

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DANIEL LUIZ STAMM BALDISSEROTTO

**ESTUDO DA SOLUBILIZAÇÃO DA QUERATINA DA LÃ DE OVELHA EM  
LÍQUIDOS IÔNICOS POR DINÂMICA MOLECULAR**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Porto Alegre, setembro de 2023**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

DANIEL LUIZ STAMM BALDISSEROTTO

**ESTUDO DA SOLUBILIZAÇÃO DA QUERATINA DA LÃ DE OVELHA  
EM LÍQUIDOS IÔNICOS POR DINÂMICA MOLECULAR**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Mestre em Química

Prof. Dr. Hubert Karl Stassen  
Orientador

**Porto Alegre, setembro de 2023**

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre (junho/2020) e (setembro/2023), no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação do Professor Doutor Hubert Karl Stassen. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

**Comissão Examinadora:**

---

Prof. Dr. Professor da Banca

---

Prof. Dr. Professor da Banca

---

Prof. Dr. Professor da Banca

---

Prof. Dr. Orientador

---

Prof. Dr. Co-orientador (se houver)

---

Aluno

## **Agradecimentos**

Primeiramente, queria agradecer a Bruna, minha psicóloga, sem ela eu não teria forças pra concluir esse trabalho e estaria com um desgaste mental ainda maior. Não menos importante, gostaria de agradecer a Andrielle, que além de continuar sendo minha melhor amiga depois de todos esses anos, me apoiando nos maiores momentos de dificuldade, em conjunto com a professora Nádyá, me possibilitou mudar o rumo da minha pesquisa em um momento muito complicado de bloqueio durante a pandemia.

Reforço também todos os agradecimentos do meu TCC, principalmente aos amigos que me acompanharam desde o começo da dessa caminhada no curso de Química (Guilherme Machado, Guilherme Strapasson, Xande, Moniqui, Vergani, Nicole). Me enche de orgulho ver os rumos que meus amigos acabaram tomando e fico feliz por cultivar essa amizade por mais de sete anos.

Também sou grato ao professor Hubert e toda a paciência que ele tem comigo e com as minhas decisões, grato aos seus ensinamentos e ao apoio em geral no projeto. Assim como sou grato ao colega Jessé por estar sempre disposto a me ajudar nos momentos de dúvidas. Também do laboratório, queria agradecer o colega Leandro Segat, eu sinto que houve uma troca muito boa de conhecimento e que eu pude contribuir na formação dele, assim como ele contribui na minha.

Agradeço de forma geral os professores que conseguiram se adequar ao momento de pandemia, e conseguiram da melhor maneira possível transmitir o conhecimento utilizando de todas as maneiras disponíveis.

De forma especial, tenho muita gratidão pela Mariana, meu amorzinho, que viveu intensamente o final desse trabalho comigo. Me ajudando todos os dias, me motivando, me inspirando e me aguentando nos meus melhores e nos meus piores momentos, tornando o fim dessa jornada mais leve e ameno.

Por ultimo, agradeço do fundo do meu coração meu pai e minha mãe que são os verdadeiros alicerces da minha formação como ser humano, carrego em mim os valores que me foram passados e sei que sempre terei um porto seguro, independente da situação que eu me encontro.

## Resumo

Uma grande parcela do que conhecemos como indústria têxtil é baseada no uso da lã da ovelha (*Ovis aries*). No processo de tratamento dessa lã temos uma grande quantidade de resíduo não utilizado por este tipo de indústria. Esse excesso industrial não aproveitado pode ter diversas aplicações, a lã de ovelha é rica em diversas proteínas, sendo uma dessas a queratina. Essa proteína é extraída normalmente em processos de hidrólise alcalina ou hidrólise ácida, processos danosos ao meio ambiente. Sabendo disso, novas metodologias de extração da queratina da lã de ovelha têm sido desenvolvidas a fim de diminuir o impacto ambiental desse processo industrial. Uma alternativa que surgiu nos últimos anos foi a utilização de líquidos iônicos que são considerados solventes verdes e menos danosos ao meio ambiente, em comparação aos ácidos e bases utilizados nos processos anteriores. No trabalho a seguir foi utilizada a metodologia da Dinâmica Molecular para o estudo de dois líquidos iônicos interagindo com a cistina e a cisteína, que são dois aminoácidos presentes na queratina e desempenham um papel fundamental no seu processo de extração. Os líquidos iônicos utilizados foram baseados no cátion 1-butil-3-metilimidazólio ( $[C_4mim]^+$ ), os ânions escolhidos para esse estudo foram o cloreto ( $[Cl]^-$ ) e o acetato ( $[Acet]^-$ ). O processo de extração da queratina é baseado em duas etapas, a quebra da ligação dissulfeto da cistina (dímero) e a formação dessa ligação entre duas cisteínas (monômeros). Temos que na primeira etapa o líquido iônico  $[C_4mim][Acet]$  teve um desempenho consideravelmente melhor, já na etapa de recuperação temos que o  $[C_4mim][Cl]$  apresentou um melhor desempenho. Chegamos nessas conclusões baseados nos resultados obtidos pelas funções de distribuição radial (RDFs) e espaciais (SDFs). Para a cisteína temos uma interação maior entre o ânion e a proteína, e para a cistina temos que o cátion é o principal responsável nesse processo. Isso se deve pela interação dos cloretos nos caso da cisteína, para a cistina temos que o principal responsável é o cátion 1-butil-3-metilimidazólio (esses resultados foram visualizados pela análise dos módulos das integrais das RDFs e pela descrição gráfica das SDFs).

**Palavras-chave:** Dinâmica Molecular, líquidos iônicos, queratina, lã, biomoléculas, extração.

## Abstract

Study of the solubilization of keratin from sheep wool in ionic liquids via Molecular Dynamics

A large part of what we know as the textile industry is based on the usage of sheep (*Ovis aires*) wool. When sheep wool is treated, there is a large amount of waste that is not used by the textile industry. This unused excess has several applications, as the wool is rich in several proteins and aminoacids and one of this aminoacids is keratin. Keratin is usually extracted by means of alkaline hydrolysis and acid hydrolysis and these process are harmful for the environment. Knowing this, new methodologies have been deployed for extracting keratin from sheep wool in order to reduce the environmental impact of this process. An alternative that has emerged in recent years is the use of ionic liquids, which are considered green solvents and more enviromental friendly compared to the bases and acids normally used in the previous process. In this work, Molecular Dynamics was used to study the interaction between two different ionic liquids and two aminoacids (cystine and cysteine), which are present in keratin and play a fundamental role in its extraction. The two ionic liquid used were based in the 1-butyl-3-methylimidazolium cation ( $[C_4mim]^+$ ), and study two anions were chosen: chloride ( $[Cl]^-$ ) and acetate ( $[Acet]^-$ ). Keratin extraction process takes place in two steps, the breakage of the cystine (dimer) disulfide bond, and the formation of the same bond between two cysteines (monomers). In the first step, the  $[C_4mim][Acet]$  ionic liquid showed a considerably better performance, in the final step  $[C_4mim][Acet]$  had a better performance. These conclusions were made based on the results of the radial distribution functions (RDFs) and spatial distribution functions (SDFs). For cysteine there was a stronger interaction between the anion and the protein, and for cystine there was a stronger interaction between the cation and the aminoacid. This is due to the chloride ions intracting with the monomers, for the dimer we had the 1-3-methylimidazolium cation being the main reason of interaction (this results were obtained by the analysis of the modules of the integrals of the RDFs and graphic description of the SDFs).

**Key words:** Molecular Dynamics, ionic liquids, keratin, wool, biomolecules, extraction.

## Lista de Figuras

Figura 1. Sulfitólise de um resíduo de cistina por um sulfito.....	20
Figura 2. Descrição gráfica da sulfitólise de um resíduo de cistina.....	21
Figura 3. Líquido Iônico nitrato de etilamônio ([EtNH <sub>3</sub> ][NO <sub>3</sub> ]).....	25
Figura 4. Ânion tetrafluoroborato ([BF <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> ).....	25
Figura 5. Ânion hexafluorofosfato ([PF <sub>6</sub> ] <sup>-</sup> ).....	26
Figura 6. Descrição gráfica do cálculo de uma função de distribuição radial (RDF).....	34
Figura 7. Cátion 1-butil-3-metilimidazólio ([C <sub>4</sub> mim] <sup>+</sup> ).....	36
Figura 8. Ânion acetato ([Acet] <sup>-</sup> ).....	36
Figura 9. Monômero cisteína.....	37
Figura 10. Dímero cistina.....	37
Figura 11. Monômero cisteína com grupos protetores (caps).....	38
Figura 12. Dímero cistina com grupos protetores (caps).....	38
Figura 13. Visualização do sistema de 8 cisteínas obtida pelo programa VMD.....	40
Figura 14. Visualização do sistema de 4 cistinas obtida pelo programa VMD.....	40
Figura 15. Função de distribuição espacial (SDF) do solvente [C <sub>4</sub> mim][Cl] ao redor das cisteínas (Sistema A) visualizada no programa VMD (com zoom).....	45
Figura 16. Função de distribuição espacial (SDF) do solvente [C <sub>4</sub> mim][Cl] ao redor das cisteínas (Sistema A) visualizada no programa VMD (caixa de simulação).....	46
Figura 17. Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do cátion [C <sub>4</sub> mim] <sup>+</sup> e o aminoácido cisteína (Sistema A) após 20 ns de simulação.....	47
Figura 18. Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do cátion [C <sub>4</sub> mim] <sup>+</sup> e o aminoácido cisteína (Sistema A) após 180 ns de simulação.....	48
Figura 19. Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion [Cl] <sup>-</sup> e o aminoácido cisteína (Sistema A) após 20 ns de simulação.....	49
Figura 20. Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion [Cl] <sup>-</sup> e o aminoácido cisteína (Sistema A) após 180 ns de simulação.....	50
Figura 21. Função de distribuição radial (RDF) entre a molécula de água e o aminoácido cisteína (Sistema A) após 20 ns de simulação.....	51
Figura 22. Função de distribuição radial (RDF) entre a molécula de água e o aminoácido cisteína (Sistema A) após 180 ns de simulação.....	52

