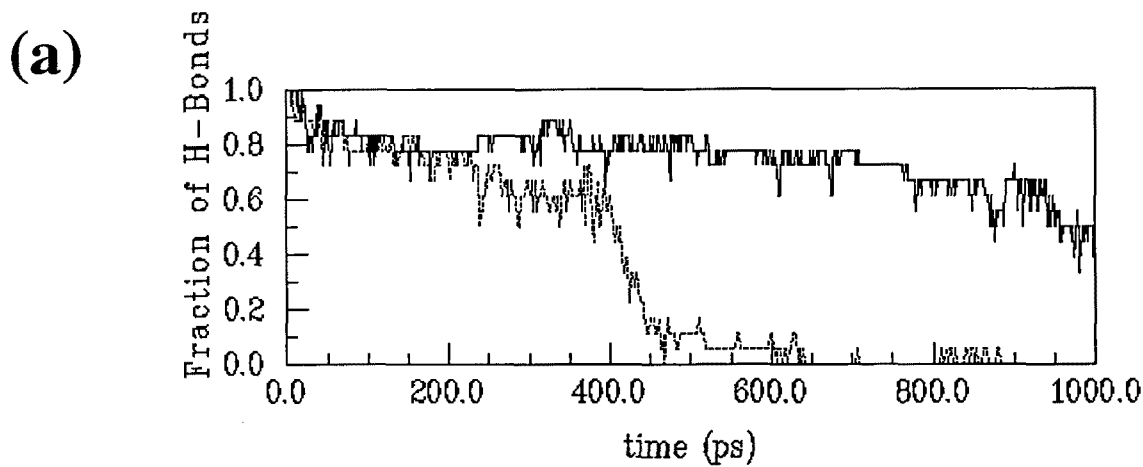
**Figure 10.** Number of interactions between the backbone amide group and the side chain oxygen atoms found in the simulations of PGDGA<sub>20</sub> (solid line) and PGDGA<sub>10</sub> (dashed line) at 300 K.



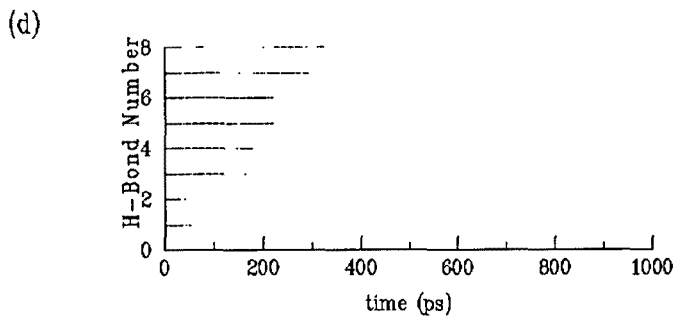
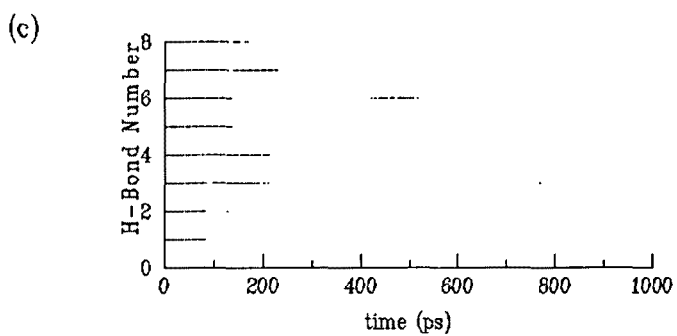
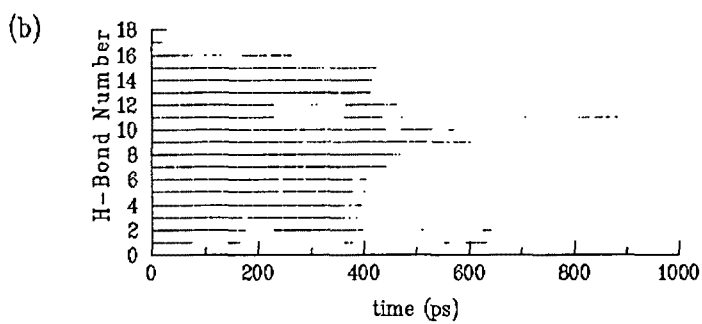
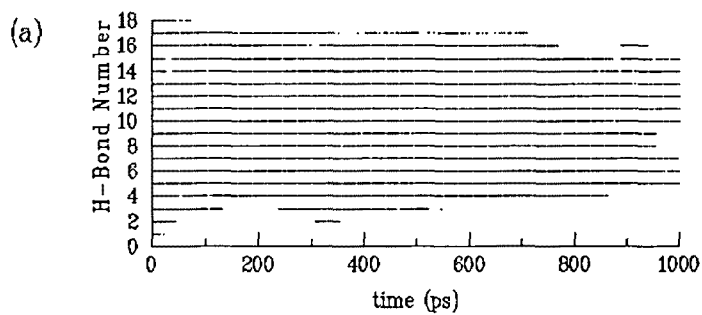
**Fig. 1. Zanuy and Alemán**



**Fig. 2. Zanuy and Alemán**



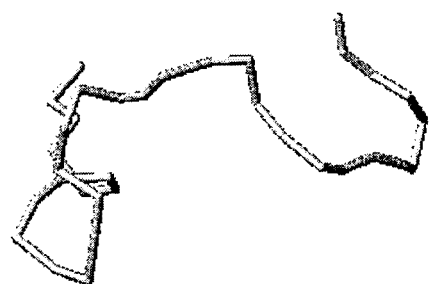
**Fig. 3. Zanuy and Alemán**



**Fig. 4. Zanuy and Alemán**



1000ps



800ps



600ps



400ps



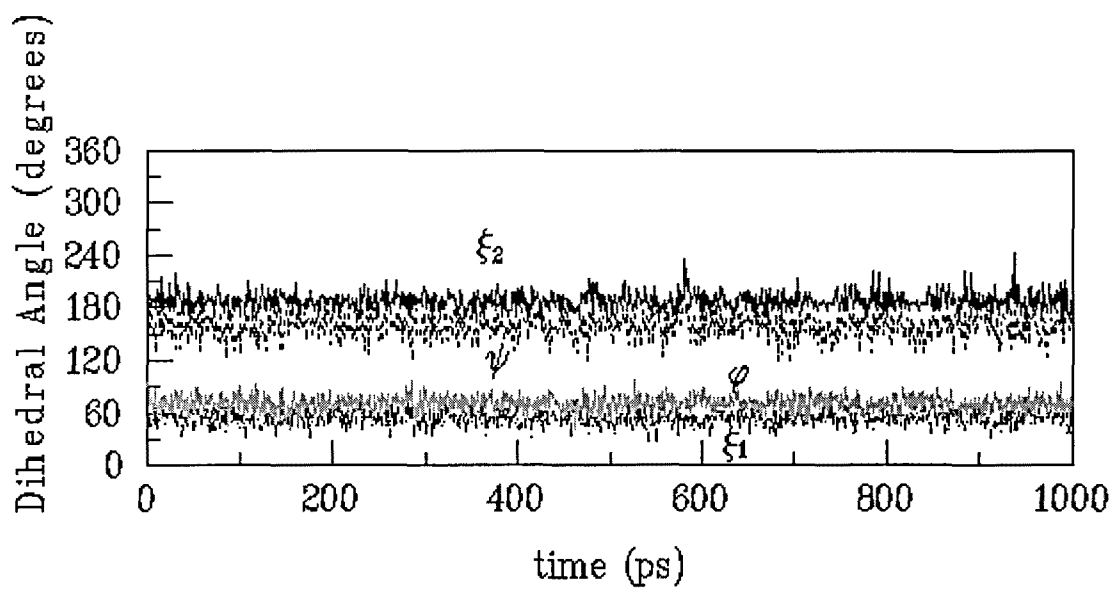
200ps



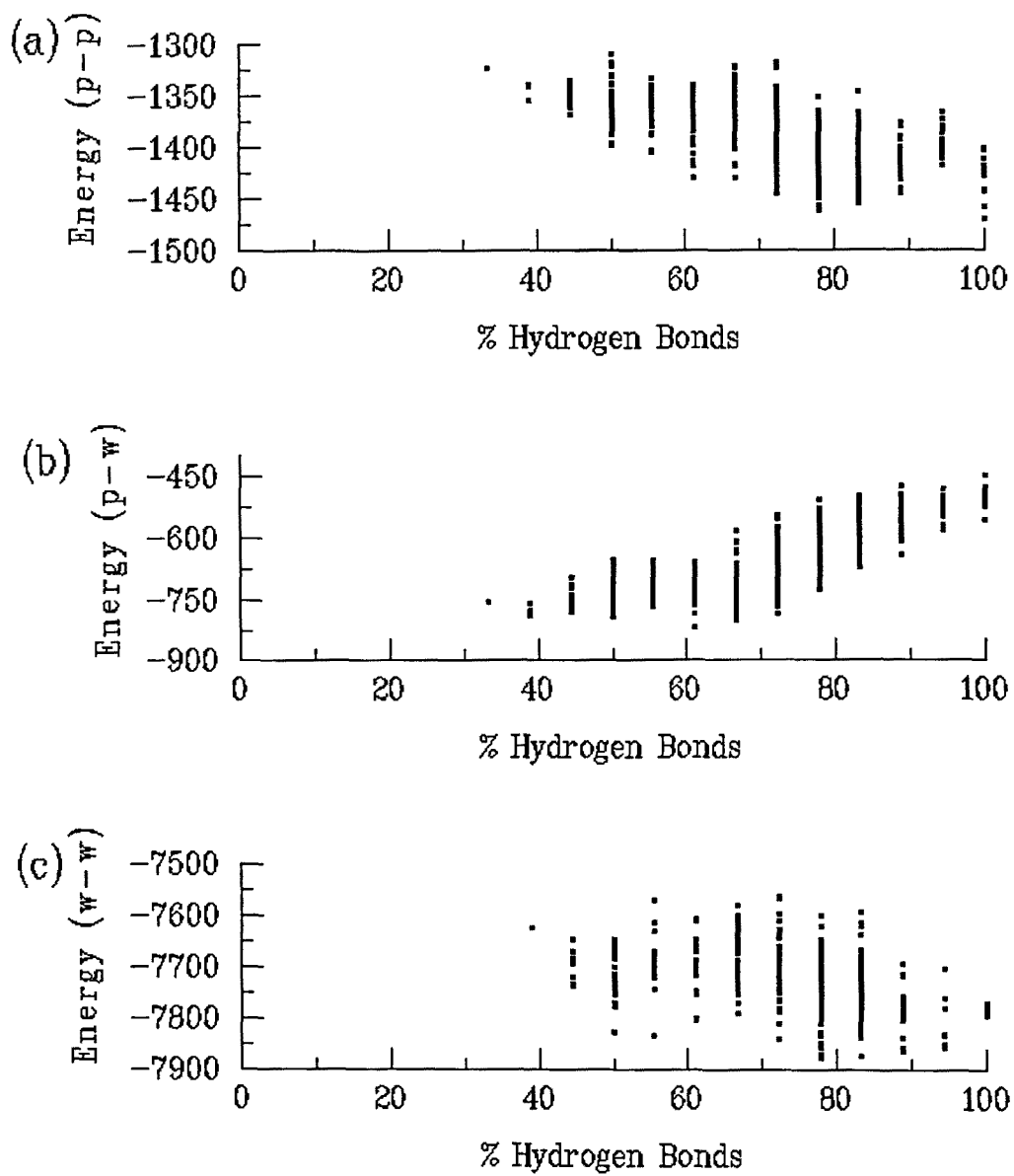
a)

b)

