

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE FÍSICA GLEB WATAGHIN

FRANCISCO ALÍRIO ALMEIDA GOMES DE  
MOURA

ESTRATÉGIAS COMPUTACIONAIS PARA  
ESCOLHA DE MONÔMEROS PARA SÍNTESE  
DE POLÍMEROS MOLECULARMENTE  
IMPRESSOS (MIPs).

DISSERTAÇÃO de MESTRADO  
APRESENTADA AO INSTITUTO  
DE FÍSICA DA UNICAMP PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
MESTRE em FÍSICA

ORIENTADOR: DOUGLAS SOARES GALVÃO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELO ALUNO, E ORIENTADA PELO PROF. DR.



Douglas Soares Galvão

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
VALKÍRIA SUCCIVICENTE – CRB8/5398 - BIBLIOTECA DO IFGW  
UNICAMP

M865e	<p>Moura, Francisco Alirio Almeida Gomes de, 1985- Estratégias computacionais para escolha de monômeros para síntese de polímeros molecularmente impressos (MIPs) / Francisco Alirio Almeida Gomes de Moura. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: Douglas Soares Galvão. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física "Gleb Wataghin".</p> <p>1. Polímeros molecularmente impressos. 2. Simulação computacional. I. Galvão, Douglas Soares, 1961- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Física "Gleb Wataghin". III. Título.</p>
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Computational strategies for monomers selection for the synthesis of molecularly imprinted polymers (MIPs)

**Palavras-chave em inglês:**  
Molecularly imprinted polymers  
Computational simulation

**Área de Concentração:** Física

**Títuloção:** Mestre em Física

**Banca Examinadora:**

Douglas Soares Galvão [Orientador]

Antonio R Iul J únior

Mario Noboru Tamashiro

**Data da Defesa:** 15-05-2012

**Programa de Pós-Graduação em:** Física



MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE FRANCISCO ALÍRIO ALMEIDA GOMES DE MOURA – R.A. 060927 APRESENTADA E APROVADA AO INSTITUTO DE FÍSICA "GLEB WATAGHIN", DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, EM 15 / 05 / 2012.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Douglas Soares Galvão - Orientador do Candidato  
DFA/IFGW/UNICAMP

Prof. Dr. Antonio Riul Júnior – DF/UNESP

Prof. Dr. Mario Noboru Tamashiro – DFA/IFGW/UNICAMP

## Agradecimentos

Agradeço a todos que tornaram possível essa dissertação. Aos meus pais, que me deram as condições para que eu chegasse até aqui, ao meu orientador Douglas Galvão que me ensinou muito desde a graduação, e aos colegas do grupo de pesquisa que me ajudaram durante a minha trajetória. Agradeço também ao CNPq pelo suporte financeiro.

*Resumo*

Nesse estudo, investigamos, utilizando ferramentas computacionais, o problema do desenvolvimento racional de polímeros molecularmente impressos (MIP). Utilizamos vários tipos de simulações moleculares: dinâmica molecular, simulated annealing e método de Monte Carlo para alcançar uma seleção de monômeros funcionais baseada em uma biblioteca de monômeros candidatos para uma dada substância-alvo de interesse. Aplicamos esses métodos à simulação das soluções pré-polimerização para a construção de um MIP para a substância  $17\beta$ -estradiol, que é uma molécula orgânica de interesse médico e ambiental. Fomos bem sucedidos em simular a solução pré-polimerização para nove monômeros diferentes e construímos uma lista ordenada de possíveis melhores candidatos dentre esses nove.

**Palavras-chave:** Polímeros molecularmente impressos, Simulação computacional, MIP

*Abstract*

In the present study, we investigated by means of computational tools, the problem of rational design of Molecularly Impressed Polymers (MIP). We used several different types of simulations: molecular dynamics, simulated annealing and Monte Carlo method to achieve a selection of functional monomers based on a library of candidates for the functional monomers for some given target substance of interest. We applied these methods to pre-polymerization solutions for the design of a MIP for the substance  $17\beta$ -estradiol, which is an organic molecule of medical and environmental interest. We were successful in simulating the pre-polymerization solutions for nine different monomers and building an ordered list of possible best monomers among these candidates.

**Keywords:** Molecularly imprinted polymers, Computational simulation, MIP

# Lista de Figuras

1.1	Esquema da síntese e utilização de um MIP genérico, retirado da referência [1] . . . . .	3
1.2	Processo de síntese dos MIPs para teste em laboratório, adaptado da referência [1] . . . . .	5
1.3	Fórmulas químicas para a substância alvo e os 9 monômeros funcionais, e monômero estrutural testados . . . . .	7
1.4	Exemplos representativos das interações não covalentes possíveis . . . . .	8
2.1	Figura ilustrativa do processo de simulated annealing, paisagem de energia para uma mudança arbitrária de conformação na solução . . . . .	16
3.1	Monômero funcional 4VP ligado ao estradiol em vácuo . . . . .	21
3.2	Estágios na formação e quebra de uma ponte de hidrogênio entre o estradiol e o monômero estrutural . . . . .	23
3.3	Porcentagem de <i>snapshots</i> que possuem ligações de hidrogênio entre monômero funcional e 3-OH ou 17-OH do estradiol . . . . .	25

# Lista de Tabelas

1.1	Substâncias-alvo para as quais já foram registrados MIPs na literatura [1] . . . . .	4
3.1	Ordem dos monômeros funcionais candidatos por energia mínima de ligação . . . . .	24
3.2	Ordem dos monômeros funcionais candidatos por simulated annealing . . . . .	25
3.3	Ordem dos monômeros funcionais candidatos por Monte Carlo . . . . .	26
4.1	Resumo das ordens encontradas por todos os métodos de análise . . . . .	28
4.2	Ordenação dos monômeros encontradas na literatura[2] . . . . .	29

# Lista de Acrônimos

<b>2VP</b>	2-Vinil Piridina
<b>4VP</b>	4-Vinil Piridina
<b>AST</b>	Acetoxiestireno
<b>DEAEMA</b>	Dietil-2-Aminoetil Metacrilato
<b>DVB</b>	Divinilbenzeno
<b>GAFF</b>	<i>General AMBER Force Field</i> (Campo de Forças AMBER Geral)
<b>HEMA</b>	2-Hidroxietyl Metacrilato
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alto Desempenho)
<b>MAAM</b>	Metacrilamida
<b>MAA</b>	Ácido Metacrílico
<b>MIP</b>	<i>Molecularly Imprinted Polymer</i> (Polímero Molecularmente Impresso)
<b>NVP</b>	N-Vinil Pirrolidona
<b>TFMAA</b>	Ácido Trifluorometacrílico

# Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Metodologia</b>	<b>10</b>
2.1	Dinâmica molecular clássica . . . . .	10
2.2	Termostato de Nosé-Hoover . . . . .	12
2.3	Simulated Annealing . . . . .	15
2.4	Método de Monte Carlo . . . . .	17
<b>3</b>	<b>Resultados</b>	<b>20</b>
3.1	Simulação direta . . . . .	21
3.2	Simulated annealing . . . . .	24
3.3	Monte Carlo . . . . .	26
<b>4</b>	<b>Conclusões</b>	<b>27</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>29</b>

# Capítulo 1

## Introdução

Polímeros molecularmente impressos (*MIPs*, da sigla em inglês para *Molecularly Imprinted Polymers*) são polímeros especificamente desenhados para serem capazes de se ligar a uma substância alvo utilizando um comportamento chave-fechadura semelhante à ação de enzimas ou anticorpos naturais [1]. A síntese de tais polímeros se baseia em uma solução composta pela molécula-alvo, monômeros funcionais polimerizáveis capazes de interagir com a mesma, e monômeros estruturais que formarão a estrutura polimérica porosa onde se formarão espaços no formato físico-químico da molécula-alvo. Tudo isso em meio a um solvente capaz de solvatar tais componentes, em geral em baixa concentração, já que para o funcionamento do polímero é necessário que ele contenha poros por onde a substância possa entrar em contato com o espaço deixado na sua forma no subsequente estágio de religação. Tal processo se encontra esquematizado na 1.1.

O primeiro registro de MIP data de 1931 [1], com a tentativa de separar diferentes corantes utilizando uma matriz de sílica por um processo semelhante ao utilizado atualmente. Durante muito tempo, até por volta dos anos 80, essa pesquisa ficou estagnada por falta de interesse ou capacidade de desenvolvimento e síntese dos polímeros, porém, a área vem tendo uma crescente atenção do meio acadêmico com cada vez mais trabalhos publicados por ano, devido ao surgimento de novas técnicas computacionais e de análise, e de computadores potentes o suficiente para as simulações necessárias [3–10]. MIPs podem ser usados basicamente como sensores ou separadores dentro de uma solução, em ambos os casos a possibilidade de reutilização do MIP é de extrema importância, porém mais do que isso, no primeiro caso, a maior vantagem sobre outras técnicas é a capacidade de detectar rapidamente, em testes que duram tipicamente segundos, contaminações

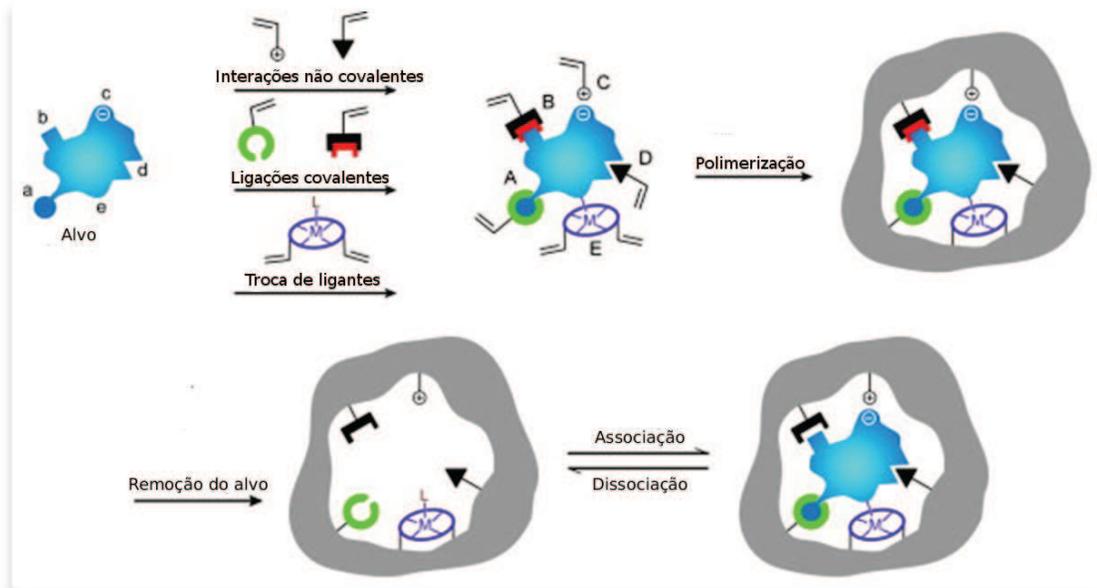


Figura 1.1: Esquema da síntese e utilização de um MIP genérico, retirado da referência [1]

em concentrações tão baixas quanto ng/mL [11] com uma baixíssima taxa de resultados falso-negativos. Por isso existem atualmente aplicações nas mais diversas áreas desde detecção de agentes poluidores [11–20] até a de explosivos para aplicações militares e de segurança [21–23]. Se feitos como membranas ou colunas de fragmentos compactados, podem ser utilizados como separadores ou extratores, sendo capazes de diferenciar até um isômero óptico com uma ótima margem de precisão [11], e serem usados na área médica como detectores de marcadores para doenças ou drogas [24–27] e matrizes de liberação controlada de medicamentos [28–30].