Figura 23. Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion $[Cl]^-$ e o centro de massa do cátion $[C_4mim]^+$ após 20 ns de simulação (Sistema A).....	53
Figura 24. Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion $[Cl]^-$ e o centro de massa do cátion $[C_4mim]^+$ após 180 ns de simulação (Sistema A).....	54
Figura 25. Função de distribuição espacial (SDF) do solvente $[C_4mim][Cl]$ ao redor das cistinas (Sistema B) visualizada no programa VMD (com zoom).....	55
Figura 26. Função de distribuição espacial (SDF) do solvente $[C_4mim][Cl]$ ao redor das cistinas (Sistema B) visualizada no programa VMD (caixa de simulação).....	56
Figura 27. Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do cátion $[C_4mim]^+$ e o aminoácido cistina (Sistema B) após 20 ns de simulação.....	57
Figura 28. Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do cátion $[C_4mim]^+$ e o aminoácido cistina (Sistema B) após 180 ns de simulação.....	58
Figura 29. Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion $[Cl]^-$ e o aminoácido cistina (Sistema B) após 20 ns de simulação.....	59
Figura 30. Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion $[Cl]^-$ e o aminoácido cistina (Sistema B) após 180 ns de simulação.....	60
Figura 31. Função de distribuição radial (RDF) entre a molécula de água e o aminoácido cistina (Sistema B) após 20 ns de simulação.....	61
Figura 32. Função de distribuição radial (RDF) entre a molécula de água e o aminoácido cistina (Sistema B) após 180 ns de simulação.....	62
Figura 33. Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion $[Cl]^-$ e o centro de massa do cátion $[C_4mim]^+$ após 20 ns de simulação (Sistema B).....	63
Figura 34. Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion $[Cl]^-$ e o centro de massa do cátion $[C_4mim]^+$ após 180 ns de simulação (Sistema B).....	64
Figura 35. Função de distribuição espacial (SDF) do solvente $[C_4mim][Acet]$ ao redor das cisteínas (Sistema C) visualizada no programa VMD (com zoom).....	66
Figura 36. Função de distribuição espacial (SDF) do solvente $[C_4mim][Acet]$ ao redor das cisteínas (Sistema C) visualizada no programa VMD (caixa de simulação).....	67
Figura 37. Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do cátion $[C_4mim]^+$ e o aminoácido cisteína (Sistema C) após 20 ns de simulação.....	68
Figura 38. Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do cátion $[C_4mim]^+$ e o aminoácido cisteína (Sistema C) após 180 ns de simulação.....	69
Figura 39. Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion $[Acet]^-$ e o aminoácido cisteína (Sistema C) após 20 ns de simulação.....	70

Figura 40. Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion [Acet] <sup>-</sup> e o aminoácido cisteína (Sistema C) após 180 ns de simulação.....	71
Figura 41. Função de distribuição radial (RDF) entre a molécula de água e o aminoácido cisteína (Sistema C) após 20 ns de simulação.....	72
Figura 42. Função de distribuição radial (RDF) entre a molécula de água e o aminoácido cisteína (Sistema C) após 180 ns de simulação.....	73
Figura 43. Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion [Acet] <sup>-</sup> e o centro de massa do cátion [C <sub>4</sub> mim] <sup>+</sup> após 20 ns de simulação (Sistema C).....	74
Figura 44. Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion [Acet] <sup>-</sup> e o centro de massa do cátion [C <sub>4</sub> mim] <sup>+</sup> após 180 ns de simulação (Sistema C).....	75
Figura 45. Função de distribuição espacial (SDF) do solvente [C <sub>4</sub> mim][Acet] ao redor das cistinas (Sistema D) visualizada no programa VMD (com zoom).....	76
Figura 46. Função de distribuição espacial (SDF) do solvente [C <sub>4</sub> mim][Acet] ao redor das cistinas (Sistema D) visualizada no programa VMD (caixa de simulação).....	77
Figura 47. Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do cátion [C <sub>4</sub> mim] <sup>+</sup> e o aminoácido cistina (Sistema D) após 20 ns de simulação.....	78
Figura 48. Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do cátion [C <sub>4</sub> mim] <sup>+</sup> e o aminoácido cistina (Sistema D) após 180 ns de simulação.....	79
Figura 49. Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion [Acet] <sup>-</sup> e o aminoácido cistina (Sistema D) após 20 ns de simulação.....	80
Figura 50. Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion [Acet] <sup>-</sup> e o aminoácido cistina (Sistema D) após 180 ns de simulação.....	81
Figura 51. Função de distribuição radial (RDF) entre a molécula de água e o aminoácido cistina (Sistema D) após 20 ns de simulação.....	82
Figura 52. Função de distribuição radial (RDF) entre a molécula de água e o aminoácido cistina (Sistema D) após 180 ns de simulação.....	83
Figura 53. Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion [Acet] <sup>-</sup> e o centro de massa do cátion [C <sub>4</sub> mim] <sup>+</sup> após 20 ns de simulação (Sistema D).....	84
Figura 54. Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion [Acet] <sup>-</sup> e o centro de massa do cátion [C <sub>4</sub> mim] <sup>+</sup> após 180 ns de simulação (Sistema D).....	85
Figura 55. Clivagem de uma ligação dissulfeto realizada pelo sal sulfito de sódio.....	86
Figura 56. Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o cátion [C <sub>4</sub> mim] <sup>+</sup> e a cisteína (Sistema A) em 20 ns e 180 ns.....	87

Figura 57. Integral da sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o cátion [C <sub>4</sub> mim] <sup>+</sup> e a cisteína (Sistema A) em 20 ns e 180 ns.....	88
Figura 58. Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o ânion [Cl] <sup>-</sup> e a cisteína (Sistema A) em 20 ns e 180 ns.....	89
Figura 59. Integral da sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o ânion [Cl] <sup>-</sup> e a cisteína (Sistema A) em 20 ns e 180 ns.....	90
Figura 60. Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o ânion [Cl] <sup>-</sup> e o cátion [C <sub>4</sub> mim] <sup>+</sup> (Sistema A) em 20 ns e 180 ns.....	91
Figura 61. Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre a molécula de água e o aminoácido cisteína (Sistema A) em 20 ns e 180 ns.....	92
Figura 62. Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o cátion [C <sub>4</sub> mim] <sup>+</sup> e a cistina (Sistema B) em 20 ns e 180 ns.....	93
Figura 63. Integral da sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o cátion [C <sub>4</sub> mim] <sup>+</sup> e a cistina (Sistema B) em 20 ns e 180 ns.....	94
Figura 64. Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o ânion [Cl] <sup>-</sup> e a cistina (Sistema B) em 20 ns e 180 ns.....	95
Figura 65. Integral da sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o ânion [Cl] <sup>-</sup> e a cistina (Sistema B) em 20 ns e 180 ns.....	96
Figura 66. Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o ânion [Cl] <sup>-</sup> e o cátion [C <sub>4</sub> mim] <sup>+</sup> (Sistema B) em 20 ns e 180 ns.....	97
Figura 67. Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre a molécula de água e o aminoácido cistina (Sistema B) em 20 ns e 180 ns.....	98
Figura 68. Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o cátion [C <sub>4</sub> mim] <sup>+</sup> e a cisteína (Sistema C) em 20 ns e 180 ns.....	99
Figura 69. Integral da sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o cátion [C <sub>4</sub> mim] <sup>+</sup> e a cisteína (Sistema C) em 20 ns e 180 ns.....	100
Figura 70. Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o ânion [Acet] <sup>-</sup> e a cisteína (Sistema C) em 20 ns e 180 ns.....	101
Figura 71. Integral da sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o ânion [Acet] <sup>-</sup> e a cisteína (Sistema C) em 20 ns e 180 ns.....	102
Figura 72. Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o ânion [Acet] <sup>-</sup> e o cátion [C <sub>4</sub> mim] <sup>+</sup> (Sistema C) em 20 ns e 180 ns.....	103
Figura 73. Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre a molécula de água e o aminoácido cisteína (Sistema C) em 20 ns e 180 ns.....	104

Figura 74. Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o cátion [C <sub>4</sub> mim] <sup>+</sup> e a cistina (Sistema D) em 20 ns e 180 ns.....	105
Figura 75. Integral da sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o cátion [C <sub>4</sub> mim] <sup>+</sup> e a cistina (Sistema D) em 20 ns e 180 ns.....	106
Figura 76. Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o ânion [Acet] <sup>-</sup> e a cistina (Sistema D) em 20 ns e 180 ns.....	107
Figura 77. Integral da sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o ânion [Acet] <sup>-</sup> e a cistina (Sistema D) em 20 ns e 180 ns.....	108
Figura 78. Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o ânion [Acet] <sup>-</sup> e o cátion [C <sub>4</sub> mim] <sup>+</sup> (Sistema D) em 20 ns e 180 ns.....	109
Figura 79. Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre a molécula de água e o aminoácido cistina (Sistema D) em 20 ns e 180 ns.....	110

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição escolhida para os sistemas de simulação.....	39
Tabela 2. Comparação entre os valores das integrais das RDFs do par cátion/aminoácido para todos os sistemas.....	112
Tabela 3. Comparação entre os valores das integrais das RDFs do par cátion/aminoácido para todos os sistemas em uma distância fixa (0,72 nm).....	112
Tabela 4. Comparação entre os valores das integrais das RDFs do par ânion/aminoácido para todos os sistemas.....	113
Tabela 5. Comparação entre os valores das integrais das RDFs do par ânion/aminoácido para todos os sistemas em uma distância fixa (0,72 nm).....	114