Fig. 5. Zanuy and Alemán



**Fig.6. Zanuy and Alemán**



**Fig.7. Zanuy and Alemán**



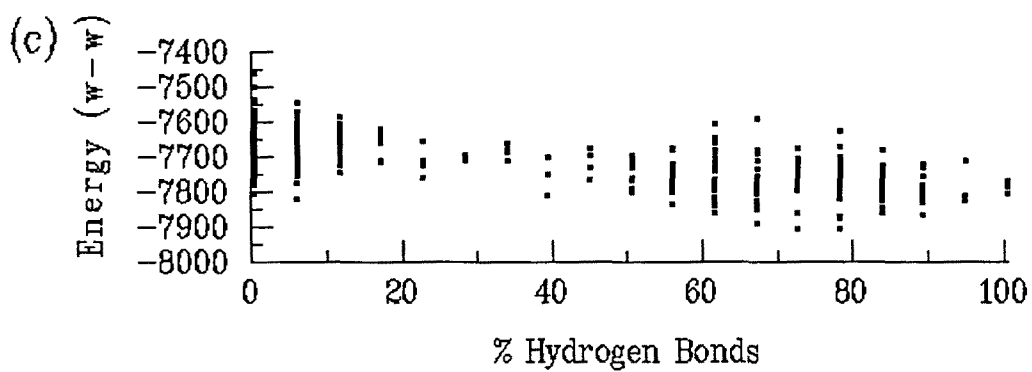
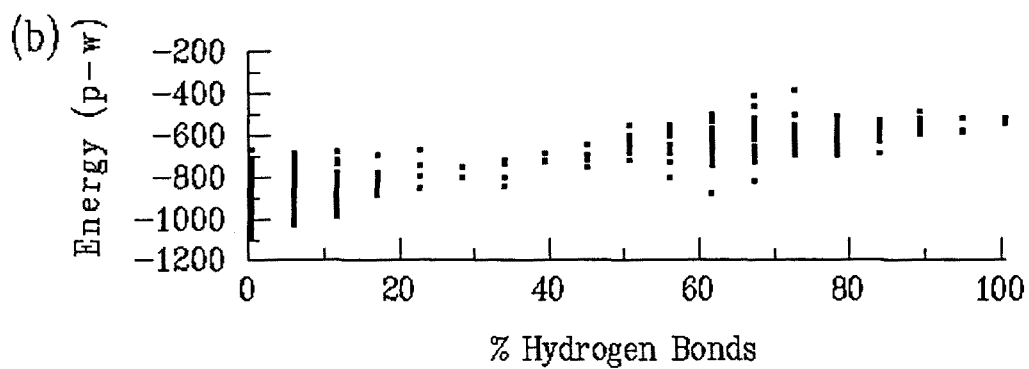
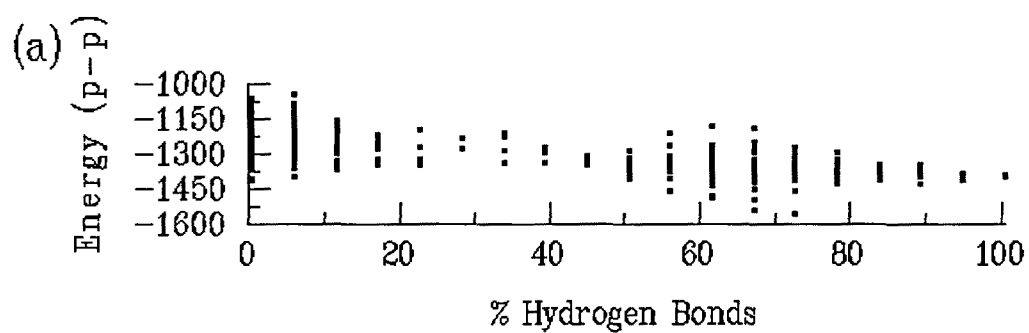
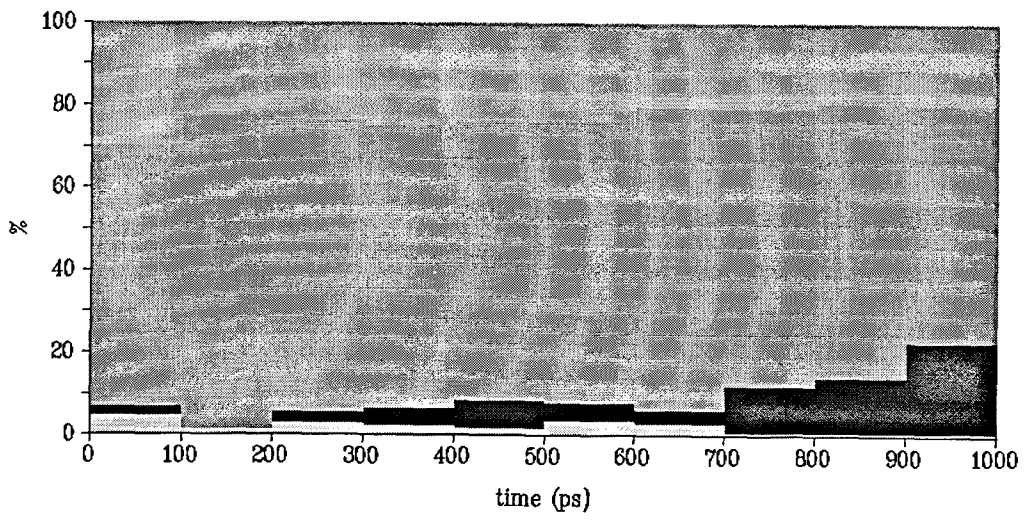
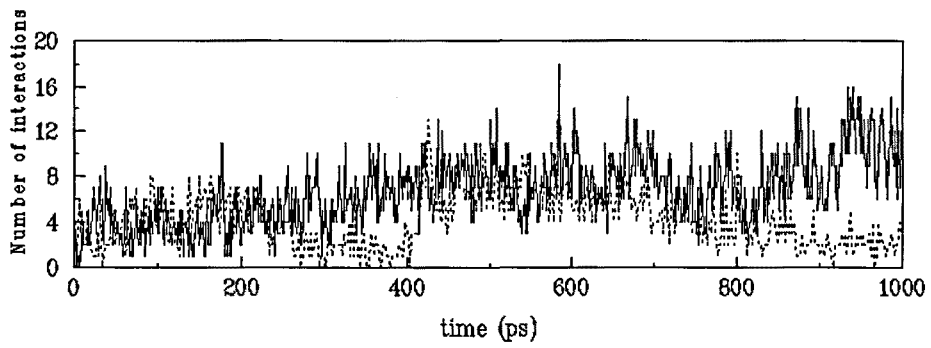


Fig.8. Zanuy and Alemán



**Fig.9. Zanuy and Alemán**



**Fig.10. Zanuy and Alemán**

**IV. 8. “Modeling of the  $\alpha$ -Helix Conformation of Homopeptides Constituted by  $\alpha$ -L-Glutamic Acid”**

Zanuy, D.; Alemán C. *Biopolymers*, 1999, 49, 497-504



David Zanuy  
Carlos Alemán  
Departament d'Enginyeria  
Química,  
E.T.S. d'Enginyers Industrials  
de Barcelona,  
Universitat Politècnica  
de Catalunya,  
Diagonal 647,  
Barcelona E-08028, Spain

Received 6 June 1998;  
accepted 5 November 1998

## Modeling of the $\alpha$ -Helix Conformation of Homopeptides Constituted by $\alpha$ -L-Glutamic Acid

**Abstract:** The  $\alpha$ -helix conformation of homopeptides constituted by  $\alpha$ -L-glutamic acid has been modeled by means of quantum mechanical methods. The results have allowed us to obtain a detailed description not only of the helical backbone, but also of the conformational preferences of the side chains. The intrinsic helix forming tendency of  $\alpha$ -L-glutamic acid has been compared with those of alanine and  $\alpha$ -aminoisobutyric acid by analyzing cooperative energy effects. The influence of the solvent on the stability of the  $\alpha$ -helix has been examined by using a self-consistent reaction field method. Finally, the stability of the  $\alpha$ -helix conformation on the ionized homopeptides has been investigated. © 1999 John Wiley & Sons, Inc. *Biopoly* 49: 497–504, 1999

**Keywords:**  $\alpha$ -helix; homopeptides;  $\alpha$ -L-glutamic acid

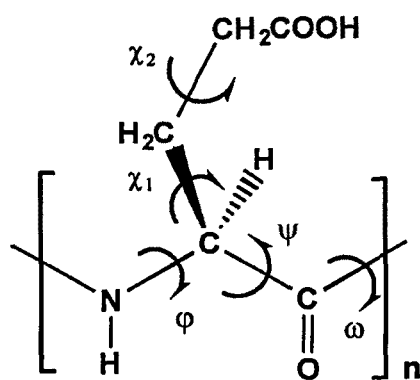
### INTRODUCTION

Systematic studies on the conformational properties of poly( $\alpha$ -amino acid)s are crucial as a prelude to rational design of new compounds with defined structural motifs.<sup>1,2</sup> For example, the ability of poly(glycine) chains to adopt  $3_1$ -helices stabilized by intermolecular hydrogen bonds<sup>3</sup> has allowed the design of a new family of helical polyamides<sup>4–6</sup>—namely nylons  $2/n$ , different from the usual extended and/or quasi-extended nylons.<sup>7,8</sup> Another example can be found in poly( $\beta$ -L-aspartate)s, which are a family of poly( $\beta$ -amino acid)s. These polyamides adopt helical conformations stabilized by intramolecular hydrogen bonds with features similar to the helices of polypeptides.<sup>9–12</sup> Thus, recent studies on poly( $\alpha$ -L-aspartate)s have allowed us to find some common features between the helices formed by such compounds and those of poly( $\beta$ -L-aspartate)s.<sup>13,14</sup>

We are now interested in the study of poly( $\gamma$ -L-glutamate)s, a family of poly( $\gamma$ -amino acid)s, since an early study<sup>15</sup> on poly( $\alpha$ -benzyl- $\gamma$ -L-glutamate) and poly( $\alpha$ -methyl- $\gamma$ -L-glutamate) using x-ray diffraction and electron microscopy revealed that they adopt helical conformations. On the other hand, a very recent computational study<sup>16</sup> of poly( $\gamma$ -D-glutamic acid) in the unionized state provided an atomistic description of the helical conformation of this polymer, which is compatible with the data obtained by Rydon using optical rotatory experiments.<sup>17</sup>

In this work we have investigated the conformational properties of poly( $\alpha$ -L-glutamic acid), abbreviated P $\alpha$ LGA (Scheme I). Thus, we expect to find a relation between the  $\alpha$ -helices of P $\alpha$ LGA and poly( $\gamma$ -D-glutamic acid) that could help in the near future to model the helical structures of related polymers. Highly protonated P $\alpha$ LGA is predominantly  $\alpha$ -helix

Correspondence to: Carlos Alemán  
*Biopolymers*, Vol. 49, 497–504 (1999)  
© 1999 John Wiley & Sons, Inc.