As propriedades comuns a todos os MIPs que os tornam mais desejáveis que as outras alternativas como *imunoassays* [31] são a sua alta estabilidade física e química, sendo um plástico basicamente ele é resistente às mudanças de temperatura e contato com ácidos e bases, além de serem reutilizáveis, já que para retirar a substância do MIP uma vez que um teste tenha sido feito basta lavá-lo novamente com solvente. Isso torna a produção e utilização de um MIP muito mais eficiente em termos de tempo e recursos financeiros do que outros métodos. Além do que, MIPs tem sido desenvolvidos para os mais variados tipos de substâncias, desde estruturas muito pequenas como aminoácidos isolados, passando por macro-moléculas de proteínas, até células inteiras, com um variável

Tabela 1.1: Substâncias-alvo para as quais já foram registrados MIPs na literatura [1]

Substâncias	Exemplos
Aminoácidos	Aminoácidos livres e derivados
Peptídeos	Encefalina, oxitocina
Esteróides	Colesterol, testosterona, estrogênio
Carboidratos	Açúcares derivados, glicosídeos
Nucleotídeos	Adenosina 5'-monofosfato, Inosina 5'-monofosfato
Pesticidas	Atrazina
Íons metálicos	$\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$
Drogas	Propranolol, morfina, nicotina, penicilina
Proteínas	Transferrina, mioglobina, uroquinase
Micro-organismos	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>
Cristais	Calcita

grau de sucesso, no entanto o maior interesse se concentra em substâncias que sejam poluidoras, tóxicas, ou de interesse médico. Um apanhado das substâncias para as quais já foram registrados MIPs aplicáveis se encontra na tabela 1.1.

As características finais de um MIP dependem tanto dos monômeros e solvente utilizados [32–35] quanto das condições de síntese tais como temperatura e concentrações [36, 37]. O método utilizado hoje para a determinação desses parâmetros ótimos durante a síntese é baseado em análise combinatória empírica em laboratório [38]. Inicialmente, é proposta uma biblioteca de monômeros e solventes candidatos para a substância de interesse baseada em considerações químicas sobre as interações desejadas entre monômeros funcionais e molécula-alvo, e então essa biblioteca é testada fazendo-se todas as combinações possíveis entre esses 3 fatores, sintetizando e testando cada polímero destes em um processo esquematizado na figura 1.2 onde uma pequena quantidade de polímero é feita no fundo de um tubo de teste, e depois ajustando finamente as condições de síntese para o monômero que for julgado mais apropriado nessa primeira etapa. Esse processo é custoso tanto em termos financeiros quanto de tempo, e portanto é um dos empecilhos para uma adoção mais ampla da tecnologia de MIPs, em favor das tecnologias mais antigas de ensaios com anticorpos ou enzimas.

É essa parte do processo de desenvolvimento de um MIP que desejamos investigar com o presente trabalho, tentando propor estratégias para os métodos de escolha dos melhores monômeros candidatos sem a necessidade dos testes laboratoriais. Aplicamos uma

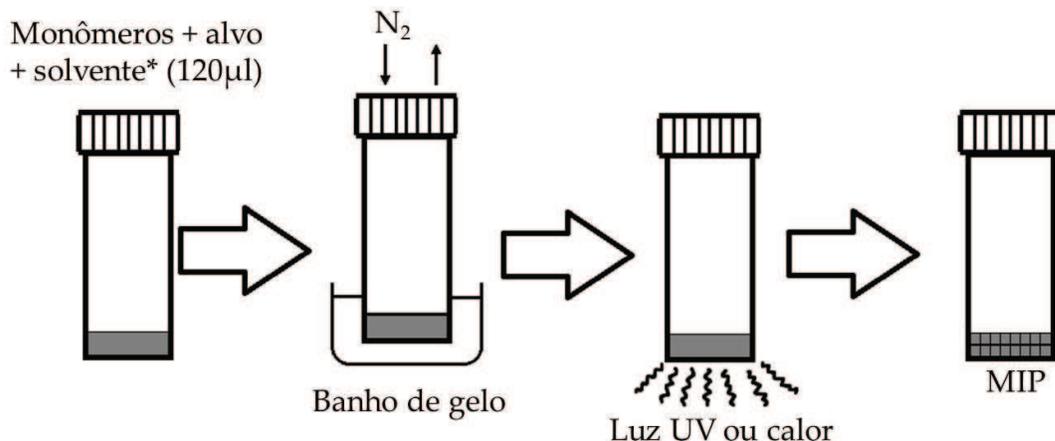


Figura 1.2: Processo de síntese dos MIPs para teste em laboratório, adaptado da referência [1]

variedade de métodos computacionais na simulação da solução pré-polimerização buscando uma forma prática e rápida de testarmos conjuntos e concentrações de monômeros funcionais, estruturais e solventes, sem a necessidade de síntese de cada MIP candidato. Existem muitos métodos documentados na literatura para o mesmo propósito, variando de dinâmica molecular clássica [10] até simulações quânticas *ab initio* [39]. Os métodos escolhidos foram selecionados com base na sua rapidez e acessibilidade, tornando possível uma análise de uma biblioteca grande de monômeros candidatos em um tempo muito menor do que o método tradicional.

Nesse trabalho focamos nossa atenção na substância  $17\beta$ -estradiol, ou mais simplesmente estradiol ou E2, que é um hormônio considerado um grave agente poluidor de águas fluviais capaz de causar danos à vida selvagem e humana na forma de defeitos congênitos, anomalias no sistema reprodutivo, e elevado risco de câncer [12]. É tóxico em concentrações extremamente baixas, o que dificulta a sua detecção e remoção das águas usadas para consumo humano. Portanto, tem sido uma substância que atrai grande interesse na área de técnicas de detecção e separação em solução. Existe vasta literatura sobre polímeros aplicados a essa substância [12–20], e em especial um estudo por Dirion *et al.* [40] onde combinações de vários monômeros funcionais, estruturais e solventes foram testados para essa substância, gerando resultados com os quais comparamos os obtidos pelo nosso estudo. Testamos uma seleção de 9 monômeros candidatos, cujas estruturas, assim como a da molécula-alvo, estão representadas na figura 1.3, e um dos nossos objetivos foi extrair

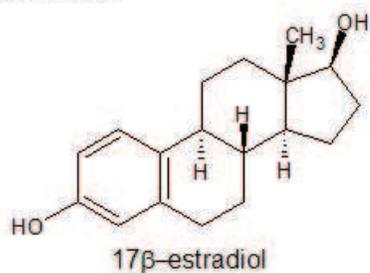
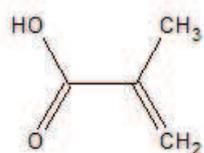
informações das simulações computacionais que permitam obter uma ordem na lista de monômeros, do melhor candidato ao pior, para o acoplamento seletivo do estradiol.

Existem dois conceitos de importância quando consideramos a eficiência de um MIP, que são a afinidade e a seletividade do mesmo[1]. Afinidade diz respeito a quão fortemente o MIP é capaz de se ligar à molécula-alvo. A medida da afinidade é dada pela quantidade de moléculas-alvo que o MIP é capaz de reter quando posto em contato com uma solução que a contém. A outra medida, seletividade, é a razão entre a afinidade do MIP com a molécula-alvo e a afinidade do mesmo com outra molécula análoga com alguma pequena modificação. Em outras palavras, um MIP é perfeito se é capaz de reter com muita eficiência a molécula-alvo ao mesmo tempo em que deixa passar totalmente moléculas muito semelhantes a ela.

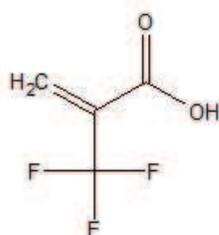
O processo laboratorial pelo qual se avalia um MIP consiste em sintetizar para cada conjunto de monômeros candidatos um MIP e um não-MIP (ou nMIP), que é um polímero sintetizado nas mesmas condições do MIP mas na ausência da molécula-alvo, gerando portanto um polímero de estrutura aleatória não relacionada à molécula-alvo. Em seguida, mede-se a absorção dos dois para a substância-alvo, em geral por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Se a absorção do MIP é significativamente maior que a do nMIP, podemos concluir que existe uma afinidade, e na próxima etapa, utilizando substâncias semelhantes à molécula-alvo podemos avaliar a seletividade como a razão entre a absorção do alvo e a da substância análoga [2].

Os 4 elementos que participam da síntese do MIP e podem influenciar nos dois fatores de qualidade do MIP são: a molécula-alvo, monômero estrutural, monômero funcional e solvente. Cada um desses elementos deve ser considerado na hora de desenvolvermos um novo MIP. Existem atualmente MIPs para várias classes de substâncias-alvo variando de coisas tão pequenas quanto íons, a grandes como células completas [41]. Os casos mais promissores são para moléculas médias (até 100 átomos constituintes), orgânicas, e rígidas, já que uma molécula capaz de deformações muito grandes, como é o caso da maioria das proteínas e outras biomoléculas grandes, podem gerar poros dentro do MIP que dependem de uma certa configuração só alcançável durante o processo de polimerização e não encontrada livre em solução [42]. Outros fatores como a existência de mais de um ponto de interação também são importantes para a afinidade e seletividade do MIP.