## **Lista de Abreviaturas**

DM – Dinâmica Molecular

LI – Líquido Iônico

DFT – Density Functional Theory

SDF – Spatial Distribution Function

RDF – Radial Distribution Function

VMD – Visual Molecular Dynamics

GROMACS – Groningen Machine for Chemical Simulations

Cys – Cisteína

Cys2 – Cistina

C<sub>4</sub>mim – 1-butil-3-metilimidazólio

Acet – Acetato

SDS – Sodium dodecyl sulfate

LBFGS - Limited-memory BFGS

BFGS – Broyden–Fletcher–Goldfarb–Shanno

PES – Potential Energy Surface

## Sumário

1	Introdução.....	15
2	Revisão Bibliográfica.....	17
2.1	Queratina e lã de ovelha.....	17
2.1.1	A ovelha.....	17
2.1.2	A lã de ovelha.....	17
2.1.3	A queratina.....	19
2.1.4	Alguns métodos para a extração de queratina.....	20
2.1.5	Sobre métodos e aplicações.....	24
2.2	Líquidos Iônicos.....	24
2.2.1	Breve história dos líquidos iônicos (LIs).....	24
2.2.2	Propriedades gerais dos líquidos iônicos (LIs).....	26
2.2.3	Aplicações.....	27
2.2.4	Dissolução de biopolímeros com líquidos iônicos.....	27
2.3	A Dinâmica Molecular.....	28
2.3.1	A Química Computacional.....	28
2.3.2	Superfície de Energia Potencial (PES).....	29
2.3.3	Aspectos centrais da Dinâmica Molecular.....	30
2.3.4	Métodos numéricos de resolução de equações do movimento.....	31
2.3.5	Sobre sistemas e ensembles.....	33
2.3.6	Função radial de distribuição (RDF).....	34
3	Metodologia.....	36
4	Resultados.....	44
4.1	Sistema A: Cloreto de 1-butil-4-metilimidazólio ([C <sub>4</sub> mim][Cl]) e Cisteína (Cys).....	44
4.1.1	Função de Distribuição Espacial do sistema (SDF).....	44
4.1.2	Função de Distribuição Radial (RDF) entre cátion e aminoácido.....	47
4.1.3	Função de Distribuição Radial (RDF) entre ânion e aminoácido.....	49
4.1.4	Função de Distribuição Radial (RDF) entre água e aminoácido.....	51
4.1.5	Função de Distribuição Radial (RDF) entre cátion e ânion.....	52
4.2	Sistema B: Cloreto de 1-butil-4-metilimidazólio ([C <sub>4</sub> mim][Cl]) e Cistina (Cys <sub>2</sub> ).....	54
4.2.1	Função de Distribuição Espacial do sistema (SDF).....	54
4.2.2	Função de Distribuição Radial (RDF) entre cátion e aminoácido.....	57
4.2.3	Função de Distribuição Radial (RDF) entre ânion e aminoácido.....	59

4.2.4	Função de Distribuição Radial (RDF) entre água e aminoácido.....	60
4.2.5	Função de Distribuição Radial (RDF) entre cátion e ânion.....	62
4.3	Sistema C: Acetato de 1-butil-4-metilimidazólio ([C <sub>4</sub> mim][Acet]) e Cisteína (Cys)..	65
4.3.1	Função de Distribuição Espacial do sistema (SDF).....	65
4.3.2	Função de Distribuição Radial (RDF) entre cátion e aminoácido.....	67
4.3.3	Função de Distribuição Radial (RDF) entre ânion e aminoácido.....	70
4.3.4	Função de Distribuição Radial (RDF) entre água e aminoácido.....	72
4.3.5	Função de Distribuição Radial (RDF) entre cátion e ânion.....	73
4.4	Sistema D: Acetato de 1-butil-4-metilimidazólio ([C <sub>4</sub> mim][Acet]) e Cistina (Cys2)..	76
4.4.1	Função de Distribuição Espacial do sistema (SDF).....	76
4.4.2	Função de Distribuição Radial (RDF) entre cátion e aminoácido.....	78
4.4.3	Função de Distribuição Radial (RDF) entre ânion e aminoácido.....	79
4.4.4	Função de Distribuição Radial (RDF) entre água e aminoácido.....	81
4.4.5	Função de Distribuição Radial (RDF) entre cátion e ânion.....	83
5	Discussão.....	86
5.1	Funções de distribuição espacial.....	86
5.2	Evolução temporal dos sistemas.....	87
5.2.1	Evolução temporal do sistema A.....	87
5.2.2	Evolução temporal do sistema B.....	92
5.2.3	Evolução temporal do sistema C.....	98
5.2.4	Evolução temporal do sistema D.....	104
5.3	Comparação entre os sistemas.....	111
5.3.1	Comparação das integrais das RDFs dos cátions.....	111
5.3.2	Comparação das integrais das RDFs dos ânions.....	113
6	Conclusão.....	115
7	Referências.....	118

## 1 Introdução

A indústria têxtil é conhecida por gerar grandes quantidades de resíduos, muitos dos quais são prejudiciais ao meio ambiente. A lã, por sua vez, é um material natural e biodegradável, mas também produz resíduos quando processada. O descarte inadequado desses resíduos pode causar poluição e afetar negativamente os ecossistemas. No entanto, existem iniciativas que visam a redução e o reaproveitamento desses resíduos, como a reciclagem da lã, que é um material complexo formado por diversas biomoléculas. Uma delas é a queratina.

A queratina é uma proteína fibrosa que é o principal componente de unhas, cabelos, pelos e penas e outros tecidos relacionados a proteção e isolamento térmico em animais. As moléculas de queratina são formadas por longas cadeias de aminoácidos entrelaçadas entre si em uma estrutura de hélice. A resistência térmica e mecânica das fibras é dada pela presença de ligações dissulfeto entre cisteínas, que são aminoácidos presentes nessa estrutura helicoidal.

São diversos os métodos para a extração desse biopolímero, podemos citar os principais que são: hidrólise alcalina, hidrólise ácida, hidrólise enzimática, extração assistida por micro-ondas, sulfólise e líquidos iônicos. Com essa queratina extraída é possível a confecção de diversos materiais, dos quais podemos citar na área dos cosméticos os shampoos e condicionadores contendo queratina que ajudam na hidratação e na fortificação dos fios de cabelo. Na indústria têxtil, novas fibras e tecidos são criados com propriedades impermeáveis a partir da queratina extraída. Por ser um material biodegradável, temos a aplicação dessa proteína na área da medicina com novos curativos e mecanismos de *drug delivery*.

Os líquidos iônicos são uma alternativa interessante para o processo de extração da queratina por serem considerados solventes verdes com propriedades físico-químicas variáveis dependendo de sua estrutura. Além disso, são compostos pouco voláteis, líquidos a temperatura ambiente, com grande estabilidade térmica e condutividade. O rendimento do processo de extração é dependente da combinação de cátion e do ânion utilizada, além do tempo de extração e da temperatura na qual ocorre o processo.

Os líquidos iônicos também podem servir de co-solvente ou auxiliar em metodologias mais tradicionais de solubilização da queratina. Nesse estudo foram utilizados dois líquidos iônicos diferentes para a compreensão do processo de solubilização da queratina. Os dois solventes são baseados no mesmo cátion o 1-butil-3-metilimidazólio ( $[C_4mim]^+$ ), os ânions utilizados foram o acetato ( $[Acet]^-$ ) e o cloreto ( $[Cl]^-$ ).

A metodologia escolhida para compreender esse fenômeno foi a dinâmica molecular. Essa metodologia é baseada na simulação computacional de sistemas contendo átomos e moléculas em um intervalo de tempo. Essas simulações são realizadas através de algoritmos que resolvem numericamente as equações do movimento de Newton. Com o resultado dessas simulações é possível compreender a estrutura dos sistemas, suas interações e prever o comportamento das moléculas estudadas em diversos meios como em soluções, líquidos, sólidos e gases.

Para descrever a queratina, a escolha de dois aminoácidos diferentes foi realizada, cistina (cys2) e cisteína (cys). A cisteína é o aminoácido mais abundante na queratina da lã de ovelha, dentro da estrutura da lã essas cisteínas são ligadas por ligações dissulfeto. Nesse contexto foi escolhida a cistina, que é o dímero do aminoácido cisteína. Nesse estudo foram montados quatro sistemas, dois com cistinas e dois com cisteínas, um para cada líquido iônico.

Para analisar os sistemas estudados, foram utilizadas majoritariamente duas formas de análise, a função da distribuição radial (*radial distribution function*) e a função de distribuição espacial (*spatial distribution function*). A primeira nos dá uma visão geral da morfologia dos sistemas postos e também a intensidade das interações de suas partes a uma certa distância, enquanto a segunda nos fornece uma representação visual dessas interações que ocorrem. As integrais das RDFs nos demonstram a quantidade de pares de um sistema em uma distância  $r$ , com esses dados podemos fazer comparações entre os dois líquidos iônicos escolhidos e também comparar a diferença de interação dos pares iônicos com o aminoácido na forma de monômero ou dímero.

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Queratina e lã de ovelha

#### 2.1.1 A ovelha

O animal que conhecemos como a ovelha doméstica, tem o nome científico de *Ovis aries* e é um mamífero ruminante que nos fornece leite, lã, carne e couro. Os primeiros relatos de domesticação deste animal vem de cerca de 9000 a.C. na Mesopotâmia<sup>1</sup>, porém as primeiras evidências do uso da lã da ovelha foram encontrados no Irã e datam de 6000 a.C., os registros das primeiras roupas de um tecido de lã, são de 2 a 3 mil anos depois<sup>2</sup>.

Atualmente existem mais de 1 bilhão de ovelhas no mundo<sup>3</sup>, divididas em mais de 900 raças, no Brasil temos aproximadamente 20 milhões de ovelhas. A China é o país que mais possui ovelhas (190 milhões), mas o título de maior quantidade de lã produzida vai para a Austrália. Mesmo sendo uma atividade muito comum, o uso da lã como tecido representa apenas 1% dos tecidos utilizados, ficando bastante atrás do poliéster (51,5%) e do algodão (24,4%)<sup>4</sup>.

#### 2.1.2 A lã de ovelha

A lã de ovelha é um material fibroso composto por diversas proteínas sendo a principal delas a  $\alpha$ -queratina. Comparado com outros animais que também produzem lã, a ovelha é o que produz uma maior quantidade por hectare. Um estudo de Moeller e Popescu<sup>5</sup>, demonstrou que uma ovelha produz aproximadamente 1 kg de lã bruta por ano por hectare de pasto. Esse material é considerado uma eco-fibra, pois é biodegradável, natural e renovável.

A fibra da lã é gerada em folículos que estão presentes nesses mamíferos, quanto mais longe do bulbo (fóliculo), maior a quantidade de queratina encontrada na fibra. A taxa de crescimento da fibra é de cerca de 1cm por ano para cada fóliculo, e a densidade de folículos varia conforme a raça da ovelha. Como vimos anteriormente, a maioria das ovelhas produz cerca de 1kg de lã por ano, porém a ovelha da raça Merino Australiana produz 4kg de lã por ano. Isso explica o fato da Austrália ser a maior produtora de lã do mundo.