SCHEME 1

in aqueous solution, whereas the fully charged poly( $\alpha$ -L-glutamate) polyanion, abbreviated P $\alpha$ LG, is randomly coiled in solution,<sup>18</sup> even though it has been found in both  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet conformations in the solid state.<sup>19</sup> Potentiometric titration curves of P $\alpha$ LGA have been used to investigate the helix-coil transition at different temperatures.<sup>18,20</sup> Such curves have revealed four distinguishable regions as the solution is brought from highly acidic to more basic pH. These have been interpreted as a region of aggregation, a helical region of dispersed polymer, a transition region, and a region of random coil.

In spite of the importance of P $\alpha$ LGA as a model for helical polypeptides with acidic side chains, the number of structural studies of unionized P $\alpha$ LGA to provide an atomistic model for the helix is rather scarce. Thus, Scheraga and co-workers<sup>21</sup> reported an early study of P $\alpha$ LGA in the gas phase using force-field methods. The authors found a right-handed  $\alpha$ -helix with dihedral angles  $\varphi, \psi = -50.5^\circ, -56.4^\circ$ . More recently, López-Navarrete et al.<sup>22</sup> investigated the potential energy surface of the unionized glutamic acid residue in the gas phase using both semiempirical and ab initio quantum mechanical calculations.

In the present work we report a computational study using quantum mechanical methods of P $\alpha$ LGA and P $\alpha$ LG. The study has been performed in both gas-phase and aqueous solution environments. The results have allowed us to provide a microscopic description for the  $\alpha$ -helix of P $\alpha$ LGA. Moreover, the low stability of the  $\alpha$ -helix with respect to the random coil has been investigated for P $\alpha$ LG.

## METHODS

### Gas-Phase Calculations

Homopeptides comprised of  $n$  residues, where  $n$  ranges from 2 to 9, were built for P $\alpha$ LGA, being abbreviated

P $\alpha$ LGA- $n$ . Homopeptides were initially built in the right-handed  $\alpha$ -helix conformation with backbone dihedral angles  $\varphi$  and  $\psi$  fixed at  $-60^\circ$  and  $-50^\circ$ , respectively. Then, the molecular conformation of all the homopeptides was fully optimized using quantum mechanical calculations. Helical conformations for P $\alpha$ LG- $n$  were built using the optimized conformations for P $\alpha$ LGA- $n$ , but removing the hydrogen atom of the acid side group.

Due to the large size of the compounds under study, quantum mechanical calculations cannot be performed at the ab initio level, so they were performed at the semiempirical AM1<sup>23</sup> level. This is a well-known method that provides a satisfactory description of both molecular geometries and energies for polypeptides with helical conformations stabilized by intramolecular hydrogen bonds.<sup>2,14,24,25</sup> A molecular mechanics correction was applied to the amide bond in the geometry optimizations by using the MMOK keyword implemented in the MOPAC computer program.<sup>26</sup>

Cooperative energy effects were examined using the procedure described in our previous works.<sup>24,25</sup> The differences between the enthalpy of formation of the peptides with  $n = 1$  and  $n = 2$  in a given conformation can be related to the energy increment (EI) that results from the addition of a single residue fragment in the same conformation of the peptide chain. Therefore, for a given peptide with  $n = m$  residues, the predicted enthalpy of formation ( $\Delta H^{\text{pred},298}$ ) can be estimated from

$$\Delta H^{\text{pred},298}(n = m) = (m - 1)\text{EI} + \Delta H^{\text{pred},298}(n = 1)$$

The difference between the predicted and the quantum mechanical computed enthalpies for a given structure provides the cooperative enthalpy effect ( $\Delta\Delta H^{\text{coop}}$ ):

$$\Delta\Delta H^{\text{coop}} = \Delta H^{\text{QM},298}(n = m) - \Delta H^{\text{pred},298}(n = m)$$

### Aqueous-Phase Calculations

The free energies of solvation were determined using the semiempirical AM1 adapted version<sup>27,28</sup> of the self-consistent reaction-field (SCRF) method developed by Miertus, Scrocco, and Tomasi (MST).<sup>29,30</sup> SCRF methods simulate the average effect of the solvent on the solute by means of the solvent reaction field induced by the solute molecule. These models assume that the solute is embedded inside a cavity surrounded by an infinite medium (the solvent), which is characterized by suitable physical properties like the permittivity or the thermal expansion coefficient. The root mean square deviation with respect to experimental data was around 1 kcal/mol,<sup>27,28</sup> which supports the suitability of the method to describe solvation in large molecular systems. In the MST/AM1 method the free energy of solvation is given by the addition of electrostatic and steric contributions [Eq. (3)], where the latter term was computed as the sum of cavitation and van der Waals terms:

$$\Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{ele}} + \Delta G_{\text{cav}} + \Delta G_{\text{vdw}}$$

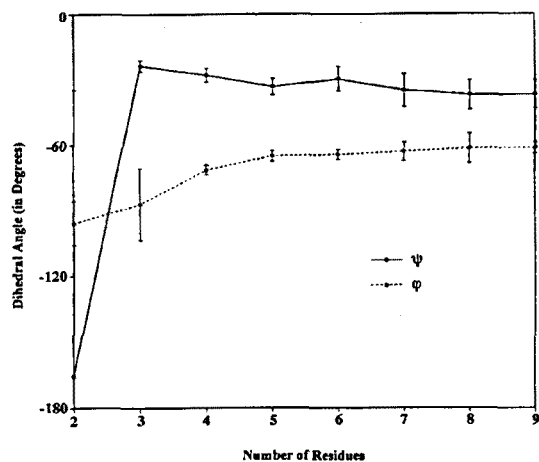


FIGURE 1 Variation of the averaged dihedral angles  $\phi$  and  $\psi$  with the number of residues for the  $\alpha$ -helix of P $\alpha$ LGA- $n$ .

The cavitation term, which provides the work required to build the solute cavity, was determined using Pierotti's scaled particle theory.<sup>31</sup> The van der Waals term was evaluated [Eq. (4)] by means of the molecular surface area,<sup>27,28</sup> where  $\xi_i$  is the hardness of atom  $i$  and  $S_i$  is the portion of the molecular surface area belonging to atom  $i$ :

$$\Delta G_{\text{vdw}} = \sum_i \xi_i S_i$$

The electrostatic term, which represents the interaction between the charge distribution of the solute and the reaction field generated by the solute in the solvent, was computed using the MST-SCRF method. In this approach, the solvent reaction field was determined from the solute molecular electrostatic potential computed at the AM1 level using the *ortho* method.<sup>27,28</sup> The self-consistent nature of the method stems from the mutual dependence between the solute charge distribution and the reaction field. The solute/solvent interface was determined using a molecular shape algorithm. Since the change in the molecular geometry upon solvation has a negligible effect on the thermodynamic parameters,<sup>32,33</sup> molecular geometries optimized in the gas phase were kept fixed in the SCRF calculations.

All the calculations were carried out with a modified version of the MOPAC<sup>26</sup> program. All calculations were run on a Silicon-Graphics O<sub>2</sub> at our laboratory, and on a IBM-SP2 at the Centre de Supercomputació de Catalunya (CESCA).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Modeling of the Helical Conformation of P $\alpha$ LGA

Geometry optimizations for the  $\alpha$ -helix conformation of P $\alpha$ LGA- $n$ , where  $n$  ranges from 1 to 9, were performed using the AM1 hamiltonian. Side chains were initially arranged in all-*trans*. Results are shown in Figure 1, where the variation of the averaged dihedral angles  $\phi, \psi$  with the number of residues is displayed. The results indicate that the  $\alpha$ -helix is stable for a number of residues larger than 3. Furthermore, the structure exhibited well-defined and continuous dihedral angles for  $n > 6$ , the averaged values for P $\alpha$ LGA-9 being  $\phi, \psi = -60.5 \pm 4.4^\circ, -40.2 \pm 7.9^\circ$ . Thus, the values for  $\phi$  and  $\psi$  predicted by quantum mechanical calculations differ by  $10.0^\circ$  and  $16.4^\circ$ , respectively, from those reported by Scheraga and co-workers<sup>21</sup> using the ECEPP force field. The optimized  $\alpha$ -helix of P $\alpha$ LGA-9 contains 3.53 residues per turn, being very close to the standard  $\alpha$ -helix (3.65 residues per turn).<sup>34</sup> On the other hand, the H $\cdots$ O distances and  $\langle \text{N}-\text{H}\cdots\text{O} \rangle$  angles are about 2 Å and  $155^\circ$ , respectively. Such hydrogen-bonding parameters are very similar to those predicted by the same computational method for other helical homopeptides.<sup>14,24,25,35</sup>

Cooperative energy effects in the gas phase ( $\Delta\Delta H^{\text{coop}}$ ) were calculated for the optimized conformations using Eqs. (1) and (2). Results are displayed in Figure 2, where the large influence of the peptide growth on the stabilization of the  $\alpha$ -helix is shown. Thus, in all cases the  $\Delta\Delta H^{\text{coop}}$  values are negative, pointing out the intrinsic tendency of the  $\alpha$ -L-glutamic acid to adopt helical conformations. The  $\Delta\Delta H^{\text{coop}}$

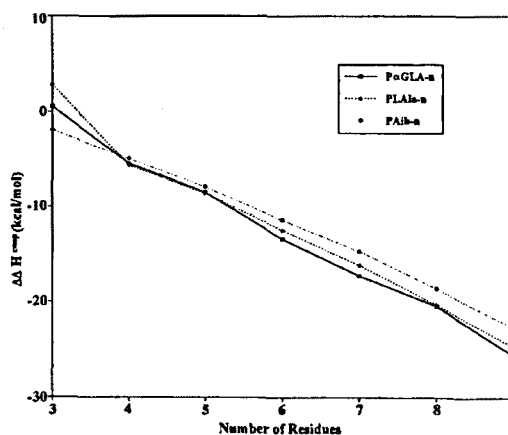
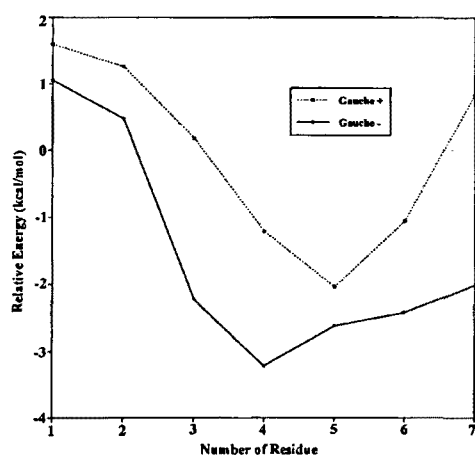


FIGURE 2 Variation of the cooperative energy effects with the number of residues for the  $\alpha$ -helix of P $\alpha$ LGA- $n$ .





