

Energía de interacción entre fragmentos de arabinogalactano tipo II presente en las partículas coloidales del jugo de manzana calculadas por simulación computacional.

Benítez, E. I.^{a,b}, Peruchena, N. M.^{a,b} y Lozano, J. E.^b

^a Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Resistencia, French 414, Resistencia. E-mail: ebenitez@fre.utn.edu.ar

^b Lab. Estructura Molecular y Propiedades. Departamento de Química, FACENA, Universidad Nacional del Nordeste, Av. Libertad 5460 (3400) Corrientes, Argentina.

^cPLAPIQUI (UNS-CONICET), Camino La Carrindanga Km.7, 8000 Bahía Blanca, Argentina

Resumen

En este trabajo se estudió la variación de la barrera de energía, entre fragmentos de oligosacáridos presentes en partículas coloidales de jugos manzana, por cambios en la orientación de los fragmentos analizados, utilizando la simulación computacional. Para ello se seleccionó un fragmento representativo de Arabinogalactano tipo II, un oligosacárido formado por una cadena principal, un tetrasacárido ($[\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow3)]_4$) y una ramificación formada por un disacárido ($\alpha\text{-L-Araf-(1\rightarrow6)-}[\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow6)]$), con unión 1-6 entre la $\beta\text{-D-Galp}$ de la cadena lateral y una $\beta\text{-D-Galp}$ de la cadena principal. Se colocaron dos moléculas de oligosacáridos en una caja conteniendo 1000 moléculas de agua, para evaluar el efecto del solvente. Las estructuras del oligosacárido y de las moléculas de agua fueron generadas por simulación computacional con el método de Metropolis Monte Carlo (MC), usando el programa DICE. Se consideró la interacción intermolecular entre dos moléculas de oligosacárido, descrita por el potencial intermolecular Coulombico más el de Lennard-Jones, usando el campo de fuerza AMBER para oligosacáridos y el modelo SPC para el agua. Luego de un período de equilibración de 1×10^5 pasos se llevó a cabo la simulación con $1,5 \times 10^6$ pasos. Se realizaron en total 12 simulaciones, 6 para cada variación de la orientación de los oligosacáridos, variando la distancia de separación entre ellos cada 0,05 nm. Debido a que el oligosacárido presenta una distribución de las cargas sobre la superficie se ubicó las partículas: i) orientadas enfrentando los potenciales positivos y ii) orientadas enfrentando potenciales electrostáticos de signo contrario. En ambos casos se observó una barrera de energía cercana a los 1,9 nm de distancia de separación de las partículas. Sin embargo la configuración i) presenta una barrera de energía de 22,70 kcal/mol y la configuración ii) una barrera de 12,95 kcal/mol. Es decir la energía de interacción entre partículas individuales se reduce en un 43% de la orientación ii) con respecto a i). Esta metodología de simulación de partículas coloidales por el método de MC permite comprender y dar explicación a varios aspectos observados experimentalmente. Asimismo permitiría predecir los cambios en la barrera de energía debida a variaciones no solo en la orientación de las partículas al aproximarse sino también variaciones en la composición de las mismas, por la presencia de grupos ácidos o grupos metilos, ambos presentes en las partículas por provenir de moléculas de pectina degradada y que están siendo estudiados actualmente.

Introducción

Un jugo turbio de manzana es una suspensión coloidal cuyas partículas están mayormente formadas por restos celulares provenientes del procesamiento de la fruta. El tratamiento enzimático que se le realiza al jugo, para degradar la pectina que complica el proceso de clarificación, produce una reducción notable de la turbiedad y por lo tanto de la cantidad de partículas presentes en el jugo, sin embargo aún permanecen en suspensión un gran número de partículas con carga neta negativa (Benítez y Lozano, 2006). Brillouet y col. (1996) han encontrado que esas partículas están mayormente compuestas por proteínas unidas a arabinogalactano tipo II (AG). Los AG, conforman un subgrupo perteneciente a lo que se denomina pectina (Vincken y col., 2003). Para elaborar jugos clarificados es necesario eliminar las partículas del medio, ya sea por ultrafiltración o por clarificación por medio de agentes clarificantes. Se han realizado varios estudios tendientes a dilucidar el mecanismo por el cual las partículas permanecen en suspensión, postulándose que las mismas se encuentran altamente hidratadas (Benítez y Lozano, 2006; Benítez y col., 2007). Esta energía de hidratación es una propiedad inherente a las partículas, siendo los cambios en su composición los que mayormente podrían ocasionar cambios en la barrera de energía. La barrera de energía es el punto de máxima energía de repulsión que se origina al representar la energía neta de interacción en función de la distancia entre las partículas. Las partículas luego del tratamiento enzimático se atraen y aglomeran en una primera etapa hasta alcanzar un tamaño cercano a $1\mu\text{m}$, luego del mismo las partículas disminuyen su interacción, ya que se forman coloides de mayor tamaño que se repelen entre sí, por su carga eléctrica negativa (Benítez y col., 2007).