Em um estudo de Popescu e Hoecker<sup>6</sup>, foi realizada a análise elementar da lã de ovelha e foram encontrados os seguintes resultados: a lã é composta principalmente por carbono

(50%), hidrogênio (7%), oxigênio (22%), nitrogênio (16%) e enxofre (5%) (as porcentagens estão em massa). A alta quantidade de enxofre encontrada nas fibras ocorre devido à alta quantidade de cistina. Algumas vezes são encontrados traços de metais na lã, esses vêm de fontes externas e se incorporam à queratina<sup>7</sup>.

A lã de ovelha é um biopolímero formado por mais de 20 aminoácidos naturais, que se ligam entre si formando as cadeias proteicas que compoem a lã de ovelha. Popescu e Hoecker também separaram esses aminoácidos em quatro categorias: aminoácidos com características “ácidas” (ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina e glutamina), “básicos” (arginina, lisina, histidina e triptofano), com hidroxila na cadeia lateral (serina, treonina, tirosina), sulfurados (cisteína, tiocisteína, cistina e metionina), e sem grupos reativos nas cadeias laterais (glicina, alanina, valina, prolina, leucina, isoleucina e fenilalanina).

As fibras da lã possuem caráter catiônico e aniônico devido aos diferentes aminoácidos que formam as cadeias proteicas, podendo assumir papel de ácido e de base. Dessa forma podemos caracterizar essas fibras como anfóteras. O estudo da estrutura dessa fibra é bastante antigo, nos anos 30 foram realizados ensaios difração de raios-X, demonstrando a presença de uma fase cristalina. Posteriormente esses resultados foram interpretados por Pauling<sup>8</sup>, como uma estrutura de  $\alpha$ -hélice devido à estrutura secundária da queratina.

A organização em  $\alpha$ -hélice da fibra da lã é organizada em protofilamentos, protofibrilas, microfibrilas e filamentos intermediários. Duas  $\alpha$ -hélices se juntam em uma estrutura de dupla hélice, gerando um dímero. Dois desses dímeros formam um tetrâmero, dois tetrâmeros formam um protofilamento, dois protofilamentos geram uma protofibrila e quatro protofibrilas geram uma microfibrila. A superfície da fibra de lã tem a aparência de escamas.

O resultado da lã ter uma estrutura tão estável faz com que ela possua um tempo de vida muito longo, sobrevivendo centenas de anos sem perder a sua aparência. Um exemplo dessa propriedade são os tapetes dos povos Pazyryk. Nos anos 40 foram encontrados na Sibéria tapetes datados de 500 a.C. Ainda em bom estado, esse tapete está em exposição no museu Hermitage, em São Petesburgo.

A lã é um material extremamente versátil. Ela pode ser usada para um grande número de produtos, desde roupas e tecidos, até itens de alto valor, como tapetes, estofados e outros itens de decoração. A lã é um material tão antigo quanto a história da humanidade. Ainda que hoje ela seja usada na manufatura, muito antes disso ela já era utilizada pelos homens como forma de se aquecer.

### 2.1.3 A queratina

A queratina faz parte de uma família de proteínas fibrosas estruturais também conhecidas como escleroproteínas. Alfa-queratina ( $\alpha$ -queratina) é um tipo de queratina encontrada em vertebrados. É o principal material estrutural que compõe escamas, cabelos, unhas, penas, chifres, garras, cascos e a camada externa da pele entre os vertebrados. A queratina também protege as células epiteliais. De forma geral, é extremamente insolúvel em água e solventes orgânicos. A queratinização excessiva participa da fortificação de certos tecidos, como chifres de bovinos e rinocerontes e escamas de tatus. As outras matérias biológicas conhecidas que se aproximam da dureza do tecido queratinizado são: a quitina (presente no exoesqueleto de insetos) e a hidroxiapatita. A queratina vem em dois tipos: as formas primitivas, mais moles, encontradas em todos os vertebrados e as formas mais duras, derivadas, encontradas apenas entre os saurópsidos (répteis e pássaros).

Devido a suas propriedades a queratina tem sido utilizada no desenvolvimentos de novos materiais com aplicação na biomedicina: bioplásticos degradáveis<sup>9</sup> e filmes com diversas aplicações<sup>10</sup>. A queratina de lã tem recebido destaque pois há uma geração muito grande de resíduo na indústria têxtil. O maior desafio para a extração dessa queratina da lã é a quebra de ligações dissulfeto que existem nessa proteína.

A estrutura primária da queratina é composta por aminoácidos. Os aminoácidos mais abundantes nessa estrutura são glicina, alanina, cisteína e valina. A estrutura secundária dessa proteína é formada por  $\alpha$ -hélices e  $\beta$ -folhas. Na sua estrutura terciária estão as ligações dissulfeto entre as hélices. Essas ligações são formadas pelos resíduos de cisteína na estrutura primária. Esse tipo de ligação também faz com que o material fique mais resistente e duro, e também faz com que seja mais difícil a degradação do material por enzimas.

A queratina também se apresenta na sua estrutura quaternária, isso ocorre quando as moléculas da proteína se associam para formar filamentos. As ligações que mantêm essas moléculas associadas são as ligações de hidrogênio.

A lã de ovelha é formada por 95% de queratina e nessa queratina há altas quantidades de cistina, glicina, prolina e serina. A cistina da queratina tem um papel fundamental na determinação das propriedades físico-químicas da lã de ovelha. Se for comparada com outras proteínas, a queratina tem uma solubilidade menor e uma maior estabilidade, devido às ligações dissulfeto entre as cadeias de aminoácidos.

Além das ligações dissulfeto, outras interações como ligação de hidrogênio, ligações iônicas e interações hidrofóbicas têm um papel chave na estabilidade desse composto. As

ligações iônicas presentes dependem do pH do meio, e em meios muito ácidos ou alcalinos essas interações deixam de acontecer (visto que se dão pela interação do ânion carboxila com o cátion amônio).

Existem dois tipos de queratina: a dura e a mole. Queratinas com uma quantidade de enxofre de 4-8% são chamadas de queratinas duras, nessa categoria se encaixa a lã de ovelha. A queratina da epiderme da pele humana possui apenas 2% de enxofre em sua composição e uma quantidade muito maior de água, assim sendo classificada como uma queratina mole.

#### 2.1.4 Alguns métodos para a extração de queratina

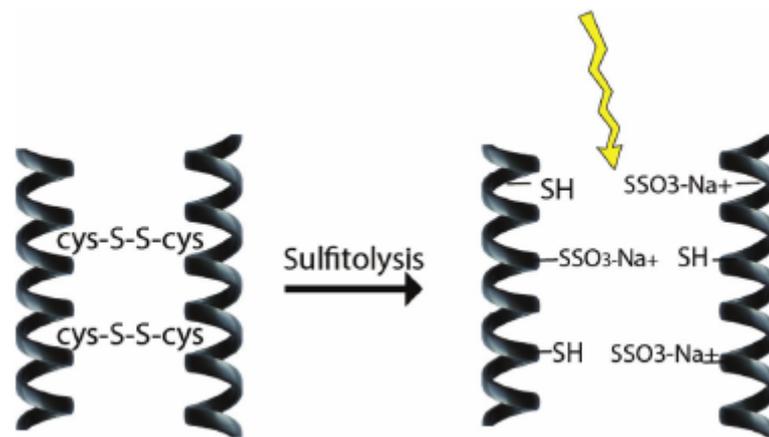
##### Sulfitólise

A sulfitólise consiste na quebra das ligações S-S existentes entre os resíduos da proteína, via redução. O método mais comum para esse processo é uso do MEC (2-mercaptoetanol). Mesmo realizando a reação com um bom rendimento, ele é um reagente caro, tem um odor desagradável e é muito danoso para o meio ambiente.

Uma alternativa ao uso do MEC é a utilização do sulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ). Um estudo demonstra que o ânion mais importante nessa reação é o bissulfito<sup>11</sup>. A imagem abaixo demonstra o processo de sulfitólise.



**Figura 1.** Sulfitólise de um resíduo de cistina por um sulfito.



**Figura 2.** Descrição gráfica da sulfitólise de um resíduo de cistina.

Para a lã de ovelha, com a utilização de sulfitos para a dissolução e extração de queratina, via sulfitólise, foram obtidos resultados que variaram entre 38% e 76,6% na taxa de extração de queratina<sup>12,13</sup>.

### Redução

Como a estabilidade das cadeias peptídicas é relacionada com as ligações dissulfeto na cadeia, existe a possibilidade da redução dessa ligação utilizando alguns compostos químicos contendo tióis. Historicamente foram utilizados para essa redução o triglicolato de sódio e o ácido triglicólico. Essa metodologia é utilizada desde os anos 30<sup>11</sup>. Para esse tipo de extração é necessário um pH básico (normalmente é realizada em um pH entre 10,5 e 12,3)<sup>14</sup>.

Um dos problemas desse método é a formação de componentes tóxicos e a degradação da proteína causada pelo alto pH e também pelas altas temperaturas. Muitas vezes esses estudos foram realizados com agentes desnaturantes e sob atmosfera de nitrogênio, o que tornou esse método também muito trabalhoso. Também foram utilizados alguns surfactantes (como por exemplo o SDS) para impedir a agregação das cadeias proteicas<sup>15</sup>. Isso fez com que o método de redução se tornasse bastante interessante e tivesse um rendimento muito maior<sup>16</sup> do que o encontrado anteriormente.

## Oxidação

Métodos de extração de queratina por oxidação não são novidade. Em 1955, Earland e colaboradores<sup>17</sup> realizaram essa extração com o ácido peracético e tratamento com amônia. Anos depois, Buchman e colaboradores fizeram a mesma reação e utilizaram HCl para a precipitação da queratina solubilizada, e com esse método foi obtido um rendimento de cerca de 6,6%. Com essa metodologia boa parte da lã é solubilizada, mas é sempre encontrado resíduo de queratina.

Em comparação com os outros métodos citados, esse é o menos utilizado pelo baixo rendimento.

## Método Alcalino

É sabido que soluções muito alcalinas em temperaturas muito elevadas são capazes de solubilizar a lã de ovelha<sup>18</sup>. Os maiores problemas dessa metodologia são a grande quantidade de solvente alcalino utilizado, a quebra das cadeias proteicas e a grande quantidade de ácido necessária para a neutralização e precipitação da queratina. Nessa metodologia o solvente mais utilizado é o hidróxido de sódio, em temperaturas superiores a 100 °C.