**FIGURE 3** Relative energies of the  $\alpha$ -helices for P $\alpha$ LGA-7 obtained by changing the dihedral angle  $\chi_1$  of one residue (indicated on the  $x$  axis) to either the *gauche*<sup>+</sup> or *gauche*<sup>-</sup> conformation, whereas the remainder residues retain a *trans* conformation. The energies are relative to the  $\alpha$ -helix with all the dihedral angles  $\chi_1$  in the *trans* conformation.

values obtained for P $\alpha$ LGA- $n$  are compared with those previously obtained<sup>2</sup> for homopeptides constituted by L-alanine and  $\alpha$ -aminoisobutyric acid, abbreviated PLAla- $n$  and PAib- $n$  respectively. Note that the intrinsic helix forming tendency of  $\alpha$ -L-glutamic acid is quite similar to that of alanine and  $\alpha$ -aminoisobutyric acid, which are strong helix formers. These results are in agreement with those obtained by Baldwin and co-workers<sup>36</sup> for short peptides in which a single alanine residue was substituted by other amino acids. However, it should be noted that  $\Delta\Delta H^{\text{coop}}$  values predicted in our previous work for PLAla- $n$  and PAib- $n$  are underestimated since they were computed for  $\alpha$ -helices with the dihedral angles  $\varphi$  and  $\psi$  fixed at  $-60^\circ$  and  $-50^\circ$ , respectively, rather than for the fully optimized structures.

In order to investigate the effect of the side chain on the helix geometry, energy minimizations were performed on the oligopeptide constituted by seven residues. The study was done in several stages by considering different starting conformations for the side chains. First, the conformation of the side chain in only one residue was systematically by varying the dihedral angle  $\chi_1$  from *trans* to both *gauche*<sup>+</sup> and *gauche*<sup>-</sup>, whereas those of the remainder residues remained in *trans*. Relative energies with respect to the helix with all the side chains in all-*trans* are displayed in Figure 3. It is worth noting that in all cases the *gauche*<sup>-</sup> conformation is energetically favored with respect to the *gauche*<sup>+</sup>. Furthermore, the *gauche*<sup>-</sup> conformation is more stable than the *trans*

one for all the residues located in both the central part of the helix and the C-cap, whereas the *trans* conformation is favored at the N-cap. Since additional intramolecular hydrogen bonds, *i.e.*, side-chain-side-chain and backbone-side-chain, were not detected in any case, the stabilization of the *gauche*<sup>-</sup> conformation should be attributed to an improvement in the packing of the side chains belonging to different residues. Thus, an analysis of the amide  $\cdots$  amide hydrogen-bonding parameters reveals an improvement in the linearity of N—H  $\cdots$  O angle of about  $10^\circ$  when the  $\chi_1$  dihedral angle changes from *trans* to *gauche*<sup>-</sup>.

In a second stage, the dihedral angle  $\chi_1$  was changed from *trans* to *gauche*<sup>-</sup> for several residues of P $\alpha$ LGA-7 at the same time. A summary of the most relevant conformers is displayed in Table I, where both the relative energies with respect to the oligopeptide with all the side chains in *trans* and the cooperative enthalpy differences are reported. Note that the helix with all the dihedral angles  $\chi_1$  in the *gauche*<sup>-</sup> conformation is the most favored one, being 12 kcal/mol more favored than that with all the side chains in *trans*, labeled  $t_7$  in Table I. Such conformation improves considerably the amide  $\cdots$  amide hydrogen-bonding parameters, *i.e.*, the H  $\cdots$  O distances decrease by about 0.1 Å and the linearity of the <N—H  $\cdots$  O angles improves by about  $10^\circ$ . This improvement is reflected in the cooperative energy difference by a decrease of about 2 kcal/mol per residue with respect to the  $t_7$  conformation.

On the other hand, the stability of the different conformers decreases when the number of residues

**Table I** Summary of the Most Relevant Conformations Computed for the Side Chains of P $\alpha$ LGA-7<sup>a</sup>

$\chi_1$ Angle for P $\alpha$ LGA-7 <sup>b</sup>	Label <sup>c</sup>	$\Delta E$	$\Delta\Delta H^{\text{coop}}$
<i>t-t-t-t-t-t-t</i>	$T_7$	0.0	-17.3
<i>g<sup>-</sup>-g<sup>-</sup>-g<sup>-</sup>-g<sup>-</sup>-g<sup>-</sup>-g<sup>-</sup>-g<sup>-</sup></i>	$(g^-)_7$	-12.0	-31.5
<i>t-g<sup>-</sup>-g<sup>-</sup>-g<sup>-</sup>-g<sup>-</sup>-g<sup>-</sup>-g<sup>-</sup></i>	$t(g^-)_6$	-10.9	-30.4
<i>t-t-g<sup>-</sup>-g<sup>-</sup>-g<sup>-</sup>-g<sup>-</sup>-g<sup>-</sup></i>	$t_2(g^-)_5$	-10.6	-30.1
<i>t-t-g<sup>-</sup>-g<sup>-</sup>-t-t-t</i>	$t_2(g^-)_2t_3$	-5.0	-24.5
<i>t-t-t-g<sup>-</sup>-g<sup>-</sup>-t-t</i>	$t_3(g^-)_2t_2$	-5.5	-25.0

<sup>a</sup> In all cases the  $\alpha$ -helix retains the backbone conformation. Helices differ only in the  $\chi_1$  dihedral angle of the different residues (see footnote b below). Relative energies with respect to the oligopeptide with all the side chains in *trans* ( $\Delta E$ ; in kcal/mol) and cooperative enthalpy differences ( $\Delta\Delta H^{\text{coop}}$ ; in kcal/mol) are indicated.

<sup>b</sup> Conformations for the dihedral angle  $\chi_1$  of residues 1-7 are indicated by a list of seven letters, where *t* and *g<sup>-</sup>* refer to *trans* and *gauche*<sup>-</sup>, respectively.

<sup>c</sup> Labels used in the text to refer to the different conformations.

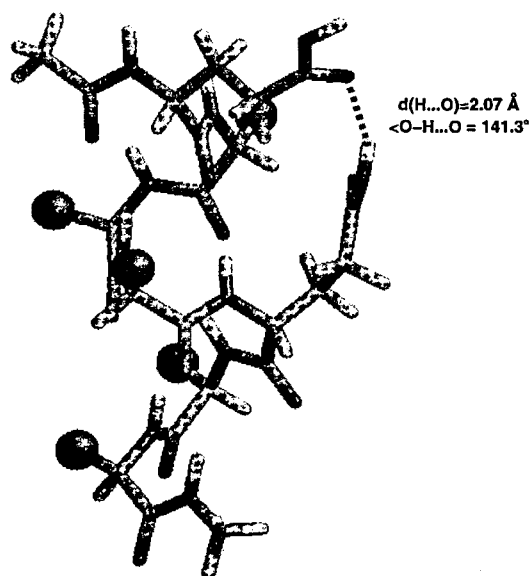


FIGURE 4 Intramolecular interaction between the carboxylic side groups of residues with *gauche*<sup>+</sup> and *trans* conformations for the conformer *tt(g*<sup>+</sup>*)*<sub>5</sub> of P $\alpha$ LGA-7. In order to clarify the figure the side chains of the remainder residues have been represented by a single sphere.

with the dihedral angle  $\chi_1$  in the *trans* conformation increases. However, a stabilization with respect to the oligopeptide with all the side chains in *trans* is observed in all cases. Such a trend can be explained on the basis of intramolecular interactions between the carboxylic side groups of different residues. Thus, residues with the dihedral angle  $\chi_1$  in *gauche*<sup>-</sup> interacts with those in which the side chain remains in *trans*. This interaction is illustrated in Figure 4 for the conformer labeled *tt(g*<sup>-</sup>*)*<sub>5</sub>. The interactions between the side chains of the different residues provide an stabilization in the cooperative energy difference of about 4 kcal/mol per interaction with respect to the *t*<sub>7</sub> conformation. The overall of the results displayed in Table I and Figures 3 and 4 permit us to conclude that the *gauche*<sup>-</sup> conformation is the preferred one for  $\chi_1$ . The same conclusion was reached by Benedetti *et al.*<sup>37</sup> from the analysis of the distributions of side chain conformations in 258 crystal structures of oligopeptides. Thus, the authors found that the *gauche*<sup>-</sup> conformation occurs most frequently for the dihedral angle  $\chi_1$  in residues with no  $\beta$ -branching. On the other hand, Dunbrack and Karplus<sup>38</sup> found that the *gauche*<sup>-</sup> and *trans* rotamers present similar populations in proteins.

Finally, the dihedral angle  $\chi_2$  was changed from *trans* to both *gauche*<sup>+</sup> and *gauche*<sup>-</sup> for different residues of P $\alpha$ LGA-7, but considering in all cases a

*gauche*<sup>-</sup> conformation for the dihedral angle  $\chi_1$ . An important number of both side-chain-side-chain and side-chain-backbone interactions was detected in all the conformers. Such intramolecular interactions stabilize the conformer with respect to that in which all the side chains are in *trans*. However, no systematic behavior was detected for  $\chi_2$  precluding the rationalization of the conformational preferences of this dihedral angle. Table II shows the most relevant data for the  $\alpha$ -helix of P $\alpha$ LGA-*n* obtained from this modeling study. On the other hand, it should be emphasized that side-chain-side-chain interactions with two hydrogen bonds between acid groups were not detected in any case. These type of interactions are found in many carboxylic acids.<sup>39,40</sup> Our calculations suggest that another degree of freedom should be considered in order to find these double interactions, *i.e.*, the rotations around the CH<sub>2</sub>-COOH bond. However, the large number of minima that can be anticipated precludes this study from a computational point of view.

The variation of the  $\Delta G_{\text{sol}}$  values with the chain length for P $\alpha$ LGA-*n* oligopeptides is displayed in Figure 5. It is worth noting that the favorable solute-solvent interactions increase with the number of residues. Thus, it is quite apparent from the results that the helix of P $\alpha$ LGA is well hydrated. The results displayed in Table III shows the different contributions to  $\Delta G_{\text{sol}}$  for the homopeptide with *n* = 7. The origin of the stabilization for the helix of P $\alpha$ LGA-7 lies in the electrostatic term, which provides the most important contribution to  $\Delta G_{\text{sol}}$ . On the other hand, the steric term has an unfavorable contribution to  $\Delta G_{\text{sol}}$ .

The effect of the solvent on the conformational preferences of the dihedral angle  $\chi_1$  was investigated by computing the  $\Delta G_{\text{sol}}$  values for both the (*t*)<sub>7</sub> and (*g*<sup>-</sup>)<sub>7</sub> conformations. Results are displayed in Table III. The  $\Delta G_{\text{sol}}$  is larger for the (*t*)<sub>7</sub> than for the (*g*<sup>-</sup>)<sub>7</sub> by about 6 kcal/mol. The analysis of the different contributions to  $\Delta G_{\text{sol}}$  reveals that the steric term is similar for the two conformations, whereas the elec-

Table II Structural Parameters for the  $\alpha$ -Helix of P $\alpha$ LGA

$\phi^a$	$-64.7^\circ \pm 5.7^\circ$	$d(\text{H} \dots \text{O})^c$	$2.15 \pm 0.05 \text{ \AA}$
$\psi$	$-36.9^\circ \pm 6.7^\circ$	$\angle \text{N}-\text{H} \dots \text{O}$	$153.1^\circ \pm 8.4^\circ$
$\omega$	$177.1^\circ \pm 2.2^\circ$	$h^d$	1.61 $\text{ \AA}$
$\chi_1^b$	$-67.8^\circ \pm 4.9^\circ$	$\nu^e$	3.54

<sup>a</sup> The  $\phi$ ,  $\psi$ , and  $\omega$  are the backbone dihedral angles.