El objetivo de este trabajo es estudiar la variación de la barrera de energía, entre fragmentos de oligosacáridos presentes en partículas coloidales de jugos manzana, por cambios en la orientación de los fragmentos analizados, utilizando la simulación computacional. Para ello se seleccionó un fragmento representativo de Arabinogalactano tipo II, un oligosacárido formado por una cadena principal, un tetrasacárido ($[\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)}]_4$) y una ramificación formada por un disacárido ($\alpha\text{-L-Araf-(1}\rightarrow\text{6)-}[\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{6)}]$), con unión 1-6 entre la $\beta\text{-D-Galp}$ de la cadena lateral y una $\beta\text{-D-Galp}$ de la cadena principal (Fig.1) El análisis conformacional con solvente explícito fue realizado previamente por la técnica de dinámica molecular (DM) para oligosacáridos. En este trabajo se presentan las interacciones intermoleculares entre fragmentos iguales cuya estructura de partida es la más estable. Previamente por MC se encontró que la partícula se encuentra hidratada formando puentes de hidrógeno con 39 moléculas de agua y que además presentan zonas con potencial electrostático positivo y negativo, lo que permitiría explicar la difusión e interacción de las partículas individuales para formar agregados de mayor tamaño observados experimentalmente.

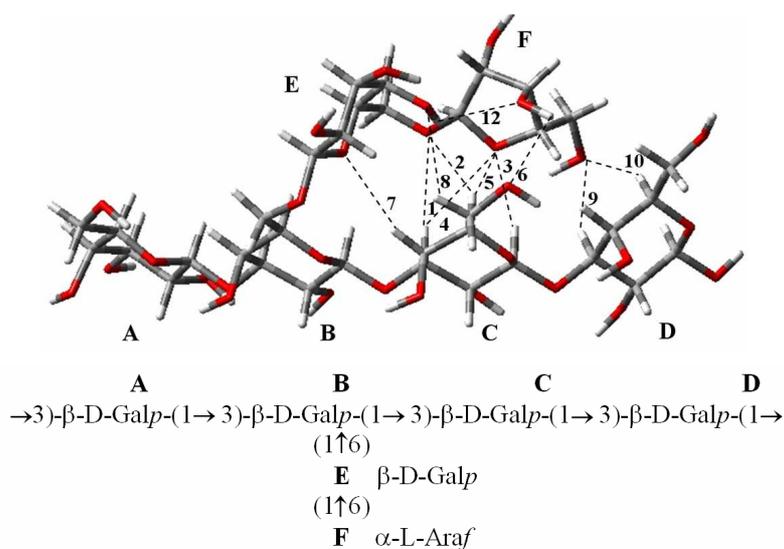


Figura 1: Esquema del fragmento de arabinogalactano tipo II utilizado en la simulación computacional. En la parte inferior de la figura se indica los residuos de monosacáridos involucrados.

Metodología

La estructura del polisacárido y de las moléculas de agua fue generado por simulación computacional con el método de Metropolis Monte Carlo (MC), usando el programa DICE (Coutinho y Canuto, 2003). Se consideró la interacción intermolecular entre el oligosacárido y el agua y entre los oligosacáridos descrita por el potencial intermolecular Coulómbico más el de Lennard-Jones, usando el campo de fuerza AMBER (Cornell y col., 1995) para oligosacáridos y el modelo SPC para el agua (Berendsen y col., 1981). El sistema está compuesto por dos oligosacáridos y 1000 moléculas de agua, a la presión de 1 atm y una temperatura de 298 K. Luego de un período largo de equilibración de 1×10^5 pasos se llevó a cabo la simulación con $1,5 \times 10^6$ pasos. Se realizaron en total 12 simulaciones, 6 para cada variación de la orientación de los oligosacáridos, variando la distancia de separación entre ellos cada 0,05 nm.

Los mapas de potencial electrostático molecular (PEM) fueron calculados con el método AM1 utilizando el programa Gaussian03 y visualizados con el programa Molekel (Flükiger y otros, 2002; Portmann y Lüthi, 2000)

Resultados

Los mapas tridimensionales de potencial electrostático (Fig. 2) representan los potenciales electrostáticos dispuestos sobre una superficie de densidad constante (0.001 e/au^3). Debido a que el potencial electrostático se define como la energía de interacción de una carga puntual positiva con los núcleos y electrones de una molécula, el color rojo ($V(r) < 0$) indican las zonas más fuertes de atracción (asociadas con átomos electronegativos) y el azul ($V(r) > 0$) indica las zonas de repulsión más intensas. De esta forma el potencial electrostático provee una medida de la distribución de carga total de una molécula.