Esse método decompõe as cistinas do biopolímero<sup>19</sup>, sendo mais útil para a produção de filmes e bioplásticos, materiais mais flexíveis e biodegradáveis. Além disso, essa metodologia possui um baixo rendimento.

## Extração assistida por micro-ondas

Com essa metodologia de extração, Zoccola e colaboradores utilizaram radiação de micro-ondas por 7 minutos, em temperaturas de até 180 °C, com um rendimento de 60%<sup>20</sup>. O papel principal das micro-ondas seria o aquecimento da solução de forma homogênea e mais rápido.

Assim como os outros métodos de altas temperaturas, há uma queda muito grande na quantidade de cisteína. Outro fator que é bastante desconhecido é a interação das radiações eletromagnéticas com a lã<sup>21</sup>. As inúmeras formas de ligação encontradas dentro da proteína e as configurações de  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$  fazem com que o mecanismo desse tipo de reação não seja tão conhecido.

## Líquidos Iônicos

Devido a interações covalentes e não-covalentes que se apresentam na lã de ovelha, é muito difícil dissolvê-la em apenas um solvente orgânico. Para o uso desses compostos foi realizada uma dissolução com o líquido iônico e precipitação com outro solvente (água, metanol ou etanol). Nesse processo foi identificado que o melhor líquido iônico foi o [C<sub>4</sub>mim][Cl], com os ânions tetrafluoroborato (BF<sub>4</sub>), hexafluorofosfato (PF<sub>6</sub>) e brometo (Br) tendo um desempenho pior<sup>22, 23, 24</sup>.

Nos estudos que os líquidos iônicos foram utilizados junto com o sulfito de sódio, é proposto que os líquidos iônicos não têm uma grande atuação na sulfólise e servem para afetar as ligações de hidrogênio das proteínas. Dessa forma, o cloreto tem um caráter mais nucleofílico comparado aos outros ânions utilizados.

Outra hipótese é que os líquidos iônicos quebram a camada lipídica que se encontra presente na superfície da lã. Essa camada lipídica é majoritariamente formada por tioésteres que são rompidos pelos ânions Cl<sup>-</sup>. Após adentrar no cerne da proteína, o ânion é o agente principal na quebra das ligações intramoleculares das cadeias proteicas (ligações de hidrogênio, ligações covalentes, interações hidrofóbicas).

Um estudo realizado por Zhang e colaboradores em 2017<sup>25</sup>, demonstra que os líquidos iônicos também podem ter um papel na quebra da ligação dissulfeto. Nesse estudo é mostrado que é necessário pelo menos uma quebra de 65% das ligações S-S para a solubilização da lã de ovelha nos líquidos iônicos.

No mesmo estudo, foram analisadas duas variáveis principais: a porcentagem de ligações S-S quebradas e a porcentagem de queratina recuperada. Foram analisados diversos líquidos iônicos, onde são destacados líquidos iônicos contendo os ânions acetato e cloreto. São eles: [C<sub>2</sub>mim][Acet], [C<sub>4</sub>mim][Acet], [C<sub>2</sub>mim][Cl] e [C<sub>4</sub>mim][Cl]. Os líquidos que apresentaram uma quebra de mais de 90% das ligações dissulfeto foram os baseados no ânion acetato: [C<sub>2</sub>mim][Acet] e [C<sub>4</sub>mim][Acet], porém, a porcentagem de queratina recuperada foi inferior a 20% em ambos os casos.

Para os LIs baseados no cloreto, foi obtida uma taxa de quebra de ligação S-S de cerca de 70%, mas diferente dos casos dos compostos baseados no ânion acetato, a taxa de recuperação ficou perto de 75% para ambos os líquidos: [C<sub>2</sub>mim][Cl] e [C<sub>4</sub>mim][Cl].

### 2.1.5 Sobre métodos e aplicações

Como discutido anteriormente, a lã de ovelha possui resistência a bases, ácidos e solventes orgânicos em geral devido às ligações entre enxofres. Métodos de sulfólise são danosos ao meio ambiente devido aos solventes implementados, como por exemplo, tióis e 2-mercaptoetanol. Metodologias de oxidação são efetivas e separam bem as frações de queratina  $\alpha$  e  $\beta$ , em contrapartida, utilizam uma grande quantidade de solventes oxidantes.

Para superação desses desafios impostos pela natureza da lã, estão sendo estudadas novas maneiras de extração de queratina, principalmente através dos líquidos iônicos e outros solventes eutéticos, além da combinação das técnicas já citadas<sup>26</sup>.

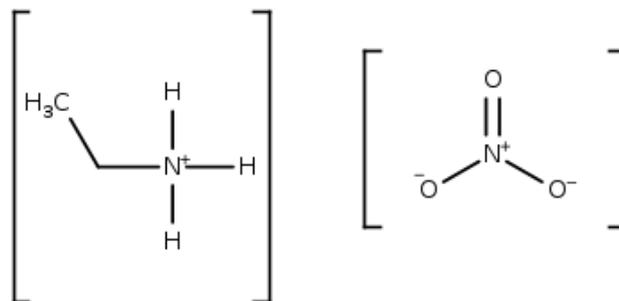
Esse tipo de estudo tem uma importância ampla no campo da biomedicina. São feitos de queratina: esponjas<sup>27</sup>, hidrogéis<sup>28</sup>, curativos<sup>29</sup> e filmes em geral<sup>30</sup>. A vantagem do uso da queratina para a confecção desses biomateriais é interessante devido a biodegradabilidade, biocompatibilidade e o fato da queratina ser um material de fácil obtenção, visto que pode vir da lã e até de cabelo.

Devido às dificuldades de solubilização da queratina de lã, os biomateriais compostos por essa matéria-prima ainda não são mais comuns. Para mudar esse panorama, outras metodologias também vêm sendo estudadas: métodos de solubilização utilizando enzimas<sup>31</sup> e fluidos supercríticos<sup>32</sup>. Dessa forma, é possível observar um horizonte onde principalmente na área de biomedicina, cada vez mais, serão utilizados biomateriais provenientes da queratina.

## 2.2 Líquidos Iônicos

### 2.2.1 Breve história dos líquidos iônicos (LIs)

O primeiro registro de um líquido iônico foi há mais de 100 anos atrás, em 1914. Ainda chamado de sal fundido, foi determinado que o ponto de fusão do nitrato de etilamônio (Figura 3) era de 12°C<sup>33</sup>, nos anos seguintes, não foram obtidos muitos avanços nesse ramo da química, pelo menos até a década de 60.

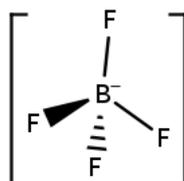


**Figura 3.** Líquido Iônico nitrato de etilamônio ( $[\text{EtNH}_3][\text{NO}_3]$ ).

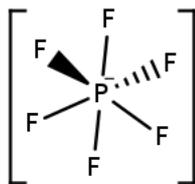
Em 1963, Yoke e colaboradores<sup>34</sup> sintetizaram um novo composto iônico que era líquido em temperatura ambiente. Esse composto tinha como cátion o trietilamônio ( $[\text{Et}_3\text{N}]^+$ ) e como ânion o clorocuprato ( $[\text{CuCl}_2]^-$ ). A síntese dessa nova substância foi realizada a partir da mistura de cloreto cuproso e cloreto de trietilamônio.

Uma das primeiras revoluções no ramo dos líquidos iônicos, também conhecidos como RTILs, do inglês *Room temperature ionic liquids*, foi a síntese de líquidos iônicos com cátions alquiperidínicos e 1,3-dialquilimidazólios e ânions haloaluminatos. Esses estudos foram conduzidos na Air Force Academy na década de 70<sup>35</sup>. O grande problema encontrado nesses novos líquidos iônicos baseados em haloaluminatos foi a sensibilidade à umidade atmosférica, os tornando instáveis fora de atmosfera inerte.

O problema encontrado na década de 70 foi resolvido quando nos anos 90<sup>36</sup> foram sintetizados líquidos iônicos baseados na combinação de cátions imidazólios com novos ânions: tetrafluoroborato ( $[\text{BF}_4]^-$ ) e hexafluorofosfato ( $[\text{PF}_6]^-$ ). Esses compostos foram um grande marco nessa área do conhecimento e até hoje são extensivamente estudados<sup>37</sup>.



**Figura 4.** Ânion tetrafluoroborato ( $[\text{BF}_4]^-$ ).



**Figura 5.** Ânion hexafluorofosfato ( $[PF_6]^-$ ).

### 2.2.2 Propriedades gerais dos líquidos iônicos (LIs)

Grande parte dos líquidos iônicos tem uma estrutura baseada em um cátion orgânico e volumoso e um ânion inorgânico (na maioria das vezes). Pode-se citar como exemplos de cátions comuns neste ramo: 1,3-dialquilimidazólios, N-alquilpiridíneos, piperidínio, fosfônios. Como ânions é comum encontrar os já citados: tetrafluoroborato, hexafluorofosfato, e também acetato e halogênios em geral.

As características mais interessantes dos LIs são: pressão de vapor negligenciável (não-voláteis), não serem inflamáveis, grande estabilidade térmica (alta temperatura de decomposição) e boa condutividade elétrica. Além disso, devido a característica de serem solventes polares não-coordenantes, os líquidos iônicos conseguem solvatar uma gama de moléculas orgânicas<sup>38</sup> e inorgânicas<sup>39</sup>.

Uma outra propriedade que os líquidos iônicos têm em comum é a capacidade de modificação de suas propriedades com alterações na estrutura. Por exemplo, se aumentarmos as cadeias carbônicas nos cátions escolhidos, o ponto de fusão do líquido iônico será maior. Para mudar a viscosidade de um líquido iônico, podemos mudar o ânion. Quanto menos volumoso, simétrico e com baixo peso molecular for o ânion, menos viscoso o líquido iônico será<sup>40</sup>.

Surgindo da diferente combinação de cátions e ânions, é possível que a quantidade de líquidos iônicos possíveis passe de um trilhão<sup>41</sup>. Dessa forma, é interessante compreender a relação entre as suas estruturas e propriedades. Uma ferramenta para melhor compreensão dessa relação é o uso da química teórica, que busca criar modelos de predição das características físico-químicas e propriedades desses compostos, para que dessa forma haja concordância nos valores calculados com os valores encontrados em laboratório.