<sup>b</sup> The  $\chi_1$  is the side chain dihedral angle.

<sup>c</sup>  $d(\text{H} \dots \text{O})$  and  $\angle \text{N}-\text{H} \dots \text{O}$  are the hydrogen-bonding parameters.

<sup>d</sup> The  $h$  is the rise per residue.

<sup>e</sup> The  $\nu$  is the number of amino acids per turn.

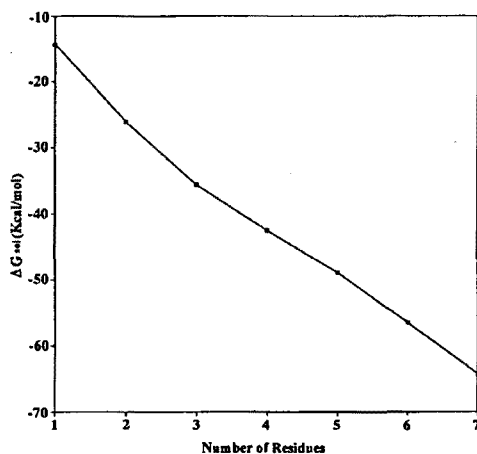


FIGURE 5 Free energies of solvation of  $\alpha$ -helices in aqueous solution for P $\alpha$ LGA-*n*.

trostatic one is more favorable for (*t*)<sub>7</sub> than for (*g*<sup>-</sup>)<sub>7</sub>. Thus, the accessibility to the bulk solvent of the polar atoms of the side groups is greater for the former conformation enhancing the solute-solvent interactions.

In order to have a better understanding of the effect of the aqueous solvent on the helix of P $\alpha$ LGA-7, homopeptides constituted by 7 residues of L-alanine and  $\alpha$ -aminoisobutyric acid, abbreviated PLAla-7 and PAib-7, respectively, were also investigated. The results in Table III, which compares the different contributions to  $\Delta G_{\text{sol}}$  for P $\alpha$ LGA-7, PLAla-7, and PAib-7, reveal that the former is better solvated than the latter two. The origin of such difference mainly lies in the electrostatic contribution, which is about 22–25 kcal/mol more favorable for P $\alpha$ LGA-7 than for PLAla-7 and PAib-7. This trend can be easily explained from the electrostatic interactions between the solvent and the side acid groups of P $\alpha$ LGA-7. This interaction seems to be much more important than that between the solvent and the dipole of the helix, which would tend to favor the hydration of PLAla-7 and PAib-7. Thus, the dipole moment of P $\alpha$ LGA-7 ( $\mu = 16.3$  Debyes) is about 11–12 Debyes smaller than those of P $\alpha$ Ala-7 ( $\mu = 27.5$  Debyes) and PAib-7 ( $\mu = 26.5$  Debyes).

Deeper insight into the electrostatic stabilization of P $\alpha$ LGA-7 in aqueous solution with respect to PLAla-7 and PAib-7 can be gained by comparison of the change in dipole moment upon solvation. Table III includes the ratio between dipole moments in aqueous solution ( $\mu_{\text{aq}}$ ) and in the gas phase ( $\mu_{\text{gp}}$ ). Results show that such a ratio is larger (~ 7–10%) for PLAla-7 and PAib-7 than for P $\alpha$ LGA-7, which indicates that the magnitude of solvent-induced polariza-

tion is lower for the latter homopeptide. Thus, polarization plays a more relevant, specific contribution to the solvation of  $\alpha$ -helices constituted by alanine and  $\alpha$ -aminoisobutyric acid than for  $\alpha$ -glutamic acid, the latter being mainly stabilized by electrostatic interactions between the bulk-solvent and the side polar group.

### Comparison with the Helix of Poly( $\gamma$ -D-Glutamic Acid)

A recent computational study<sup>16</sup> of poly( $\gamma$ -D-glutamic acid) in the unionized state indicated that a left-handed helix with 19-membered ring hydrogen bonds set between the CO of the amide group *i* and the NH of amide group *i* + 3 is the most stable for this poly( $\gamma$ -amino acid). Thus, an unexpected handedness with respect to the stereochemistry of the compound was predicted. This trend was rationalized in terms of weak intramolecular interactions between the oxygens of the carboxyl side groups and the NH of the backbone amide groups. The predicted conformation was compatible with the data obtained by Rydon using optical rotatory experiments.<sup>17</sup>

The present study indicates that P $\alpha$ LGA adopts an  $\alpha$ -helix stabilized by intramolecular hydrogen bonds between the CO of the amide group *i* and the NH of amide group *i* + 3. Thus, a 13-membered ring was obtained for this poly( $\alpha$ -amino acid) that is equivalent to the 19-membered ring predicted for the poly( $\gamma$ -amino acid). On the other hand, a right-handed helix was obtained for P $\alpha$ LGA, in good agreement with previous studies on poly( $\gamma$ -alkyl- $\alpha$ -L-glutamates).<sup>13,14</sup> Thus, for these compounds the distance of the side acid group to the main chain is large enough to preclude any backbone-side-chain interaction. The helices of P $\alpha$ LGA and poly( $\gamma$ -D-glutamic acid) are compared in Figure 6.

Another trend that deserves comparison is the conformational preferences predicted for the dihedral angle  $\chi_1$  since they are shared by the poly( $\gamma$ -amino acid)

Table III Electrostatic ( $\Delta G_{\text{ele}}$ ) and Steric [van der Waals + Cavitation; ( $\Delta G_{\text{ste}}$ )] Contributions (in kcal/mol) to the Free Energy of Solvation ( $\Delta G_{\text{sol}}$ ) and Ratio Between the Dipole Moments in the Aqueous Solution and Gas Phase ( $\mu_{\text{aq}}/\mu_{\text{gp}}$ ) for the  $\alpha$ -Helix of P $\alpha$ LGA-7, PLAla-7, and PAib-7

Compound	$\Delta G_{\text{sol}}$	$\Delta G_{\text{ele}}$	$\Delta G_{\text{ste}}$	$\mu_{\text{aq}}/\mu_{\text{gp}}$
P $\alpha$ LGA-7 ( <i>t</i> ) <sub>7</sub>	-64.3	-75.8	11.2	1.21
P $\alpha$ LGA-7 ( <i>g</i> <sup>-</sup> ) <sub>7</sub>	-58.1	-68.8	10.7	1.31
PLAla-7	-42.2	-47.3	5.1	1.28
PAib-7	-39.3	-43.0	3.7	1.31

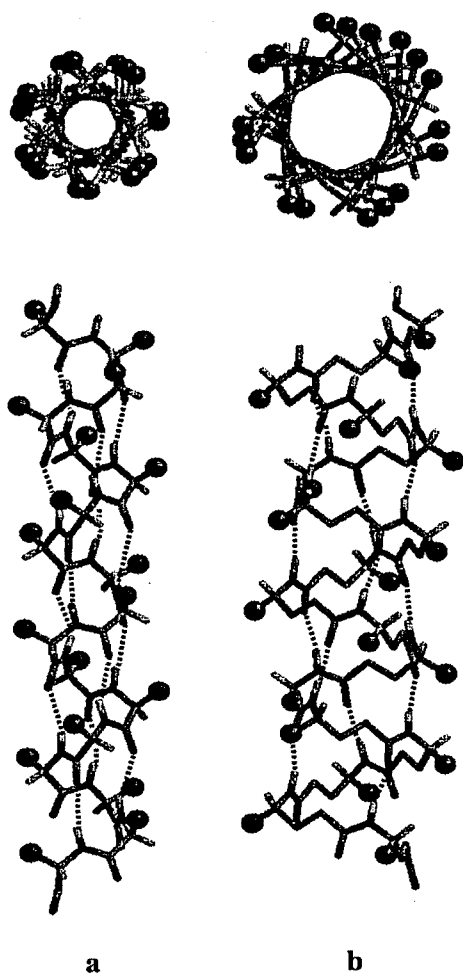


FIGURE 6 Comparison between the helices predicted for (a) P $\alpha$ LGA and (b) poly( $\gamma$ -D-glutamic acid).

and the poly( $\alpha$ -amino acid). A *gauche*<sup>-</sup> conformation was predicted for the left-handed helix of the poly( $\gamma$ -D-glutamic acid), the *gauche*<sup>-</sup> conformation being also obtained for P $\alpha$ LGA. This feature suggests that such a conformational preference provides an improvement in the packing of the acidic side chains.

### Modeling of the Conformation of P $\alpha$ LG

Geometry optimizations of P $\alpha$ LG- $n$ , where  $n$  ranges from 1 to 9, were performed using as starting geometry the  $\alpha$ -helix previously obtained for P $\alpha$ LGA- $n$ . In all cases a disruption of the helix was obtained, the resulting structure being an irregular conformation that we will denote as the *coil* conformation. Analysis of the backbone dihedral angles indicates that ex-

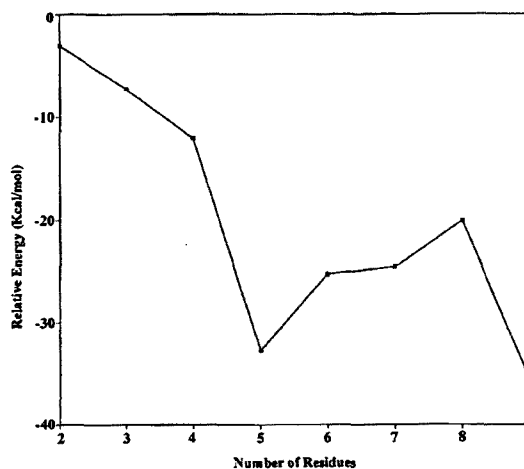


FIGURE 7 Relative energy between the fully minimized (named *coil* in the text) and  $\alpha$ -helix conformations for P $\alpha$ LG- $n$ .

tremely large differences exist among the different residues of a given oligopeptide.

In order to estimate the stabilization of the *coil* conformation with respect to the  $\alpha$ -helix, for P $\alpha$ LG- $n$ , geometry optimizations of the latter were performed by fixing the values of the dihedral angles  $\varphi$  and  $\psi$  to those obtained for P $\alpha$ LGA- $n$ . Figure 7 shows the relative energy of the *coil* conformation with respect to the  $\alpha$ -helix for P $\alpha$ LG- $n$  oligopeptides. Results point out that the *coil* conformation is considerably more stable than the  $\alpha$ -helix, the repulsive interactions between the negatively charged side groups being minimum and maximum in the former and in the latter, respectively.

