

# PROPIEDADES POLIMERICAS DE CADENAS DE $\kappa$ -CARRAGENANO A DIFERENTES TEMPERATURAS

## POLYMERIC PROPERTIES OF $\kappa$ -CARRAGEENAN CHAINS AT DIFERENTS TEMPERATURES

M.Villegas\*<sup>¶</sup>, S. Guidugli\*, C. Esteban\*, C. Fernández Gauna\*, S. Pantano+, S. Paoletti† y J. Benegas\*

\*Departamento de Física/IMASL, Universidad Nacional de San Luis/CONICET, Argentina, Ejército de los Andes 950 - (5700) San Luis – Argentina.

+Instituto Pasteur, Montevideo, Uruguay.

†Dipartimento di Science Della Vita, Università degli Studi di Trieste, Trieste, Italia.

*e-mail: mvilleg@unsl.edu.ar*

Este trabajo describe la dependencia con la temperatura de la longitud de persistencia y el cociente característico de cadenas del polisacárido iónico  $\kappa$ -carragenano. Estas propiedades poliméricas fueron calculadas en una asamblea estadística de cadenas largas ( $n=900$ ) construidas con un algoritmo de Monte Carlo que utiliza resultados de dinámica molecular para asignar probabilidades para la agregación de unidades poliméricas a una cadena en construcción. Los resultados muestran que al bajar la temperatura de la solución de 363K a 282K la longitud de persistencia de las cadenas casi se duplica, obteniéndose a 282K un valor de 7 nm, muy cercano al valor experimental. Este comportamiento indica que al bajar la temperatura las cadenas se ordenan y vuelven más rígidas, condiciones esenciales para la formación de los geles termoreversibles y mesofases ordenadas que caracterizan a este polisacárido iónico en solución acuosa.

Palabras claves:  $\kappa$ -carragenano, flexibilidad polimérica, dinámica molecular, método de monte carlo

This work describes the temperature dependence of persistence lengths and characteristic ratios of 900 residues long  $\kappa$ -carrageenans chains. These polymeric properties were calculated on an appropriate ensemble of calculated long chains ( $n=900$ ), which were built with a Monte Carlo algorithm that assigned conformational probabilities based on the results of previously run molecular dynamics simulations. In very good agreement with experimental results, a value of 7nm is obtained for the calculated persistence length at 282K, which almost double the value calculated at 363K. This behavior indicates that the  $\kappa$ -carrageenans chains become more rigid and ordered at low temperatures, the basic condition for chain association leading to the formation of the thermo reversible gels and ordered mesophases that characterize this polysaccharide in aqueous solutions.

Key word:  $\kappa$ -carrageenan. Polymeric flexibility, molecular dynamic, Monte Carlo method

### I. INTRODUCCIÓN

El  $\kappa$ -carragenano es uno de los más conocidos polisacáridos iónicos. Obtenidos de algas rojas marinas, su habilidad para formar geles en soluciones acuosas en presencia de contraiones metálicos de radio atómico grande ha sido explotada en numerosas aplicaciones industriales, en particular en cosmética, medicina y alimentos, donde se lo utiliza para dar estabilidad y textura a diferentes soluciones, emulsiones y geles. Los geles que genera son termo reversibles<sup>(1)</sup> (con o sin histéresis térmica), parecidos a los que se obtienen con otros polisacáridos de similar estructura como el  $\iota$ -carragenano y la agarosa. El proceso de formación de geles depende de las características físico-químicas de la solución: se forman a baja temperatura y/o alta concentración de polímero y/o fuerza iónica. El mecanismo molecular que da lugar a la formación de geles no ha sido todavía completamente determinado,

pero hay acuerdo en que el paso inicial consiste en la asociación, mediada por contraiones simples, de dos porciones de cadena de polisacárido. Desde el punto de vista de la conformación molecular este proceso de gelificación requiere que las cadenas sean relativamente ordenadas y que ese ordenamiento tenga una longitud mínima adecuada. Rochas y Rinaudo<sup>(2)</sup> mostraron mediante una serie de experimentos de rotación óptica y conductividad que, en soluciones diluidas, las condiciones de coexistencia conformacional entre estados ordenados y desordenados de las cadenas podía representarse mediante líneas rectas en un diagrama de fase conformacional del logaritmo de la concentración iónica ( $I_m$ ) vs la inversa de la temperatura de transición (o de "melting"),  $T_m$ . Es decir los valores de ( $I_m, T_m$ ) a los cuales se tiene mitad de las unidades poliméricas ordenadas y mitad desordenadas. Mostraron además que, para un dado solvente, estas líneas rectas forman

¶ Autor a quién debe dirigirse la correspondencia.

una familia de rectas paralelas para distintos contraiones simples. Esta información experimental de la transformación conformacional fue luego interpretada por Benegas et al<sup>(3)</sup> mediante la aplicación de teoría de condensación contraiones al proceso de orden-desorden inducido por variaciones en temperatura y/o concentración de contraiones en soluciones diluidas de  $\kappa$ -carragenano. En este trabajo se describió la transición conformacional en término de los cambios en entropía y entalpía de los distintos componentes del proceso.