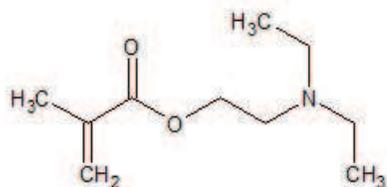
Quanto aos monômeros funcionais, são escolhidos de acordo com a interação que desejamos obter com a molécula-alvo. Essas interações podem ser do tipo covalente, onde o monômero se liga covalentemente à molécula-alvo com a vantagem que tal ligação garante

**Molécula-alvo****Monômeros funcionais****Ácidos**

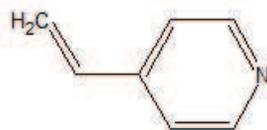
MAA



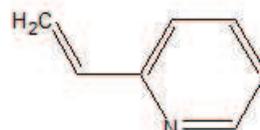
TFMAA

**Básicos**

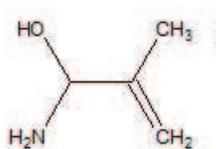
DEAEMA



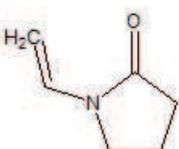
4VP



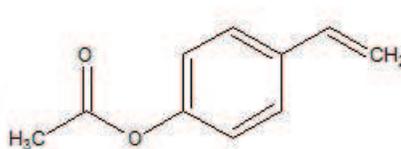
2VP

**Neutros**

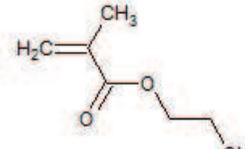
MAAM



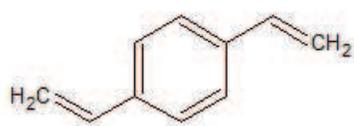
NVP



AST



HEMA

**Monômero estrutural**

DVB

Figura 1.3: Fórmulas químicas para a substância alvo e os 9 monômeros funcionais, e monômero estrutural testados

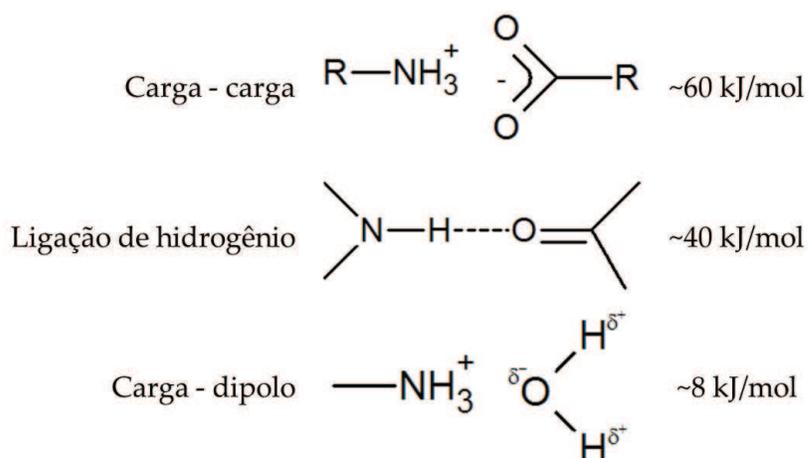


Figura 1.4: Exemplos representativos das interações não covalentes possíveis

uma alta energia de ligação (da ordem de 500 kJ/mol) [43]. Isso permite, portanto, uma afinidade maior, além de fornecer automaticamente proporções estequiométricas entre o alvo e os monômeros funcionais e viabilizar uma previsão teórica inicial do formato dos poros formados dentro do polímero. Isso não acontece com as interações não-covalentes que, além de mais fracas, não permitem uma previsão exata da proporção ideal entre monômeros e alvo. Em contrapartida, nem todas as moléculas-alvo de interesse possuem pontos possíveis de serem explorados dessa maneira. Retirar a molécula-alvo de dentro do polímero uma vez que esse tenha sido sintetizado é muito mais difícil, pois envolve a quebra de ligações covalentes, e isso tem que ser feito entre cada uso do MIP, o que torna esse primeiro método de aplicação lenta, e também de baixa seletividade, já que a ligação é forte o suficiente para acontecer com substâncias semelhantes se elas possuírem sítios de ligação e tamanhos aproximados da molécula-alvo. Por essas razões um MIP feito com interações não-covalentes, apesar de mais fraco, é em geral mais versátil, e portanto esse é o método utilizado nesse trabalho, mais especificamente ligações de hidrogênio, que possuem energias de ligação da ordem de 40 kJ/mol [44]. As interações não-covalentes possíveis estão representadas na Figura 1.4. O estradiol possui dois sítios capazes de interagir com os monômeros escolhidos por ligação de hidrogênio, no carbono 3 e no carbono 17, rotulados então de sítios 3-OH e 17-OH (Figura 1.3).

Para o monômero estrutural, em geral, o único pré-requisito é que ele seja solúvel na solução pre-polimerização e que não interfira com as ligações que são pretendidas de serem formadas entre monômeros funcionais e molécula-alvo. Se for possível que ele contribua

para a estabilidade dos poros tanto melhor, mas não é a sua função primária. No nosso caso, como o estradiol possui um anel aromático o DVB (Divinilbenzeno) escolhido como monômero estrutural pode interagir favoravelmente para a estabilização das cavidades por empilhamento  $\pi - \pi$ , outro tipo de interação não-covalente [32].

Por último, o solvente deve ser capaz de solvatar todos esses componentes na proporção desejada, e deve ser de tal forma que favoreça a formação de um polímero poroso. De nada adiantaria um polímero compacto cujos poros não fossem capazes de entrar em contato com a solução. Estudos indicam que os melhores solventes são aqueles que só são capazes de dissolver a substância-alvo na presença dos monômeros funcionais [45], no nosso caso o solvente escolhido foi a acetona, de acordo com os outros estudos já citados da literatura sobre MIPs para o  $17\beta$ -estradiol.

Nos capítulos seguintes, apresentamos a metodologia e os resultados obtidos.

## Capítulo 2

# Metodologia

A presente dissertação se baseia em simulações computacionais de vários tipos para tentar estabelecer uma ordem de monômeros funcionais dentro de uma lista de possíveis candidatos em um problema específico de MIP, no caso o  $17\beta$ -estradiol. Neste capítulo apresentamos de maneira sucinta informações sobre os métodos utilizados, que foram simulação de dinâmica molecular direta, *simulated annealing* [46] e método de Monte Carlo [47]. Na maioria dos casos existe mais de uma forma para implementar os métodos ou algoritmos utilizados, e o resumo trata das técnicas como empregadas no trabalho através de pacotes de programas desenvolvidos para tal.

### 2.1 Dinâmica molecular clássica

Em simulações de dinâmica molecular, as moléculas são codificadas como parâmetros que indicam as características físicas dos átomos (massa, carga, posição) e as características das ligações entre eles. Esses parâmetros são inseridos em uma fórmula para a forma tradicional de energia em um campo de força. No nosso caso utilizamos o campo de forças AMBER definido por uma equação de energia empírica [48],

$$E_{total} = \sum K_r(r - r_{eq})^2 + \sum K_\Theta(\Theta - \Theta_{eq})^2 + \sum \frac{V_n}{2}[1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum \left\{ \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{r_m}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{r_m}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \right\}. \quad (2.1)$$

Essa energia é calculada para cada átomo, onde o primeiro termo é um potencial

harmônico simples que modela as ligações entre átomos dentro das moléculas,  $K_r$  é uma constante elástica,  $r_{eq}$  a distância interatômica de equilíbrio, e a somatória é sobre todas as ligações que o átomo participa. O termo seguinte é também um potencial harmônico para o ângulo das ligações e, assim como no termo anterior,  $K_\Theta$  é uma constante elástica e  $\Theta_{eq}$  é o ângulo de equilíbrio. O terceiro termo é uma soma sobre os ângulos sólidos e modela a energia de torção das ligações em torno dos ângulos de equilíbrio. Esse termo permite modelar as barreiras estéricas e manter a quiralidade e planaridade das moléculas,  $V_n$  é uma constante de força,  $\gamma$  é uma fase que pode ser 0 ou 180 graus, e  $\phi$  é o ângulo de torção. O último termo trata das interações entre átomos separados por 3 ou mais ligações covalentes (ou simplesmente não ligados), a somatória é sobre todos os pares de átomos e é dividida em dois termos que são respectivamente o potencial de Lennard-Jones e interação eletrostática.  $\epsilon_{ij}$  é uma constante,  $\epsilon$  é a permissividade elétrica,  $r_{ij}$  a separação entre os átomos e  $r_m$  a separação de equilíbrio no potencial de Lennard-Jones. Todos os parâmetros relevantes que não são constantes naturais ou dependem da posição dos átomos ( $K_r$ ,  $r_{eq}$ ,  $K_\Theta$ ,  $\Theta_{eq}$ ,  $V_n$ ,  $\phi$ ,  $\epsilon_{ij}$ ,  $r_m$ ) são obtidos de simulações quânticas *ab initio* das ligações envolvidas ou de dados experimentais sobre moléculas pequenas que servem de modelo. No nosso caso o conjunto desses parâmetros utilizados nas simulações é conhecido como GAFF [49] (*General AMBER Force-field*), que é o mais indicado para moléculas orgânicas pequenas que é exatamente o caso do qual tratamos.

Da derivada dessa energia em relação à posição obtemos para cada átomo uma força instantânea e integramos a equação de movimento através de, geralmente, um algoritmo de Verlet [50], que é um método numérico onde aproximamos derivadas temporais por diferenças finitas discretizando o tempo em intervalos de tamanho  $h$ . Descrevemos o algoritmo para uma dimensão pois a extensão para mais dimensões é direta. Partindo da equação de movimento,

$$\ddot{x}(t) = F[x(t), t], \quad (2.2)$$

e utilizamos a expansão de Taylor para  $x$  em  $t = \pm h$  em torno de  $t = 0$

$$x(h) = x(0) + h\dot{x}(0) + \frac{h^2}{2}F[x(0), 0] + \frac{h^3}{6}\ddot{x}(0) + O(h^4), \quad (2.3)$$

$$x(-h) = x(0) - h\dot{x}(0) + \frac{h^2}{2}F[x(0), 0] - \frac{h^3}{6}\ddot{x}(0) + O(h^4). \quad (2.4)$$

As duas equações acima somadas nos dão finalmente

$$x(h) = 2x(0) - x(-h) + h^2 F[x(0), 0] + O(h^4). \quad (2.5)$$

Logo, sabendo os valores de  $x(0)$ , e  $x(-h)$  podemos calcular o valor de  $x(h)$  com erros da ordem de  $h^4$ . Para o caso especial do primeiro passo, quando só temos  $x(0)$  e  $v(0)$  (velocidade em  $t = 0$ ) que é o estado inicial, aproximamos o primeiro  $x(h)$  por

$$x(h) = x(0) + v(0)h + \frac{h^2}{2} F[x(0), 0] + O(h^3). \quad (2.6)$$

Podemos constatar que uma das vantagens do método de Verlet é que ele é reversível no tempo, se invertermos os dois valores mais recentes de  $x$  recuperamos exatamente a trajetória contrária da que estávamos seguindo. Além disso, o erro acumulado em  $x$  depois de sucessivas aplicações do método se mantém da ordem de  $h^2$  [50].

Se utilizarmos apenas a força gerada pelo campo de forças, desprezando efeitos de temperatura, a esse tipo de simulação dá-se o nome de NVE (ensemble microcanônico), que significa número, volume e energia constantes, uma vez que durante a simulação a energia total do sistema se conserva e é possível apenas a transferência de energia entre os constituintes do sistema nas formas de energia cinética e potencial.

