



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
CURSO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

DANIELA MIRELA LIMA PINHEIRO

**PREVISÃO E INTERPRETAÇÃO DE PROPRIEDADES VIBRACIONAIS DO
MONÔMERO DA INSULINA HUMANA: UM MÉTODO COMPUTACIONAL
DE FRAGMENTAÇÃO EM NÍVEL QUÂNTICO**

CARAÚBAS-RN
2016

DANIELA MIRELA LIMA PINHEIRO

**PREVISÃO E INTERPRETAÇÃO DE PROPRIEDADES VIBRACIONAIS DO
MONÔMERO DA INSULINA HUMANA: UM MÉTODO COMPUTACIONAL DE
FRAGMENTAÇÃO EM NÍVEL QUÂNTICO**

Monografia apresentada a Universidade
Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA,
Campus Caraúbas para obtenção do título de
Bacharel em Ciência e Tecnologia

Orientador: José Júnior Alves da Silva, Prof.
Dr.

Co-orientador: Roner Ferreira da Costa, Prof.
Dr.

CARAÚBAS
2016

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central Orlando Teixeira (BCOT)
Setor de Informação e Referência (SIR)

P654p Pinheiro, Daniela Mirela Lima.
 Previsão e interpretação de propriedades
 vibracionais do monômero da insulina humana: um
 método computacional de fragmentação em nível quântico
 / Daniela Mirela Lima Pinheiro. - 2016.
 56 f. : il.

 Orientador: José Júnior Alves da Silva.
 Coorientador: Roner Ferreira da Costa.
 Monografia (graduação) - Universidade Federal
 Rural do Semi-árido, Curso de Ciência e
 Tecnologia, 2016.

 1. Espectroscopia. 2. Simulação Computacional. 3.
 Modos Vibracionais. I. Silva, José Júnior Alves da,
 orient. II. Costa, Roner Ferreira da, co-orient.
 III. Título.

Bibliotecário-Documentalista
Dalvanira Brito Rodrigues, Bib. Me. (CRB-15/10.000)

DANIELA MIRELA LIMA PINHEIRO

**PREVISÃO E INTERPRETAÇÃO DE PROPRIEDADES VIBRACIONAIS DO
MONÔMERO DA INSULINA HUMANA: UM MÉTODO COMPUTACIONAL DE
FRAGMENTAÇÃO EM NÍVEL QUÂNTICO**

Monografia apresentada no Campus Caraúbas
para obtenção do título de Bacharel em Ciência
e Tecnologia

APROVADO EM: 20 / 05 / 2016

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Júnior Alves da Silva – UFERSA
Presidente



Prof. Dr. Roner Ferreira da Costa - UFERSA
Primeiro Membro



Prof. Dr. Francisco Francine Maia Júnior
Segundo Membro

A minha tia-avó, Raimunda Pinheiro da Fonsêca (in memoriam), que me amou imensamente e que até hoje me acompanha de onde quer que esteja.

A minha tia-avó, Terezinha Pinheiro da Fonsêca (in memoriam), pela paciência ensinada.

A Deus, que em tuas mãos, sempre coloquei minhas preocupações, cuidados e problemas. Em tua sabedoria, colCO2 meu caminho. Em teu amor, colCO2 minha vida.

A minha mãe, Ana Maria Rodriguês de Lima, que foi o melhor presente de Deus.

A minhas irmãs Rafaela, Gabriela e Graziela pela união de sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que se mostrou criador. Seu fôlego de vida em mim, foi sustento e me deu coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades.

Agradeço a minha mãe, Ana Maria Rodriguês de Lima, pelo apoio, orações, amor, incentivo, preocupações e investimento junto aos meus estudos e sonhos.

Agradeço a minhas irmãs, Rafaela, Gabriela, Graziela por sempre estarem ao meu lado e me servirem e exemplo.

Agradeço a Lydyane Pinheiro, Sousani da Silva e José Wilson, pessoas de fundamental importância que durante a minha caminhada acadêmica auxiliaram financeiramente e foi fonte de contínuo incentivo.

Agradeço ao meu orientador, José Júnior Alves da Silva, pela paciência e principalmente empenho para a realização desse trabalho.

Agradeço ao meu co-orientador, Roner Ferreira da Costa, pela ajuda e orientação na bolsa de Iniciação Científica.

Agradeço aos meus amigos de sempre, Jefferson William, Amália Virgínia e Savina Petrilli, que mesmo longe sempre me ajudaram dando a força necessária.

Agradeço aos amigos feitos na universidade, Aline Ribeiro e Layane Érica, pelo companheirismo e ajuda mútua. E a Luann Marcos, companheiro do projeto de Iniciação Científica, com quem foi dividido tarefas e aprendizados.

Agradeço a meu namorado, Alef John, quero agradecer pelos conselhos, incentivo, paciência e todo amor demonstrado. Obrigada, por ter feito parte do meu convívio.

Agradeço a todos que direto ou indiretamente fizeram parte da minha vida e que ajudaram na realização deste trabalho, muito obrigada.

Quanto mais as ciências físicas progridem,
mais elas tendem a entrar no domínio da
Matemática, que é um tipo de centro para onde
elas convergem. Nós podemos julgar o grau de
perfeição que a ciência tem alcançado, pela
facilidade com que ela pode ser submetida a
CÁLCULO. - A. Quetelet (1828).

RESUMO

Tendo em vista os números alarmantes das mortes causadas pelo Diabetes, decorrentes tanto de fatores genéticos como principalmente de uma má alimentação e do sedentarismo, torna-se de grande interesse social e econômico o entendimento aprofundado da estrutura e funcionamento da insulina. Diante disso, o presente trabalho versa sobre simulações computacionais, com implementação de cálculos de primeiros princípios, aplicadas ao monômero da proteína de insulina humana e apresentando como objetivo a interpretação de suas propriedades vibracionais. Para esse estudo, a estrutura do monômero (previamente escolhida de um banco de dados experimental) foi fragmentada e cada parte foi submetida separadamente a cálculos usando DFT, para obtenção dos modos normais e intensidades IR e Raman. Os resultados dos cálculos dos fragmentos foram então recombinados para gerar os espectros vibracionais da estrutura completa da insulina. Esse processo de fragmentação se deu em quatro níveis: por aminoácido, onde apenas um cálculo de cada tipo de resíduo presente no monômero da insulina foi calculado e na recombinação dos resultados o fator de multiplicidade foi considerado; por estrutura secundária, os fragmentos variaram de acordo com a conformação estrutural da proteína; pontes dissulfeto, nesta fragmentação o monômero foi quebrado de modo que levasse em consideração a influência das pontes dissulfeto; e por cadeia, em que como a proteína estuda apresenta duas cadeias, cada uma desta, foi submetida a cálculos com um nível de precisão mais baixo, devido ao elevado custo computacional requerido. A partir da análise dos resultados, foi possível verificarmos a influência das pontes dissulfeto nos espectros vibracionais e associar alguns picos a presença específica de determinados resíduos, estrutura secundária ou cadeia. Ao confrontar as quatro formas de fragmentação para o monômero da insulina, modos vibracionais característicos de determinados aminoácidos foram verificados nas outras metodologias, no entanto, com um deslocamento das frequências. Este fato pode ser explicado devido a adição do PCM, forças intermoleculares e a massa do sistema analisado. A metodologia descrita neste trabalho constitui uma ferramenta importante de auxílio na interpretação de espectros vibracionais obtidos experimentalmente.

Palavras-chave: Insulina. Propriedades Vibracionais. Simulações Computacionais. Aminoácidos. Espectroscopia.

ABSTRACT

In view of the alarming number of deaths caused from diabetes, arising both from genetic factors as primarily a poor nutrition and sedentary lifestyle, becomes of great social and economic interest the deepened understanding of the structure and functioning of insulin. Before this, the present work talk on computer simulations, with implementation of the calculations of the first principles applied to the monomer of protein of human insulin and presenting as an objective the interpretation of vibrational properties. For this study, the structure of the monomer (previously chosen an experimental database) was fragmented and each part was submitted separately the calculations using DFT, for obtaining the normal modes and intensities IR and Raman. The results of the calculations of the fragments were then recombined to generate the vibrational spectra of the complete structure of insulin. This process of fragmentation if gave at four levels: by amino acid, where only a calculation of each type of waste present in the monomer of insulin was calculated and the recombination of results the multiplicity factor was considered; by secondary structure, the fragments varied according to the conformation of the structural protein; disulfide bridges, this fragmentation monomer was broken so that would take into account the influence of disulfide bridges; and by the chain, each one of them was submitted to the calculations with a lower level of precision, due to the high computational cost required. From the analysis of the results, it was possible to verify the influence of disulfide bridges in vibrational spectra and associate some peaks to specific presence of certain waste, secondary structure or chain. To compare the four forms of fragmentation to the monomer of insulin, vibrational modes characteristic of certain amino acids were verified in other methodologies, however, with a displacement of the frequencies. This fact can be explained because the addition of PCM, intermolecular forces and the mass of the system analyzed. The methodology described in this work constitutes an important tool to aid in the interpretation of vibrational spectra obtained experimentally.

Keywords: Insulin. Vibrational Properties. Computer simulations. Amino Acids. Spectroscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Leonard Thompson apenas um mês após o seu tratamento com insulina.	14
Figura 2 - Número de portadores de Diabetes por gênero e a expectativa para 2040.	15
Figura 3 - Representação do dipolo elétrico da molécula da água.	23
Figura 4 - Espalhamento de luz: (a) espalhamento inelástico (região Stokes); (b) espalhamento elástico (Rayleigh); (c) espalhamento inelástico (região anti-Stokes).	24
Figura 5 - Espalhamentos Rayleigh e Raman obtidos como uma fonte de excitação de frequência ν_0 . Uma dada vibração molecular da amostra tem frequência ν_k	25
Figura 6 - Representação esquemática de uma ligação peptídica.	28
Figura 7 - Esquema de fragmentação das estruturas secundárias do monômero da insulina.	33
Figura 8 - Esquema de fragmentação considerando as pontes dissulfetos do monômero da insulina (FPD).	34
Figura 9 - Esquema de fragmentação por cadeias do monômero da insulina.	34
Figura 10 - Espectro Raman da primeira metodologia de fragmentação (AAI) considerando a Cisteína e a Cistina. A região hachurada mostra um artefato do método devido à quebra da ponte dissulfeto.	35
Figura 11 - Espectro Infravermelho da primeira metodologia de fragmentação (AAI) por aminoácidos individuais.	37
Figura 12 - Espectro Raman da primeira metodologia de fragmentação (AAI) por aminoácidos individuais.	38
Figura 13 - Espectro Infravermelho da segunda metodologia de fragmentação (FES) por estrutura secundária.	42
Figura 14 - Espectro Raman da segunda metodologia de fragmentação (FES) por estrutura secundária.	43
Figura 15 - Espectro Infravermelho da terceira metodologia de fragmentação (FPD) considerando as pontes dissulfeto.	45
Figura 16 - Espectro Raman da terceira metodologia de fragmentação (FPD) considerando as pontes dissulfeto.	46
Figura 17 - Espectro Infravermelho quarta metodologia de fragmentação (CAB) por cadeia do monômero da insulina.	49
Figura 18 - Espectro Raman da quarta metodologia de fragmentação (CAB) por cadeia do monômero da insulina.	50

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Valores dos ângulos diedrais Φ e Ψ para as estruturas regulares mais encontradas.	29
Tabela 2 - Assinalamento dos modos vibracionais característicos de alguns aminoácidos.	39
Tabela 3 - Assinalamento dos modos vibracionais característicos das estruturas secundárias.	41
Tabela 4 - Assinalamento dos modos vibracionais característicos da fragmentação considerando as pontes dissulfeto.	44
Tabela 5 - Assinalamento de algumas bandas características da fragmentação por cadeia.	48
Tabela 6 - Comparação dos modos normais entre as quatro metodologias.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DFT	Teoria do Funcional de Densidade
IR	Infravermelho
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
NIRS	Espectroscopia no infravermelho próximo
MIR	Região do infravermelho médio
AAI	Aminoácidos Independentes
FES	Fragmentação por estrutura secundária
FPD	Fragmentação considerando as pontes dissulfeto
CAB	Fragmentação considerando as cadeias

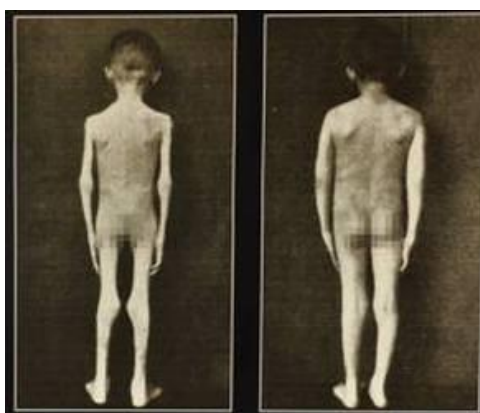
Sumário

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVO GERAL.....	17
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 EQUAÇÃO DE SCHRÖDINGER.....	18
2.2 TEORIA DO FUNCIONAL DE DENSIDADE	19
2.3 ESPECTROSCOPIA.....	21
2.3.1 Espectroscopia Infravermelho	21
2.3.2 Espectroscopia Raman.....	24
2.4 QUÍMICA COMPUTACIONAL.....	26
2.5 PROTEÍNAS, AMINOÁCIDOS E O MONÔMERO DA INSULINA	28
3 METODOLOGIA	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
5 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1 INTRODUÇÃO

Os pesquisadores puderam verificar as propriedades dos modelos teóricos, através de realização de cálculos mais exatos, com o uso de computadores para o tratamento de sistemas moleculares mais complexos como o nosso objeto de estudo que é o monômero da insulina. Peregrino (2005) começa explicando o Diabetes, afirmando que todos nós temos uma certa quantidade de açúcar no sangue chamado glicose. A quantidade normal gira em torno de 70 a 110 milésimos de grama para cada 100 mililitros. Essa glicose é o principal combustível que é utilizado pelas células para produzir energia. Para que a glicose entre na célula é necessário que exista uma substância chamada insulina. Quando o pâncreas não produz a insulina ou produz em pequena quantidade as células não conseguem absorver a glicose. Fazendo com que o sangue apresente altos valores de glicose e como consequência o desenvolvimento do Diabetes. A Figura 1 ilustra a primeira pessoa que teve o Diabetes tratado com a Insulina.

Figura 1 - Leonard Thompson apenas um mês após o seu tratamento com insulina.



Fonte: theevolutionofinsulin.weebly.com/diabetes

Como mostra a *Internacional Diabetes Federation*, a cada sete segundos uma pessoa morre de diabetes. Em escala global isso significou 4,9 milhões de mortes em 2014. Só no Brasil neste mesmo período os números foram de aproximadamente 116.382 mortes pela doença. Já no ano de 2015 e a estimativa para 2040 está representado na Figura 2. Diante dessa problemática que é o Diabetes e dos números alarmantes quanto aos portadores desta doença e ao número de óbitos apresentados, surge a necessidade de um estudo quântico da mesma. Além do mais, diante da fundamental importância da insulina quanto ao tratamento de pessoas com diabetes, ela vem sendo estudada assiduamente pela comunidade científica.

Figura 2 - Número de portadores de Diabetes por gênero e a expectativa para 2040.



Fonte: Atlas Mundial do Diabetes, 2015.