### 2.2.3 Aplicações

Com o crescente interesse na química verde, os líquidos iônicos adquiriram um papel importante em diversas áreas do conhecimento. Podemos citar os principais campos onde essas substâncias têm tido destaque: eletroquímica, solventes verdes, química analítica e ambiental, síntese de moléculas bioativas (síntese de medicamentos, materiais antimicrobianos e *drug delivery*).

Os líquidos iônicos são interessantes na área de eletroquímica por terem ótimas propriedades físico-químicas como: alta viscosidade, presença de eletrólitos condutores, alta estabilidade térmica, gerando assim uma extensa janela de potencial eletroquímico<sup>42, 43</sup>.

Na química analítica, novas aplicações de líquidos iônicos estão presentes nas áreas de espectroscopia<sup>44</sup>, cromatografia<sup>45,46</sup> desenvolvimento de sensores químicos<sup>47</sup> e eletroforese capilar<sup>48</sup>.

O campo do conhecimento onde o uso desses compostos é mais proeminente é o de solventes verdes. Como indicado anteriormente, em geral, esses materiais têm uma pressão de vapor negligenciável e alta estabilidade térmica. Dessa forma, eles têm como função substituir solventes orgânicos e inorgânicos em processos químicos. Um desses processos que podemos destacar é a remoção de impurezas na extração de gás natural<sup>49, 50, 51</sup> (substituindo aminas) e a dissolução de biomoléculas<sup>52,53</sup> (substituindo solventes inorgânicos como HCl e NaOH).

### 2.2.4 Dissolução de biopolímeros com líquidos iônicos

A característica dos líquidos iônicos mais importante para esse trabalho é a capacidade deles dissolverem diversos biopolímeros, com estruturas bastante diferentes. Podemos citar como exemplos de biopolímeros: celulose<sup>54</sup>, hemicelulose<sup>55</sup>, lignina<sup>56</sup>, queratina<sup>57</sup>, amido<sup>58</sup> e pectina<sup>59</sup>. Na maioria dos casos essa dissolução se dá pela perturbação das ligações de hidrogênio inter e intramoleculares destes polímeros. Os estudos citados demonstram que tanto os cátions quanto os ânions têm um papel importante na dissolução dessas moléculas, porém esse efeito é mais pronunciado nos ânions.

A dissolução de biopolímeros tem um papel relevante na geração de energia, no que é chamado de biomassa<sup>60</sup>. Biomassa é uma fonte de energia que pode ser animal ou vegetal. O material necessário para geração dessa fonte de energia pode vir de resíduos da agricultura, pecuária, restos de alimentos, excremento e lixo. O nosso país tem uma posição privilegiada na geração de energia por biomassa, ficando apenas atrás da China. Um estudo realizado em

2020<sup>61</sup> pela Agência Internacional para as Energias Renováveis (IRENA) demonstrou que o Brasil gerou 15228 MW de energia a partir de biocombustíveis sólidos e resíduos renováveis.

Os processos de geração de biomassa e extração de substratos provindos de fontes naturais normalmente demandam grandes quantidades de energia e solventes orgânicos bastante voláteis. Em muitos casos, o uso desse tipo de solvente faz com que a massa molecular do biopolímero extraída seja muito reduzida durante o processo. Nesse contexto entram os líquidos iônicos, que possuem uma baixa pressão de vapor e, em muitos casos, são utilizados nesses processos de extração demandando um menor custo energético.

A primeira vez que um líquido iônico foi utilizado para processar biomassa foi em 2002, com a dissolução de celulose utilizando um líquido iônico com cátion imidazólio<sup>62</sup>. Atualmente, esses processos se tornaram cada vez mais comuns com a descoberta de diversos líquidos iônicos capazes de dissolver celulose<sup>63, 64</sup>, além de possuírem capacidade de formar filmes e fibras deste biopolímero<sup>65, 66</sup> e possibilidade de funcionalização<sup>67, 68</sup>.

Os biopolímeros têm estruturas muito diversas, com isso temos que diferentes líquidos iônicos agem de diferentes maneiras para os dissolverem. A questão chave é compreender como combinações diferentes de cátions e ânions agem sobre esses substratos. Por exemplo, líquidos iônicos baseados no cátion 1-butil-3-metilimidazólio são notórios por dissolverem celulose<sup>69</sup>, hemicelulose<sup>70</sup>, lignina<sup>71</sup> e lã<sup>72</sup>. Para esse trabalho, é importante entender como os líquidos iônicos dissolvem a lã de ovelha.

Pensando em um futuro mais sustentável, torna-se crucial estudar maneiras menos nocivas ao meio ambiente de extração de biopolímeros. Além do fator ecológico, a dissolução de biopolímeros com líquidos iônicos nos dá uma nova perspectiva, podendo gerar estruturas diferentes como fibras, membranas e estruturas granulares, e a possibilidade de adição de novos grupos funcionais no processo químico.

## **2.3 A Dinâmica Molecular**

### *2.3.1 A Química Computacional*

A química computacional foi criada para auxiliar na resolução de problemas reais através da abordagem de cálculo computacional. No princípio foi bastante utilizada para a resolução de problemas da química teórica que não eram possíveis de ser resolvidos analiticamente. Dessa forma, os resultados teóricos podem complementar os obtidos de forma experimental, ou também, prever comportamentos de sistemas reais.

Para a simulação de um sistema físico é necessária uma representação desse sistema e das regras que o regem. Os sistemas reais encontrados em nosso planeta são praticamente baseados em átomos e moléculas em condições não muito extremas de pressão e temperatura. Dentro da química computacional é possível a criação de vários modelos de diferentes complexidades. Deve ser levado em conta se o modelo escolhido consegue descrever o sistema a ser analisado.

Berendsen<sup>73</sup> propôs um sistema de hierarquias de simulação que varia do nível 1 ao 11, baseado na complexidade do sistema. O primeiro sistema é o mais complexo (sistema quântico relativístico) e o décimo primeiro é o menos complexo (fluxo laminar de um fluido). Conforme vamos aumentando de nível há uma perda de sofisticação, mas muitas vezes pode haver um ganho de aplicabilidade (dependendo do sistema de interesse). Para ir de um nível ao outro, é necessário o uso de aproximações. As simulações de Dinâmica Molecular ocorrem no Nível 4.

As duas aproximações mais importantes para a dinâmica molecular são a aproximação que o movimento dos núcleos ocorre de uma forma mais lenta do que o movimento dos elétrons (Born-Oppenheimer)<sup>74</sup>, assim podemos analisar individualmente o movimento dos átomos, e a de que o movimento dos núcleos atômicos obedecem as equações da mecânica clássica (Newton) e a da mecânica estatística (Boltzmann).

### 2.3.2 Superfície de Energia Potencial (PES)

Do inglês *Potential Energy Surface*, as superfícies de energia potencial representam uma superfície que engloba todas as configurações possíveis de uma molécula dentro de um sistema. No caso da Dinâmica Molecular, a superfície utilizada é baseada na conformação dos núcleos (aproximação de Born-Oppenheimer). A PES é uma hipersuperfície que para um número de átomos maior do que 3, tem  $3N-6$  dimensões.

Os potenciais utilizados para moléculas poliatômicas possuem uma forma semelhante a equação 1:

$$V(r^N) = \sum_{\text{ligações}} k_b(l-l_0)^2 + \sum_{\text{ângulos}} k_a(\theta-\theta_0)^2 + \sum_{\text{torsões}} \sum_n \frac{1}{2} V_n [1 + \cos(n\omega - \gamma)] + \sum_{j=1}^{N-1} \sum_{i=j+1}^N f_{ij} \left\{ \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{r_{0ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{r_{0ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4 \pi \epsilon_0 r_{ij}} \right\}$$

(eq. 1)

Esses potenciais são expressos por campos de força, onde as constantes utilizadas podem ser obtidas empiricamente ou por uma forma mais complexa de simulação computacional, como simulações quânticas *ab initio*, por exemplo. Um bom campo de força possui termos que podem ser utilizados em outros sistemas de moléculas.

Um potencial encontrado nessa equação é o potencial de Lennard-Jones<sup>75</sup>. Também conhecido como potencial 12-6, ele é um modelo matemático amplamente utilizado para descrever a interação entre duas partículas em um sistema, onde essas partículas podem ser átomos ou moléculas. Os seus principais termos consistem em forças repulsivas e atrativas. O termo  $(1/r^{12})$  representa a repulsão em distâncias curtas, gerado pela sobreposição de orbitais e o termo  $(1/r^6)$  representa o termo atrativo a respeito das interações de longa distância. Conforme o aumento da distância  $r$  temos que esse potencial tende ao valor 0.

$$V_{LJ}(r) = 4 \varepsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (\text{eq. 2})$$

### 2.3.3 Aspectos centrais da Dinâmica Molecular

As equações de movimento de Newton podem ser resolvidas analiticamente quando temos um problema de até dois corpos. A integração das equações de movimento clássicas nos fornece uma trajetória que contém as informações relacionadas às posições e velocidades de moléculas do sistema, em relação ao tempo.

Historicamente temos que a primeira simulação de Dinâmica Molecular ocorreu em 1957 e foi realizada por Alder e Wainwright<sup>76</sup>, através de um sistema baseado em um modelo de esferas rígidas. A primeira simulação de um líquido molecular ocorreu em 1971 e foi realizada por Rahman e colaboradores<sup>77</sup>.

Em um sistema de coordenadas onde temos a distância entre as partículas como um vetor  $x_i$  para cada átomo, e uma força  $F_i$  dependente dos potenciais e das interações entre as partículas do sistema, podemos escrever a segunda lei de Newton da seguinte maneira:

$$\vec{F}_i = m_i \cdot \vec{a}_i \quad (\text{eq. 3})$$

$$\frac{d^2 \vec{x}_i}{dt^2} = \frac{F_i}{m_i} \quad (\text{eq. 4})$$

A resolução dessas equações de maneira numérica corresponde à evolução temporal de um sistema. Existem diversos algoritmos capazes de resolver esse tipo de equação, e muitos deles são utilizados para as técnicas de Dinâmica Molecular.