## 2.2 Termostato de Nosé-Hoover

A formulação para a energia apresentada em 2.1 nos permite simular um ensemble microcanônico, porém, como pretendemos tratar também de alterações na temperatura especialmente na seção sobre *simulated annealing*, é necessário saber como a energia térmica é inserida dentro da simulação para obtermos um ensemble canônico (NVT) e isso acontece com uma formulação conhecida como termostato de Nosé-Hoover [51], onde a equação de movimento integrada pelo algoritmo integrador é derivada de uma Hamiltoniana modificada inicialmente proposta por Nosé da forma

$$\mathcal{H} = \sum_i \frac{p_i^2}{2m_i s^2} + \frac{1}{2} \sum_{i,j,i \neq j} U(\vec{r}_i - \vec{r}_j) + \frac{p_s^2}{2Q} + gkT \ln(s). \quad (2.7)$$

Vamos provar de forma resumida, seguindo as referências [51, 52] que tal Hamiltoniana modificada gera de fato um ensemble canônico através de uma trajetória determinística, suave, e reversível no tempo. A função partição decorrente de tal Hamiltoniana pode ser calculada como

$$Z = \frac{1}{N!} \int dp_s \int dp \int dq \int ds \delta \left( \sum_i \frac{p_i^2}{2m_i s^2} + \frac{1}{2} \sum_{i,j,i \neq j} U(\vec{r}_i - \vec{r}_j) + \frac{p_s^2}{2Q} + gkT \ln(s) - E \right) \quad (2.8)$$

Onde  $\delta$  é a função delta de Dirac,  $dp = dp_1 dp_2 dp_3 \dots dp_N$  e  $dr = dr_1 dr_2 dr_3 \dots dr_N$ . Se tomarmos a definição  $p' = p/s$  substituímos o termo  $\sum_i \frac{p_i^2}{2m_i s^2}$  da Hamiltoniana que aparece na integral por  $\sum_i \frac{p_i'^2}{2m_i}$  e, trocando a ordem de integração de  $dp'$  e  $ds$  obtemos depois de efetuadas as integrais

$$Z = \frac{1}{g} \left( \frac{2\pi Q}{kT} \right)^{1/2} \exp \left( \frac{E}{kT} \right) Z_c, \quad (2.9)$$

$$Z_c = \frac{1}{N!} \int dp' \int dr \exp [-\mathcal{H}(p'/q)/kT].$$

Onde  $Z_c$  é a função partição do ensemble canônico, provando que recuperamos a mesma média temporal de qualquer variável dinâmica que o ensemble canônico à temperatura  $T$ . O desenvolvimento até aqui foi feito por Nosé, sendo melhorado por Hoover que descobriu uma forma de eliminar a variável de escalonamento de tempo  $s$ . As equações de movimento obtidas de 2.7 são, sendo  $q_i$  posição e  $p_i$  momento

$$\dot{q}_i = \frac{p_i}{m_i s^2}, \quad \dot{p}_i = F_i(q), \quad \dot{s} = \frac{p_s}{Q},$$

$$\dot{p}_s = \sum_i \frac{p_i^2}{m_i s^3} - \frac{gkT}{s}. \quad (2.10)$$

Essas equações assumem uma forma mais simples se escalonarmos o tempo multiplicando por  $s$ , ou seja  $dt = s dt'$ , e expressamos todas as equações em 2.10 em função de  $t'$ :

$$\begin{aligned}\dot{q}_i &= \frac{p_i}{ms}, & \dot{p}_i &= sF_i(q), & \dot{s} &= \frac{sp_s}{Q}, \\ \dot{p}_s &= \sum \frac{p_i^2}{ms^2} - gkT.\end{aligned}\tag{2.11}$$

Omitiremos o índice  $i$  em todos os momentos, posições e funções dos mesmos por simplicidade de notação daqui para frente, onde também entendemos que os somatórios são sempre sobre  $i$ . Podemos eliminar a variável  $s$  reescrevendo as equações em termos de  $q$ ,  $\dot{q}$ , e  $\ddot{q}$ :

$$\ddot{q} = \frac{\dot{p}}{ms} - \left(\frac{p}{ms}\right)\frac{\dot{s}}{s} = \frac{F(q)}{m} - \frac{\dot{q}p_s}{Q} \equiv \frac{F(q)}{m} - \xi\dot{q}, \quad \dot{p} = sF(q), \quad \dot{s} = \frac{sp_s}{Q}.\tag{2.12}$$

O fator  $\xi$  que aparece em 2.12 evolui de acordo com a equação de primeira ordem

$$\dot{\xi} = \frac{\sum m\dot{q}^2 - gkT}{Q}.\tag{2.13}$$

Como temos a prova anterior de que essa dinâmica reproduz o ensemble canônico, descartamos a variável  $s$  usando as equações 2.12 que só dependem de  $q$  e  $\xi$  e suas derivadas, e, definindo  $p \equiv m\dot{q}$  obtemos:

$$\dot{q} = \frac{p}{m}, \quad \dot{p} = F(q) - \xi p, \quad \dot{\xi} = \frac{\sum p^2/m - gkT}{Q}.\tag{2.14}$$

Como as variáveis  $q$ ,  $p$  e  $\xi$  são independentes, podemos calcular o fluxo de probabilidade  $f(q, p, \xi)$ , e como a equação de movimento é não-hamiltoniana as derivadas  $\frac{\partial \dot{q}}{\partial q}$  e  $\frac{\partial \dot{p}}{\partial p}$  não se anulam, portanto a equação análoga ao teorema de Liouville [53], incluindo o fluxo na direção  $\xi$  é

$$\frac{\partial f}{\partial t} + \dot{q}\frac{\partial f}{\partial q} + \dot{p}\frac{\partial f}{\partial p} + \dot{\xi}\frac{\partial f}{\partial \xi} + f\left[\frac{\partial \dot{q}}{\partial q} + \frac{\partial \dot{p}}{\partial p} + \frac{\partial \dot{\xi}}{\partial \xi}\right] = 0.\tag{2.15}$$

Assumindo uma função densidade  $f_{NVT}$  proporcional a  $\exp\left[\frac{-U(q) + \sum \frac{p^2}{2m} + \frac{Q\xi^2}{2}}{kT}\right]$ , temos finalmente os termos não-nulos da equação 2.15

$$\begin{aligned}\dot{q} \frac{\partial f}{\partial q} &= \left(\frac{f}{kT}\right) \sum \frac{F(q)p}{m}, \\ \dot{p} \frac{\partial f}{\partial p} &= \left(\frac{f}{kT}\right) \sum \frac{(-F(q) + \xi p)p}{m}, \\ \xi \frac{\partial f}{\partial \xi} &= \left(\frac{f}{kT}\right) \left(\frac{-\sum p^2/m + gkT}{Q}\right) \xi Q, \\ f \frac{\partial \dot{p}}{\partial p} &= \left(\frac{f}{kT}\right) (-gkT\xi).\end{aligned}\tag{2.16}$$

Esses termos somam zero somente se tomarmos  $g$ , o coeficiente de  $kT$ , igual ao número de graus de liberdade do meu sistema, portanto  $g$  na equação original 2.7 tem esse valor, e recuperamos uma distribuição de ensemble microcanônico em contato comum reservatório à temperatura  $T$  em estado estacionário com fluxo de probabilidade zero, e obtemos a evolução do sistema através de uma integração de movimento do tipo algoritmo de Verlet já descrito.

## 2.3 Simulated Annealing

O termo *simulated annealing* (arrefecimento simulado) pode se referir a qualquer método estocástico de amostragem de conformações possíveis para obtermos uma de energia mais baixa. No nosso caso ele se refere ao processo computacional de, dentro de uma simulação de dinâmica molecular, efetivamente esquentar e esfriar o sistema muitas vezes para amostrarmos várias conformações que são mínimos locais de energia em relação ao posicionamento dos átomos no espaço da simulação. O primeiro trabalho a relacionar o processo de *simulated annealing* matemático (basicamente uma evolução é um tipo de cadeia de Markov [54]) com a simulação molecular diretamente data de 1983 [46]. Tal simulação se aproxima bastante de simulações de Monte Carlo na sua capacidade de amostrar vales de funções, com uma vantagem na amostragem de poços de potencial muito estreitos. Podemos resumidamente explicar o processo da seguinte forma: quando esquentamos o sistema a uma temperatura muito alta, vários estados passam a estar acessíveis e o sistema evolui por esses estados rapidamente de forma aleatória. Quando começamos o resfriamento até

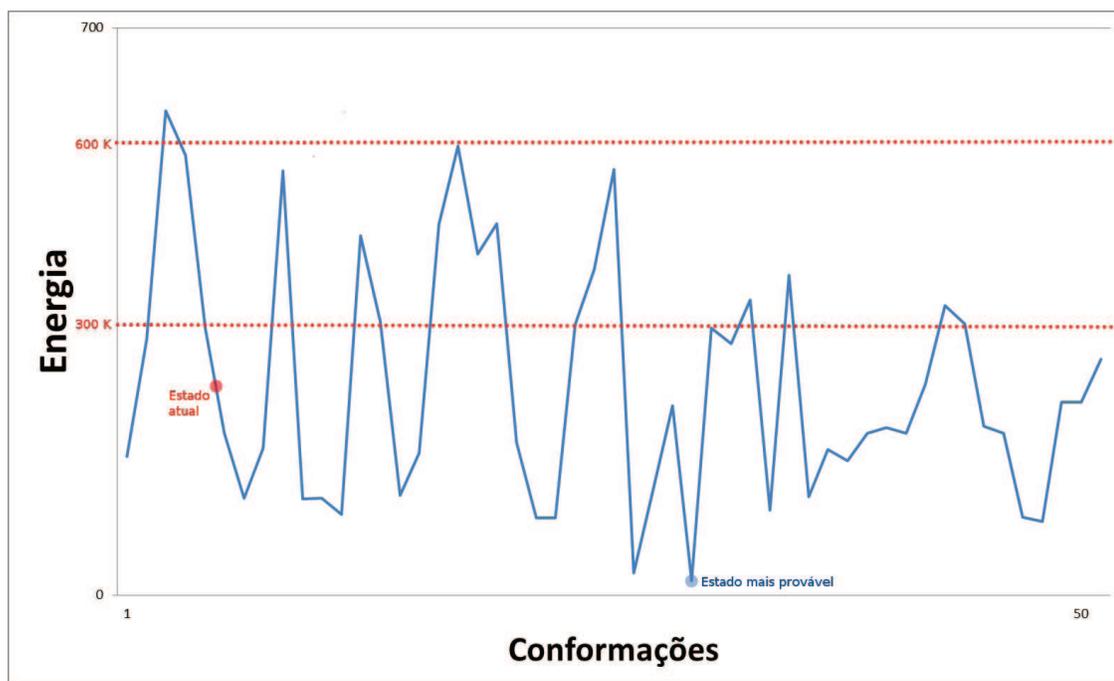


Figura 2.1: Figura ilustrativa do processo de simulated annealing, paisagem de energia para uma mudança arbitrária de conformação na solução

perto de zero Kelvin os estados vão se restringindo cada vez mais à medida que a solução cai dentro de um poço de potencial alcançando finalmente um estado de menor energia no fundo desse poço.

Para explicarmos melhor o propósito do *simulated annealing* usamos a figura 2.1 como um exemplo ilustrativo do que acontece com um sistema quando posto em uma configuração inicial. Assumindo o eixo das abscissas como uma variação qualquer na conformação das moléculas na solução, e as ordenadas como o valor de energia correspondente, podemos iniciar a simulação em um estado que está preso dentro de um poço de potencial acessível dentro da energia disponível para o sistema a uma dada temperatura (representada pela região abaixo da linha vermelha no gráfico) e jamais explorarmos todas as soluções acessíveis para o sistema na realidade. Durante o processo de aquecimento, damos condição para que o sistema evolua por toda a paisagem de energia e quando o resfriamos ele vai novamente cair em um dos vales acessíveis abaixo de 300K, com maior probabilidade de se encontrar na menor energia possível se fizermos a simulação durante vezes o suficiente, e resfriarmos o mais lentamente possível.