Até o final do século XIX os modelos químicos eram incompatíveis com a física. A partir da década de 1910, com a ilustração pelos físicos de alguns elementos da estrutura atômica, os químicos passaram a utilizar elementos de física atômica em seus modelos de ligação química. Mas só com o advento da mecânica quântica de 1920, passou a ser possível, em princípio, basear modelos químicos inteiramente em resultados de considerações teóricas de estrutura eletrônica. Entretanto, os problemas de interesse dos químicos eram mais complicados dos que os físicos poderiam resolver. Devido a essa dificuldade, foram formulados modelos mais simplificados (BARBOSA, 2009).

Sendo assim, com o progresso no desenvolvimento de softwares e hardwares juntamente com uma redução de custos dos materiais informáticos a química computacional torna-se uma das áreas mais promissoras deste novo século (RAUPP, 2008), além do mais, a implementação computacional da química quântica torna possível a compreensão dos mais variados assuntos no ramo da Química. Hoje em dia existe disponível no mercado pacotes de química computacional que utiliza da mecânica quântica, incluindo mais de um método semi-empírico e também mais de um conjunto de base para o cálculo *ab initio*, além dos métodos da Teoria do Funcional de Densidade (DFT) (LEAL et al., 2010).

De acordo com Morgon (2001) uma das grandes virtudes da química teórica é de operar como ferramenta de apoio na análise e interpretação de dados experimentais, a partir de informações que muitas vezes não são possíveis de serem obtidas diretamente dos experimentos, ou na previsão de propriedades diversas.

Os trabalhos de Lázaro et al., 2005 constatou que com o advento de novas técnicas e metodologias para estudar sistemas quânticos, muitos softwares foram desenvolvidos especificamente para lidar com esse tipo de sistema. Dentre as ferramentas desses programas, como por exemplo, o Gaussian, pode-se visualizar a estrutura de cristais e moléculas, assim como otimizar geometria, calcular energia de interação e realizar dinâmica molecular - dentre outras possibilidades - desses sistemas. Este método fornece informações relevantes que pode ser usado como complemento àquelas obtidas por técnicas experimentais possibilitando um intercâmbio entre teoria e experimento.

Segundo Morgon e Custodio (1995) a Teoria do Funcional de Densidade (DFT) surgiu como uma alternativa para os métodos *ab initio* e semi-empíricos no estudo das propriedades no estado fundamental dos sistemas moleculares. Sendo assim, as simulações computacionais desenvolvidas neste trabalho são embasadas no DFT, um método *ab initio*. A escolha de tal método se deve ao fato de que como mesmo afirma Sant'anna (2009) os cálculos em *ab initio* são cálculos mecânico-quântico que usam equações exatas, sem aproximações, que envolvem a população eletrônica total da molécula. Os métodos de cálculo mecânico-quântico são baseados no uso da equação de Schrödinger completa para tratar todos os elétrons de um sistema químico. Como Sant'anna continua afirmando, sabe-se que a equação de Schrödinger é uma equação diferencial e sua resolução envolve a avaliação de um grande número de integrais. Nos métodos quânticos semi-empíricos, a negligência de um grande número dessas integrais foi a solução encontrada para economizar tempo de máquina e também reduzir a quantidade de memória necessária nos cálculos.

Na primeira parte deste trabalho é apresentado um panorama sucinto da química teórica (da mecânica quântica), enfatizando aplicações, evolução, e as técnicas espectroscópicas utilizadas. Posteriormente, serão abordados os aspectos técnicos relacionados as ferramentas e parâmetros utilizados. Bem como, o detalhamento do método desenvolvido para a abordagem da estrutura a ser estudada.

Tendo em vista que o objeto de estudo é o monômero da insulina humano e aplicando a esta proteína simulações computacionais baseadas na DFT e implementadas no software Gaussian, este trabalho tem por objetivo prever e interpretar suas propriedades vibracionais por meio de um método computacional de fragmentação em nível quântico e da análise espectroscópica através das técnicas Infravermelho (IR) e Raman.

1.1 OBJETIVO GERAL

Prever e interpretar as propriedades vibracionais do monômero da insulina humana através de um método computacional de fragmentação em nível quântico e da análise espectroscópica.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fragmentar o monômero da insulina de acordo com quatro metodologias;
- Associar alguns picos nos espectro (Raman e IR) à presença específica de determinados resíduos;
- Analisar os modos vibracionais das bandas mais características dos espectros;
- Verificar um mesmo modos vibracional nas quatro metodologias.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 EQUAÇÃO DE SCHRÖDINGER

Segundo Solomons e Fryhle (2012), uma teoria sobre a estrutura atômica e molecular foi desenvolvida de forma independente e quase que concomitantemente por três pessoas em 1926: Erwin Schrödinger, Erner Heisenberg e Paul Dirac. Essa teoria foi chamada de mecânica ondulatória por Schrödinger e de mecânica Quântica por Heisenberg. Dela surgiu a base de onde deriva nossa compreensão das ligações nas moléculas.

Com o surgimento dessa teoria, o físico Erwin Schrödinger propôs uma equação para obter a função de onda. A resolução da equação de Schrödinger que leva várias funções matemáticas chamadas funções de onda tentam descrever o movimento ondulatório do elétron. Essas funções são representadas pelo símbolo ψ . A função de onda em si não tem um significado físico direto, o quadrado da função da onda, ψ^2 , fornece informações de fundamental importância sobre a probabilidade de o elétron ser encontrado em uma dada posição. Por essa razão, ψ^2 , é conhecido como densidade de probabilidade (BROWN et al., 2007).

Em mecânica quântica o primeiro passo que deve ser feito para a modelação de um sistema é a equação de Schrödinger. Levando em consideração que o interesse é descrever um sistema em um estado estacionário, escreve-se então a equação de Schrödinger independentemente do tempo:

$$\hat{H}\psi = E\psi$$

Onde $\hat{H}$ é o operador hamiltoniano, ψ a função de onda que descreve todo o sistema e E a energia de um dos estados desse sistema, que frequentemente corresponde àquela do estado fundamental, ou seja, ao de menor energia.

O operador hamiltoniano, por sua vez, é definido como a soma dos operadores de energia cinética ($\hat{T}$) e potencial ($\hat{V}$)

$$\hat{H} = \hat{T} + \hat{V}$$

Custódio (2002) ainda afirma que resolver a equação de Schrödinger significa ser um trabalho sistemático de determinar a função de onda ψ e a energia do sistema E . Conhecendo-se essa função de onda pode-se então determinar diversas propriedades do sistema. O controle

sobre esta equação está na determinação das condições de controle que caracterizam o sistema de interesse.

A equação de Schrödinger independente do tempo para uma única partícula de massa “m” e movendo-se com energia “E”, é (ATKINS e DE PAULA, 2011)

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{d^2\psi}{dx^2} + V(x)\psi = E\psi$$

Nessa expressão, V(x) é a energia potencial; $\hbar$ é uma modificação conveniente da constante de Planck:

$$\hbar = \frac{h}{2\pi} = 1,055 \times 10^{-34} Js$$

2.2 TEORIA DO FUNCIONAL DE DENSIDADE

Como mostra os estudos de Morgon (2001), a Teoria do Funcional de Densidade (DFT) foi formulada a partir dos trabalhos de Kohn, Hohenberg e Sham, que se tornou popular a partir de meados da década de 80. E, com relação a algoritmos mais eficientes destacam-se implementação de cálculo direto de integrais eletrônicas, métodos de otimização global, de integração numérica (DFT), cálculos analíticos de gradientes de energia da matriz hessiana (frequência e intensidades).

Um dos principais objetivos da Química Quântica é prever quantitativamente ou de forma qualitativa as propriedades das moléculas e explicar a natureza das ligações químicas. A Teoria do Funcional de Densidade surgiu como uma alternativa para os métodos *ab initio* e semi-empíricos no estudo das propriedades no estado fundamental dos sistemas moleculares (MORGON e CUSTODIO, 1995).

Sant’anna (2009) afirma que os cálculos em *ab initio* são cálculos mecânico-quântico que usam equações exatas, sem aproximações, que envolvem a população eletrônica total da molécula. Os métodos de cálculo mecânico-quântico são baseados no uso da equação de Schrödinger completa para tratar todos os elétrons de um sistema químico. Sabe-se que a equação de Schrödinger é uma equação diferencial e sua resolução envolve a avaliação de um grande número de integrais. Nos métodos quânticos semi-empíricos, a negligência de um grande número dessas integrais foi a solução encontrada para economizar tempo de máquina e também reduzir a quantidade de memória necessária nos cálculos.

Já os métodos empíricos para o cálculo de propriedades moleculares dispensam completamente o formalismo mecânico-quântico e o cálculo da função de onda. As

propriedades de interesse são calculadas exclusivamente por recursos a funções empiricamente parametrizadas (LASCHUK, 2005).

Walter Kohn e seu aluno Hohenberg em 1964 apresentaram uma reformulação na mecânica quântica que não utiliza função de onda. Segundo eles, para se conhecer as propriedades de um átomo, de uma molécula ou de um sólido só precisava-se saber qual sua densidade eletrônica (MARQUES e BOTTI, 2006).

Em termos genéricos o DFT pode ser representado por dois postulados básicos como mostra Duarte (2001):

(a) A função de onda no estado fundamental e daí todas as propriedades deste estado são funcionais da densidade eletrônica – $\rho(r)$, estabelecendo que o potencial externo, $\hat{U}$, é um funcional único de $\rho(r)$, além de uma constante aditiva, e

(b) A energia do estado fundamental de um sistema multieletrônico sob um dado potencial externo $v(r)$ pode ser escrito como

$$Ev[\rho(r)] = \int v(r)\rho(r)dr + F[\rho]$$

Onde de acordo com Mogon e Custódio (1995) F é denominado de funcional universal de ρ , que independe do potencial externo $v(r)$. Substituindo a função densidade exata deste estado por outra função aproximada ρ , Ev aumenta então:

$$\tilde{E} = \tilde{E}[\rho(r)] = \int v(r)\rho(r)dr + F[\rho] \geq E_0 = E[\rho(r)]$$

Como representar a função de densidade eletrônica ρ ?

Marques e Botti (2006) diz que a ideia para se determinar essa densidade eletrônica de interação é construir um sistema de elétrons “fictícios”, onde os “elétrons” não interagem uns com os outros, mas cuja densidade é igual à densidade do sistema original.

O desenvolvimento da metodologia computacional para fazer cálculos DFT leva, invariavelmente, as equações matemáticas semelhantes às equações do método de Hartree-Fock-Roothaan. No entanto, apesar das semelhanças, os resultados dos cálculos DFT devem ser interpretados à luz da Teoria do Funcional de Densidade. Diferentemente dos outros métodos, tais como métodos semi-empíricos que tentam se aproximar do método Hartree-Fock o mais possível, a DFT está relacionada com solução exata do problema de muitos elétrons. (DUARTE, 2001)

Atkins e de Paula (2011) afirmam que a técnica do DFT ganhou uma considerável fundamentação nos últimos anos. Suas vantagens incluem um menor esforço computacional, e

em alguns casos (particularmente em complexos de metais d), um melhor acordo com os valores experimentais obtidos por procedimento baseado no método Hartree-Fock.

Outra vantagem deste método como mostra Vessecchi et al., (2008) é a possibilidade de se estimar as frequências vibracionais e as intensidades das bandas de absorção no infravermelho de moléculas contendo átomos de primeiro e segundo períodos.

2.3 ESPECTROSCOPIA

Leite e Prado (2012) disseram que as técnicas espectroscópicas têm sua utilidade na caracterização dos materiais. Significando dizer que com elas várias informações são possíveis de serem determinadas, tais como: informações sobre os tipos de ligações entre os átomos, a vizinhança atômica desses átomos, a presença e concentração de substâncias em amostra, etc. A caracterização de materiais tem um significado especial pois trata dos átomos e como eles estão arranjados entre si.

Os métodos experimentais em espectroscopia contribuem de forma nítida para a arte da física atômica e molecular, da química e da biologia molecular. Muito do conhecimento atual sobre a estrutura da matéria foi baseado em análises espectroscópicas. As interações de moléculas com as estruturas vizinhas são derivadas de várias formas através de espectros de emissão e/ou absorção gerados quando a radiação interage com os átomos e/ou moléculas de matérias (JÚNIOR, 2002).

De acordo com Trevisan e Poppi (2006) uma das vantagens das técnicas espectroscópicas é que estas são mais rápidas e com obtenção de espectros em poucos segundos. Dentre os vários métodos experimentais de espectroscopia de átomos e moléculas este trabalho será voltado para as análises de espectroscopia Raman e Infravermelho.

2.3.1 Espectroscopia Infravermelho

Este tipo de espectroscopia produz espectros de absorção (e/ou transmissão). Fazendo com que um feixe de luz na região do infravermelho seja incidido sobre a substância e determinando as frequências absorvidas por ela. O que se mede diretamente é o quanto de cada comprimento de onda (ou frequência) da radiação eletromagnética que incide é absorvida (ou transmitida). Este tipo de espectroscopia também é utilizado para examinar gases como, por exemplo, a atmosfera dos planetas. (LEITE e PRADO, 2012)

Rodrigues e Galzerani (2012) dizem que para entender-se o princípio do funcionamento da espectroscopia de infravermelho, deve-se entender primeiramente como uma onda eletromagnética viajando através do ar comporta-se ao deparar-se com um meio material. Acontecimentos de interação entre a radiação eletromagnética e um meio finito tais como absorção, reflexão e refração podem ser descritas macroscopicamente através da equação de Maxwell. Esse processo de absorção da radiação eletromagnética pela matéria é uma característica essencial da espectroscopia no infravermelho (LEITE e PRADO, 2012).

O infravermelho alcança do limite superior da faixa de micro-ondas até o começo da região visível, apresentando comprimento de ondas de aproximadamente 800 nm. Os comprimentos de onda mais longos (0,1 – 1 mm) é aplicável à excitação de espectros rotacionais, enquanto os comprimentos de ondas menores (10^{-3} – 10^{-1} mm) é a região onde os espectros vibracionais típicos das moléculas são observados: os chamados espectros rotacionais-vibracionais (JÚNIOR, 2002).

A espectroscopia no infravermelho próximo – NIRS – compreende a faixa espectral de (12800 a 4000 cm^{-1}). As bandas de absorção relativamente específicas permitem uma seletividade espectral possibilitando a determinação de diversos compostos simultaneamente, com auxílios de métodos quimiométricos. Em vista das técnicas talvez a NIRS seja o que apresenta o maior número de aplicações no monitoramento de processos farmacêuticos, polímeros, ambiental, combustíveis e mais recentemente em bioprocessos. Já a região do infravermelho médio (MIR) apresenta maior seletividade devida à região de impressão digital. Compreendendo a região de 4000 a 200 cm^{-1} , esta técnica é também utilizada em processos, mas em uma escala muito menor em relação a NIR (TREVISAN e POPPI, 2006).

Como afirmam Leite e Prado (2012), cada molécula possui frequências naturais de vibração, onde as ondas eletromagnéticas de frequências específicas são absorvidas e de onde posteriormente são gerados um espectro de absorção característico, quando ocorre uma ressonância entre a frequência de radiação infravermelha incidente e as frequências naturais de vibração do material. Além do mais uma das grandes vantagens de descrever a matéria como algo que é formado de partículas, no caso átomos, que vibram é poder fazer uma associação de frequências naturais de oscilação à mesma, de modo que a respectiva matéria passa a ter características comuns às ondas, facilitando assim a descrição da interação entre radiação e matéria.