Debido a la diferencia observada en la distribución de las cargas sobre la superficie se ubicó las partículas:

- i- orientadas enfrentando los potenciales positivos
- ii- orientadas enfrentando potenciales electrostáticos de signo contrario

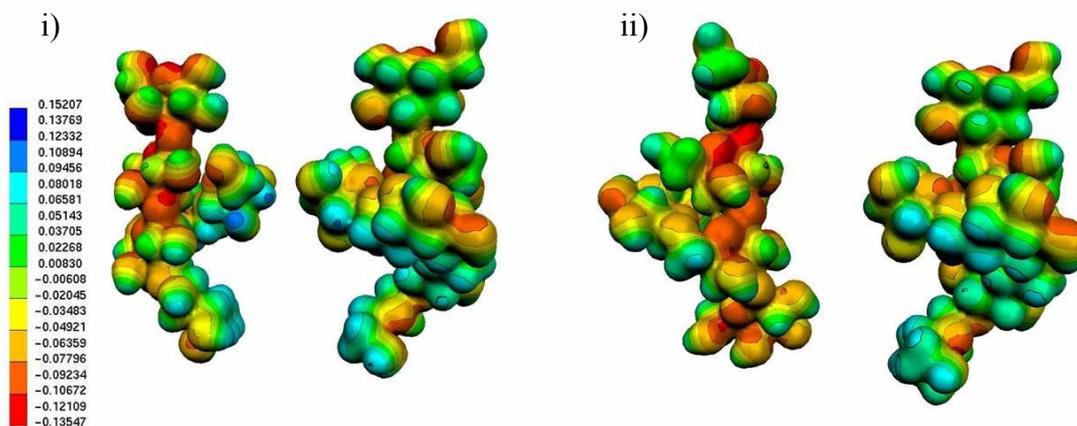


Figura 2: Mapas de potencial electrostático para la estructura del oligosacárido utilizado. Los fragmentos de oligosacáridos fueron orientados de la siguiente manera: i) enfrentando potenciales electrostáticos positivos y ii) enfrentando potenciales electrostáticos de signo contrario. Se utilizó para todos los mapas la misma escala de colores para el potencial de interacción.

La primer orientación se debió a que previamente se había observado que en las zonas de potencial positivo había menos moléculas de agua interaccionando que en el resto de la molécula y por lo tanto la energía de hidratación, que experimentalmente se había observado que es la que mayor influencia ejerce en la estabilidad de las partículas, sería mínima.

Una vez finalizada la simulación se evaluó la energía de interacción intermolecular entre ambas moléculas de polisacáridos. El programa DICE permite almacenar el cálculo de las energías de interacción entre oligosacáridos; entre oligosacáridos y el agua; y entre moléculas de agua. Para este trabajo se seleccionaron los datos correspondientes a la energía de interacción entre oligosacáridos, calculada de la siguiente manera:

$$U(r_{ij}) = 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \left(\frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right) \quad (1)$$

Donde r_{ij} es la distancia entre los sitios i y j de las diferentes moléculas, ϵ_{ij} y σ_{ij} son las combinaciones de los parámetros de Lennard-Jones para los sitios i y j ; q_i es la carga del sitio i . Los datos para los diferentes sitios en la molécula fueron tomados de Homans, 1995. El potencial de interacción entre ambas moléculas es la suma de $U(r_{ij})$ de todos los sitios de cada una de las moléculas. Para más detalles del cálculo ver referencia: Coutinho y Canuto, 2003.

En la Fig. 3 se graficó el potencial de interacción en función de la distancia de separación entre partículas, medida desde el centro de masa, para las dos orientaciones seleccionadas. En ambos casos se observó una barrera de energía cercana a los 1,9 nm. Sin embargo en la configuración i) presenta una barrera de energía de 22,70 kcal/mol y la configuración ii) una barrera de 12,95 kcal/mol. Es decir la energía de interacción entre partículas individuales se reduce en un 43% de la orientación ii) con respecto a i). Por lo que se puede observar como las distintas orientaciones modifican las energías de interacción y a su vez podrían explicar la atracción observada experimentalmente entre partículas individuales.