The effect of the solvent on the relative stability of the *coil* and  $\alpha$ -helix conformation were investigated for P $\alpha$ LG-7. Results are displayed in Table IV, where both the electrostatic and steric contributions are displayed. The  $\alpha$ -helix conformation is better hydrated than the *coil* one. The origin of such trend lies in the electrostatic term, which is 14 kcal/mol more favored for the former than for the latter. Thus, the electro-

Table IV Electrostatic ( $\Delta G_{\text{ele}}$ ) and Steric [van der Waals + Cavitation; ( $\Delta G_{\text{ste}}$ )] Contributions (in kcal/mol) to the Free Energy of Solvation ( $\Delta G_{\text{sol}}$ ) and Ratio Between the Dipole Moments in the Aqueous Solution and Gas Phase ( $\mu_{\text{aq}}/\mu_{\text{gp}}$ ) for the  $\alpha$ -Helix and Coil Conformation of P $\alpha$ LG-7

Conformation	$\Delta G_{\text{sol}}$	$\Delta G_{\text{ele}}$	$\Delta G_{\text{ste}}$	$\mu_{\text{aq}}/\mu_{\text{gp}}$
$\alpha$ -Helix	-1160.6	-1174.9	11.8	1.62
Coil	-1146.4	-1160.5	11.9	1.28

static interactions are favored for the  $\alpha$ -helix due to the greater solvent accessibility of the carboxylate groups. However, the favorable  $\Delta G_{\text{sol}}$  value for the helix conformation of P $\alpha$ LG-7 is not enough to compensate the unfavorable gas-phase energy.

## CONCLUSIONS

Computational calculations of homopeptides constituted by  $\alpha$ -L-glutamic acid allowed to model the  $\alpha$ -helix of P $\alpha$ LGA. This structure consists of  $\varphi$ ,  $\psi \sim -65^\circ, -37^\circ$ . On the other hand, the dihedral angle of the side chains  $\chi_1$  adopts a *gauche*<sup>-</sup> conformation in the gas phase, whereas in aqueous solution it prefers a *trans* conformation. The estimation of the cooperative energy reveals that  $\alpha$ -L-glutamic acid is a good helix former providing similar values to those obtained for alanine and  $\alpha$ -aminoisobutyric acid, which are well known helix formers. Furthermore, the helices constituted by  $\alpha$ -L-glutamic acid are better hydrated than those constituted by alanine and  $\alpha$ -aminoisobutyric acid. Finally, calculations of the ionized homopeptides show that the poly( $\alpha$ -L-glutamate) tends to adopt an irregular conformation due to the electrostatic repulsions between the carboxylate side groups.

This work was supported by DGICYT with grant no. PB96-0490. DZ acknowledges the support of the Ministry of Education of Spain for the award of a scholarship. The authors are indebted to the C<sup>4</sup> for computational facilities. Authors are thanked to Prof. S. Muñoz-Guerra for a critical discussion of the manuscript.

## REFERENCES

- Karle, I. L.; Pramanik, A.; Banerjee, A.; Bhattacharya, S.; Balaram, P. *J Am Chem Soc* 1997, 39, 9087.
- Alemán, C.; Roca, R.; Luque, F. J.; Orozco, M. *Proteins Struct Funct Genet* 1997, 28, 83.
- Crick, F. H.; Rich, A. *Nature* 1955, 176, 780.
- Puiggali, J.; Muñoz-Guerra, S.; Lotz, B. *Macromolecules* 1986, 19, 1119.
- Muñoz-Guerra, S.; Fita, I.; Aymamí, J.; Puiggali, J. *Macromolecules* 1989, 21, 3464.
- Bermudez, M.; Puiggali, M.; Muñoz-Guerra, S. *Macromolecules* 1994, 27, 6325.
- Bunn, C. W.; Garner, E. W. *Proc R Soc London Ser A* 1947, 189, 39.
- Kinoshita, Y. *Makromol Chem* 1959, 33, 1.
- Fernández-Santín, J. M.; Aymamí, J.; Rodríguez-Galán, A.; Muñoz-Guerra, S.; Subirana, J. A. *Nature* 1984, 311, 53.
- López-Carrasquero, F.; García-Alvarez, M.; Navas, J. J.; Alemán, C.; Muñoz-Guerra, S. *Macromolecules* 1996, 29, 8449.
- Navas, J. J.; Alemán, C.; López-Carrasquero, F.; Muñoz-Guerra, S. *Macromolecules* 1995, 28, 4487.
- García-Alvarez, M.; León, S.; Campos, L.; Alemán, C.; Muñoz-Guerra, S. *Macromolecules* 1998, 31, 124.
- Alemán, C.; Navas, J. J.; Muñoz-Guerra, S. *J Phys Chem* 1995, 99, 17653.
- León, S.; Alemán, C.; Muñoz-Guerra, S. *Macromolecules* 1997, 30, 6662.
- Puiggali, J.; Muñoz-Guerra, S.; Rodríguez-Galán, A.; Alegre, C.; Subirana, J. A. *Macromol Symp* 1988, 167, 182.
- Rydon, H. N. *J Chem Soc* 1964, 1328.
- Zanuy, D.; Alemán, C.; Muñoz-Guerra, S. *Int J Biol Macromol* 1998, 23, 175.
- Holtzer, A.; Hawkins, R. B. *J Am Chem Soc* 1996, 118, 4220.
- Keith, H. D.; Giannoni, G.; Padden, F. J. *Biopolymers* 1969, 7, 775.
- Olander, D. S.; Holtzer, A. *J Am Chem Soc* 1968, 90, 4549.
- Yan, J. F.; Vanderkoo, G.; Scheraga, H. A. *J Chem Phys* 1968, 49, 2713.
- López-Navarrete, J. T.; Bencivenni, L.; Raimondo, F.; Hernández, V.; Ramírez, F. J. *J Mol Struct (Theochem)* 1995, 330, 261.
- Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P. *J Am Chem Soc* 1985, 107, 3902.
- Alemán, C. *Biopolymers* 1994, 34, 841.
- Alemán, C. *Proteins Struct Funct Genet* 1997, 29, 575.
- Stewart, J. J. P. *MOPAC 93 Revision 2*; Stewart Comp Chem, 1994. Adapted to perform MST calculations by F. J. Luque and M. Orozco.
- Negre, M. J.; Orozco, M.; Luque, F. J. *Chem Phys Lett* 1992, 196, 27.
- Luque, F. J.; Bachs, M.; Orozco, M. *J Comp Chem* 1994, 15, 847.
- Miertus, S.; Scrocco, E.; Tomasi, J. *Chem Phys* 1981, 55, 117.
- Miertus, S.; Tomasi, J. *Chem Phys* 1982, 65, 239.
- Pierotti, R. A. *Chem Rev* 1976, 76, 717.
- Orozco, M.; Luque, F. J. *J Am Chem Soc* 1995, 117, 1378.
- Alemán, C.; Navarro, E.; Puiggali, J. *J Org Chem* 1995, 60, 6135.
- Pauling, L.; Corey, R. B.; Branson, H. R. *Proc Natl Acad Sci USA* 1951, 37, 205.
- Navas, J. J.; Alemán, C.; Muñoz-Guerra, S. *Biopolymers* 1997, 41, 721.
- Marquesse, S.; Robbins, V. H.; Baldwin, R. L. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86, 5286.
- Benedetti, E.; Morelli, G.; Némethy, G.; Scheraga, H. A. *Int J Peptide Protein Res.* 1983, 22, 1.
- Dunbrack, R. L. Jr.; Karplus, M. *J Mol Biol* 1993, 330, 543.
- Desiraju, G. R. *Acc Chem Res* 1996, 29, 441.
- Sharma, C. V. K.; Panneerselvan, K.; Pilati, T.; Desiraju, G. R. *J Chem Soc Perkin Trans. 2* 1993, 2204.

### IV.9. Conclusiones parciales

1) Se ha modelado la conformación helicoidal del PGGA en estado no ionizado. La hélice adoptada es sinistrorsa y está estabilizada por puentes de hidrógeno intramoleculares entre el CO del grupo amida  $i$  y el H-N del grupo amida  $i+3$ . Su sentido de giro es contrario al esperado sobre la base de la configuración  $R$  del carbono 4. Esta inversión es debida a las interacciones estabilizantes que se establecen entre los grupos carboxilato de las cadenas laterales del PGGA y los grupos amida de la cadena principal.

2) Se ha investigado el comportamiento de la hélice modelada para el PGGA en disolución acuosa, evidenciándose que el disolvente favorece la estabilidad de dicha conformación a temperatura ambiente. Así, la presencia de disolvente induce una notable resistencia al desplegamiento. Estos resultados están en excelente concordancia con los datos experimentales obtenidos a  $\text{pH} < 7$ .

3) Se ha estudiado el efecto de la temperatura y el tamaño molecular en la estabilidad de la conformación helicoidal propuesta para el PGGA. Los resultados han indicado que dicha estabilidad disminuye al aumentar la temperatura y al reducir el tamaño molecular. Así, tanto en polipéptidos cortos como a temperaturas superiores a 300 K, la conformación helicoidal evoluciona rápidamente hacia un ovillo estadístico.

4) La transición hélice - ovillo estadístico inducida en el PGGA por el aumento de temperatura ha permitido analizar la estabilidad de la conformación helicoidal sobre la base de diferentes contribuciones. La conformación helicoidal está favorecida respecto a al ovillo estadístico debido a las interacciones de puentes de hidrógeno entre los grupos amida del polímero. Por el contrario, la energía de interacción del polipéptido con el disolvente favorece claramente el ovillo estadístico debido a la mejor accesibilidad al disolvente de los grupos polares del polímero. Sin embargo, La energía intramolecular es suficientemente favorable en la conformación helicoidal para contrarrestar el efecto del disolvente.

5) Se ha modelado la conformación helicoidal del PAGA en estado no ionizado, comparándola con la hélice  $\alpha$  característica de otros poli( $\alpha$ -péptidos). Los resultados han indicado que el ácido  $\alpha$ -glutámico es incluso mejor formador de hélice  $\alpha$  que la alanina y el ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico. La hélice propuesta para el PAGA es morfológica y topológicamente similar a la hélice descrita para el PGGA. De hecho, la única diferencia entre ambas conformaciones radica en el sentido de giro, dextrorso y sinistrorso para el PAGA y el PGGA, respectivamente.

## **V. RESULTADOS:**

**ESTRUCTURA DE LOS POLI( $\alpha$ -ALQUIL- $\gamma$ -  
GLUTAMATO)S**





## V. ESTRUCTURA DE LOS POLI( $\alpha$ -ALQUIL- $\gamma$ -GLUTAMATO)S

En la actualidad uno de los aspectos de mayor relevancia en la ciencia de los polímeros es el desarrollo de materiales que presenten una mayor compatibilidad con el medio ambiente. Tal como ya ha sido apuntado en el capítulo anterior, el estudio del PGGA se enmarca dentro de esta nueva filosofía. Sin embargo, algunas de sus propiedades físicas (como su baja solubilidad y la incapacidad para formar fibras o películas) ha limitado su aplicabilidad propiciando la exploración de sus derivados químicos para así mejorar estas propiedades.