Instrumentos que utilizam a Transformada de Fourier ou filtros tem a capacidade de apresentar uma grande aplicabilidade em processo industrial devido à alta velocidade nas medidas espectrais e reduzida (ou nenhuma) preparação de amostras. Esse tipo de instrumento

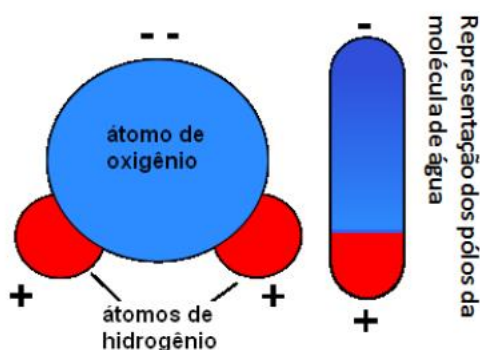
é padrão na área, permitindo além de varreduras rápidas uma alta precisão e relação sinal ruído. (TREVISAN e POPPI, 2006)

Hoje em dia os equipamentos mais utilizados neste tipo de espectroscopia são baseados em interferômetros. Esses tipos de instrumentos baseiam-se no interferômetro de Michaelson: um aparato que pode dividir um feixe de radiação e depois recombiná-los de maneira que interfiram entre si levando em conta a diferença no caminho percorrido pelos feixes (RODRIGUES e GALZERANI, 2012).

Aplicando um interferômetro como espectrômetro, as vantagens derivam tanto de uma abertura larga na entrada do sinal como da presença do espectro inteiro na saída. Dessa forma o espectrômetro por transformada de Fourier não é limitado como os espectrômetros de prisma e de grade, pela presença de fendas estreitas que restringem tanto a irradiância como intervalo de comprimentos de onda disponíveis. Além disto, a resolução obtida com esta técnica é muito alta (JÚNIOR, 2002).

Este tipo de espectroscopia ainda é fundamento no contexto do momento de dipolo. Leite e Prado (2012) mostram que do mesmo jeito que as cargas elétricas oscilantes podem gerar radiação eletromagnética, este tipo de radiação também pode fazer com que este de cargas elétricas oscile. Pode-se dizer então que as ondas eletromagnéticas podem ser absorvidas pelo material, cedendo então alguma quantidade de energia a ele. Qualquer tipo de distribuição de carga seja ela mais complexa ou mais simples, como uma carga elétrica oscilante, podem vibrar quando expostas a uma radiação eletromagnética como uma ligação química, molécula ou arranjo atômico qualquer que possua momento de dipolo (Figura 3).

Figura 3 - Representação do dipolo elétrico da molécula da água.



Fonte: Leite e Prado, 2012.

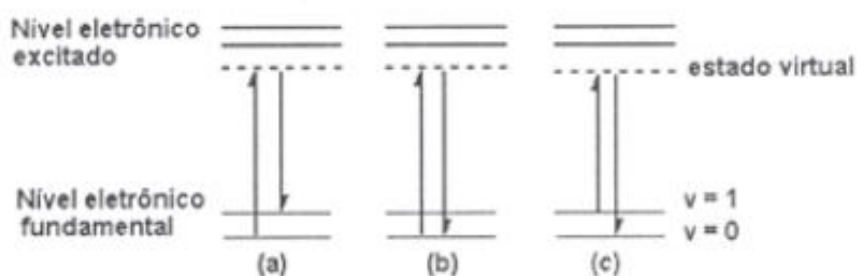
2.3.2 Espectroscopia Raman

A descoberta do efeito Compton em 1923, levou Chandrasekhara Vankata Raman a pensar que poderia existir um efeito similar, ou seja, espalhamento inelástico de radiação. Raman imaginou que seria possível a radiação visível interagir com a matéria de modo que houvesse variação na energia do fóton incidente (FARIA et al., 1996).

A nível molecular uma radiação pode associar-se a matéria por processos de absorção ou de espalhamento, onde este último poderá ser elástico ou inelástico. O espalhamento elástico de fótons pela matéria ficou conhecido como espalhamento Rayleigh, já o espalhamento inelástico, relatado primeiramente pelo físico indiano Chandrasekhara Vankata Raman, é chamado de espalhamento Raman. Neste espalhamento inelástico de luz a componente de campo elétrico do fóton espalhado perturba a nuvem eletrônica da molécula e pode ser entendido como uma excitação do sistema para um estado “virtual” de energia (JÚNIOR, 2002) assim chamado por não corresponder a um auto estado da molécula (FARIA et al., 1996).

Segundo Lima (2008), o espalhamento inelástico de luz permite o estudo de rotações e vibrações moleculares. Esse espalhamento pode resultar tanto em um fóton de menor energia, quanto fóton de maior energia. No primeiro caso, o fóton que incide encontra a molécula em um estado vibracional fundamental e o fóton espalhado a deixa em um estado vibracional excitado (Figura 4-a: a diferença de energia entre o fóton incidente e o espalhado corresponde a energia necessária para excitar esse nível vibracional. O mesmo acontece quando o fóton espalhado tem maior energia que o fóton incidente: devido a distribuição de Boltzman, existe um número finito de moléculas que já estão vibracionalmente excitadas, e mesmo em condições ambientes (Figura 4-c) um fóton de maior energia do que o fóton incidente é criado (FARIA et al., 1996).

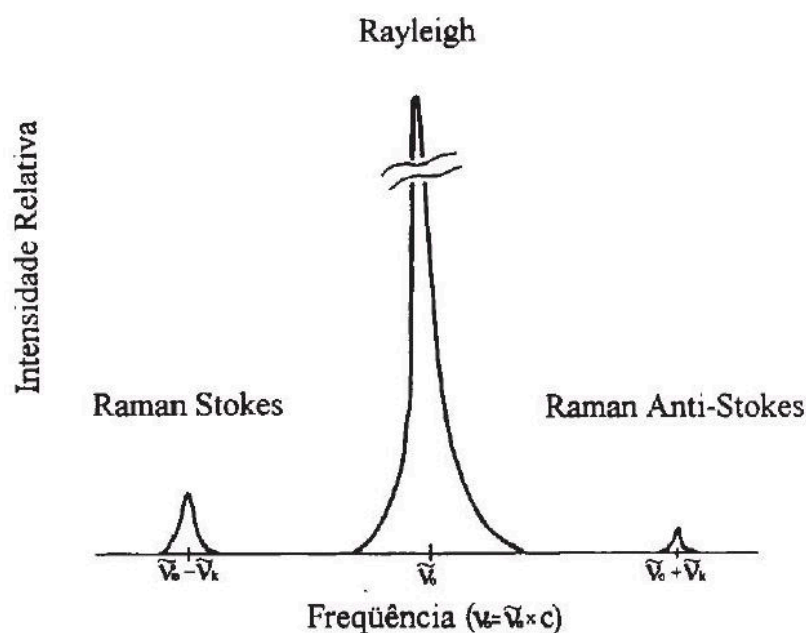
Figura 4 - Espalhamento de luz: (a) espalhamento inelástico (região Stokes); (b) espalhamento elástico (Rayleigh); (c) espalhamento inelástico (região anti-Stokes).



Fonte: Faria et al., 1996.

Dependendo se o sistema ganha ou perde energia de vibração a frequência do deslocamento Raman se dá para cima e/ou abaixo da energia do fóton espalhado, em relação ao fóton incidente. As componentes deslocadas para baixo e para cima são chamadas de Stokes e anti-Stokes, respectivamente (Figura 5) (JÚNIOR, 2002).

Figura 5 - Espalhamentos Rayleigh e Raman obtidos como uma fonte de excitação de frequência ν_0 . Uma dada vibração molecular da amostra tem frequência ν_k .



Fonte: LIMA, 2008.

Alcântara Júnior (2002) afirma que existe uma diferença muito significativa entre os espectros Raman dos gases e dos líquidos, para os obtidos dos sólidos, em particular os cristais. Para entender esta diferença basta perceber que nos gases e líquidos é significativa a noção dos níveis de energia vibracionais das moléculas individuais. Já nos materiais cristalinos, se comportam como se toda a estrutura cristalina sofresse vibração levando a um efeito macroscópico cujos modos são chamados de fônons.

Quando a radiação interage com a matéria, isto é, quando a matéria está na presença de um campo elétrico, há uma mudança na posição de equilíbrio. Esta posição é aquela em que os núcleos e os elétrons situam-se na ausência de perturbações externas. Logo, na presença de um campo elétrico há uma mudança no momento dipolar, ou seja, o campo elétrico induz um momento dipolar na molécula. O mesmo se pode dizer a respeito de sistemas atômicos mais complexos, como os cristais. Em qualquer caso é possível considerar a polarização

macroscópica do meio como o resultado de toda a polarização microscópica, pois ambas as magnitudes estão ligadas (LIMA, 2008). Temos então

$$\vec{\mu} = \alpha \vec{E}$$

Onde $\vec{\mu}$ é o vetor momento dipolo induzido, $\vec{E}$ é o vetor campo elétrico e α constante de proporcionalidade denominada polarizabilidade de ligação. Essa constante é uma medida da deformação da ligação em um campo elétrico. O deslocamento das cargas moleculares, depende da intensidade e direção do campo elétrico e também da intensidade das ligações intramoleculares que unem as cargas. Os vetores $\vec{E}$ e $\vec{\mu}$ tem orientações diferentes (não são colineares) e portanto não é apenas um número que se pode expressar a proporção as intensidades dos vetores indutor $\vec{E}$ e induzido $\vec{\mu}$.

Esta técnica é muito utilizada no estudo de estruturas de sistemas moleculares conhecida como espectroscopia Raman (JÚNIOR, 2002). Por consequência das transações vibracionais fundamentais, os espectros do Raman são bastante simples e seletivos mostrando-se como uma vantagem na análise de processos. Este tipo de espectroscopia tem apresentado um forte desenvolvimento nos últimos anos. Isso acontece devido à excelente eficiência de fibras ópticas na região do visível e NIR onde alguns instrumentos são utilizados para a excitação (TREVISAN e POPPI, 2006).

Faria et al., (1996) diz que não resta dúvida de que a espectroscopia Raman apresenta uma série de vantagens quando comparadas a espectroscopia de absorção do infravermelho (IV). Uma das principais são a possibilidade de obtenção dos espectros vibracionais de substâncias em meio aquoso e a perspectiva de abrir mão de recursos especiais como o efeito Raman ressonante e o efeito SERS que aumentam sua sensibilidade. Além do mais, trata-se de uma técnica não destrutiva, que aliada com o uso de fibras ópticas, permite a monitoração remota das amostras, por exemplo, no estudo de obras de arte e em pesquisa biomédica. Faria et al., (1996) alega que, no entanto, a realidade brasileira mostra dados de que são poucos os grupos de pesquisa que utilizam essa técnica espectroscópica devido aos custos de um equipamento Raman, principalmente considerando a necessidade de aquisição de lasers para excitação das amostras.

2.4 QUÍMICA COMPUTACIONAL

Segundo a IUPAC a química computacional é definida da seguinte forma: “aspectos da pesquisa molecular que são tornados práticos pelo uso de computadores” (IUPAC, 2008).

Este ramo vem crescendo bastante nas últimas décadas por causa dos grandes avanços dos hardwares de computadores e ao desenvolvimento eficiente de softwares de simulação (ATKINS et al., 2009), fazendo com que os softwares de cálculos químicos fossem aplicados a outros campos da ciência, como no planejamento e síntese de fármacos, na química ambiental, nanotecnologia e ciência dos materiais, como um item complementar aos estudos realizados (ALLOUCHE, 2011).

O desenvolvimento nessa área modifica a rotina do ensino da química: hoje em dia, os cálculos químico-quânticos são imprescindíveis em qualquer laboratório acadêmico. Diante dessa realidade a química computacional fornece resultados confiáveis sobre a geometria molecular e outras propriedades, que são provenientes de experimentação química ou derivada da abordagem puramente teórica, sendo obtido através de métodos da mecânica molecular, mecânico quântico e pela metodologia do funcional de densidade (LEAL et al., 2010).

Neste trabalho, todos os cálculos serão realizados utilizando o software Gaussian. O referido programa utilizado calcula propriedades químicas e físicas, tais como superfícies potenciais de energia de excitação, as energias e etc. Os cálculos podem ser feitos para os sistemas na fase gasosa ou em solução, no estado fundamental ou em estados excitados (WASS, 2000). Já o Gaussview é um programa de interface gráfica utilizada para importar ou construir estruturas moleculares, configurar, iniciar, monitorar e controlar os cálculos do software Gaussian, além de recuperar e visualizar os resultados obtidos (ORTOLON, 2014).

Ao falar da implementação de métodos, os dois exemplos a seguir são marcantes. O primeiro refere-se à Teoria de Perturbação (MPn), fundamentada nos trabalhos de Moller e Plesset da década de 30, mas que apenas a partir da década de 70 teve cálculos de energias e gradientes implementados eficientemente nos programas computacionais. O segundo exemplo, é mais recente, trata-se da Teoria do Funcional de Densidade, formulada a partir dos trabalhos de Kohn, Hohenberg e Sham, que se tornou popular a partir de meados da década de 80. E, com relação a algoritmos mais eficientes destacam-se implementações de cálculo direto de integrais eletrônicas, métodos de otimização global, de integração numérica (DFT), cálculos analíticos de gradientes de energia, da matriz hessiana (frequência e intensidades), busca na superfície de energia potencial de estado de transição, entre outros. Graças aos avanços, observa-se uma forte interação entre químicos teóricos e experimentais, e com uma frequência crescente o surgimento, em bancadas dos laboratórios, de estações de trabalho e computadores pessoais voltados exclusivamente para cálculos teóricos. Aplicações rotineiras podem ser encontradas, nas diversas áreas da Química (MORGON, 2001).

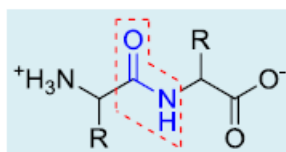
2.5 PROTEÍNAS, AMINOÁCIDOS E O MONÔMERO DA INSULINA

Segundo Devlin (2011) as proteínas desempenham uma variedade de funções essenciais dinâmicas e estruturais. Dentre as funções dinâmicas incluem processos como catálise de transformações químicas, transporte, controle metabólico e contração. Já nas funções estruturais, as proteínas compõem a matriz para osso e tecido conjuntivo, dando estrutura e forma ao organismo humano.

O filamento da proteína não permanece em uma cadeia reta. Os aminoácidos em diferentes locais ao longo de todo filamento são atraídos uns pelos outros. Estas atrações levam ao enrolamento dos segmentos dos filamentos. Por outro lado, cada ponto do filamento espiralado é atraído ou repelido para outros pontos do comprimento fazendo com que a estrutura espiral inteira se dobre formando uma estrutura globular ou fibrosa. A forma como as proteínas estão estruturadas possibilitam a realização de muitas funções vitais. Enquanto que os carboidratos e gorduras possuem átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio, as proteínas contêm átomos de nitrogênio. Estes átomos de nitrogênio dão o nome de amino (= que contém nitrogênio) aos aminoácidos, os blocos de construção das proteínas. Outra diferença com relação ao carboidrato, que apresentam unidades repetidas, é que em um filamento de proteína os aminoácidos são diferentes um dos outros (SINZER e WHITNEY, 2003).

Os aminoácidos são capazes de formar longas cadeias através da formação do que é conhecido como ligação peptídica (Figura 6). Os aminoácidos são, então, os principais constituintes de proteínas, como por exemplo, a insulina, onde as cadeias destas são formadas por essa sequência de aminoácidos unidos através de ligações peptídicas para formar o monômero da insulina. Praticamente todos os aminoácidos presentes em proteínas, ocorrem na natureza, na sua forma levógira.