É provável que a cada simulação de resfriamento o sistema se encontre no fundo de um vale de potencial, que são na realidade os estados termodinamicamente mais prováveis de encontramos o sistema real a qualquer tempo. Portanto, contando a quantidade de vezes que atingimos um estado que possui ligações de hidrogênio, estamos contando quantos fundos de poços de potenciais possuem tais ligações, um bom indicador da prevalência dessas ligações entre o monômero funcional e molécula-alvo em solução.

## 2.4 Método de Monte Carlo

Qualquer método estatístico de amostragem baseado em números aleatórios pode ser chamado método de Monte Carlo, porém no nosso caso em particular utilizamos o algoritmo de Metropolis [47], que funciona da seguinte maneira: a partir de uma condição inicial do sistema, amostramos um ensemble com uma dada distribuição de probabilidade que queremos, nesse caso o ensemble NVT (canônico), gerando novas configurações em um processo conhecido como cadeia de Markov, onde a nova configuração é gerada com base na configuração anterior. No caso, queremos gerar uma amostragem de estados acessíveis do sistema com uma distribuição de Boltzmann  $P(X) = e^{-\beta E_X}$ ,  $\beta = \frac{1}{kT}$ .

Uma cadeia de Markov [54] é definida pela probabilidade de transição  $P(X \rightarrow X')$  que é a probabilidade de evolução do sistema do estado  $X$  para o estado  $X'$ . Em outras palavras, se aplicarmos  $P$  a cada estado do ensemble  $X$  obteremos o ensemble  $X'$ . Se pensarmos em  $Q(a)$  como um vetor representando a probabilidade de um ensemble  $a$ , então  $P(X \rightarrow X')$  é uma matriz que aplicada a  $Q(X)$  nos dá  $Q'(X')$ , onde  $X$  e  $X'$  são características que definem cada estado:

$$Q'(X') = \sum_X P(X \rightarrow X')Q(X), \quad (2.17)$$

ou em notação compactada:

$$Q' = PQ. \quad (2.18)$$

Definimos um ponto fixo, ou estado estacionário da cadeia,  $W$  como o ensemble que não se altera após repetidas aplicações da matriz  $P$  ao mesmo,

$$\lim_{n \rightarrow +\infty} P^n Q_0 = W, \quad (2.19)$$

$$PW = W. \quad (2.20)$$

Para que  $W$  exista e seja único, algumas condições tem que ser seguidas pela cadeia de Markov aplicada. Para que a probabilidade total se conserve e  $P$  leve sempre algum estado em outro estado temos

$$\sum_{X'} P(X \rightarrow X') = 1. \quad (2.21)$$

Exigimos também que a cadeia seja ‘fortemente ergódica’, ou seja, todos os estados tem que ser acessíveis a partir de qualquer estado inicial, em um único passo da cadeia, e obviamente, o sistema tem que estar em algum ponto permitido a qualquer passo da evolução da cadeia:

$$1 \geq P(X \rightarrow X') \geq 0, \quad (2.22)$$

$$\sum_X Q(X) = 1. \quad (2.23)$$

Por último, impomos uma condição chamada de ‘balanço detalhado’:

$$P(X \rightarrow X')W(X) = P(X' \rightarrow X)W(X'). \quad (2.24)$$

Finalmente, todas essas condições garantem que  $W$  existe, e é um auto-vetor de  $P$  com autovalor 1

$$\sum_X P(X \rightarrow X')W(X) = \sum_X P(X' \rightarrow X)W(X') = W(X'). \quad (2.25)$$

Como visto, em uma cadeia de Markov, começamos em um estado e evoluímos o sistema passando por vários estados diferentes onde cada evolução é baseada apenas no

estado atual, e não no histórico de estados anteriores. A cada mudança de estado dessa maneira chamamos um ‘passo’ de Monte Carlo. Esperamos que depois de uma grande quantidade de passos o sistema tenha esquecido o estado inicial e estejamos amostrando uma distribuição de probabilidade final que nos interessa, no nosso caso,  $P(X) = e^{-\beta E_X}$ . Para tal basta garantir que as condições impostas sobre a cadeia de Markov anteriormente estejam cumpridas pelo algoritmo.

Poderíamos escolher qualquer taxa de transição que quiséssemos e que respeitasse as duas regras, mas mais usual é fazermos o processo representado pelo conjunto completo de equações 2.26, que é conhecido por algoritmo de Metropolis-Hastings [47].

$$T(X \rightarrow X') = \Omega_{XX'} A_{XX'}; \quad (2.26a)$$

$$\sum_{X'} \Omega_{XX'} = 1; \quad (2.26b)$$

$$\Omega_{XX'} = \Omega_{X'X}; \quad (2.26c)$$

$$\Omega_{XX'} \geq 0 \text{ para todo } X, X'; \quad (2.26d)$$

$$\text{Se } E(X') > E(X) : A_{XX'} = e^{-\beta(E_{X'} - E_X)}; \quad (2.26e)$$

$$\text{Se } E(X') \leq E(X) : A_{XX'} = 1. \quad (2.26f)$$

Onde  $\Omega_{XX'}$  é a probabilidade de escolhermos como próximo estado candidato o estado  $X'$  a partir do estado  $X$  e  $A_{XX'}$  é a taxa de aceitação do estado  $X'$  a partir do estado  $X$ . Na prática, o que isso significa é que a partir de uma condição inicial, mantendo todos os outros graus de liberdade fixos, o algoritmo escolhe um grau de liberdade aleatoriamente com igual probabilidade para cada um para ser variado e compara a energia do estado obtido após a variação ( $E_{X'}$ ) com a energia do estado anterior ( $E_X$ ). Se a energia do estado candidato for menor que a do anterior, a mudança é automaticamente aceita, se for maior, a mudança é aceita com probabilidade  $e^{-\beta(E_{X'} - E_X)}$ . É fácil notar que esse processo obedece a todos os critérios expostos no conjunto de equações se considerarmos que cada passo na cadeia de Markov corresponde a uma quantidade de passos do algoritmo igual ao número de graus de liberdade do sistema 2.26 e portanto amostra o ensemble que queremos, dado que sejam feitos passos suficientes para que o algoritmo ‘esqueça’ o estado inicial em que foi colocado e convirja para um conjunto de estados estacionários. No nosso caso as simulações de Monte Carlo foram realizadas utilizando o pacote computacional DICE [55].

## Capítulo 3

# Resultados

Nessa seção apresentamos os resultados das simulações realizadas no trabalho. Todas as simulações foram feitas utilizando o pacote de programas LAMMPS [56], exceto o método de Monte Carlo onde foi utilizado o pacote DICE [55]. Outras ferramentas utilizadas incluem os pacotes Packmol [57], para geração de soluções iniciais, AMBER 9.0 [48] para geração de arquivos de parâmetros e coordenadas e Hyperchem [58] para geração de arquivos de coordenadas.

Para obter as simulações é necessário gerar arquivos de coordenadas e parâmetros para todas as substâncias envolvidas. Esses são os arquivos que contém informações sobre as coordenadas dos átomos na conformação mais estável da molécula, assim como as cargas parciais de cada átomo e os parâmetros necessários para a equação de energia do campo de força (eq. 2.1). Primeiramente modelamos as moléculas no programa Hyperchem, que é capaz de aproximar uma estrutura ótima a partir da fórmula estrutural e gerar um arquivo de coordenadas. A partir desse arquivo usamos programas do pacote AMBER para gerar os arquivos de parâmetros utilizando parâmetros GAFF [49] para os parâmetros do campo de forças, e o método AM1-BCC [59] para o cálculo das cargas parciais. Ambos foram escolhidos por serem os mais indicados para o caso de pequenas moléculas orgânicas que é a maioria dos casos que estamos tratando. Esses arquivos foram testados individualmente dentro do LAMMPS rodando uma simulação curta em vácuo para garantir uma consistência interna e foram considerados satisfatórios.

Sempre que falarmos de uma solução inicial nos referimos a uma solução pré-polimerização composta da molécula-alvo e monômeros funcionais e estruturais em uma proporção fixa de 1:8:40 respectivamente, que são concentrações experimentalmente razoáveis segundo

outros trabalhos da literatura [13–15, 40]. Nessa solução é adicionada moléculas de acetona em número suficiente, como solvente, para atingir a densidade experimental da mistura em uma caixa periódica de contorno de 30nm de lado. Assumimos por hipótese que a força responsável pela formação de complexos entre a substância alvo e os monômeros funcionais são as ligações de hidrogênio e baseamos as simulações na contagem do número ou intensidade da força dessas ligações.

### 3.1 Simulação direta

O primeiro teste foi composto de duas etapas: na primeira realizamos simulações simples com apenas uma molécula da substância-alvo e duas moléculas de cada monômero funcional, em vácuo, a uma temperatura fixa de 300K. Mantivemos a molécula-alvo fixa no centro da caixa e adicionamos forças externas entre os grupos 17-OH e 3-OH da mesma e o grupo funcional relevante nos monômeros funcionais com os quais desejamos formar as ligações de hidrogênio, obtendo assim um complexo formado pela molécula-alvo ao centro ligada às outras duas moléculas como mostra, por exemplo, a figura 3.1. Excluímos em seguida a força externa que une as moléculas e deixamos essa simulação rodar por 1ns e confirmamos que as ligações de hidrogênio permanecem estáveis a essa temperatura, validando todos os monômeros como possíveis candidatos.

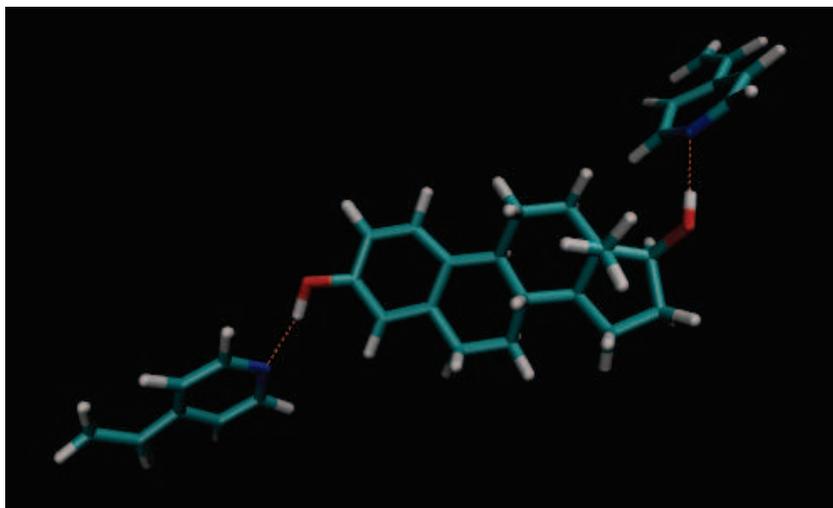


Figura 3.1: Monômero funcional 4VP ligado ao estradiol em vácuo

A segunda etapa começa em um estado inicial gerado pelo Packmol, onde temos a

solução completa na caixa periódica não mais em vácuo. Esse estado inicial é composto com a molécula-alvo ao centro inicialmente, com duas ligações de hidrogênio formadas com monômeros funcionais como no caso anterior, e com as outras seis moléculas de monômero funcional dispostas em torno da mesma. O resto das moléculas é distribuído aleatoriamente e a temperatura foi mantida constante a 300K. A razão para começarmos desse estado em particular é que nos interessava amostrar a ocorrência de ligações de hidrogênio e portanto convinha iniciarmos de um estado onde os monômeros funcionais já estejam próximos da molécula-alvo. A partir dessa solução inicial realizamos uma simulação de 4ns com *timestep* de 1fs, da qual a cada 100fs obtivemos uma ‘foto’ (*snapshot*) da simulação e contamos a quantidade desses que continham ligações de hidrogênio presentes entre a molécula-alvo e qualquer molécula de monômero funcional. Ao mesmo tempo calculamos o abaixamento de energia causado pelo posicionamento instantâneo da molécula-alvo e todas as moléculas de monômeros funcionais. Quanto menor essa energia, mais fortemente ligado estaria o complexo formado por eles e, portanto, maior a chance que esse complexo permanecesse após o processo de polimerização. Assim, temos já dois modos de organizar em uma lista em ordem de melhor para pior os candidatos. A primeira forma é baseado na energia mínima de ligação, e a segunda, na quantidade de *snapshots* que possuem ligações de hidrogênio.