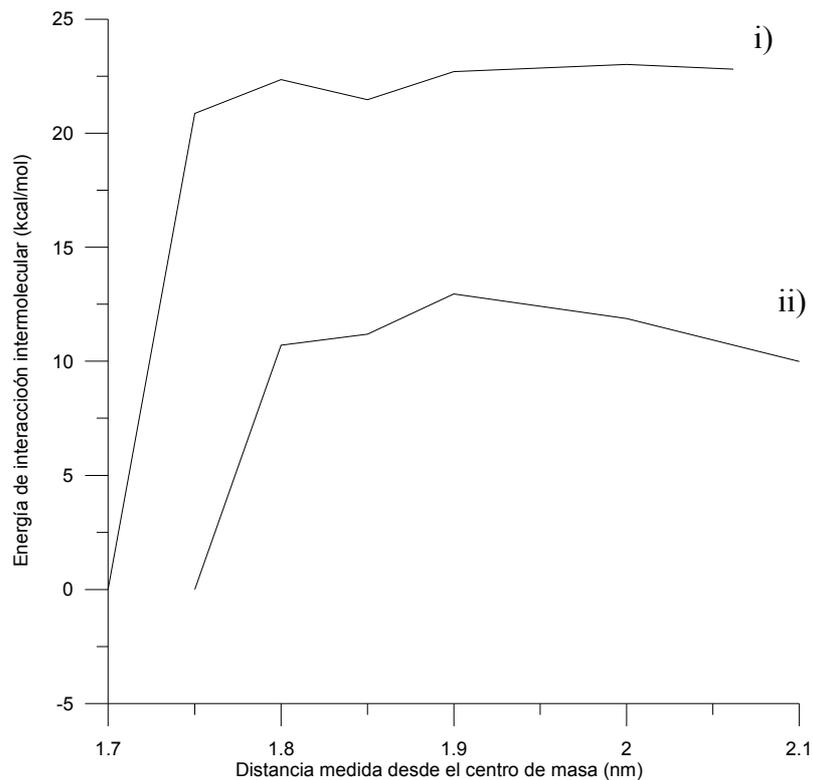


Figura 3: Potencial de interacción en función de la distancia de separación entre partículas, medida desde el centro de masa, para las orientaciones i) e ii)

Conclusión

Esta metodología de simulación de partículas coloidales por el método de MC permite comprender y dar explicación a varios aspectos observados experimentalmente. Asimismo permitiría predecir los cambios en la barrera de energía debida a variaciones no solo en la orientación de las partículas al aproximarse sino también variaciones en la composición de las mismas, por la presencia de grupos ácidos o grupos metilos, ambos presentes en las partículas por provenir de moléculas de pectina degradada y que están siendo estudiadas actualmente.

Bibliografía

- Benítez, E. I. y Lozano J. E. (2006). Influence of the Soluble Solids on the Zeta Potential of a Cloudy Apple Juice. *Latin American Applied Research*, 36, 163-168.
- Benitez, Elisa I., Genovese Diego B. y Lozano Jorge E. (2007). Effect of pH and ionic strength on apple juice turbidity: Application of the extended DLVO theory. *Food Hydrocolloids*, 21, 100-109
- Berensen, H., Postma, J., van Gunsteren, W. y Hermans, J. (1981). Interactions models for water in relation to protein hydration, in *Intermolecular Forces*. Eds. Pullman, B. Dordrecht, The Netherlands, 331-342.
- Brillouet, J.M., Williams, P., Will, F., Müller, G. y Pellerin, P. (1996). Structural characterization of apple juice arabinogalactan-protein which aggregates following enzymic dearabinosylation. *Carbohydrate Polymers*, 29, 271-275.
- Cornell, W., Cieplak P., Bayly C., Gould I., Merz K., Ferguson D., Spellmeyer D., Fox T., Caldwell, J. y Kollman, P. (1995). Structural Analysis of β -Turn Mimics Containing a Substituted 6-Aminocaproic Acid Linker. *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 5169-5178.
- Coutinho K. y Canuto S. (2003). DICE: A Monte Carlo program for molecular liquid simulation, University of São Paulo, Brazil, version 2.9.
- Homans, S. W. (1990). A Molecular mechanical force field for the conformational analysis of oligosaccharides: comparison of theoretical and crystal structure of $\text{Man}\alpha 1\text{-3Man}\beta 1\text{-4GlcNAc}$. *Biochemistry*, 29, 9110-9118.
- Flükiger, P.; Lüthi, H. P.; Portmann, S.; Weber, J. (2000-2002). MOLEKEL 4.3 Swiss Center for Scientific Computing, Manno (Switzerland)
- Portmann, S. y Lüthi, H. P. (2000). MOLEKEL: An Interactive Molecular Graphics Tool. *CHIMIA*, 54, 766-770.
- Vincken, J.P., Schols, H.A., Oomen R., McCann, M.C., Ulvskov, P., Voragen, A. y Visser, R. (2003). If homogalacturonan were a side chain of Rhamnogalacturonan I. Implication for cell wall architecture. *Plant Physiology*, 132, 1781-1789.