Figura 6 - Representação esquemática de uma ligação peptídica.



Fonte: ESTEVES e COSTA, 2014.

Geralmente, a cadeia polipeptídica não assume uma estrutura tridimensional aleatória, ao contrário, forma arranjos regulares de aminoácidos que estão localizados próximos uns aos outros na sua sequência linear. Pequenas regiões em uma proteína podem se organizar em um arranjo helicoidal, enquanto outras regiões se organizam em arranjos mais estendidos e ou pregueados devido a movimentação dos átomos da cadeia principal dos resíduos de aminoácidos em torno dos seus ângulos de rotação. Quando cada cadeia peptídica se arranja em conformação estereoquímica permitida para seus ângulos de rotação, dizemos que ela apresenta uma estrutura secundária que descreve a conformação local dos resíduos de aminoácido na cadeia proteína. A tabela abaixo fornece os valores dos ângulos ϕ e Ψ para as conformações mais frequentemente encontradas nas proteínas conhecidas

Tabela 1 - Valores dos ângulos diedrais Φ e Ψ para as estruturas regulares mais encontradas.

Conformação	Φ	Ψ
α -hélice	-57	-47
Fita- β paralela	-119	+113
Fita- β antiparalela	-139	+135

Fonte: CAMPBELL & DWEK, 1984.

Os aminoácidos comuns são conhecidos como α -aminoácidos por terem um grupo amino primário ($-\text{NH}_2$) ligado a um carbono- α , que é o carbono próximo ao grupo carboxílico ($-\text{COOH}$). Os 20 aminoácidos padrões diferem nas estruturas de suas cadeias laterais (grupo R) (VOET et al., 2014), que de acordo com Karp (2005) essas cadeias que exibem uma ampla variedade de características estruturais, como tamanho, forma e carga elétrica, podem participar de ligações covalentes ou não-covalentes.

Como afirma Voet et al., (2014) no primeiro procedimento para se fabricar uma proteína, cada aminoácido se liga ao seu vizinho. A ligação CO-NH resultante, uma ligação amina, é conhecida como ligação peptídica. Polímeros compostos de dois, três e muitos aminoácidos são conhecidos respectivamente como dipeptídeos, tripeptídeos e polipeptídeos.

Depois de incorporados a um peptídeo os aminoácidos individuais são chamados de resíduos de aminoácidos.

Como mostra Devlin (2011) muitos hormônios são proteínas ou peptídeos. Insulina, tiropropina, somatotropina, prolactina, hormônio luteinizante e hormônio folículo-estimulante são proteínas. Em geral o termo proteína é usado para moléculas que contêm mais de 50 aminoácidos e peptídeo é usado para aqueles que contêm menos de 50 aminoácidos. Como a insulina é um tipo de proteína que será o objeto de estudo deste trabalho vale ressaltar alguns pontos a respeito dela. Quando o pâncreas não produz a insulina ou produz em pequena quantidade a célula não consegue absorver a glicose. Fazendo com que o sangue apresente altos valores de glicose e como consequência o desenvolvimento do diabetes (PEREGRINO, 2005).

A droga que revolucionou o tratamento dos diabéticos, a insulina, foi descoberta e estudada por quatro cientistas, sendo o principal deles Frederick Banting. A insulina foi isolada entre os anos de 1921 e 1922 na Universidade de Toronto. Neste estudo, mostraram que ao extrair o pâncreas de cachorros isto os deixavam diabéticos. Ademais, eles injetaram fluido extraído das ilhotas de Langerhans (situadas no pâncreas) de cachorros saudáveis em cachorros doentes e constataram que os cachorros doentes voltavam à normalidade.

O primeiro produto da biotecnologia fazia uso da insulina. Ela foi isolada pela primeira vez a partir do pâncreas de vacas e porcos, no início dos anos vinte. No entanto, dado que a insulina animal não é idêntica à matéria humana, os médicos preocupavam-se cada vez mais com os efeitos do seu uso prolongado. Em 1978, uma versão sintética do gene da insulina humana foi construída e inserida na bactéria *Escherichia Coli*, no laboratório de Herbert Boyer na Universidade da Califórnia em São Francisco. A insulina é uma proteína e, como todas as proteínas, consiste numa cadeia de aminoácidos. A ordem dos aminoácidos numa proteína não é aleatória, pelo contrário, é única a cada proteína específica. Quando se conhece a sequência dos aminoácidos, pode-se isolar (ou neste caso, sintetizar quimicamente) a sequência de DNA correspondente, e introduzi-la nas células bacterianas para fazer a proteína humana.

3 METODOLOGIA

As simulações computacionais foram conduzidas nos Laboratórios de Simulações Computacionais do campus Caraúbas e Mossoró (DCEN) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Além de ter contado com o auxílio de um *cluster* de supermáquinas disponibilizado pelo departamento de física da Universidade Federal do Ceará, mediante parceria firmada com um dos seus grupos de pesquisa.

Para todas as simulações computacionais desenvolvidas nesse trabalho, foi utilizado o programa Gaussian, com os seguintes parâmetros: Método: DFT; Funcional: b3lyp ou sto-3g*; Base: 6-311g. Em algumas simulações as moléculas estiverão no vácuo e em outras foram utilizados a solvatação com Modelo: IEFPCM (PCM) e Solvente: água.

Devido a molécula da insulina ser um sistema biológico grande e como o interesse deste trabalho é elaborar um espectro da insulina completa, torna-se irrealizável uma simulação computacional com a proteína completa, visto que estes cálculos implicam em um custo computacional elevado e não se tem o acesso a computadores com essa capacidade. Diante desta problemática, foi proposta uma forma de fragmentação para este tipo de proteína, estruturada em quatro tipos de metodologias.

A proteína estudada foi o monômero de insulina (cuja estrutura foi previamente escolhida em um banco de dados experimental), a qual foi fragmentada e cada parte foi submetida separadamente a cálculos usando DFT, para obtenção dos modos normais e intensidades IR e Raman. Os resultados dos cálculos dos fragmentos foram então recombinados para gerar os espectros vibracionais da estrutura completa da insulina.

• Primeira Metodologia: Aproximação de Aminoácidos Independentes (AAI)

A Metodologia de Aproximação de Aminoácidos Independentes (AAI) é a forma de fragmentação mais simples, onde é necessário apenas conhecer a sequência primária da proteína. Os espectros vibracionais dos aminoácidos presentes na literatura possibilitam a verificações das propriedades vibracionais de qualquer proteína e isso é feito a partir da ponderação da contribuição de cada aminoácido para o espectro IR e Raman da proteína. No entanto, existe uma limitação neste tipo de metodologia empregada já que não leva em conta as interações relacionadas a estrutura secundária. Além do mais, os espectros dos aminoácidos estão isolados embora estejam imersos no ambiente aquoso descrito pelo PCM.

No que se refere a aplicar a metodologia AAI para a proteína da insulina, em nível de resíduo apenas um cálculo de cada tipo de aminoácido, presente na proteína de insulina, foi computado e na recombinação dos resultados o seu fator de multiplicidade foi considerado. Valendo ressaltar que na recombinação dos resultados as seis Cisteínas que compõe a insulina foram substituídas por três Cistinas, essa consideração foi feita já que na molécula da insulina, a Cisteína não está de forma isolada e sim fazendo ligações com as outras Cisteínas, e a essa ligação existente entre os dois átomos de enxofre das duas Cisteínas dá-se o nome de Cistina. Embora as proteínas se apresentem na forma levógira, em nossos cálculos de AAI em nível de aminoácidos, apenas a Fenilalanina estava na forma dextrógira. Tal fato, não compromete o resultado do respectivo trabalho, visto que, como mesmo afirma Esteves e Costa (2014) o espectro vibracional da Alanina para estas duas formas (L-Alanina e D-Alanina) foi exatamente o mesmo. Logo, para qualquer outro aminoácido tal afirmação é válida, isto se justifica pelo fato de que estas moléculas são imagens especulares uma da outra.

Para cada tipo de aminoácido a estrutura foi otimizada e calculada as frequências com os parâmetros: Funcional - B3LYP e Base – 6-311 e PCM em água. Pôde-se então serem elaborados os espectros Raman e IR para este tipo de fragmentação.

- **Segunda Metodologia: Os Fragmentos da Estrutura Secundária (FES)**

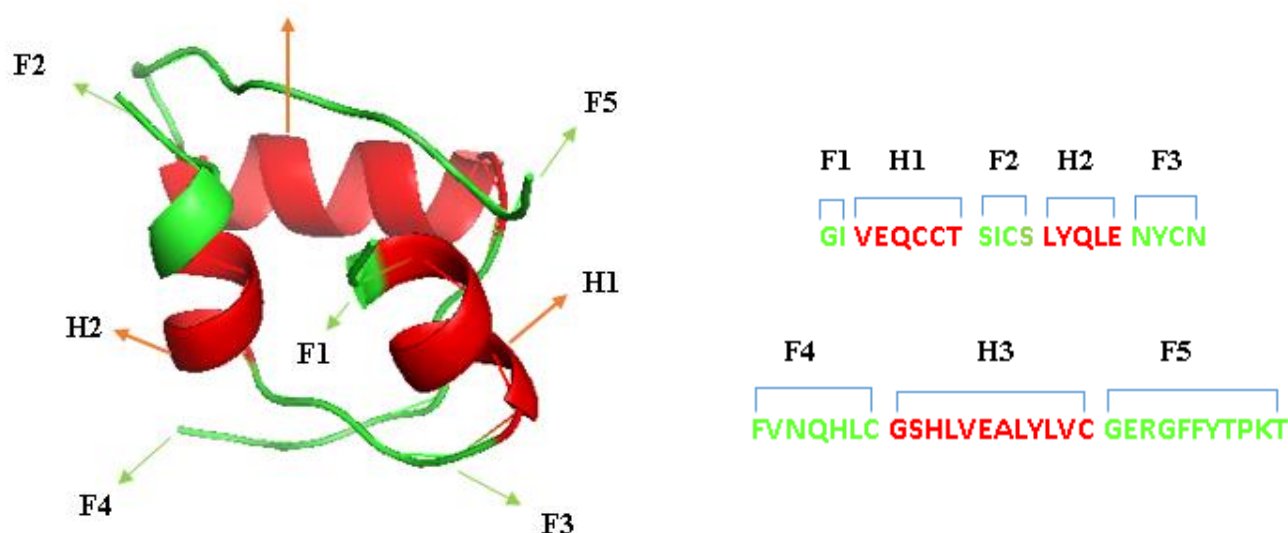
A contribuição de elementos de estrutura secundária para as propriedades de vibração de uma proteína pode ser estudada dividindo-a em fragmentos de estrutura secundária (FES), que são constituídas principalmente de alfa-hélices, beta-folha. Devido ao grande número de átomos na maioria FES da segunda metodologia, o nível (qualidade funcional e base) dos cálculos DFT deve ser diminuído em certos casos, de modo que seja possível a obtenção das propriedades de vibração da proteína em um tempo de processamento do computador razoável (dias, semanas ou mesmo meses, de acordo com o interesse, recursos económicos, bem como a paciência dos pesquisadores), mas sem comprometer a qualidade dos resultados da metodologia FES. Com a metodologia FES pode-se pesquisar a existência (ou não) de um modo vibracional característico de um fragmento específico, por exemplo, uma em que uma proteína de estrutura secundária vibra consideravelmente, enquanto todas as suas outras partes permanecem praticamente sem qualquer deslocamento. Devido ao elevado número de átomos, seus modos vibracionais coletivos irão muito provavelmente aparecerem na gama de frequência muito baixa.

Para aplicar a metodologia FES à insulina, esta proteína que apresenta os dois tipos principais de estrutura secundária que são a hélice alfa e a folha beta, foi fragmentada em oito

partes de acordo com o esquema a seguir (Figura 7), onde as letras vermelhas representam a estrutura de hélices alfa e as verdes as estruturas de fita beta. Na Figura 7 ainda está representado a mesma fragmentação onde é possível perceber visualmente as estruturas alfa-hélice (cor vermelha) e das fitas-beta (cor verde). Os parâmetros utilizados foram Funcional-B3LYP e Base- 6-311 com PCM em água.

Uma vez que a espectros vibracionais da insulina serão a soma dos seus espectros individuais SSF, torna-se possível atribuir modos de vibração para elementos estruturais da insulina. Note-se que é possível verificar se as estruturas secundárias apresentam assinaturas vibratórias que podem ser medidas.

Figura 7 - Esquema de fragmentação das estruturas secundárias do monômero da insulina.

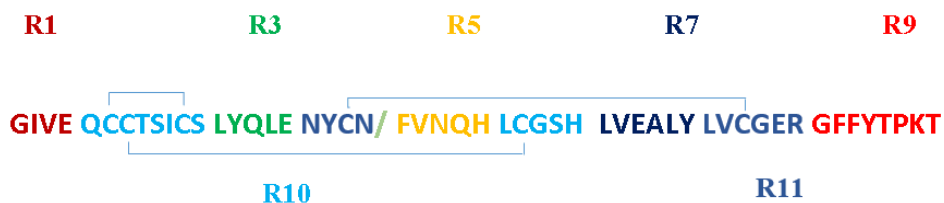


Fonte: Autoria Própria, 2016

- **Terceira Metodologia: Fragmentação com Ponte Dissulfeto (FPD)**

Nesta quarta forma de fragmentação (FPD), o monômero da insulina foi fragmentado em sete partes levando em consideração as pontes dissulfeto, representação na Figura 8, na qual os fragmentos utilizados foram nomeados de R1 a R7. Os parâmetros utilizados para realização dos cálculos foram: Funcional B3LYP; Base 6-311 e PCM em água.

Figura 8 - Esquema de fragmentação considerando as pontes dissulfetos do monômero da insulina (FPD).

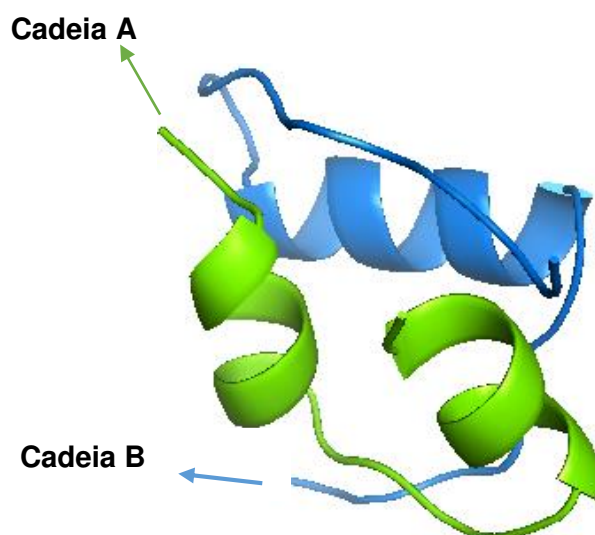


Fonte: Autoria Própria, 2016.

- **Quarta Metodologia: Fragmentação Por Cadeia (CAB)**

Para aplicar a metodologia de CAB para a insulina, a Cadeia A está representado pela cor. verde e a Cadeia B está representada pela cor azul como representada na Figura 9, cada cadeia foi calculada separadamente e os parâmetros utilizados foram: Funcional – sto-3g*; Base – 6-311. A qualidade do funcional foi reduzida visto que o tamanho do sistema biológico é grande. Tornando-se mais relevante diminuir a qualidade dos parâmetros para obter resultados em tempo hábil.