La asociación de cadenas, que sigue a este ordenamiento de las cadenas simples, ha sido recientemente descrito por Donati et. al<sup>(4)</sup> mediante un modelo, basado en teoría de campo medio para polielectrolitos en solución, que describe satisfactoriamente algunas de las características de la asociación de cadenas poliméricas iónicas. Esta contribución, que trata de dar una base física al llamado modelo de "egg-box" para la formación de geles<sup>(1)</sup>, describe como dos pedazos de cadena pueden asociarse por la acción mediadora de ciertos contraiones simples. El requisito es que, al menos en la zona de unión, las cadenas tengan la regularidad conformacional y la longitud mínima necesaria para formar el "sitio de unión" que inicia el proceso. La cooperatividad del mismo permite su posterior crecimiento, hasta formar las características estructuras tridimensionales de los geles. Experimentos más recientes han demostrado que la transformación desorden-orden de cadenas simples de  $\kappa$ -carragenano no solo induce la formación de geles, sino también de fases líquido cristalinas, aunque en un régimen distinto de concentración molecular y temperatura. Analizando soluciones de otros polisacáridos Chronakis et al<sup>(5)</sup> mostraron que la concentración a la cual se forma la fase líquido cristalina depende de la longitud de persistencia del polímero. Se observa entonces que el punto común en ambos procesos es que al bajar la temperatura, se debería producir una rigidización del polímero, característica de un ordenamiento local de las cadenas, y que estos segmentos más o menos ordenados deben alcanzar una longitud adecuada para la iniciación del correspondiente proceso de ordenamiento o asociación de cadenas.

Con estas bases experimentales y teóricas, y a los efectos de un modelado a nivel molecular del proceso de dimerización de cadenas, en el presente trabajo proponemos estudiar, mediante un esfuerzo combinado de simulación por dinámica molecular (DM) y Monte Carlo (MC), los efectos de la temperatura en las propiedades poliméricas de cadenas largas de  $\kappa$ -carragenano en solución de dimetilsulfóxido (DMSO). A tal efecto se ha desarrollado un algoritmo de Monte Carlo para construir cadenas de carragenano el cual utiliza resultados previamente obtenidos mediante dinámica molecular para asignar las probabilidades de que el siguiente monómero agregado a una cadena tenga una dada orientación espacial. Este proceso ha sido llevado a cabo con dinámicas moleculares de decámeros de la unidad copolimérica fundamental del

$\kappa$ -carragenano a dos temperaturas características del proceso de gelación: alta temperatura (363K), en la cual deberían predominar las conformaciones más extendidas y flexibles, y baja temperatura (282K), característica de conformaciones más ordenadas y rígidas de la cadena. Nuestros resultados indican que efectivamente al bajar la temperatura las cadenas pierden flexibilidad, aumentándose casi al doble la longitud de persistencia, calculándose para 282K un valor de casi 70 Å, en excelente acuerdo con datos experimentales. Se analizan en este trabajo posible fuentes de esta variación de la flexibilidad, encontrándose que a alta temperatura se favorece la aparición de otra región accesible en el espacio conformacional ( $\phi, \psi$ ) de un tipo de unión copolimérica. Esta región está asociada con la casi desaparición, a la temperatura más alta, de un puente hidrógeno intramolecular. En la siguiente sección se describen los procedimientos de cálculo llevados a cabo, seguidos luego por una descripción de los principales resultados. Finalmente se discuten y comparan estos con las evidencias experimentales y teóricas disponibles en la literatura.