#### 2.3.4 Métodos numéricos de resolução de equações do movimento

Para a descrição de um sistema de N partículas em um campo de força conservativo que atua sob os átomos, teremos essas partículas com massa  $m_i$ , coordenadas  $r_i$  e energia potencial baseada nessa coordenada ( $E_{\text{pot}} = V(r)$ ). Temos também que a força de cada partícula do sistema depende do potencial:

$$F_i(r) = -\nabla_i \cdot V(r) \quad (\text{eq. 5})$$

Sabendo as velocidades  $v_i$  em um certo tempo  $t$ , podemos relacionar a força com as equações de movimento de Newton:

$$\dot{r}_i = v_i \quad (\text{eq. 6})$$

$$\dot{v}_i = \frac{F_i}{m_i} \quad (\text{eq. 7})$$

Se tratando de um campo de força com energia conservada, é válida a conservação da energia total do sistema em relação ao tempo.

$$E_{\text{tot}} = K + V \quad (\text{eq. 8})$$

$$\frac{dK}{dt} + \frac{dV}{dt} = 0 \quad (\text{eq. 9})$$

Podemos expandir essa equação utilizando as leis newtonianas do movimento:

$$\frac{dE_{tot}}{dt} = \frac{d}{dt} \sum_i \frac{1}{2} m_i v_i^2 + \frac{dV(r)}{dt} = \sum_i (m_i v_i \cdot \dot{v}_i) + \sum_i \frac{\partial V}{\partial r_i} \cdot v_i = \sum_i \left( v_i \cdot F_i + \frac{\partial V}{\partial r_i} \cdot v_i \right) = 0 \quad (\text{eq. 10})$$

A solução dessa equação nos leva a um ensemble chamado de microcanônico, onde há a conservação do número de partículas (N), do volume (V) e da energia (E). Quando resolvemos essas equações de maneira numérica temos que o infinitesimal de tempo  $dt$  é um intervalo de tempo muito pequeno  $\Delta t$ .

Em 1967, Verlet<sup>78</sup> desenvolveu um algoritmo para a resolução desse problema de múltiplos corpos. Esse algoritmo original não utiliza as velocidades.

$$\ddot{x}(t) \approx \frac{x(t-\Delta t) - 2x(t) + x(t+\Delta t)}{(\Delta t)^2} \quad (\text{eq. 11})$$

Nesse caso temos que  $x$  é a coordenada de cada partícula. Por conveniência, o algoritmo considera a força de cada partícula dividida por sua massa. Essa força é avaliada em cada tempo  $t$ .

$$f(t) = \frac{F_i(x(t))}{m_i}$$

Para montar uma trajetória, é necessário determinar a posição das partículas em um certo tempo.

$$x(t+\Delta t) = 2x(t) - x(t-\Delta t) + f(t)(\Delta t)^2 + O((\Delta t)^4) \quad (\text{eq. 12})$$

Não é necessário o cálculo das velocidades para determinação da trajetória do sistema estudado, porém é possível calcular a velocidade de forma retroativa utilizando as posições calculadas em um intervalo de tempo.

$$v(t) = \frac{x(t+\Delta t) - x(t-\Delta t)}{2\Delta t} + O(\Delta t^2) \quad (\text{eq. 13})$$

Anos depois, Hockney e colaboradores<sup>79</sup> desenvolveram um novo algoritmo baseado no algoritmo de Verlet. Esse algoritmo é conhecido como *leap frog* e é o padrão no pacote de softwares GROMACS<sup>80</sup>. Com ele, partimos de uma velocidade inicial. Assim, podemos ter novas posições baseadas nas seguintes equações:

$$v\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = v\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + f(t)\Delta t \quad (\text{eq. 14})$$

$$x(t+\Delta t)=x(t)+v\left(t+\frac{1}{2}\Delta t\right)\Delta t \quad (\text{eq. 15})$$

Esse algoritmo é equivalente ao de Verlet na determinação da trajetória do sistema em questão. Quando é necessária a determinação da velocidade no mesmo passo de integração onde se é determinada a posição, é utilizado um algoritmo baseado em Verlet. Esse algoritmo foi desenvolvido por Swope e colaboradores em 1982<sup>81</sup>:

$$x(t+\Delta t)=x(t)+v(t)\Delta t+\left[\frac{2}{3}f(t)-\frac{1}{6}f(t-\Delta t)\right](\Delta t)^2 \quad (\text{eq. 16})$$

$$v(t+\Delta t)=v(t)+\left[\frac{1}{3}f(t+\Delta t)+\frac{5}{6}f(t)-\frac{1}{6}f(t-\Delta t)\right]\Delta t \quad (\text{eq. 17})$$

Utilizando o algoritmo velocity-Verlet, é necessário conhecer a força de cada partícula no tempo. Berendsen e Van Gunsteren<sup>82</sup> demonstraram que todos os algoritmos citados são equivalentes em encontrar as trajetórias.

### 2.3.5 Sobre sistemas e ensembles

Muitas vezes para adequação do modelo teórico ao caso real estudado é necessário realizar modificações nas equações do movimento. Muitos fenômenos ocorrem a temperatura constante. Essa condição gera dois novos ensembles: NVT (chamado de ensemble canônico, com número de moléculas, volume e temperaturas constantes) e o NPT (também conhecido como isobárico-isotérmico, onde temos número de moléculas, pressão e temperatura constantes). Existe a possibilidade também de encontrarmos sistemas onde o número de moléculas não é constante. Nesse ensemble temos o potencial químico como constante, e esse tipo de sistema é mais comum quando temos simulações de dinâmica molecular fora do equilíbrio.

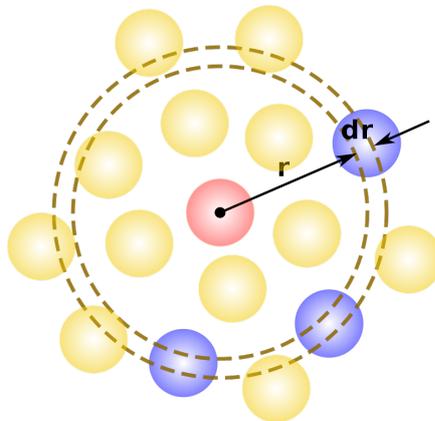
Existem também algoritmos capazes de controlar variáveis do sistema como termostatos e barostatos. Podemos citar três termostatos presentes no pacote de softwares GROMACS: Berendsen<sup>83</sup>, Nose-Hoover<sup>84</sup> e Andersen<sup>85</sup>. Os dois algoritmos para controlar a pressão mais utilizados são: Berendsen<sup>86</sup> e Parrinello-Rahman<sup>87</sup>.

Muitas vezes antes de uma simulação é desejável gerar velocidades para a implementação de algoritmos que resolvam as equações do movimento. Dentro do pacote GROMACS há um algoritmo que gera as velocidades iniciais das partículas do sistema com base na distribuição

de velocidades de Maxwell-Boltzmann. Ele parte da temperatura inicial e de uma semente aleatória informada previamente, a qual é um número inteiro.

### 2.3.6 Função radial de distribuição (RDF)

A função radial de distribuição, do inglês *radial distribution function*, é uma ferramenta da mecânica estatística que relaciona pares em um sistema. Chamamos essa função de  $g(r)$ , e ela está relacionada com a probabilidade de encontrar uma partícula (que pode ser átomo, molécula, fragmento, proteína, etc) a uma distância  $r$  de uma outra partícula de referência.



**Figura 6.** Descrição gráfica do cálculo de uma função de distribuição radial (RDF).

A RDF é basicamente um histograma de probabilidades, e para a normalização desse histograma é utilizada a probabilidade de encontrar um gás ideal a uma distância  $r$  da partícula de referência (para um gás ideal,  $g(r) = 1$ ), ou seja, quando temos que para uma certa partícula a uma certa distância  $g(r) = 2$ , torna-se duas vezes mais provável de encontrar a partícula desejada nessa distância em relação a de referência comparado a um gás ideal. Em outras palavras, temos uma interação maior entre os pares.

Essa função pode ser calculada por métodos computacionais como Monte Carlo e Dinâmica Molecular. Além disso, a RDF pode ser calculada de maneira experimental, utilizando técnicas de espalhamento de neutrons e raios-X. Se as partículas forem grandes o suficientes, pode-se determinar a  $g(r)$  através da microscopia.

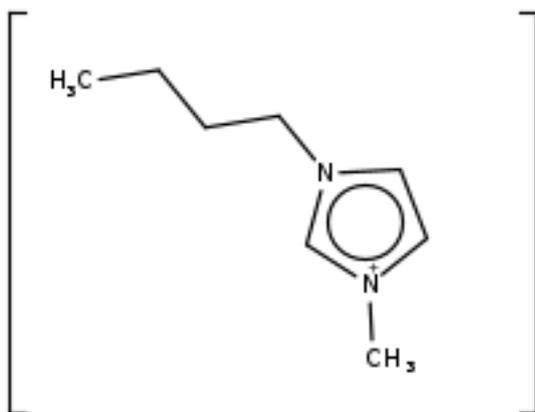
As RDFs também são utilizadas no estudo de colóides e líquidos. Nos colóides é possível mensurar o grau de agregação das partículas do sistema e determinar propriedades termodinâmicas, como energia e difusividade. Nos líquidos se tem a possibilidade de calcular densidades e relações espaciais, que podem ser utilizadas no estudo das transições de fase.

Também temos outro tipo de função de distribuição chamada de função de distribuição espacial (SDF), do inglês *spatial distribution function*. Essa é uma função matemática que descreve a probabilidade de encontrar partículas ou objetos em uma certa região do espaço, baseada também em uma partícula de referência. Ela também é utilizada na descrição de sistemas de partículas em uma mistura, podendo ser de gases ou líquidos. Além disso, ela pode descrever perfis de distribuição de energia, como radiação e partículas em um plasma.

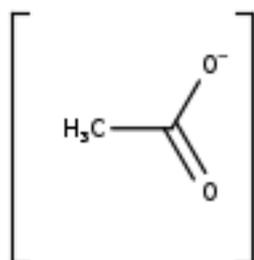
### 3 Metodologia

Para a realização das simulações de Dinâmica Molecular, foi utilizado o pacote de software GROMACS<sup>81</sup>, na versão 4.5.5. Também se utilizando desse pacote, foram realizados os cálculos de função radial de distribuição (RDFs) e de funções espaciais de distribuição (SDFs). Para visualizações gráficas do sistema foi utilizado o software Visual Molecular Dynamics (VMD) em sua versão 1.9.3. Todos os gráficos foram gerados pelo software Gnuplot em sua versão 5.4.