De las diferentes modificaciones químicas que han sido estudiadas destacan la obtención de hidrogeles por entrecruzamiento de las cadenas de PGGA (González et al., 1996; Choi y Kunioka, 1995) y, especialmente, la alquilación por esterificación mediante el uso de derivados halogenados (Giannos et al., 1990). Este último tipo de modificación química da lugar a los poli( $\alpha$ -alquil- $\gamma$ -glutamato)s (figura V.1).

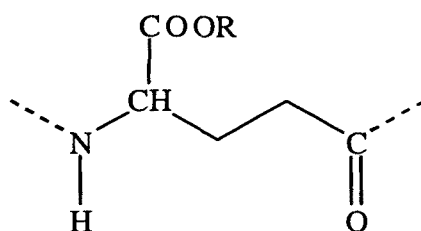


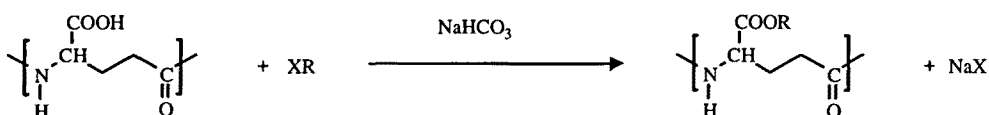
Figura V.1. Representación esquemática y general de los poli( $\gamma$ -glutamato)s

### V.1. Obtención de los poli( $\gamma$ -glutamato)s

El método de síntesis más usado para obtener este tipo de materiales es mediante la esterificación del PGGA. La obtención del poliácido puede ser realizada por síntesis química, siendo la policondensación de ésteres activos el método que proporciona mejores resultados (Bruckner et al., 1958). Sin embargo, la manera más habitual de obtener el PGGA es por biosíntesis, tal como se ha detallado en el capítulo anterior.

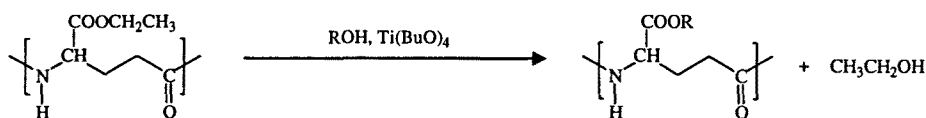
La obtención del éster deseado puede hacerse mediante dos procedimientos diferentes:

-*Esterificación por sustitución nucleófila*: todos los procedimientos reportados para la esterificación del PGGA se basan en el método descrito por Bocchi et al. (1979) para la esterificación de aminoácidos en disolventes apróticos. Se disuelve el PGGA en un disolvente como DMSO, NMP o DMF, añadiéndose a continuación bicarbonato sódico en exceso para obtener la sal sódica del PGGA. La agregación posterior de un halogenuro de alquilo da lugar a una esterificación por sustitución nucleófila alquílica (figura V.2).



**Figura V.2.** Esquema del proceso de esterificación de PGGA mediante sustitución nucleófila con derivados alogenados.

-*Transesterificación catalítica*: este método fue desarrollado en nuestro departamento por el Dr. Melis (1999). Se basa en obtener inicialmente el poli( $\alpha$ -etil- $\gamma$ -glutamato) (abreviado PAAG-2) mediante el método anteriormente expuesto y, a partir de éste, llevar a cabo una transesterificación con el alcohol alifático o alquil - aromático que se desee usar como cadena lateral (figura V.3). Este proceso se lleva a cabo en presencia de tetrabutoóxido de titanio que actúa como catalizador.



**Figura V.3.** Representación esquemática del proceso de transesterificación del PGGA-2 (Melis, 1999)

## V.2. Estructura de los Poli( $\gamma$ -glutamato)s

Existen únicamente dos trabajos en los que se haya estudiado la estructura de los poli( $\gamma$ -glutamato)s. Ambos trabajos fueron realizados en el Departamento de Ingeniería Química de la UPC: el primero fue realizado por Puiggali et al. en el año 1988 y el

segundo corresponde a la memoria de la Tesis Doctoral del Dr. José Melis (1999). Ambos trabajos difieren fundamentalmente en el método de obtención de los polímeros estudiados: mientras que Puiggali et al. (1988) sintetizaron los polímeros partiendo de su precursor monomérico (el ácido glutámico), en el trabajo del Dr. Melis se obtuvieron los polímeros por esterificación del PGGG de biosíntesis (Pérez-Camero et al., 1999).

### V.2.1. Estructura de ésteres obtenidos mediante síntesis química

Puiggali et al. (1988) estudiaron la estructura del poli( $\alpha$ -bencil- $\gamma$ -L-glutamato) y el poli( $\alpha$ -metil- $\gamma$ -L-glutamato) en estado sólido mediante difracción de rayos X y espectroscopía IR.

Para el poli( $\alpha$ -bencil- $\gamma$ -L-glutamato), abreviado PABLG, dichos autores observaron que este polímero presentaba polimorfismo cristalino en función del procedimiento de obtención de las muestras sólidas analizadas. Así, pusieron de manifiesto la existencia de dos formas cristalinas diferentes a las que denominaron formas I y II.

Para la forma I se propuso una estructura laminar donde las cadenas de polímero adoptarían una conformación casi extendida, empaquetándose en una celdilla monoclinica (tabla V.1) e interaccionarían entre ellas mediante puentes de hidrógeno. El parámetro  $a_0$  correspondería al doble de la distancia entre dos cadenas adyacentes puesto que la disposición de las cadenas dentro de las láminas sería antiparalela.

**Tabla V.1.** Estructuras descritas para el poli( $\alpha$ -bencil- $\gamma$ -L-glutamato) de síntesis química.

Forma	Red cristalina	Hélice <sup>a</sup>		Dicroísmo
		u/t	h(Å)	
(I) Extendida	Monoclínica $a_0= 9.62 \text{ \AA}$ ; $b_0=19.6 \text{ \AA}$ ; $c_0= 12.3 \text{ \AA}$ ; $\alpha= 71.1^\circ$	2/1	6.15	perpendicular
(II) Helicoidal	Hexagonal $a_0= 13.14 \text{ \AA}$ ; $c_0=10.0 \text{ \AA}$	5/2	2.0	paralelo

<sup>a</sup> u/t: residuos / vuelta; h: altura del residuo

Por el contrario, para la forma II del PABLG se propuso una conformación helicoidal de simetría  $5/2$ , estabilizada por puentes de hidrógeno intramoleculares que se alinearían a lo largo del eje  $c$ , según un esquema  $i, i+2$ . Las cadenas de polímero se empaquetarían en una red hexagonal (tabla V.1)

Al mismo tiempo estos autores estudiaron mediante DSC el comportamiento térmico de este polímero e interpretaron una de las transiciones térmicas observadas como una transición de fase entre la forma II y la forma I.

Finalmente Puiggali et al. propusieron para el poli( $\alpha$ -metil- $\gamma$ -glutamato) una conformación similar a la observada para la forma II del PABLG, con un empaquetamiento análogo (o sea, en una celdilla hexagonal). De todos modos la estructura del éster de metilo no quedó totalmente clara debido que la información que se obtuvo fue muy limitada.

### V.2.2. Ésteres derivados del ácido poli( $\gamma$ -glutámico) de biosíntesis

Una de las novedades que presentan los poli( $\gamma$ -glutamato)s obtenidos a partir del PGGGA de biosíntesis, en comparación con los obtenidos por síntesis química, es la falta de pureza enantiomérica. Tal como se ha expuesto en el capítulo IV, el PGGGA de origen bacteriano se caracteriza por presentar una proporción variable de enantiómero L en su constitución. La influencia que este hecho podía ejercer sobre las propiedades estructurales de los poli( $\gamma$ -glutamato)s fue estudiada por el Dr. Melis (1999). A su vez, este autor investigó nuevos ésteres alquílicos para poder establecer como variaban las propiedades estructurales de los poli( $\gamma$ -glutamato)s en función de la constitución de la cadena lateral.

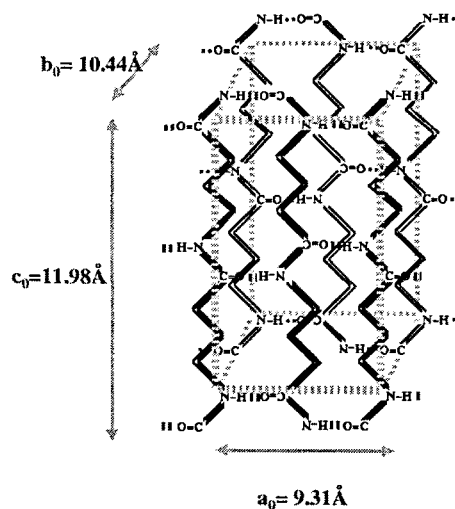
Todos los estudios estructurales fueron realizados mediante difracción de rayos X y dicroísmo de IR. Por último las propiedades térmicas de cada polímero sintetizado fueron analizadas mediante DSC.

#### V.2.2.1. Poli ( $\alpha$ -bencil- $\gamma$ -glutamato). Relación entre la estructura y la proporción de enantiómero

Usando como punto de referencia los estudios reportados por Puiggali et al. (1988) el Dr. Melis estudió la estructura del PABG en dos polímeros de composición enantiomérica diferente: un polímero con una proporción de enantiómero L del 44% y otro con una proporción del 15%, a los que denominaremos PAB(D,L)G y PAB(D)G, respectivamente.

De forma general el comportamiento estructural de estos polímeros era igual al descrito para el polímero de síntesis por Puiggali et al. En el PAB(D,L)G se observaron las dos formas cristalinas descritas anteriormente, existiendo únicamente pequeñas discrepancias en la interpretación de la geometría de las celdillas de ambas formas.

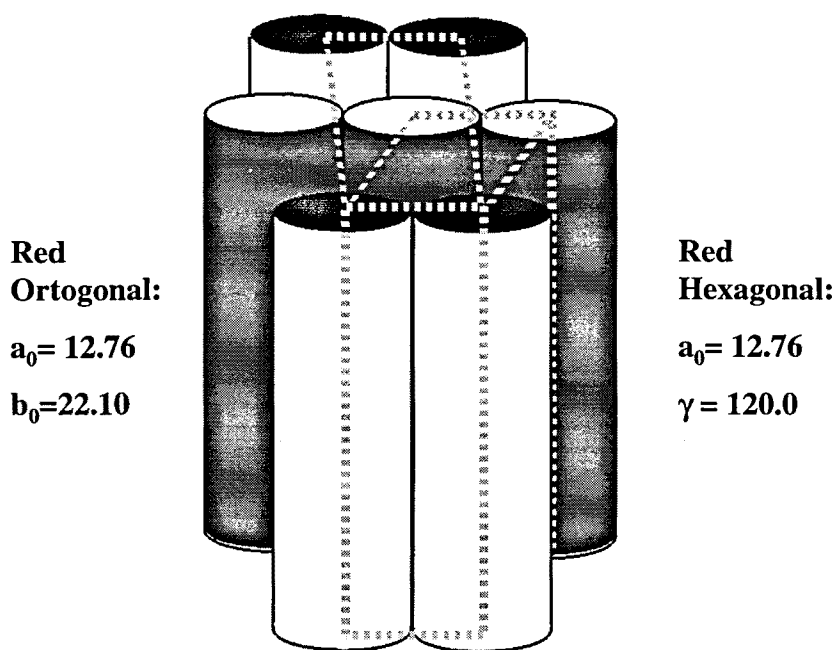
La forma I fue descrita sobre la base de una celda de geometría ortorrómbica en lugar de una celda monoclinica. A pesar de ello, ambas celdas cristalinas tienen un tamaño muy parecido y la disposición de las cadenas es análoga. Así el Dr. Melis propuso un empaquetamiento laminar de cadenas con una conformación casi extendida (figura V.4), las cuales adoptan una disposición antiparalela a lo largo de la dirección de la lámina, para formar puentes de hidrógeno intermoleculares.