A primeira coisa que notamos quando realizamos a simulação direta da solução é que apesar das ligações de hidrogênio terem se mostrado estáveis para 300K para todos os monômeros funcionais, elas não são permanentes quando em solução, pois, por agitação térmica e competição com o solvente, que também forma ligações de hidrogênio com o estradiol, as ligações na verdade tendem a formarem-se e desfazerem-se várias vezes durante um curto espaço de tempo, tendo uma duração medida nesse caso da ordem de picossegundos. Na figura 3.2 temos *snapshots* que mostram a formação e quebra de uma ligação de hidrogênio, onde inicialmente na figura 3.2a temos o estradiol ligado a uma molécula de monômero estrutural de um lado (esquerda da figura) e a uma molécula de acetona do outro (direito da figura), no próximo quadro 3.2b a ligação com o monômero funcional é quebrada, e por fim, no último quadro 3.2c temos uma nova ligação formada com outra molécula de acetona que tomou o lugar do monômero funcional que por sua vez formou ligações com outra molécula de monômero funcional que estava nas vizinhanças.

Observamos também, como esperado, que os monômeros com a menor energia de ligação são os que formam ligações que duram mais tempo em média. A tabela 3.1 mostra a sequência obtida para os monômeros funcionais em ordem de menor energia de

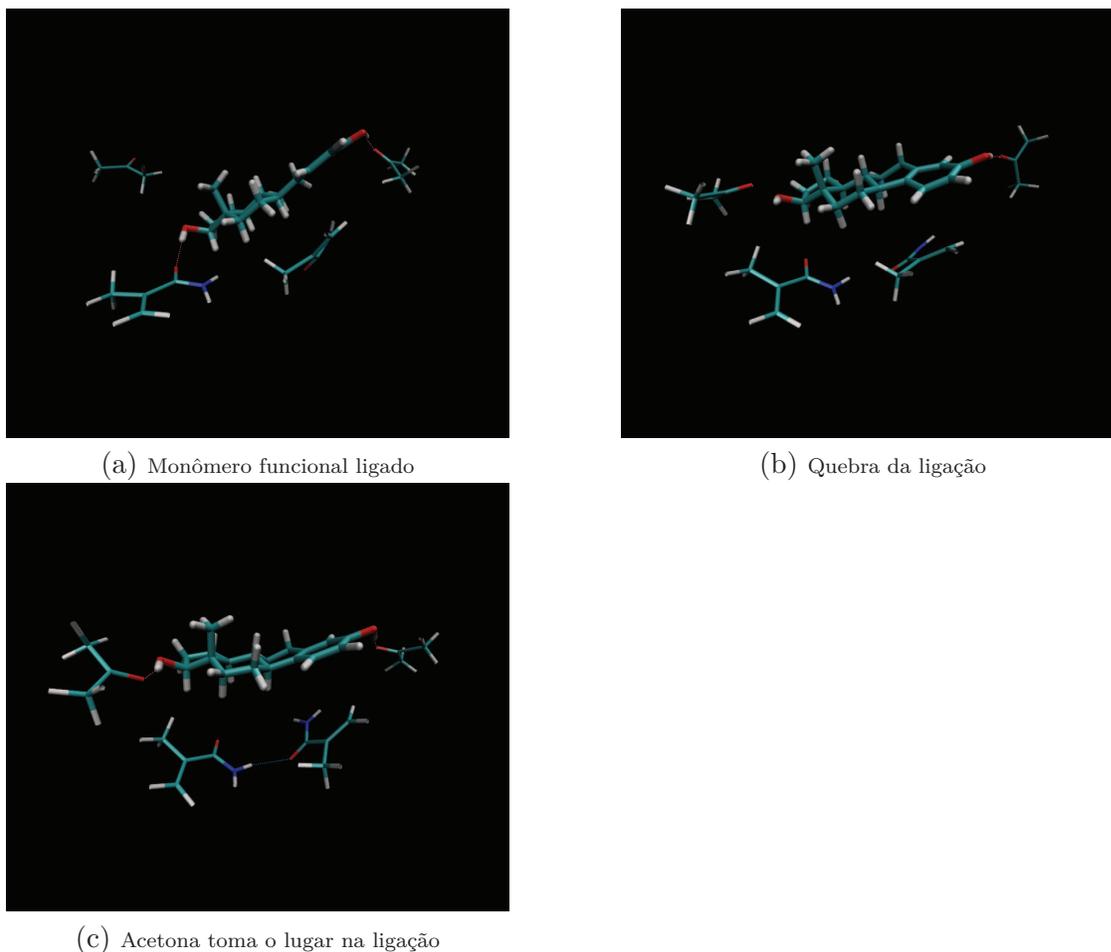


Figura 3.2: Estágios na formação e quebra de uma ponte de hidrogênio entre o estradiol e o monômero estrutural

ligação. Como se trata de uma simulação computacional não faz sentido falarmos de um ‘erro de medida’ absoluto associado aos valores apresentados na tabela, já que esse valor depende sensivelmente do modelo utilizado para o campo de força, dos parâmetros GAFF e particularmente do método usado para o cálculo das cargas já que estamos medindo primariamente interações eletrostáticas. Porém como nos interessa apenas estabelecer uma ordem de melhor para pior monômero basta para os nossos propósitos utilizarmos a precisão necessária para ‘desempatar’ todos os valores.

A figura 3.3 mostra um gráfico com a porcentagem de *snapshots* que possuem ligações de hidrogênio nas posições 3-OH e 17-OH da molécula-alvo. O gráfico está assim

Tabela 3.1: Ordem dos monômeros funcionais candidatos por energia mínima de ligação

Monômero	$E_{min}$ (kcal/mol)
NVP	-35,9
MAAM	-29,7
DEAEMA	-22,6
MAA	-21,4
4VP	-20,6
TFMAA	-15,6
HEMA	-10,1
AST	-9,9
2VP	-7,0

distribuído pois um monômero que forme ligações apenas com um dos pontos, embora as forme muito fortemente, provavelmente não será um bom monômero funcional para o imprinting considerando que poderá ter alta afinidade (o polímero liga-se fortemente à substância alvo) mas baixa seletividade (o polímero aceita também qualquer substância parecida, já que a cavidade de ligação tem apenas um ponto de conexão entre o polímero e a molécula-alvo), portanto, para ordenamento dos polímeros nesse caso utilizamos o critério de maior média entre as ligações no 3-OH e 17-OH.

## 3.2 Simulated annealing

Para o *simulated annealing*, a simulação parte da mesma situação inicial da simulação anterior, mas dessa vez ajustamos a temperatura para 1200K e realizamos rodadas de simulações por 25ns para cada solução. Isso causa uma enorme variação nas posições e velocidades dos átomos do sistema. Dentre os milhares de configurações geradas no processo, amostramos o sistema extraindo *snapshots* a cada 25ps da simulação, obtendo dessa forma 1000 distribuições. Considerando cada uma dessas conformações como uma nova condição inicial, resfriamos a solução até perto de 0K durante um período de 100ps, obtendo, portanto, 1000 configurações de mínimos locais bem distribuídos e contamos em quantas dessas posições existem ligações de hidrogênio entre a molécula-alvo e moléculas de monômero funcional.

Durante o simulated annealing, exceto em alguns poucos casos, a molécula-alvo ter-

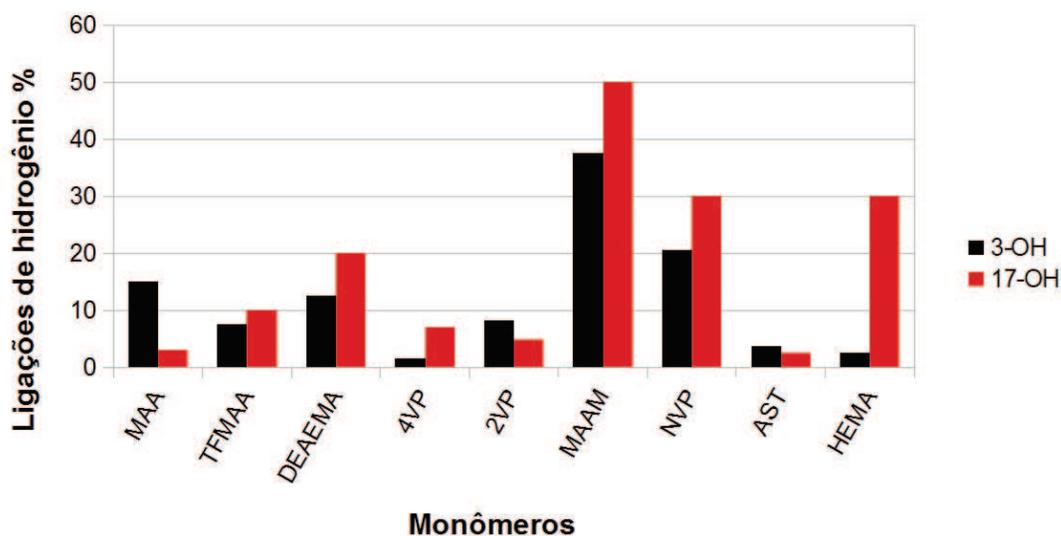


Figura 3.3: Porcentagem de *snapshots* que possuem ligações de hidrogênio entre monômero funcional e 3-OH ou 17-OH do estradiol

mina a simulação com ligações de hidrogênio feitas nas duas extremidades 3-OH e 17-OH com o monômero funcional ou o solvente, logo, podemos concluir que os monômeros funcionais mais capazes de competir com a acetona são os que mais aparecem ligados ao estradiol. A tabela 3.2 mostra a ordem obtida com esse método.