Figura 9 - Esquema de fragmentação por cadeias do monômero da insulina.

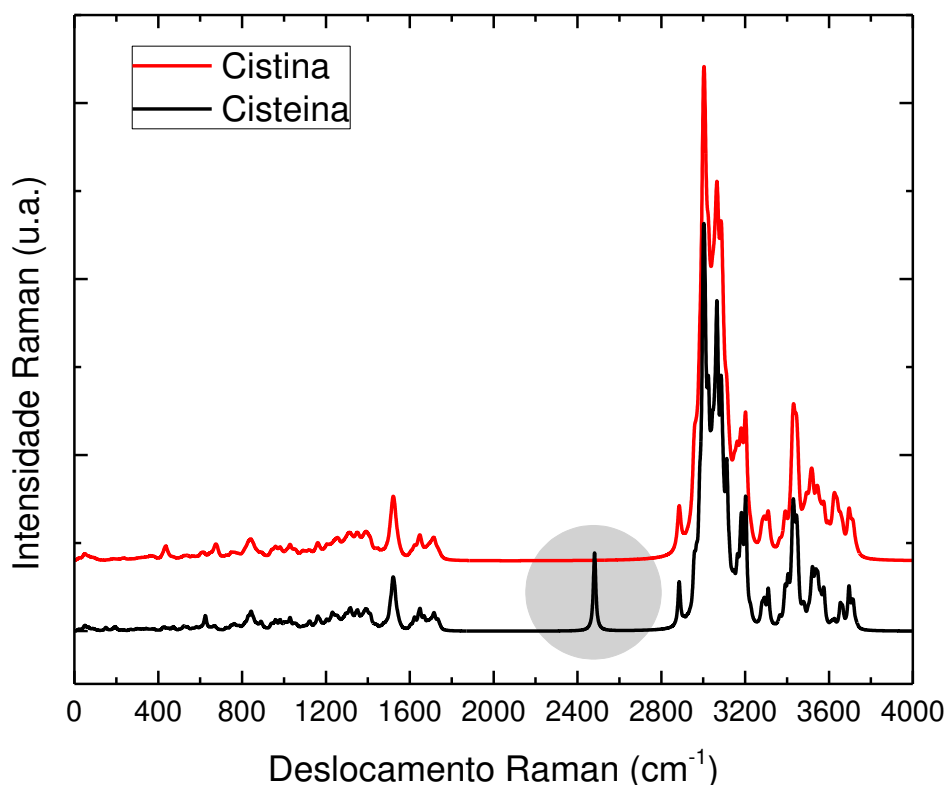


Fonte: Autoria Própria, 2016.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Figura 10, construída segundo a primeira metodologia de fragmentação (AAI), representa o espectro Raman dos cristais dos dezessete aminoácidos que compõe a insulina onde cada um destes aminoácidos foi submetido ao cálculo separadamente e então combinados, segundo o fator de multiplicidade, para formar o espectro da insulina. Percebeu-se que no entorno de 2500 cm^{-1} evidencia-se um pico que é característico do aminoácido Cisteína, devido a um modo vibracional do tipo estiramento entre o enxofre e o hidrogênio. No entanto ele é um artefato do método, tendo em vista que na estrutura da insulina as Cisteínas não estão de forma isolada e sim unidas através das ligações dissulfeto, formando as Cistinas. Logo, as seis Cisteínas foram substituídas por três Cistinas e o artefato do método não foi mais percebido no espectro, como observado na Figura 10 (linha vermelha). Mais adiante, observou-se que nas metodologias em que as pontes dissulfeto foram quebradas, este artefato sempre apareceu na mesma faixa de frequência.

Figura 10 - Espectro Raman da primeira metodologia de fragmentação (AAI) considerando a Cisteína e a Cistina. A região hachurada mostra um artefato do método devido à quebra da ponte dissulfeto.



Embora esta primeira metodologia seja a menos exata, já que não levou em consideração as interações intermoleculares, nem os modos vibracionais coletivos, pôde-se associar alguns picos à presença específica de determinados aminoácidos e ainda prever a qual modo vibracional aquela determinada frequência estava associada como mostrado na Tabela 2. Durante todos os assinalamentos desde trabalho, a convenção de símbolos adotada para os modos vibracionais está indicado a seguir. ν = stretching; τ = torsional; δ = scissoring; ρ = rocking; ω = wagging; s = symmetric; a = asymmetric.

No monômero da insulina, só existe uma Lisina, estando bem caracterizada na frequência de $2908,2\text{ cm}^{-1}$ com um modo vibracional $\nu(\text{NH})$. A Fenilalanina apresentou modos vibracionais bem definidos entre diferentes átomos e frequências, por exemplo, em $3188,1\text{ cm}^{-1}$ verificou-se um $\nu(\text{CH})$, em $3365,1\text{ cm}^{-1}$ vibravam dois modos nesta mesma frequência que foram $\nu(\text{NH})$ e $\alpha(\text{NH}_2)$, já em $3473,5\text{ cm}^{-1}$ observou-se um $\nu(\text{OH})$. A Cistina tornou-se evidente no espectro completo da insulina na frequência de $3639,1$ com um $\nu(\text{OH})$. Na frequência de $2923,8\text{ cm}^{-1}$, a Alanina apresentou um modo vibracional conhecido como “tesoura” representado por $\omega(\text{NH}_2)$.

Ao analisar o espectro completo do monômero, as bandas mais características que podiam ser associadas diretamente a um aminoácido específico estavam em regiões de frequências mais altas, conseqüentemente, estas faixas específicas dos espectros representavam vibrações características dos grupos funcionais. Isso foi observado ao analisar os assinalamentos, onde os átomos envolvidos na maioria dos casos eram oxigênio/hidrogênio caracterizando o grupo ácido carboxílico e nitrogênio/hidrogênio o grupo amina.

O Ácido Glutâmico, Arginina, Asparagina, Serina, em seus picos bem isolados nos espectros representaram mais de uma forma de vibração nas suas respectivas frequências. Os aminoácidos Ácido Glutâmico, Serina, Cistina, Fenilalanina, Tirosina e Asparagina puderam ser observadas tanto no espectro Raman como no Infravermelho, já que apresentaram mesmo modo vibracional nas mesmas frequências. Em outros casos como Lisina, Alanina, Arginina, Treonina, Valina e Histidina só puderam ser visualizadas em uma das técnicas.

Nem sempre determinada frequência apresentará vibrações ativas nas duas técnicas. Como o efeito Raman e o IR são técnicas complementares, é comum que determinados modos e frequências sejam observadas em uma técnica e em outra não. Esta é a vantagem de se estudar uma determinada proteína a partir destas duas técnicas.

Figura 11 - Espectro Infravermelho da primeira metodologia de fragmentação (AAI) por aminoácidos individuais.

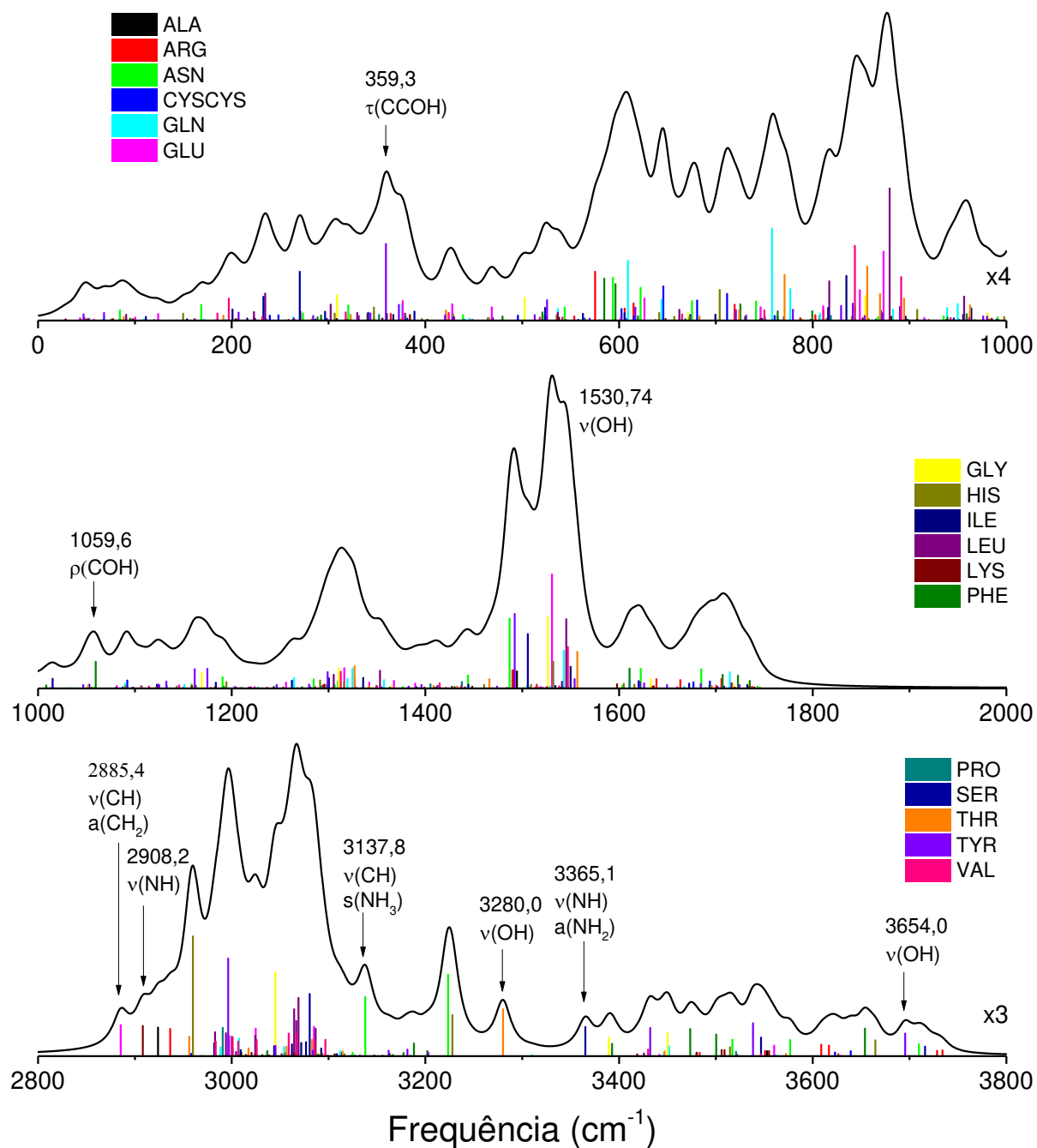


Figura 12 - Espectro Raman da primeira metodologia de fragmentação (AAI) por aminoácidos individuais.

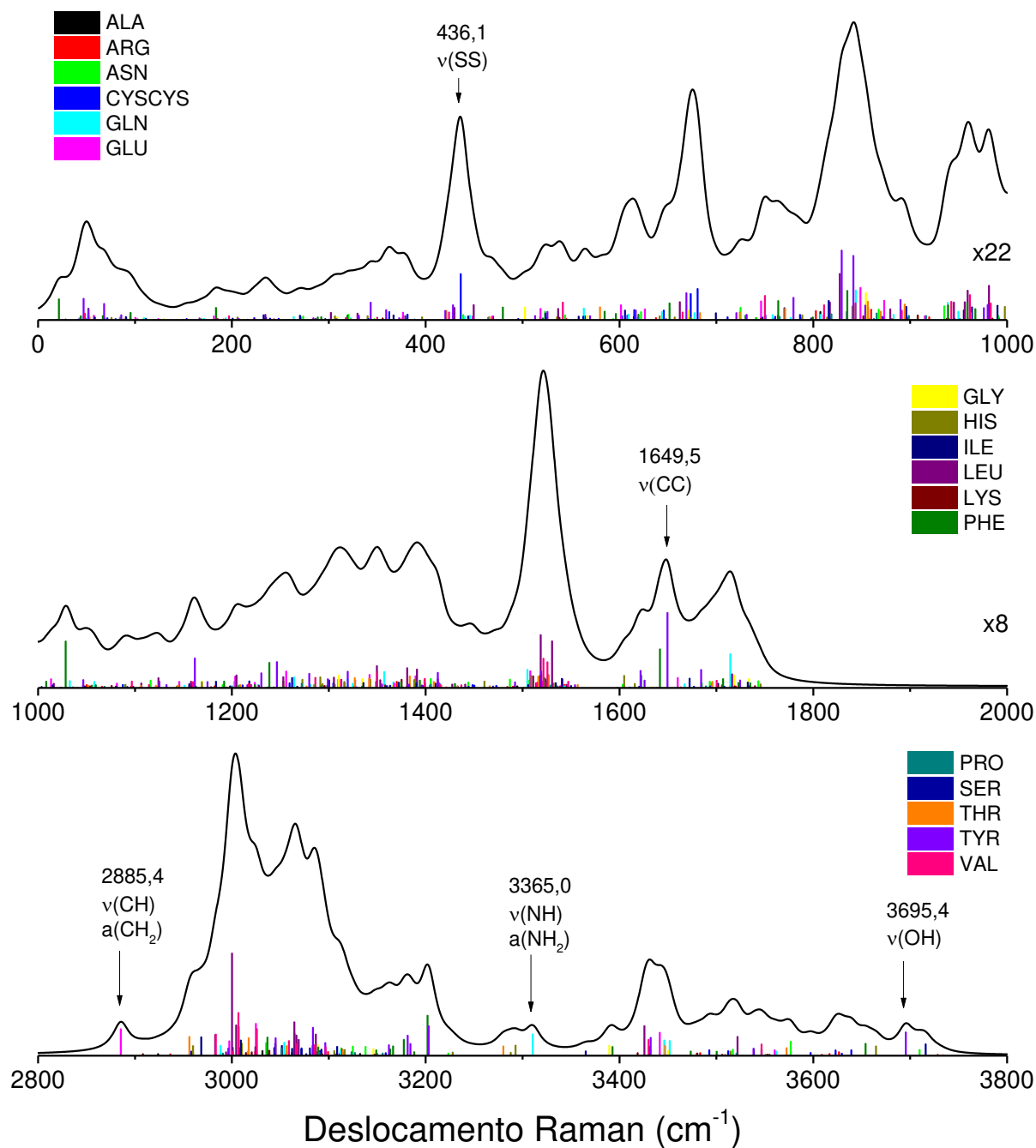


Tabela 2 - Assinalamento dos modos vibracionais característicos de alguns aminoácidos.