## II. MÉTODOS

### Dinámica molecular

$\kappa$ -carragenano es un copolisacárido iónico compuesto por monómeros de D-galactosa 4-sulfato (de ahora en más S), unidos  $\beta$ -(1-4) a monómeros de 3,6-anhidro-D-galactosa (de ahora en más A). Estas unidades copoliméricas SA se repiten regularmente a lo largo de la cadena para formar el polisacárido. En la simulación mediante dinámica molecular, un decámero de unidades SA se colocó en una caja con moléculas de DMSO. La solución se mantuvo neutra agregando los correspondientes contraiones, que fueron introducidos reemplazando aleatoriamente moléculas del solvente. Se utilizó el campo de fuerzas contenido en el paquete GROMACS<sup>(6)</sup> para simular tanto el soluto como el solvente. La simulación se realizó con condiciones de contorno periódicas, a temperatura y presión constantes y utilizando la sumatoria de Ewald ("Particle Mesh Ewald")<sup>(6)</sup> para la interacción electrostática. Los ángulos diedros ( $\phi, \psi$ ) de las uniones AS y SA de las uniones centrales del decámero visitados durante estos 10 ns fueron almacenados y utilizados para generar las funciones de distribución de probabilidad  $p(\phi, \psi)$  usadas luego por el algoritmo de Monte Carlo. Esta función de probabilidad se calculó simplemente dividiendo el espacio ( $\phi, \psi$ ) en retículos de  $5^\circ \times 5^\circ$  y contando el número de eventos de la DM que visitaron cada retículo elemental. Este número, adecuadamente normalizado por el total de eventos disponibles, definió la probabilidad  $p_i(\phi_i, \psi_i)$  de que los ángulos diedros de una dada unión tuviera esos valores ( $\phi_i, \psi_i$ ).

### Generación de cadenas de $\kappa$ -carragenano

El cálculo de las propiedades poliméricas exige la construcción de una asamblea estadística de cadenas similares. Para generación de tales cadenas se adaptó un algoritmo de Monte Carlo que considera al polisacárido

como una sucesión de uniones virtuales entre los enlaces glicosídicos alternados AS-SA. En este proceso, una vez calculada la probabilidad  $p_i(\phi, \psi)_{AS}$  y  $p_i(\phi, \psi)_{SA}$ , de que la unión polimérica tenga ángulos  $(\phi, \psi)$  que caen en la  $i$ -ésima celda unitaria de área  $5^\circ \times 5^\circ$ , se sigue el siguiente algoritmo,

1-se ordenan de mayor a menor los estados de probabilidad  $p_i(\phi, \psi)$  para cada tipo de unión (AS o SA)  
 2- se calcula una probabilidad acumulada  $P_i = \sum_{j=1}^i p_j$ , para todo  $j < i$  para cada tipo de unión.

3- se elige un primer monómero, de tipo AS.

4- se genera un número aleatorio,  $q$ , entre 0 y 1.

5- se toma un estado “ $i$ ” del banco de datos de probabilidad que le corresponde. Entonces:

si  $P_i > q$ , ese estado  $i$ , que tiene un par de ángulos diedros  $(\phi, \psi)_i$ , se asigna para el próximo monómero que se agrega a la cadena.

si  $P_i < q$ , se rechaza el estado  $i$  y el algoritmo regresa a 4.

6-Se cambia de monómero alternando el tipo de unión y se repite el proceso.

7-El proceso termina cuando la cadena alcanza el número  $n$  de unidades deseada, (grado de polimerización)

Se construye así un número apropiado de cadenas para cada grado de polimerización  $n$ . Este número debe ser suficientemente alto para garantizar la convergencia y la estabilidad de los parámetros estadísticos que se deseen calcular. En los cálculos de este trabajo se generaron 10.000 cadenas para cada  $n$ , para las dos temperaturas estudiadas.

Sobre estas ensamblas estadísticas de cadenas se calcularon dos parámetros que permiten cuantificar la flexibilidad de las cadenas: el cociente característico

$$C_n = \frac{\langle r^2 \rangle}{nl^2}$$

y la longitud de persistencia

$$L_p = \left\langle \frac{\vec{l}_1}{l_1} \cdot \sum_{i=1}^n \frac{\vec{l}_i}{l_i} \right\rangle \text{ con } n \rightarrow \infty$$

Donde  $\vec{l}$  es el vector de unión virtual, de longitud  $l$  y  $\vec{l}_1$  es el vector que representa al primer monómero.

### III- RESULTADOS

En la Figura 1 se presentan trayectorias típicas de los ángulos diedros  $(\phi, \psi)$  para las uniones SA a las temperaturas de trabajo 282 K y 363K, respectivamente. Estas trayectorias tienen un comportamiento similar para todas las uniones centrales a lo largo del decámero simulado. Por esta razón, para cada temperatura, el banco de datos de valores  $(\phi, \psi)$  se formó con la suma de los valores visitados por la DM en todas las uniones centrales equivalentes.

En general estas trayectorias muestran que la dinámica visita una sola zona del espacio  $(\phi, \psi)$ , la cual contiene una o más subregiones permitidas, pasando continuamente de una a otra, denotando que esas

subregiones no están separadas por barreras de potencial demasiado altas.