Tabela 3.2: Ordem dos monômeros funcionais candidatos por simulated annealing

Monômero	Snapshots (%)
NVP	35,0
MAAM	18,1
HEMA	17,3
DEAEEMA	17,3
MAA	17,2
TFMAA	15,8
2VP	12,4
4VP	9,7
AST	5,5

Tabela 3.3: Ordem dos monômeros funcionais candidatos por Monte Carlo

Monômero	Snapshots
NVP	372
MAAM	621
MAA	41
2VP	35
4VP	23
TFMAA	9

### 3.3 Monte Carlo

Na simulação de Monte Carlo utilizamos o programa DICE [55] para, partindo das mesmas configurações iniciais, amostrarmos a distribuição canônica como descrito no item 2.4 realizando 500000 passos de simulação de Monte Carlo e contamos quantas dessas configurações possuem ligações de hidrogênio relativamente estáveis. Em contraste com o *simulated annealing* esse método visa buscar, utilizando novamente o gráfico ilustrativo de exemplo (figura 2.1) regiões que possuem vales largos, porém não muito profundos, onde um sistema pode permanecer por muito tempo da simulação, já que esse método amostra igualmente toda a área acessível sem se importar com barreiras de potencial.

Ao contrário do *simulated annealing*, ou da simulação direta por dinâmica molecular, onde já começamos com um estado favorável a observarmos ligações de hidrogênio, na simulação de Monte Carlo estamos amostrando estatisticamente os estados acessíveis do sistema de acordo com a distribuição de Boltzmann. Logo, não devemos esperar de fato que de todos os estados aleatórios disponíveis existam muitos onde há ligações de hidrogênio formadas com o estradiol. Porém, como a distribuição dá mais peso às configurações com menor energia total, devemos esperar uma diferença observável por ordem de menor energia entre os monômeros. Devido às limitações do programa utilizado para as simulações, que considera todas as moléculas como rígidas e portanto não capazes de torções, dos 9 monômeros candidatos propostos apenas 6 puderam ser analisados, já que os outros 3 precisam sofrer torções para poder se ligar ao estradiol. A ordem obtida com o número de *snapshots* que continham ligações de hidrogênio relevantes está na tabela 3.3.

## Capítulo 4

# Conclusões

Inicialmente, levando em conta apenas a análise por simulação direta de dinâmica molecular e contagem de ligações de hidrogênio chegamos a um resultado não completamente consistente com a maior parte do conhecimento estabelecido na literatura sobre os monômeros funcionais aplicados ao 17- $\beta$ -estradiol, que foram obtidos em sua maioria por meio de testes laboratoriais por método combinatório. No entanto, os outros métodos aplicados ao mesmo problema geram ordenamentos semelhantes entre os monômeros candidatos. Logo, além de cumprir o objetivo secundário do projeto de dissertação de permitir o aprendizado de várias técnicas, esse estudo permitiu estabelecer de maneira mais confiável estatisticamente a confiabilidade do ordenamento dos monômeros. De maneira geral, com inversões de alguns casos, os diversos métodos colocam de maneira robusta e consistente o ordenamento dos melhores candidatos para esse problema específico do MIP como apresentados na tabela 4.1.

Como tratamos apenas de simulações da solução pré-polimerização, o que acontece com as ligações e formação dos poros durante o processo de polimerização em si e formato final dos poros dentro do material continua não esclarecido e pode influenciar no resultado final do polímero depois de sintetizado. O que podemos afirmar baseados nos dados é que o *ranking* apresentado ilustra os melhores monômeros, na solução pré-polimerização, que seriam os mais capazes de formar ligações de hidrogênio e mantê-las nos dois sítios de ligação do estradiol.

Todos os métodos concordam sobre os primeiros dois monômeros da lista. Como o resultado obtido por método mais semelhante a outros estudos apresentados na literatura foi o obtido por simulação direta e contagem de ligações de hidrogênio, escolhemos

Tabela 4.1: Resumo das ordens encontradas por todos os métodos de análise

Energia de interação	Simulação direta H-bonds	Simulated Annealing	Monte Carlo
NVP	MAAM	NVP	NVP
MAAM	NVP	MAAM	MAAM
DEAEMA	HEMA	HEMA	MAA
MAA	DEAEMA	DEAEMA	2VP
4VP	MAA	MAA	4VP
TFMAA	TFMAA	TFMAA	TFMAA
HEMA	2VP	2VP	
AST	4VP	4VP	
2VP	AST	AST	

esse para codificar a tabela 4.1 em um gradiente de cor para explicitar as inversões na lista nos outros métodos. O cálculo simples da energia de interação em solução é o que mais diverge dos outros métodos, possivelmente porque a agitação térmica e competição com o solvente não entrem nessa primeira aproximação. O *simulated annealing* concorda quase totalmente, invertendo apenas a posição dos primeiros dois colocados. O método de Monte Carlo faz o mesmo e, além disso, rebaixa o TFMAA. A diferença entre o *simulated annealing* e Monte Carlo pode ser explicada pelo funcionamento dos dois métodos estocásticos. No primeiro temos os monômeros ordenados pela profundidade dos vales de energia potencial, e no segundo, pela largura dos mesmos.

A literatura atual é discordante sobre os melhores monômeros para o imprinting do 17- $\beta$ -estradiol, como era de se esperar devido ao fato de que a eficácia de um MIP depende muito das condições de síntese e o processo inteiro de análise como é feito hoje é muito empírico e sujeito a flutuações experimentais. Usualmente aceita-se o MAA como melhor por vários fatores, inclusive facilidade de síntese do polímero. Comparamos nossos resultados com o de um estudo recente utilizando os mesmos monômeros funcionais, solvente, e monômero estrutural [2], cujos resultados estão apresentados na tabela 4.2.

Notamos uma concordância entre os resultados obtidos e a tabela 4.2 no que diz respeito à afinidade, exceto pela elevação de posição do 2VP e 4VP, de onde supomos que existe algum fenômeno não esclarecido pelas simulações envolvendo esses dois monômeros, possivelmente devido aos anéis aromáticos. A discordância na seletividade se dá pelo fato de que a seletividade depende muito mais fortemente do formato final do polímero, que

Tabela 4.2: Ordenação dos monômeros encontradas na literatura[2]

Ordem de afinidade	Ordem de seletividade
2VP	TFMAA
4VP	MAA
NVP	DEAEMA
MAAM	MAAM
HEMA	2VP
DEAEMA	4VP
MAA	AST
TFMAA	NVP
AST	HEMA

não foi simulado, do que da solução pré-polimerização. Em resumo, simular a solução de monômeros e moléculas-alvo na síntese nos dá uma noção da força de interação entre eles (ou seja, da sua afinidade final) mas não nos dá informação sobre a seletividade. Para tanto, simulações contendo substâncias análogas ao estradiol poderiam ser utilizadas no futuro.

Futuramente, uma possível extensão desse trabalho é tratar não somente a solução pré-polimerização, como também o processo de polimerização, chegando a prever o formato das cavidades presentes no polímero depois de formado. Isso permitiria melhores previsões verificáveis experimentalmente e obtermos uma imagem mais realista da interação da substância-alvo com o polímero na etapa de detecção e não de síntese. Outra possível rota de investigação seria utilizar um algoritmo genético [60] ou semelhante para automatizar o processo de fazer as simulações, efetuar os ajustes finos nas condições de temperatura e concentrações, e ordenar os polímeros dentro de um banco de dados com a maior quantidade de monômeros funcionais possível. Estudos nessas direções estão em andamento.

# Referências Bibliográficas

- [1] M. Yan and O. Ramström, *Molecularly Imprinted Materials: Science and Technology*. CRC Press, 2005.
- [2] B. Sellergren, E. Schillinger, and F. Lanza, “Experimental combinatorial methods in molecular imprinting,” *Integrated Analytical Systems*, vol. 3, pp. 173–198, 2009.
- [3] C. Isarankura, C. Nantasenamat, P. Buraparuangsang, T. Piacham, L. Ye, L. Bülow, and V. Prachayasittikul, “Computational insights on sulfonamide imprinted polymers,” *Molecules*, vol. 13, pp. 3077–3091, 2008.
- [4] T. Zolek, P. Lulinski, and D. Maciejewska, “A computational model for selectivity evaluation of 2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethylamine (homoveratrylamine) imprinted polymers towards biogenic compounds,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 693, pp. 121–129, 2011.
- [5] T. A. Sergeyeva, L. A. Gorbach, O. A. Slinchenko, L. A. Goncharova, O. V. Piltska, and O. O. Brovko, “Towards development of colorimetric test-systems for phenols detection based on computationally-designed molecularly imprinted polymer membranes,” *Materials Science and Engineering*, vol. 30, pp. 431–436, 2010.
- [6] F. Yañez, I. Chianella, S. A. Piletsky, A. Concheiro, and C. Alvarez-Lorenzo, “Computational modeling and molecular imprinting for the development of acrylic polymers with high affinity for bile salts,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 659, pp. 178–185, 2010.
- [7] I. A. Nicholls, H. S. Andersson, C. Charlton, H. Henschel, B. C. G. Karlsson, J. G. Karlsson, J. O’Mahony, A. M. Rosengren, K. J. Rosengren, and S. Wikman, “Theoretical and computational strategies for rational molecularly imprinted polymer design,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 25, pp. 543–552, 2009.
- [8] E. M. A. Dourado, C. Herdes, P. R. V. Tassel, and L. Sarkisov, “Molecular recognition effects in atomistic models of imprinted polymers,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 12, pp. 4781–4804, 2011.

- [9] C. Dong, X. Li, Z. Guo, and J. Qi, "Development of a model for the rational design of molecular imprinted polymer: Computational approach for combined molecular dynamics/quantum mechanics calculations," *Analytica Chimica Acta*, vol. 647, pp. 117–124, 2009.
- [10] I. A. Nicholls, H. S. Andersson, K. Golker, H. Henschel, B. C. G. Karlsson, G. D. Olsson, A. M. Rosengren, S. Shoravi, S. Suriyanarayanan, J. G. Wiklander, and S. Wikman, "Rational design of biomimetic molecularly imprinted materials: theoretical and computational strategies for guiding nanoscale structured polymer development," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 400, pp. 1771–1786, 2011.
- [11] T. P. Rao and R. Kala, "Potentiometric transducer based biomimetic sensors for priority envirototoxic markers - an overview," *Talanta*, vol. 76, pp. 485–496, 2008.
- [12] Y. Shi, D.-D. Peng, C.-H. Shi, X. Zhang, Y.-T. Xie, and B. Lu, "Selective determination of trace 17- $\beta$ -estradiol in dairy and meat samples by molecularly solid-phase extraction and hplc," *Food Chemistry*, vol. 126, pp. 1916–1925, 2010.
- [13] A. Prieto, A. Vallejo, O. Zuloaga, A. Paschke, B. Sellergen, E. Schillinger, S. Schrader, and M. Möder, "Selective determination of estrogenic compounds in water by microextraction by packed sorbents and a molecularly imprinted polymer coupled with large volume injection-in-port-derivatization gas chromatography-mass spectrometry," *Analytica Chimica Acta*, vol. 703, pp. 41–51, 2011.
- [14] J. Ma, L. Yuan, M. Ding, S. Wang, F. Ren, J. Zhang, S. Du, F. Li, and X. Zhou, "The study of core-shell molecularly imprinted polymers of 17 $\beta$ -estradiol on the surface of silica nanoparticles," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, pp. 2761–2795, 2011.
- [15] T. Jiang, L. Zhao, B. Chu, Q. Feng, W. Yan, and J.-M. Lin, "Molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective determination of 17 $\beta$ -estradiol in fishery samples with high performance liquid chromatography," *Talanta*, vol. 78, pp. 442–447, 2009.
- [16] M. D. Celiz, D. S. Aga, and L. A. Colón, "Evaluation of a molecularly imprinted polymer for the isolation/enrichment of  $\beta$ -estradiol," *Microchemical Journal*, vol. 92, pp. 174–179, 2011.
- [17] S. Wang, Y. Li, M. Ding, X. Wu, J. Xu, R. Wang, T. Wen, W. Huang, P. Zhou, K. Ma, X. Zhou, and S. Du, "Self-assembly molecularly imprinted polymers of 17 $\beta$ -estradiol on the surface of magnetic nanoparticles for selective separation and detection of estrogenic hormones in feeds," *Journal of Chromatography*, vol. 879, pp. 2595–2600, 2011.