ESPECTRO INFRAVERMELHO		
Frequência (cm⁻¹)	Aminoácido	Assinalamento
359,3	TYR	$\tau(\text{CCOH})$
1059,6	PHE	$\rho(\text{COH})$
1530,7	GLU	$\nu(\text{OH})$
2885,4	GLU	$\nu(\text{CH}), a(\text{CH}_2)$
2908,2	LYS	$\nu(\text{NH})$
2923,8	ALA	$\omega(\text{NH}_2)$
2945,1	ARG	$\nu(\text{CH}), s(\text{CH}_2)$
3137,8	ASN	$\nu(\text{CH}), s(\text{NH}_3)$
3188,1	PHE	$\nu(\text{CH})$
3280,0	THR	$\nu(\text{OH})$
3365,1	SER	$\nu(\text{NH}), a(\text{NH}_2)$
3473,5	PHE	$\nu(\text{NH}), a(\text{NH}_2)$
3639,1	CYSCYS	$\nu(\text{OH})$
3654,0	PHE	$\nu(\text{OH})$
3695,4	TYR	$\nu(\text{OH})$
3709,6	ASN	$a(\text{NH}_2)$
ESPECTRO RAMAN		
Frequência (cm⁻¹)	Aminoácido	Assinalamento
436,12	CYSCYS	$\nu(\text{SS})$
1649,5	TYR	$\nu(\text{CC})$
2885,4	GLU	$\nu(\text{CH}), a(\text{CH}_2)$
3365,1	SER	$\nu(\text{NH}), a(\text{NH}_2)$
3546,0	VAL	$a(\text{NH}_2)$
3597,1	CYSCYS	$a(\text{NH}_2)$
3639,1	CYSCYS	$\nu(\text{OH})$
3654,0	PHE	$\nu(\text{OH})$
3664,34	HIS	$\nu(\text{NH})$

3695,4	TYR	$\nu(\text{OH})$
3709,6	ASN	$\alpha(\text{NH}_2)$
3716,0	SER	$\nu(\text{OH})$

Ao analisar os espectros gerados da segunda forma de fragmentação (FES), alguns picos característicos foram associados a determinados fragmentos da estrutura secundária (Tabela 3). Percebeu-se ainda que na Figura 13, na faixa entre 2300 cm^{-1} e 2500 cm^{-1} , uma banda de baixa intensidade fazia referência a três fragmentos (VEQCCT, GSHLVEALLYLVC, NYCN), estes apresentavam a mesma estrutura secundária, hélices alfas. Logo, essa banda característica, desta faixa específica, pode ser caracterizada como um artefato do método ao quebrar as pontes dissulfeto no momento da fragmentação. Como nestas estruturas de fragmentação, já se percebia a influência dos modos vibracionais coletivos nas regiões de frequência mais baixa, as bandas mais características ficaram mais evidentes na faixa de frequências maiores.

Na análise das Figuras 13 e 14, foram poucos os picos característicos que pudesse fazer referência a um determinado fragmento. Três fragmentos foram observados nas duas técnicas com a mesma faixa de frequência, foram eles: o fragmento GERGFFYTPKT, fita beta, na frequência de $2895,10\text{ cm}^{-1}$ com modo vibracional de estiramento $\nu(\text{NH})$ e o fragmento GSHLVEALLYLVC, hélice alfa, na frequência de $1769,14\text{ cm}^{-1}$ verificou-se assinalamento $\nu(\text{CO})$. O fragmento FVNQHLC na frequência $3356,02\text{ cm}^{-1}$ representava dois modos vibracionais $\nu(\text{NH})$ e $\delta(\text{NH}_2)$ e também foram observados no espectros duas técnicas. Enquanto estes fragmentos citados foram observados nos dois espectros dessa metodologia, algumas frequências só apareceram em uma das duas técnicas, por exemplo no Infravermelho, o fragmento que representava a fita beta, GERGFFYTPKT, na frequência de $3305,16\text{ cm}^{-1}$ equivale a um $\nu(\text{OH})$ e o fragmento característico da hélice alfa, GSHLVEALLYLVC, estava em $3237,45\text{ cm}^{-1}$ correspondendo a $\nu(\text{NH})$.

No espectro infravermelho (Figura 13), as frequências nas regiões mais baixas como $198,6$, $227,3$ e $348,4\text{ cm}^{-1}$ representaram respectivamente os fragmentos SICS, GSHLVEALLVC e GERGFFYTPKT, apresentando como vibração $\delta(\text{OH})$.

Tabela 3 - Assinalamento dos modos vibracionais característicos das estruturas secundárias.

ESPECTRO INFRAVERMELHO		
Fragmento	Frequência (cm⁻¹)	Assinalamento
GSHLVEALLYLVC	1769,14	v(CO)
GERGFFYTPKT	878,21	v(NH)
GERGFFYTPKT	2895,10	v(NH)
GERGFFYTPKT	3305,16	v(OH)
GSHLVEALLYLVC	3237,45	v(NH)
ESPECTRO RAMAN		
Fragmento	Frequência (cm⁻¹)	Assinalamento
LYQLE	835,94	δ(CC)
GSHLVEALLYLVC	1769,14	v(CO)
GERGFFYTPKT.	2895,10	v(NH)
FVNQHLC	3356,02	v(NH), s(NH ₂)

Figura 13 - Espectro Infravermelho da segunda metodologia de fragmentação (FES) por estrutura secundária.

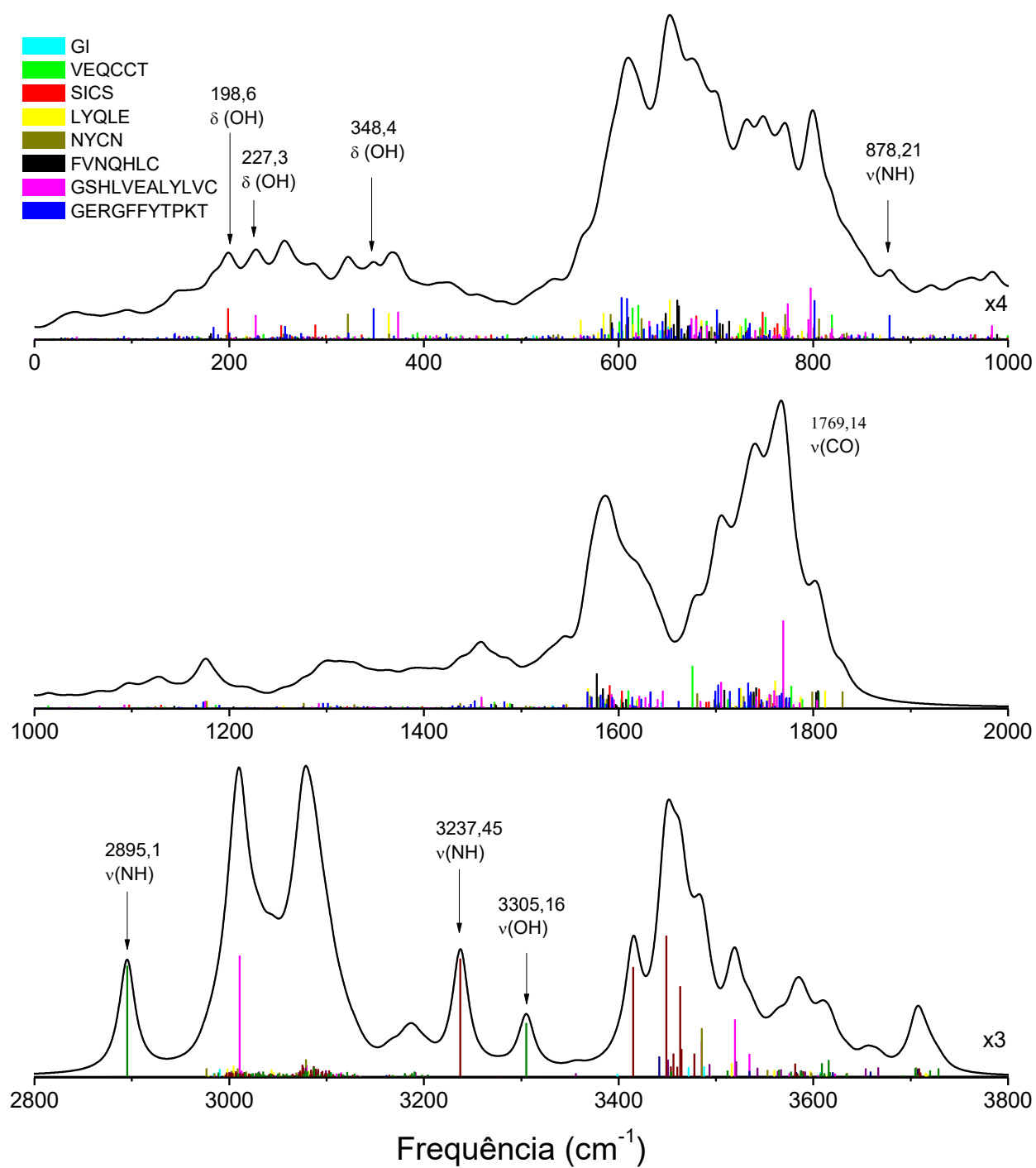
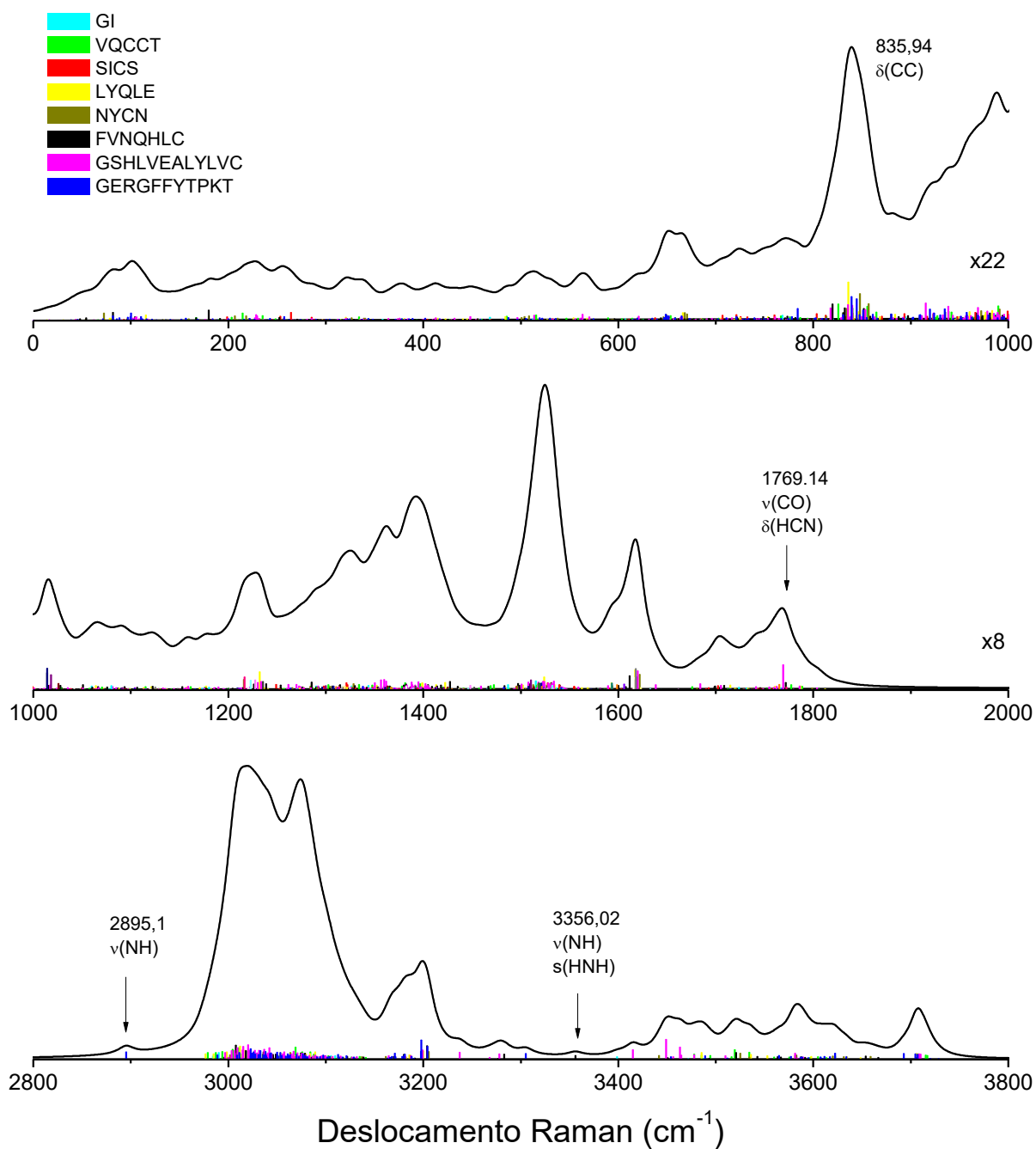


Figura 14 - Espectro Raman da segunda metodologia de fragmentação (FES) por estrutura secundária.



Ao observar os espectros gerados da terceira fragmentação (FPD), que foi levado em consideração as pontes dissulfeto, algumas bandas características foram observadas e feito o assinalamento destes fragmentos, como mostrado na Tabela 4. As frequências de 2675,33, 2892,30 e 3308,11 cm^{-1} que representam os Fragmentos 1, 5 e 7, respectivamente, foram percebidos tanto no Espectro Raman como no Infravermelho, apresentando os mesmos modos vibracionais. Outros modos de vibração estavam encobertos por modos mais intensos e por isso não puderam ser visualizados no espectro devido a sobreposição desses modos de maior intensidade. Como nas frequências mais baixas predominam os modos vibracionais coletivos, as bandas mais características foram percebidas a partir de 2600 cm^{-1} e a todos esses picos característicos foi observado o modo vibracional de estiramento entre N-H, no espectro Infravermelho isso é explicado porque como os aminoácidos se encaixam na categoria de aminas primárias e as soluções diluídas de aminas primárias e secundárias fornecem picos pronunciados na região de 3300-3500 cm^{-1} originados de vibrações de estiramento simétrico e assimétrico das duas ligações N-H.

Tabela 4- Assinalamento dos modos vibracionais característicos da fragmentação considerando as pontes dissulfeto.

ESPECTRO INFRAVERMELHO		
Fragmento	Frequência (cm^{-1})	Assinalamento
Fragmento 7	586,19	$\tau(\text{NNCC})$
Fragmento 1	1663,36	$\delta(\text{HNC})$
Fragmento 1	2675,33	$\nu(\text{NH})$
Fragmento 5	2892,30	$\nu(\text{NH})$
Fragmento 1	3124,74	$\nu(\text{NH})$
Fragmento 7	3196,31	$\nu(\text{NH})$
Fragmento 3	3274,37	$s(\text{NH}_2)$
Fragmento 7	3308,11	$\nu(\text{NH})$
ESPECTRO RAMAN		
Fragmento	Frequência (cm^{-1})	Assinalamento
Fragmento 6	646,5	$\nu(\text{SS})$
Fragmento 1	2675,33	$\nu(\text{NH})$
Fragmento 5	2892,30	$\nu(\text{NH})$
Fragmento 7	3308,11	$\nu(\text{NH})$

Figura 15 - Espectro Infravermelho da terceira metodologia de fragmentação (FPD) considerando as pontes dissulfeto.