**Figura V.4.** Representación esquemática de la estructura de la forma I según la interpretación de los diagramas de rayos X del PAB(D,L)G.

La forma II descrita para el PAB(D,L)G presentaba una estructura cristalina muy parecida a la descrita por Puiggali et al. para el polímero de síntesis. Se trataba de una estructura formada por un empaquetamiento de hélices  $5/2$ , estabilizadas por puentes de

hidrógeno según un esquema  $i, i+2$ . Sin embargo, en este caso fue posible interpretar ciertas reflexiones presentes en los diagramas de difracción de rayos X y que no pudieron ser explicadas con un modelo de empaquetamiento hexagonal. Para ello se propuso una celdilla cristalina ortogonal y una disposición antiparalela entre hélices de diferentes láminas, obteniéndose un empaquetamiento pseudo - hexagonal (figura V.5).



**Figura V.5.** Representación esquemática de la estructura de la forma II para el PAB(D,L)G según una celdilla pseudo - hexagonal. Los cilindros representan las hélices de polímeros. La disposición antiparalela de las hélices se representa mediante cilindros de diferente color. En color malva se indica la red hexagonal que se tendría si la orientación de todas las hélices fuera paralela.

Al mismo tiempo, el Dr. Melis caracterizó las propiedades térmicas del PABG mediante DSC, corroborando la transición de fase observada por Puiggalí et al. Esta transición fue igualmente atribuida a un cambio de forma cristalina.

Finalmente cabe reseñar que el PABDG presenta una estructura cristalina muy similar a la descrita para el PAB(D,L)G. Así, se puede concluir que la presencia de enantiómero L en la constitución del polímero no afecta aparentemente a las propiedades estructurales de los polímeros derivados del PGGA de biosíntesis.

### ***V.2.2.2. Poli ( $\alpha$ -alquil- $\gamma$ -glutamato). Ésteres de alquilo lineales y ramificados***

Uno de las conclusiones más importantes del trabajo del Dr. Melis es el haber establecido dos grupos diferentes de poli( $\gamma$ -glutamato)s en función de su estructura. Todos aquellos ésteres con grupos alquilo de 4 o menos átomos de carbono, ya sean lineales o ramificados, presentan un comportamiento estructural diferente al de los ésteres con grupos alquilo de más de 4 átomos de carbono.

#### ***V.2.2.2.1. Grupos alquilo lineales cortos y ramificados***

Los ésteres de alquilo de cadena lineal corta o de cadena alquílica ramificada presentan un polimorfismo estructural parecido. Estos polímeros se caracterizan por presentar dos estructuras cristalinas diferentes en función del tratamiento al que se sometan las muestras sólidas. A pesar de que este comportamiento es aparentemente análogo al descrito para el PABG, existe una importante diferencia: mientras que los polímeros estudiados por el Dr. Melis podían cristalizarse en la forma II, no se pudo cristalizar ninguna muestra en la forma I. Sin embargo, todos ellos presentaban una segunda forma cristalina que resultó ser diferente a las descritas hasta el momento. Esta nueva forma cristalina fue denominada como forma III por el Dr. Melis.

A su vez, dicho autor estudió mediante DSC todos los polímeros de este subgrupo, observando en todos ellos una transición térmica de fase. Para poder caracterizar la naturaleza de dicha transición se estudió la estructura del poli( $\alpha$ -etil- $\gamma$ -glutamato) (Abreviado PAAG-2) a diferentes temperaturas mediante el uso de difracción de rayos X. De esta forma pudo establecer que este proceso correspondía a un cambio en la estructura cristalina, en la que se obtenía la forma III a partir de la forma II al aumentar la temperatura. Este proceso ocurría de forma irreversible, siendo aparentemente inviable obtener de nuevo la forma II una vez el polímero adoptaba la nueva forma cristalina.

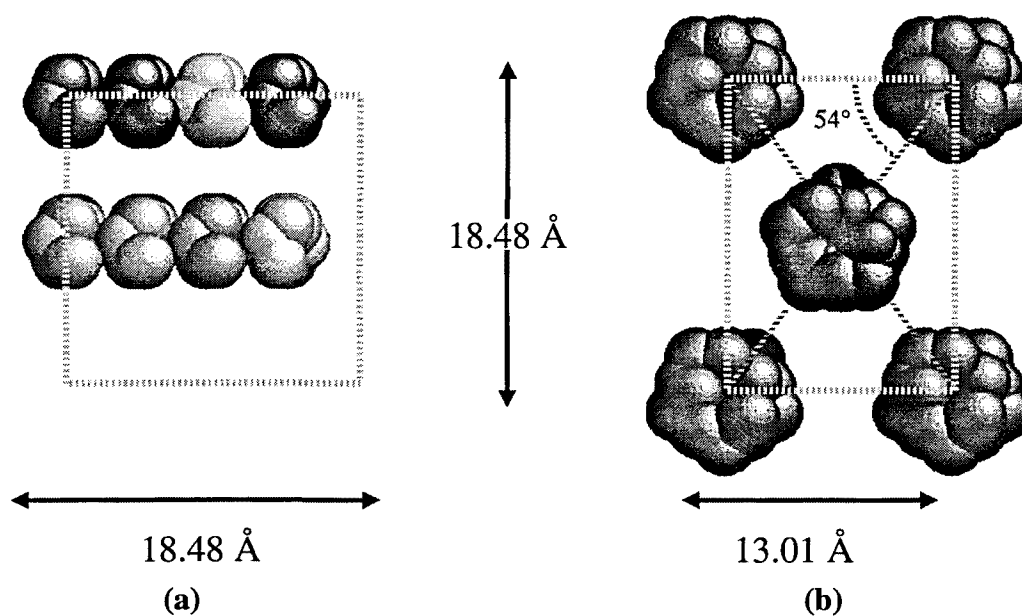
#### ***V.2.2.3. La forma cristalina III: modelos propuestos***



La forma III ha sido la que más controversia ha creado. La información estructural obtenida por el Dr. Melis mediante difracción de rayos X no resultó ser unívoca. En base a la densidad medida ( $1.24 \text{ g/cm}^3$ ), se propusieron dos estructuras cristalinas diferentes: una celdilla de proyección cuadrada (a la que nos referiremos como *modelo tetragonal*) o una celdilla ortorrómbica (a la que nos referiremos como *modelo hexagonal*). Para poder explicar las reflexiones meridionales que aparecían en el difractograma de fibra y, a su vez, poder respetar la densidad medida, se propusieron conformaciones de simetría helicoidal  $2/1$  y  $5/2$ , para el modelo tetragonal y para el modelo hexagonal, respectivamente.

En el modelo tetragonal, la cadena polimérica debería estar muy plegada, para poder ajustar el período de repetición de la hélice  $2/1$  al valor experimental,  $c_0 = 9.20 \text{ \AA}$ . Este punto se pone de manifiesto al comparar este parámetro con el que se tendría en una conformación totalmente extendida, que es aproximadamente  $12.2 \text{ \AA}$ . Así, la conformación en la forma III debería tener un acortamiento de aproximadamente  $1.7 \text{ \AA}$  por residuo. A su vez, con los parámetros de red propuestos se necesitarían 16 UCR por celdilla para ajustar la densidad calculada a la observada ( $\rho_{\text{calc}} = 1.33 \text{ g/cm}^3$ ). Este hecho implicaría ubicar 8 cadenas de polímero cristalográficamente diferenciables por celdilla, algo aparentemente inusual (figura V.6a).

Finalmente, el modelo que fue propuesto como más razonable fue el de la celda ortorrómbica (figura V.6b). Los argumentos que llevaron a considerar el modelo hexagonal como el más probable fueron los siguientes: la forma III se obtenía por calentamiento de la forma II, así la transición entre ambas formas únicamente respondería a pequeñas reordenaciones conformacionales del polímero. Una conformación de hélice  $5/2$  para la forma III implicaría únicamente un acortamiento en la distancia entre pisos de  $0.4 \text{ \AA}$  respecto la conformación  $5/2$  de la forma II. Así mismo, el empaquetamiento no variaría de forma drástica, pudiéndose interpretar la forma III como una pequeña distorsión del empaquetamiento pseudo - hexagonal de la forma II. Este modelo, sin embargo, presentaba un inconveniente, la densidad calculada para la celdilla ortorrómbica ( $\rho_{\text{calc}} = 1.19 \text{ gr/cm}^3$ ) era ligeramente inferior a la observada ( $1.24 \text{ g/cm}^3$ ).



**Figura V.6.** (a) Representación esquemática de la celda unitaria para el modelo tetragonal. Las hélices 2/1 han sido coloreadas de diferente color para destacar la necesidad de que sean cristalográficamente diferenciables. (b) Representación esquemática de la celda unitaria para el modelo hexagonal, donde la orientación de las cadenas queda reflejada mediante el uso de una coloración diferencial (la hélice 5/2 antiparalela está coloreada en azul). Nótese que este empaquetamiento es realmente ortorómbico y no pseudo hexagonal como en la forma II, tal como puede constatarse con un ángulo  $\gamma$  inferior a  $120^\circ$ .



### V.3. Objetivos

El objetivo general de este capítulo es determinar los empaquetamientos cristalinos de las formas I, II y II de los poli( $\gamma$ -glutamato)s. Este objetivo general puede desglosarse en los siguientes objetivos específicos:

1) Obtener modelos atómicos para las formas cristalinas I y II del PABG compatibles con los datos de difracción de rayos X y dicroísmo de IR. Para ello, se debe modelar la conformación del polímero y refinar los empaquetamientos cristalinos.

2) Obtener un modelo atómico de la forma II del PAAG-2. La conformación del polímero y el empaquetamiento cristalino se optimizarán mediante cálculos energéticos y mediante refinado frente los datos de difracción de rayos X disponibles.

3) Determinar la estructura cristalina de la forma III del PAAG-2. Para ello se reinvestigarán la celdilla unitaria, la conformación del polímero y el empaquetamiento anteriormente propuestos.



**Prefacio**

El autor de esta memoria únicamente ha obtenido una parte de los resultados presentados en esta sección. Estos corresponden específicamente a los cálculos energéticos y a las simulaciones de modelado molecular.



#### **V.4. “Crystal Structure of Poly( $\alpha$ -benzyl- $\gamma$ -glutamate) of Microbial Origin”**

Melis, J.; Zanuy, D.; Alemán, C.; García-Álvarez, M.; Muñoz-Guerra, S.

(En preparación)