Con los valores de los ángulos  $(\phi, \psi)$  visitados, se construyeron las funciones de probabilidad  $p(\phi, \psi)$  que se muestran en las Figuras 2a y 2b, para las uniones AS y SA y para las dos temperaturas de trabajo. La unión AS es más rígida que la SA, y esa característica se mantiene en ambas temperaturas.

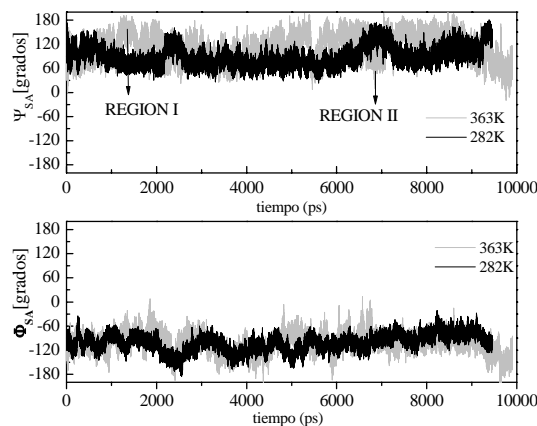


Figura 1. Trayectorias de los ángulos  $\psi$  (arriba) y  $\phi$  (abajo) correspondientes a una unión típica SA a  $T=363K$  (gris) y 282 K (negro). En la primera se han indicado intervalos de la dinámica transcurridas mayoritariamente en las regiones I y II de la Figura 2b.

En cambio la función de probabilidad de la unión SA muestra una importante dependencia con la temperatura, con la aparición de un pico, denominado Región II en la probabilidad gráfica de 363 K (Figura 2b).

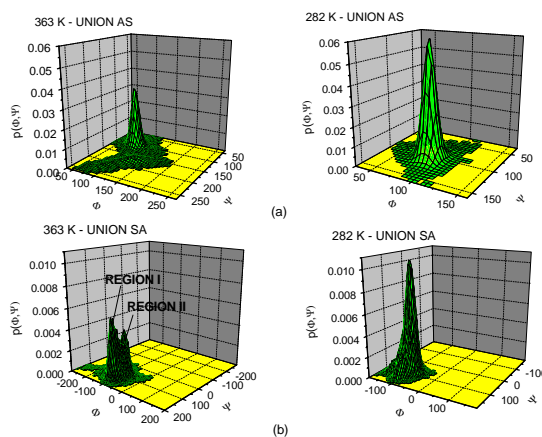


Figura 2: a) funciones de probabilidad  $p(\phi, \psi)$  para la unión AS a  $T=363K$  y 282K (arriba) y b) idem para la unión SA (abajo)

Un análisis detallado de la simulación de DM (que no se presenta aquí) demuestra que estos resultados no solo están de acuerdo con los mapas de Ramachandran obtenidos mediante simulaciones de mecánica molecular, sino que también responden a las condiciones de ligadura establecida por las distancias

entre átomos O de distintos grupos de los monómeros S y A obtenidas en experimentos de RMN<sup>(7)</sup>.

Con estas funciones de distribución  $p(\phi, \psi)$  para los dos tipos de unión, y para cada temperatura, se procedió a crear las ensamblas estadísticas de cadenas de distinto grado de polimerización, que permiten la evaluación de la dependencia de la longitud de persistencia y del coeficiente característico con el largo de la cadena. La Figura 3 muestra los resultados obtenidos para la variación de la longitud de persistencia con el grado de polimerización hasta  $n=300$ . El principal resultado es que la longitud de persistencia de las cadenas calculadas con los resultados de la DM a 282 K es prácticamente el doble que la calculada para 363 K.

#### IV- DISCUSIÓN

Las curvas de la Figura 3 muestran la característica dependencia de la longitud de persistencia con el grado de polimerización: una dependencia lineal para cadenas cortas, que luego satura para cadenas de una cierta extensión. Este valor límite de la longitud de persistencia es claramente más bajo para las cadenas a mayor temperatura, indicando que las cadenas se vuelven más rígidas a baja temperatura, cuyo valor límite de aproximadamente 68 Å está en excelente acuerdo con valor experimental<sup>(8)</sup> extrapolado a valores de muy alta fuerza iónica. Esta condición experimental limita las interacciones electrostáticas de largo alcance, es decir condiciones similares a las del cálculo de DM.