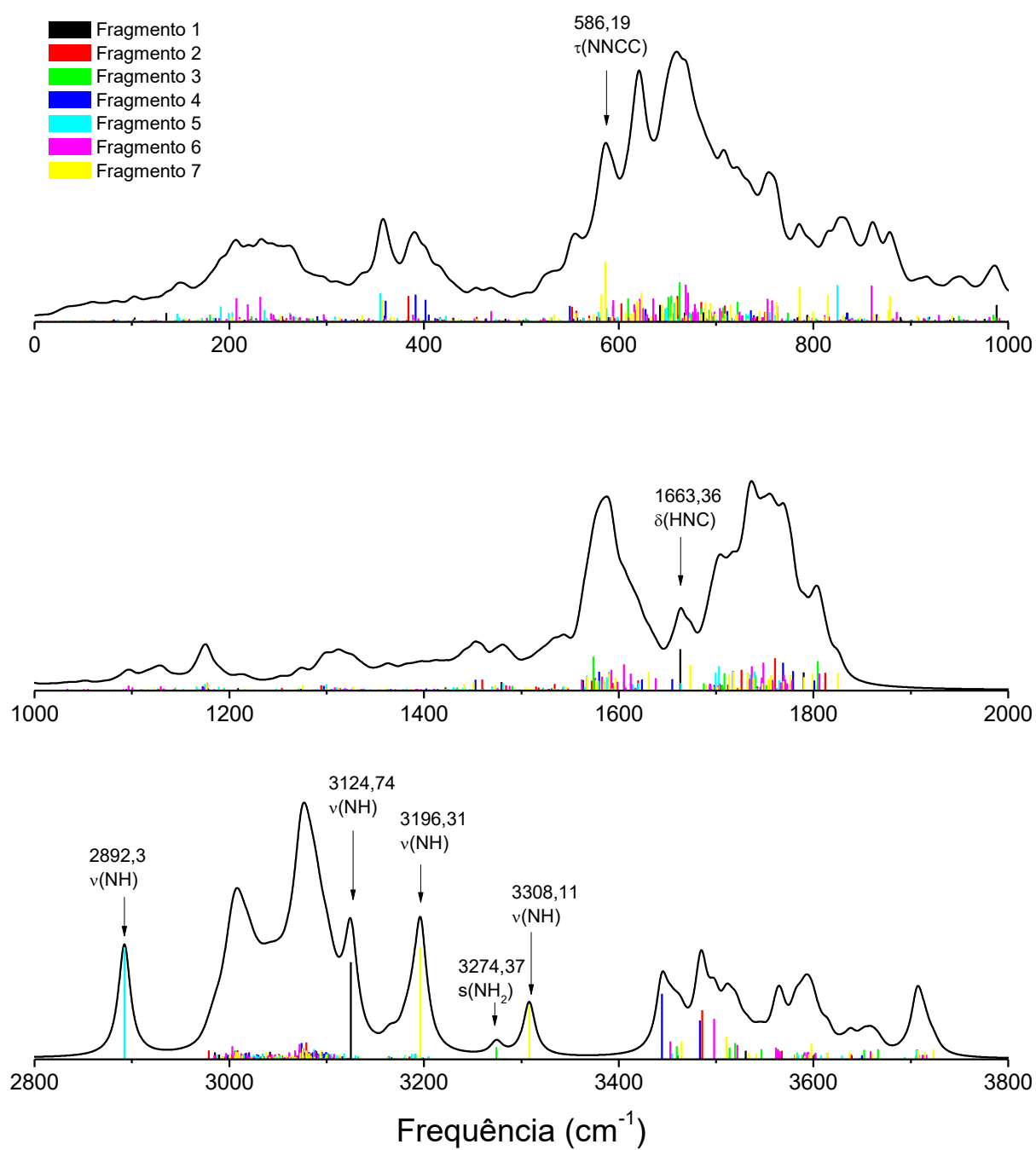
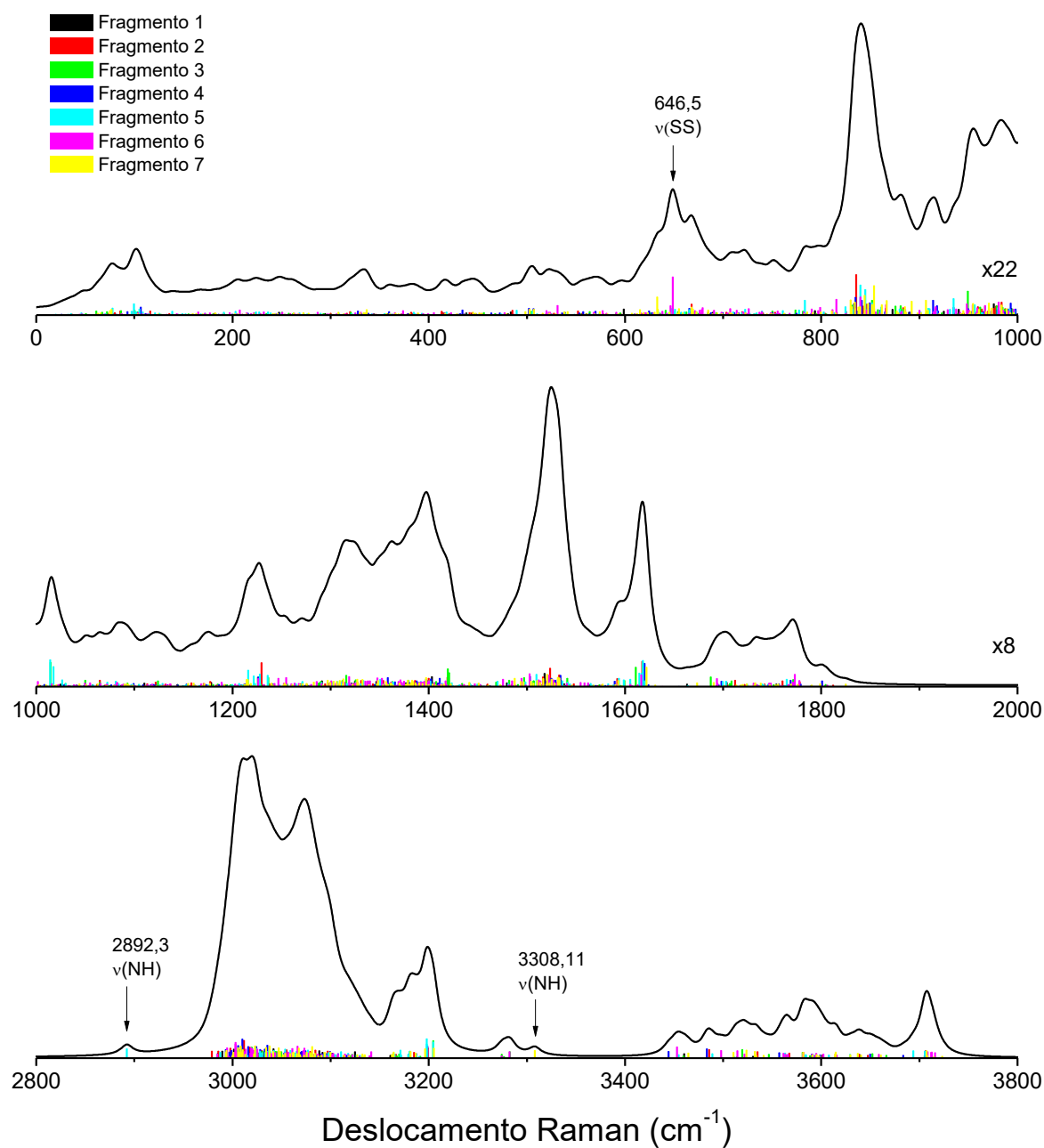


Figura 16 - Espectro Raman da terceira metodologia de fragmentação (FPD) considerando as pontes dissulfeto.



Analisando os espectros gerados pela quarta fragmentação (CAB) por cadeia, devido esse cálculo ter sido realizado no vácuo, pode-se verificar um deslocamento de frequências quando comparado os espectros das outras metodologias. Nos espectros desta, as frequências ultrapassam 4000 cm^{-1} , já nas outras metodologias isso não ocorre. Normalmente um deslocamento das frequências indica uma alteração na constante de força da ligação em questão. Os deslocamentos evidenciados nas regiões de frequência mais baixas indicam que as constantes de força associadas a cada um dos modos vibracionais diminuem com a inserção do solvente aqui representado pelo contínuo dielétrico onde a molécula encontra-se inserida.

Na Figura 17, existem mais barras verticais da cor azul que representam os modos normais da Cadeia B. Já na Figura 18, existem mais barras verticais vermelhas que representam os modos normais da Cadeia A. Isso se deve ao fato de que os átomos e moléculas da Cadeia B tendem a absorver radiações eletromagnéticas nas mesmas frequências em que as emitem, de modo que o espectro de absorção (IR) é obtido quando um espectro contínuo de luz atravessa uma molécula. No espectro Raman, os átomos e moléculas da Cadeia B embora não pudessem ser observados neste espectro, não pode-se dizer que não existem modos naquelas frequências e sim, devido à existência de modos mais intensos da Cadeia A que encobriram os modos da Cadeia B.

Foi feito o assinalamento de alguns picos dos Espectros IR e Raman, como está representado na Tabela 4. Na Figura 17, uma banda bem caracterizada e de maior intensidade em uma frequência de $3706,6\text{ cm}^{-1}$ representando a Cadeia B e apresenta como modo vibracional o $s(\text{NH}_2)$, $\nu(\text{NH})$. Na Cadeia B, na faixa de frequência que passa por $682,4$, $1544,9$, $925,7\text{ cm}^{-1}$ apenas uma parte da molécula vibrava, que representava a Treonina.

Tabela 5 - Assinalamento de algumas bandas características da fragmentação por cadeia.

ESPECTRO INFRABERMELHO		
Cadeia	Frequência (cm⁻¹)	Assinalamento
B	808,4	v(CC)
B	925,7	v(CC)
B	1544,9	a(CH ₂)
A	1208,7	v(NC)
B	3466,6	s(CH ₂)
B	3706,6	s(NH ₂), v(NH)

ESPECTRO RAMAN		
Cadeia	Frequência (cm⁻¹)	Assinalamento
B	682,4	a(CO ₂)
A	962,2	v(CC)
A	1647,7	δ(CH ₂)
A	1744,0	δ(NH ₂)
B	1913,8	a(CO ₂)
A	3388,6	s(CH ₂)
A	3901,4	v(NH)
A	3994,0	v(NH)
B	4129,7	v(NH)
A	4243,1	v(OH)

Figura 17 - Espectro Infravermelho quarta metodologia de fragmentação (CAB) por cadeia do monômero da insulina.

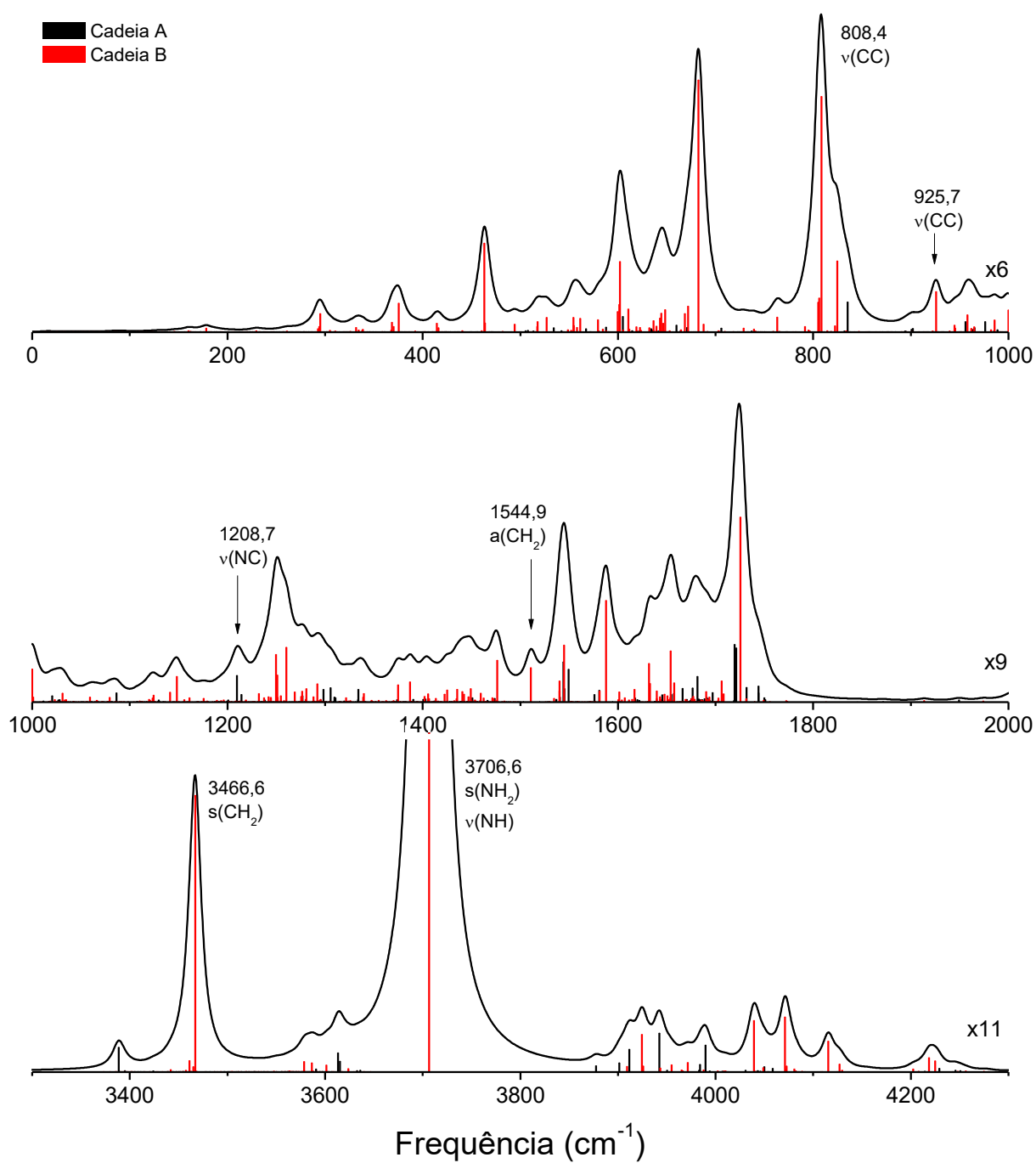
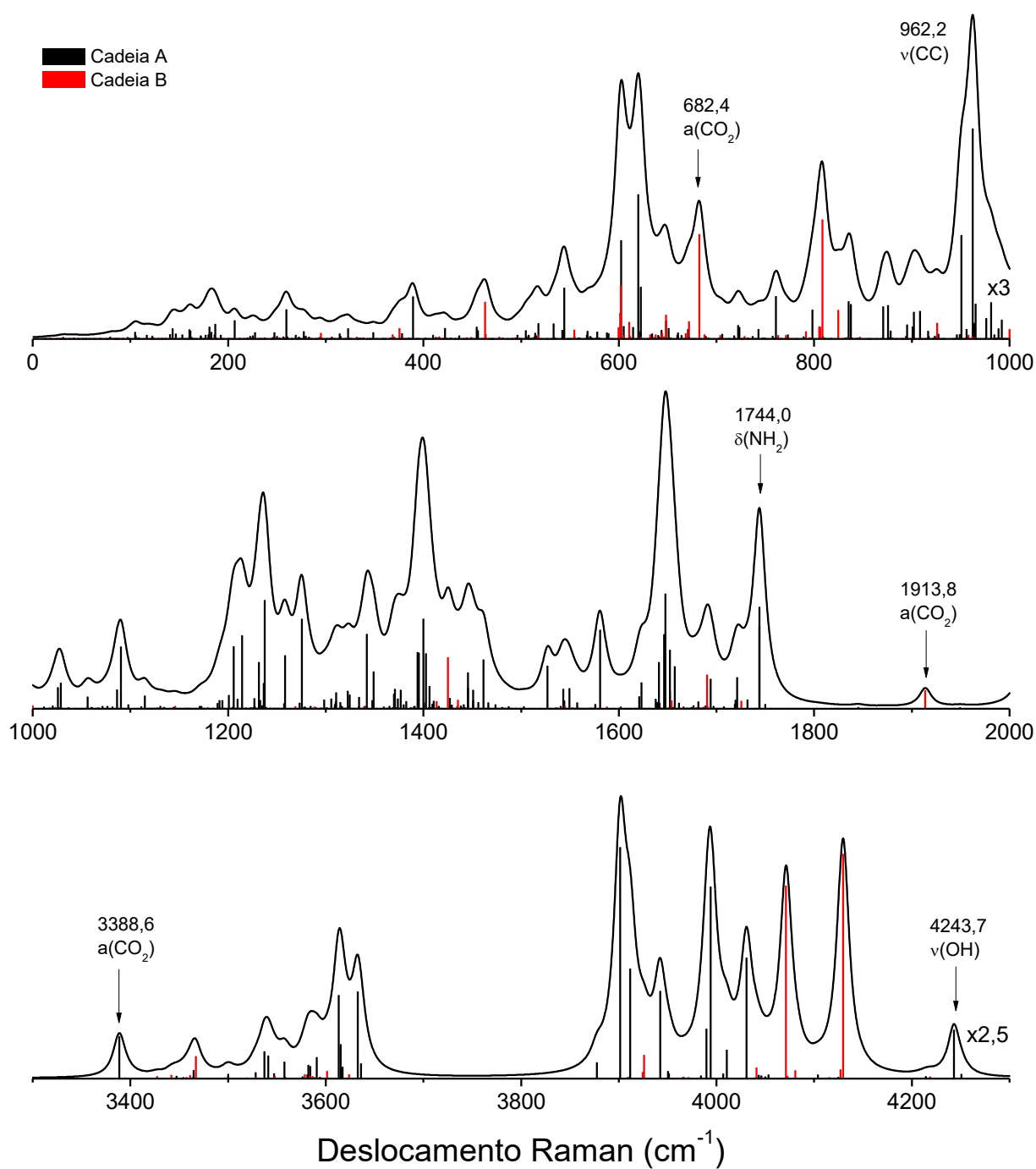


Figura 18 - Espectro Raman da quarta metodologia de fragmentação (CAB) por cadeia do monômero da insulina.