- [18] I. Koç, G. Baydemir, E. Bayram, H. Yavuz, and A. Denizli, "Selective removal of  $17\beta$ -estradiol with molecularly imprinted particle-embedded cryogel systems," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 192, pp. 1819–1826, 2011.
- [19] V. Pichon and F. Chapuis-Hugon, "Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants - a review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 622, pp. 48–61, 2008.
- [20] B. Buszewski, J. Ricanyova, R. Gadzala-Kopciuch, and M. Szumski, "Supramolecular recognition of estrogens via molecularly imprinted polymers," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 397, pp. 2977–2986, 2010.
- [21] J. Saloni, S. S. R. Dasary, Y. Anjaneyulu, H. Yu, and G. H. Jr., "Molecularly imprinted polymers for detection of explosives: computational study on molecular interactions of 2,6-dinitrotoluene and methacrylic acid complex," *Struct. Chem.*, vol. 21, pp. 1171–1184, 2010.
- [22] J. Saloni, S. S. R. Dasary, Y. Anjaneyulu, H. Yu, and G. H. Jr., "Theoretical study of molecular interactions of tnt, acrylic acid, and ethylene glycol dimethacrylate - elements of molecularly imprinted polymer modeling process," *Polymer*, vol. 52, pp. 1206–1216, 2011.
- [23] G. Gupta, P. K. Singh, M. Boopathi, D. Kamboj, B. Singh, and R. Vijayaraghavan, "Molecularly imprinted polymer for the recognition of biological warfare agent staphylococcal enterotoxin b based on surface plasmon resonance," *Thin Solid Films*, vol. 519, pp. 1115–1121, 2010.
- [24] M.-H. Lee, T.-C. Tsai, J. L. Thomas, and H.-Y. Lin, "Recognition of creatinine by poly(ethylene-co-vinyl-alcohol) molecular imprinting membrane," *Desalination*, vol. 234, pp. 126–133, 2008.
- [25] A. Zurutuza, S. Bayouhd, P. A. G. Cormack, L. Dambies, J. Deere, R. Bischoff, and D. C. Sherrington, "Molecularly imprinted solid-phase extraction of cocaine metabolites from aqueous samples," *Analytica Chimica Acta*, vol. 542, pp. 14–19, 2005.
- [26] Y. Yang, C. Yi, J. Luo, R. Liu, J. Liu, J. Jiang, and X. Liu, "Glucose sensors based on electrodeposition of molecularly imprinted polymeric micelles: A novel strategy for mip sensors," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, pp. 2607–2612, 2011.
- [27] B. T. S. Bui, F. Merlier, and K. Haupt, "Toward the use of a molecularly imprinted polymer in doping analysis: Selective preconcentration and analysis of testosterone and epitestosterone in human urine," *Anal. Chem.*, vol. 82, pp. 4420–4427, 2010.

- [28] C. L. Bayer and N. A. Peppas, “Advances in recognitive, conductive and responsive delivery systems,” *Journal of Controlled Release*, vol. 132, pp. 216–221, 2008.
- [29] M. S. da Silva, R. Viveiros, P. I. Morgado, A. Aguiar-Ricardo, I. J. Correia, and T. Casimiro, “Development of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate-based molecular recognition devices for controlled drug delivery using supercritical fluid technology,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 416, pp. 61–68, 2011.
- [30] M. Abdouss, E. Asadi, S. Azodi-Deilami, N. Beik-Mohammadi, and S. A. Aslanzadeh, “Development and characterization of molecularly imprinted polymers for controlled release of citalopram,” *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, vol. 22, pp. 2273–2281, 2011.
- [31] W. G. Wood, “Immunoassays and co.: past, presente, future? – a review and outlook from personal experience and involvement over the past 35 years,” *Clin. Lab.*, vol. 54, pp. 423–438, 2008.
- [32] H. Henschel, N. Kirsch, J. Hedin-Dhalström, M. J. Whitecombe, S. Wikman, and I. A. Nicholls, “Effect of the cross-linker on the general performance and temperature dependent behaviour of a molecularly imprinted polymer catalyst of a diels-alder reaction,” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 72, pp. 199–205, 2011.
- [33] Y. Zhang, D. Song, L. M. Lanni, and K. D. Shimizu, “Importance of functional monomer dimerization in the molecular imprinting process,” *Macromolecules*, vol. 43, pp. 6284–6294, 2010.
- [34] J. L. Urraca, M. C. Carbajo, M. J. Torralvo, J. Gozáles-Vázquez, G. Orellana, and M. Moreno-Bondi, “Effect of the template and functional monomer on the textural properties of molecularly imprinted polymers,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, pp. 155–161, 2008.
- [35] A. M. Rosengren, K. Golker, J. G. Karlsson, and I. A. Nicholls, “Dielectric constants are not enough: Principal component analysis of the influence of solvent properties on molecularly imprinted polymer-ligand rebinding,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 25, pp. 553–557, 2009.
- [36] E. V. Piletska, A. R. Guerreiro, M. J. Whitcombe, and S. A. Piletsky, “Influence of the polymerization conditions on the performance of molecularly imprinted polymers,” *Macromolecules*, vol. 42, pp. 4921–4928, 2009.
- [37] Y. Yang, J. Li, Y. Liu, J. Zhang, B. Li, and X. Cai, “Optimization of polymerization parameters for the sorption of oseltamivir onto molecularly imprinted polymers,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 400, pp. 3665–3674, 2011.

- [38] C.-Y. Chen, C.-H. Wang, and A.-H. Chen, “Recognition of molecularly imprinted polymers for a quaternary alkaloid of berberine,” *Talanta*, vol. 84, pp. 1038–1046, 2011.
- [39] L. E. Gómez-Pineda, “Quantum chemical calculations on the interaction between flavonol and functional monomers (methacrylic acid and 4-vinylpyridine) in molecularly imprinted polymers,” *Molecules*, vol. 15, pp. 4017–4032, 2010.
- [40] B. Dirion, E. Schillinger, and B. Sellergren, “Development of a high throughput synthesis technique for the optimization of mips for  $17\beta$ -estradiol,” *MRS Proceedings*, p. 787, 2009.
- [41] C. Alexander and E. N. Vulfsen, “Spatially functionalized polymer surfaces produced via cell-mediated lithography,” *Adv. Mat.*, vol. 9, pp. 751–755, 1997.
- [42] B. C. G. Karlsson, J. O’Mahony, J. G. Karlsson, H. Bengtsson, L. A. Eriksson, and I. A. Nicholls, “Structure and dynamics of monomer-template complexation: An explanation for molecularly imprinted polymer recognition site heterogeneity,” *Integrated Analytical Systems*, vol. 3, pp. 173–198, 2009.
- [43] G. Wulff, “Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers,” *Chem. Rev.*, vol. 102, pp. 1–28, 2002.
- [44] K. Mosbach, “Keynote lecture: towards the next generation of molecular imprinting with emphasis on the formation, by direct molding, of compounds with biological activity (biomimetics),” *Anal. Chim. Acta*, vol. 435, pp. 3–8, 2001.
- [45] I. A. Nicholls, H. S. Andersson, K. Golker, H. Henschel, B. C. G. Karlsson, G. D. Olsson, A. M. Rosengren, S. Shoravi, S. Suriyanarayanan, J. G. Wiklander, and S. Wikman, “Rational design of biomimetic molecularly imprinted materials: theoretical and computational strategies for guiding nanoscale structured polymer development,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 400, pp. 1771–1786, 2011.
- [46] S. Kirkpatrick, C. D. GELATT, and M. P. Vecchi, “Optimization By Simulated Annealing,” *Science*, vol. 220, no. 4598, pp. 671–680, 1983.
- [47] M. Hjorth-Jensen, *Computational Physics*. University of Oslo, 2003.
- [48] D. A. Case, T. A. Darden, T. E. Cheatham, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, R. C. Walker, W. Zhang, K. M. Merz, B. Roberts, B. Wang, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, I. Kolossváry, K. F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, J. Liu, X. Wu, S. R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M. J. Hsieh, G. Cui, D. R. Roe, D. H. Mathews, M. G. Seetin, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, and P. A. Kollman, “AMBER 11,” 2010.

- [49] J. M. Wang, R. M. Wolf, and J. W. C. *et al.*, “Development and testing of a general amber force field,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 25, pp. 1157–1174, 2004.
- [50] S. Jang and G. A. Voth, “Simple reversible molecular dynamics algorithms for nosé-hoover chain dynamics,” *Journal of Chemical Physics*, vol. 107, no. 22, pp. 9514–9526, 1997.
- [51] S. Nosé, “A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble,” *Mol. Phys.*, vol. 52, no. 2, pp. 255–268, 1984.
- [52] W. G. Hoover, “Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions,” *Phys. Rev. A*, vol. 91, no. 3, pp. 1695–1697, 1985.
- [53] R. C. Tolman, *The Principles of Statistical Mechanics*. Courier Dover Publications, 1979.
- [54] G. Bhanot, “The metropolis algorithm,” *Rep. Prog. Phys*, vol. 51, pp. 429–457, 1988.
- [55] K. Coutinho and S. Canuto, “Dice: A monte carlo program for molecular liquid simulation,” *University of São Paulo, Brazil*, 2009.
- [56] S. J. Plimpton, “Fast parallel algorithms for short-range molecular dynamics,” *J. Comp. Phys.*, vol. 117, pp. 1–19, 1995.
- [57] L. Martínez, R. Andrade, E. G. Birgin, and J. M. Martínez, “Packmol: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations.,” *J. Comp. Chem.*, vol. 30, no. 13, pp. 2157–2164, 2009.
- [58] “Hyperchem(tm) professional 7.51, hypercube, inc., 1115 nw 4th street, gainesville, florida 32601, usa,”
- [59] A. Jakalian, B. L. Bush, D. B. Jack, and C. I. Bayly, “Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. am1-bcc model: I. method,” *J. Comp. Chem.*, vol. 21, no. 2, pp. 132–146, 2000.
- [60] D. E. Goldberg, *Genetic Algorithms in Search, Optimization, and Machine Learning*. Addison-Wesley, 1989.