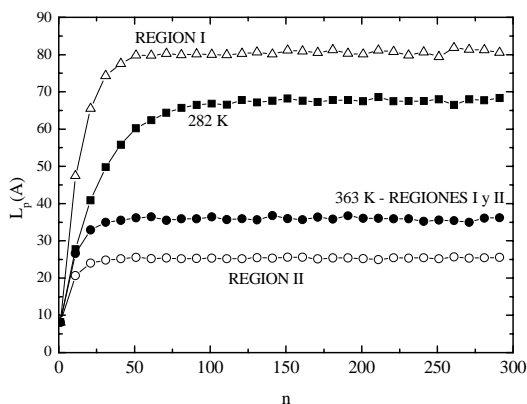


Figura 3: Variación de la longitud de persistencia con el grado de polimerización, para  $T= 282K$  y  $363K$ . Las curvas denominadas Región I y Región II han sido calculadas solo con los eventos de las Regiones I y II de las distribuciones de probabilidad de la unión SA a  $363K$  (figura 2b)

También la forma desordenada, que según el diagrama de fase conformacional de Rochas y Rinaudo<sup>(2)</sup> debería predominar a  $363K$ , muestra valores importantes de la longitud de persistencia. En este sentido no parecen dos conformaciones totalmente diferentes, como las  $\alpha$ -hélices y las conformaciones hebras de las cadenas polipeptídicas, sino que, siguiendo la propuesta de Guenet et al<sup>(9)</sup> para agarosa (un polisacárido derivado también de algas marinas, estructuralmente muy similar al  $\kappa$ -carragenano),

pueden ser consideradas como conformaciones helicoidales con distinto grado de ordenamiento y rigidez. Para analizar estos aspectos y también el origen del cambio en flexibilidad, en la misma Figura 3 se ha representado la dependencia de  $L_p$  tomando para la unión SA a  $T = 363 K$  en forma separada los eventos de la llamada Región I (o solo aquellos de la región II). Observamos que los eventos de la región I resultan en un polímero el doble más rígido que considerando todos los eventos a  $363K$ , inclusive ligeramente más rígido que toda la simulación a  $282 K$ . Estos resultados indican que la mayor flexibilidad a  $363 K$  proviene de esta nueva región II, que podría ser característica de la conformación desordenada del  $\kappa$ -carragenano. Por otro lado si comparamos los valores de la longitud de persistencia con la longitud de una unidad repetitiva del polímero ( $\sim 10\text{Å}$  para el  $\kappa$ -carragenano), vemos que para el caso de la temperatura alta, la longitud de persistencia contiene aproximadamente 3 unidades repetitivas, mientras que a la temperatura menor la longitud de persistencia contiene 6 unidades repetitivas. Si pensamos que el sitio de unión entre cadenas necesita al menos tres monómeros ordenados consecutivos estos resultados parecen confirmar que solo a  $282 K$  se tiene el ordenamiento necesario para dar inicio al proceso de gelificación.

En definitiva, el presente trabajo muestra que un esfuerzo combinado de dinámica molecular y simulación de Montecarlo, reproduce satisfactoriamente algunas características básicas de la transición molecular inducida por temperatura de cadenas de  $\kappa$ -carragenano, un paso importante para poder modelar a nivel molecular la asociación de cadenas mediadas por contraiones simples, que dan inicio a la formación de geles de este polisacárido iónico.

#### Referencias:

- 1 Yalpani M, *Polysaccharides, Syntheses, Modifications and Structure / Property Relations*, Elsevier Science, Amsterdam, (1998).
- 2 Rochas, C.; Rinaudo, M. *Biopolymers*, **19**, 1675-1687. (1980)
- 3 Benegas, J.C., Cesàro, A., Rizzo, R., Paoletti, S. *Biopolymers*, **45**, 203-216, (1998)
- 4 Donati I, Benegas J.C., Cesàro A., and Paoletti S. *Biomacromolecules*, **7**(5); 1587-1596. (2006)
- 5 Chronakis, I. S.; Ramzi, M. *Biomacromolecules* **2002**, **3**, 793-804.
- 6 van Gunsteren WF, Billeter S, Eising A et al. *Biomolecular Simulation: the Gromos 96 manual and user guide*. Zurich: Vdf Hochschulverlag AG and der ETH Zurich; 1996. GROMACS: <http://www.gromacs.org>.
- 7 Bosco, M., Segre, A., Miertus, S., Cesàro, A., Paoletti, S. *Carbohydr. Res.*, **340**, 943-958. (2005).
- 8 Slootmaekers, D., De Jonghe, C., Reynaers, H., Varkevisser, F. A., Bloys van Treslong, C. *Int. J. Biol. Macromol.*, **10**, 160-168. (1988)
- 9 Guenet, J.-M. *Trends Polym. Sci.* **4**, 6-11. (1996)