Ao confrontar todos os métodos, a fim de verificar um modo vibracional de algum aminoácido nas outras metodologias, a Tabela 5 mostra os deslocamentos de frequência para um mesmo modo vibracional nas diferentes metodologias. A banda na frequência de $2895,3\text{ cm}^{-1}$, que representava o Ácido Glutâmico, foi verificado de forma nítida nas três primeiras metodologias, só deixando de aparecer no espectro da quarta metodologia. Nos aminoácidos como Alanina, Serina e Cistina nas frequências $2923,8\text{ cm}^{-1}$, $3716,0\text{ cm}^{-1}$ e $3639,1\text{ cm}^{-1}$ respectivamente, não foi possível encontrar os mesmos modos vibracionais nas outras metodologias. Isso pode ser explicado, porque ao analisar apenas a nível de aminoácido não se leva em consideração as interações vibracionais entre os resíduos. Já nas demais metodologias, os fragmentos levavam em conta as interações. Apenas com um espectro vibracional experimental da insulina é que poderá ser indicado qual das quatro metodologia é a melhor forma de fragmentação para sistemas biológicos mais complexos.

Tabela 6 - Comparação dos modos normais entre as quatro metodologias.

ESPECTRO INFRAVERMELHO					
Aminoácido	Assinalamento	(AAI)	(FES)	(FPD)	(CAB)
		Frequência (cm⁻¹)	Fragmento/Freq	Fragmento/Freq	Fragmento/Freq
GLU	v(CH), a(CH ₂)	2885,4	LYQLE / 3009,8	Frag. 2 / 3023,6	CA / 3527,4
LYS	v(NH)	2908,2	GERGFFYTPKT/ 2895,1	Frag.5 / 2892,2	CB / 4058,4
ARG	v(CH), s(CH ₂)	2945,1	GERGFFYTPKT/ 3011,2	Frag.7/ 3008,3	CB / 3518,9
ASN	v(CH), s(NH ₃)	3137,8	NYCN / 3441,8	Frag.3/ 3581,0	CA / 4012,3
PHE	v(CH)	3188,1	FVNQHLC/ 3191,85	Frag.5/ 3187,5	CB / 3631,7
THR	v(OH)	3280,0	GERGFFYTPKT/ 3692,97	Frag.6/ 3708,43	CA / 4309,5
SER	v(NH), a(NH ₂)	3365,1	SICS / 3613,4	Frag.6/ 3590,7	CA / 3901,4
PHE	v(NH), a(NH ₂)	3473,5	FVNQHLC/ 3450,19	Frag.3/ 3513,8	CB / 4046,2
PHE	v(OH)	3654,0	FVNQHLC/ 3542,5	Frag.3/ 3546,5	CB / 4367,9
TYR	v(OH)	3695,4	LYQLE / 3705,5	Frag.2/ 3706,4	CA / 4362,9
ASN	a(NH ₂)	3709,6	NYCN / 3709,6	Frag.7 / 3707,9	CA / 4041,9

ESPECTRO RAMAN					
Aminoácido	Assinalamento	(AAI)	(FES)	(FPS)	(CAB)
		Frequência (cm⁻¹)	Fragmento/Freq	Fragmento/Freq	Fragmento/Freq
GLU	v(CH), a(CH ₂)	2885, 4	LYQLE / 3009,8	Frag. 2/ 3023,6	CA / 3527,4
SER	v(NH), a(NH ₂)	3365,1	SICS / 3613,4	Frag.6/ 3590,7	CA / 3901,4
VAL	a(NH ₂)	3546,01	VEQCCT / 3706,8	Frag.3/ 3705,5	CA / 4071,9
PHE	v(OH)	3654,0	FVNQHLC / 3542,4	Frag.3 / 3546,5	CB / 4367,9
HIS	v(NH)	3664,34	FVNQHLC / 3653,67	Frag.6/ 3658,6	CB/ 4081,0
ASN	a(NH ₂)	3709,6	NYCN / 3709,6	Frag.7/ 3707,9	CA / 4041,9

5 CONCLUSÃO

Tendo em vista os aspectos observados, pode-se fazer algumas considerações finais a cerca deste trabalho. Através da proposta de fragmentação para a proteína da insulina conseguiu-se associar determinados picos a fragmentos específicos e a ainda informar quanto ao modo vibracional característico. Observou-se que a banda característica na frequência em torno de 2500 cm^{-1} , espectro Raman, é decorrente da fragmentação das pontes dissulfeto qualquer que fosse a metodologia de fragmentação, caracterizando-se como um artefato do método.

Na primeira metodologia de aproximação de fragmentação por aminoácidos (AAI), percebeu-se que cada aminoácido apresenta modos vibracionais bem característicos em determinadas frequência. Alguns picos presentes nos dois espectros pôde caracterizar determinados aminoácidos como, Ácido Glutâmico na frequência de $2885,4\text{ cm}^{-1}$, Serina a $3365,1\text{ cm}^{-1}$, Cistina a $3639,1\text{ cm}^{-1}$, Fenilalanina a $3654,0\text{ cm}^{-1}$, Tirosina a $3695,4\text{ cm}^{-1}$ e Asparagina a $3709,6\text{ cm}^{-1}$.

Na segunda metodologia de fragmentação por estrutura secundária (FES), o fragmento GERGFFYTPKT, que representa a estrutura fita beta, estava presente nos dois espectros (Raman e IR) na frequência de $2895,10\text{ cm}^{-1}$. Somente no espectro IR ainda se verificou que o fragmento GERGFFYTPKT ainda estava de forma bem definida na frequência de $3305,16\text{ cm}^{-1}$. E a estrutura de hélice alfa, característica do fragmento GSHLVEALLYLVC estava a uma frequência de $3237,45\text{ cm}^{-1}$. Já no espectro Raman, o fragmento FVNQHLC, característico da estrutura hélice alfa se destacou em $3354,78\text{ cm}^{-1}$.

Na terceira metodologia considerando as pontes dissulfeto (FPD), os fragmentos 1, 5 e 7, estavam em frequências características de $2675,33$, $2892,30$ e $3308,11\text{ cm}^{-1}$, respectivamente. Estes modos vibracionais foram percebidos tanto no espectro Raman como IR. Já na fragmentação por cadeia (CAB), verificou-se que a Cadeia A apresentou mais modos vibracionais ativos na técnica Raman e a Cadeia B modos vibracionais ativos na técnica Infravermelho.

Através da metodologia de fragmentação para sistemas biológicos grandes, proposto neste trabalho, pôde-se verificar aspectos vibracionais das partes que compõe o monômero da insulina e ainda gerar um espectro completo desta proteína de acordo com cada metodologia proposta.

Mais análises se faz necessário para um melhor entendimento da estrutura vibracional do monômero de insulina. Apenas alguns modos dos espectros foram assinalados, sendo assim necessária a descrição de uma quantidade maior de modos para se fazer um estudo mais detalhado da estrutura em questão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLOUCHE, A. **Gabedit—a graphical user interface for computational chemistry softwares**. Journal of computational chemistry, 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.21600/full>>. Acesso em: 23/06/2015.
- ATKINS, Peter; PAULA, Julio De. **Físico-química: fundamentos**. Rio de Janeiro: LTC, 2011. 493 p. ISBN: 9788521618652.
- ATKINS, Peter; PAULA, Julio De. **Físico-química**. Rio de Janeiro: LTC, 2012. 386p. p. v.1. ISBN: 9788521621041.
- ATKINS, Peter; PAULA, Julio De. **Elements of Physical Chemistry**. Fifth Edit ed. W. H. Freeman and Company, 2009.
- Atlas da Diabete. Disponível em: <http://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014_ES.pdf> Acesso em: 11 de junho de 2015
- BARBOSA, André G. H. **A Estranha e Contraditória Relação entre os Químicos e a Química teórica**. Rev. Virtual Quim. Vol 1, nº. 3, Jun, 2009.
- BROWN, Theodore L et al. **Química: a ciência central**. 9. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2007. 972 p. ISBN: 8587918427.
- CUSTÓDIO et al. **Quatro alternativas para resolver a equação de Schrödinger para o átomo de hidrogênio**. Química Nova, Vol. 25, No. 1, 159-170, 2002.
- DEVLIN, Tomaz M. **Manual de bioquímica com relações clínicas**. 7.ed. São Paulo: Blucher, 2011. ISBN: 9788521205920.
- DUARTE, Hélio A. **Índices de reatividade química a partir da teoria do funcional de densidade: formalismo e perspectivas**. Quim. Nova, Vol. 24, No. 4, 501-508, 2001.
- ESTEVES, L. F.; COSTA, L.A. S. **Investigação computacional sobre a espectroscopia de dicroísmo circular vibracional (VCD) dos aminoácidos R-alanina e S-alanina**. Rev. Virtual Quim, Vol 6 , No. 4, 924-936 , 2014.
- FARIA, D.L.A. de et al. **Uma demonstração sobre o espalhamento inelástico de luz: repetindo o experimento de Raman**. Química Nova, v.20, n.3 (1996)
- IUPAC. **Glossary of terms used in medicinal chemistry**. Iupac recommendations 2008. Disponível em: < <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/medchem/ah.html> > Acesso em: 27/06/2015.
- JÚNIOR, Petrus Alcantara. **Espectroscopia Molecular**. Curso Física Moderna II, Março 2002.
- KARP, Gerald. **Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos**. 3.ed. Barueri, São Paulo: Manole, 2005. ISBN: 8520415938.

LÁZARO, Sérgio R et al. **Propriedades eletrônicas e estruturais do pbtiO_3** : teoria do funcional de densidade aplicada a modelos periódicos. *Química Nova*, v.28, n.1, p.10-18, 2005.

LEAL et al. **A Química Quântica na compreensão de teorias de Química Orgânica**. *Química Nova* vol.33 no.5, p 211-215. São Paulo, 2010.

apresentação para o ensino médio. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 34, n. 2, p. 2504, 2012.

LIMA, D.G. de. **Caracterização dos Modos Vibracionais da α -Glicina por Métodos Ab-Initio**. 2008. 72 f. Dissertação (Mestrado em Física) - Instituto de Física. Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá. 2008.

LASCHUK, Eduardo F. **Novo formalismo semi-empírico para cálculos químico-quânticos**. 2005. 143f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2005.

MARQUES, Miguel A. L.; BOTTI, Silvana. **O que é e para que serve a teoria do funcional de densidade?** *A Gazeta de Física*. Sociedade Portuguesa de Física, Lisboa, v. 29, n. 04, p. 10-15, jul. 2006.

MORGON, Nelson Henrique. **Computação em química teórica**: informações técnicas. *Quím. Nova*. 2001, vol.24, n.5, pp. 676-682. ISSN 1678-7064.

MORGON, Nelson H; CUSTODIO, Rogério. **Teoria do Funcional de Densidade**. *Quím. Nova*. 1995, vol.18, n.1, pp.44-55

ORTOLAN, Alexandre O. **Apostila de práticas de química computacional**. 2014. 88 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Licenciatura em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco.

PEREGRINO, Maurício. **Verdades e mentiras sobre doenças**. 1.ed. Rio de Janeiro: Brasport, 2005. ISBN: 8574522430

PESSOA JÚNIOR, Osvaldo. **Conceitos de Física Quântica**. 1.ed. São Paulo: Livraria da Física, 2003. ISBN: 8588325179

PINHEIRO, Nilcéia Aparecida M et al. **O contexto científico-tecnológico e social acerca de uma abordagem crítico –reflexiva**: perspectiva e enfoque. *Revista Iberoamericana de Educación*. n.º 49/1- 25 de março de 2009. Editora: Organización de Estados Iberoamericanos para la Educación, la Ciencia y la Cultura (OEI)

RAUPP, D., SERRANO, A., MARTINS, T.L.C. **A Evolução da Química Computacional e sua Contribuição para a Educação em Química**. *Revista Liberato*, Novo Hamburgo, v. 9, n. 12, p. 13-22, jul./dez. 2008.

RODRIGUES, Ariano de G; GALZERANI, José C. **Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência**: potencialidades e complementaridades. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 34, n. 4, 4309 (2012)

SANT'ANNA Carlos M. R. **Métodos de Modelagem Molecular para Estudo e Planejamento de Compostos Bioativos:** Uma Introdução. Rev. Virtual Quim. Vol 1, No. 1, p.49-57, 2009.

SINZER, F.S; WHITNEY, E.N. **Nutrição:** conceitos e controvérsias. 8.ed. São Paulo: MANOLE, 2003. ISBN: 8520411975

SOLOMONS, T. W. Graham; FRYHLE, Craig B. **Química orgânica.** Rio de Janeiro: LTC, 2012. 616p. v.1. ISBN: 9788521620334.

TREVISAN, Marcello G; POPPI, Ronei J. **Química Analítica de Processos.** Química Nova, Vol. 29, No. 5, p.1065-1071, 2006.

VESSECCHI et al. **Aplicação da química quântica computacional no estudo de processos químicos envolvidos em espectrometria de massas.** Quim. Nova, Vol. 31, No. 4, 840-853, 2008.

VOET, Donald et al. **Fundamentos da Bioquímica:** a vida em nível molecular. 4.ed. Porto Alegre : LTDA Artmed, 2014. ISBN: 9780470547847 / 0470547847

WASS, J. A. **SOFTWARE:** Modeling Molecules. Science, v. 290, n. 5499, p. 2098,2000.
Disponível em

<<http://www.sciencemag.org.ez48.periodicos.capes.gov.br/content/290/5499/2098.1.full?sid=5a68e97c-ec8d-48e6-a364-a9ac9ac3e7dd>> Acesso em: 23/06/2015