Nesse trabalho foram construídos sistemas, baseados em pares de líquidos iônicos, aminoácidos e água presente no sistema. Algumas correções foram necessárias para uma equivalência maior do sistema simulado com a realidade. Os líquidos iônicos utilizados são baseados no mesmo cátion: o 1-butil-3-metilimidazólio ( $[C_4mim]^+$ ). Os ânions utilizados no estudo foram o cloreto ( $[Cl]^-$ ) e o acetato ( $[Acet]^-$ ).



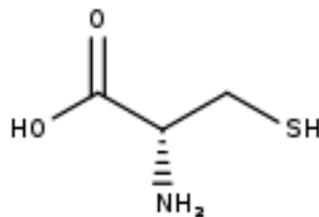
**Figura 7.** Cátion 1-butil-3-metilimidazólio ( $[C_4mim]^+$ ).



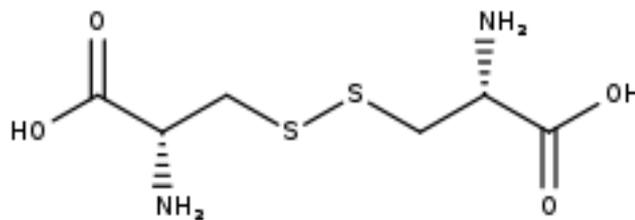
**Figura 8.** Ânion acetato ( $[Acet]^-$ ).

Com o intuito de uma correspondência maior com o caso real, também foram inseridas no sistema, moléculas de água. Líquidos Iônicos em geral são bastante higroscópicos, muitas vezes a sua manipulação é realizada em ambientes de atmosfera inerte de Nitrogênio ou Argônio. Como na composição da lã de ovelha há uma grande presença de água<sup>88</sup>, a presença dessa molécula no sistema simulado se deu como crucial para a condução do estudo.

Para a representação da queratina da lã no sistema, foram utilizados dois aminoácidos diferentes: a cisteína, que é o aminoácido mais abundante nesse tipo de proteína, e a cistina, seu dímero, que fornece uma representação de duas cisteínas ligadas por uma ligação dissulfeto. Em um processo de solubilização de queratina, o objetivo é a quebra da ligação SS.

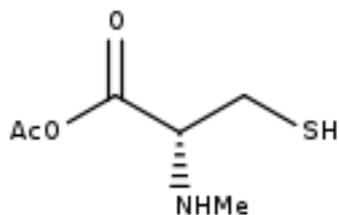


**Figura 9.** Monômero cisteína.

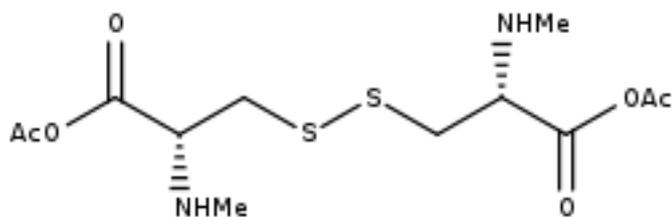


**Figura 10.** Dímero cistina.

Como os aminoácidos fazem parte de uma macroestrutura proteica, foi necessária a implementação de grupos protetores (caps), no intuito de evitar a protonação dos grupos terminais dos aminoácidos, carboxilas e amins. Com esses caps, evita-se a formação de cargas ao redor dos aminoácidos estudados e se estuda de melhor forma as interações do solvente com os átomos de enxofre.



**Figura 11.** Monômero cisteína com grupos protetores (caps).



**Figura 12.** Dímero cistina com grupos protetores (caps).

Dessa maneira (tabela 1), foram criados quatro sistemas diferentes: A,B,C,D. Nos sistemas A e B, o solvente escolhido foi o [C<sub>4</sub>mim][Cl] na presença de água. No sistema A, o aminoácido escolhido foi a cisteína, e no sistema B foi escolhida a cistina (dímero). Da mesma maneira, os sistemas C e D foram baseados no líquido iônico [C<sub>4</sub>mim][Acet] na presença de água com o sistema C tendo como sua biomolécula a cisteína e no sistema D a cistina. A composição do sistema está apresentada na tabela abaixo.

**Tabela 1.** Composição escolhida para os sistemas de simulação.

Sistema	Cátions	Ânions	Aminoácidos	Água
<b>A</b>	240 [C <sub>4</sub> mim] <sup>+</sup>	240 [Cl] <sup>-</sup>	8 cisteínas (Cys)	28 moléculas
<b>B</b>	240 [C <sub>4</sub> mim] <sup>+</sup>	240 [Cl] <sup>-</sup>	4 cistinas (Cys2)	28 moléculas
<b>C</b>	240 [C <sub>4</sub> mim] <sup>+</sup>	240 [Acet] <sup>-</sup>	8 cisteínas (Cys)	28 moléculas
<b>D</b>	240 [C <sub>4</sub> mim] <sup>+</sup>	240 [Acet] <sup>-</sup>	4 cistinas (Cys2)	28 moléculas

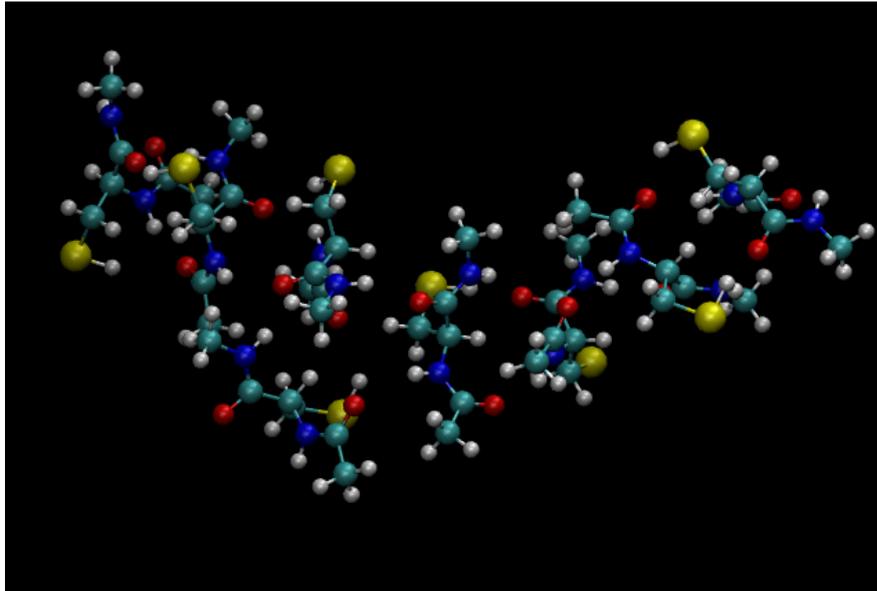
Para a obtenção do campo de força das proteínas com os caps, foi utilizado o programa Gaussian 16<sup>89</sup>. Foi realizado o cálculo com o funcional híbrido B3LYP ("Becke, 3-parameter, Lee–Yang–Parr")<sup>90, 91</sup>. A base utilizada nesse cálculo foi a 6-31G(d). Para geração das topologias desses aminoácidos foi utilizado o programa pdb2gmx do pacote de software GROMACS. Os campos de força foram gerados a partir da metodologia AMBER com AMBER14SB-ILDN protein e AMBER94<sup>92</sup>. E para os líquidos iônicos foi utilizado campos de força também obtidos pela metodologia AMBER, parametrizados por Jones de Andrade e colaboradores<sup>102</sup>.

O primeiro passo das simulações foi a inserção de cistinas e cisteínas em caixas cúbicas no vácuo. Essas caixas foram construídas no GROMACS e foram realizadas simulações de dinâmica molecular com o algoritmo leap frog. No primeiro cubo de 7 nm de aresta, foram inseridas 8 moléculas de cisteína e no segundo cubo, também com aresta de 7 nm, foram inseridas 4 cistinas. O intuito dessa primeira simulação é a agregação dos aminoácidos.

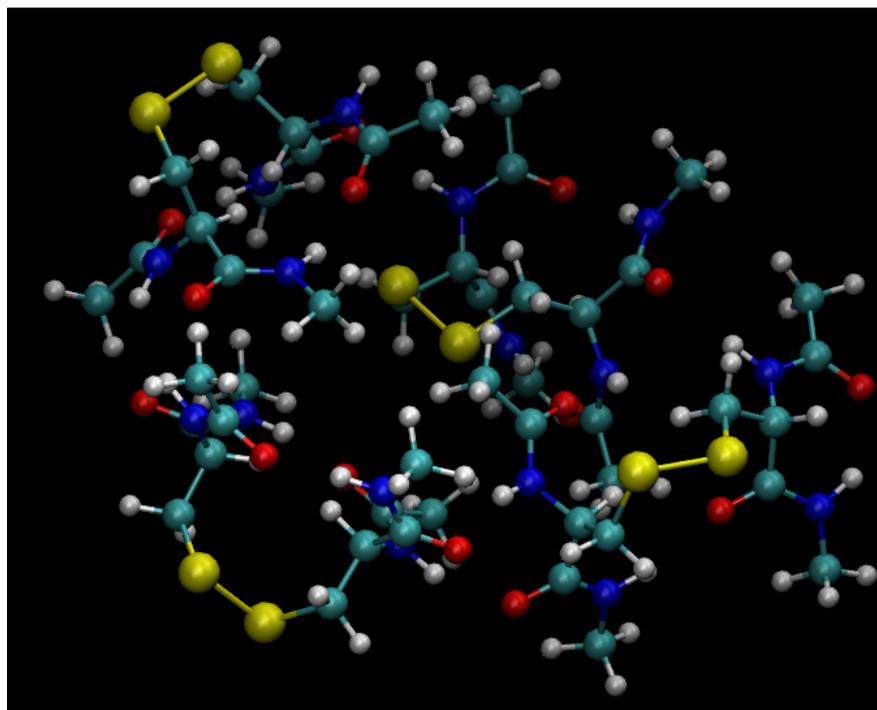
Para essa agregação foram realizadas simulações de dinâmica molecular com um intervalo de integração de 2,0 fs. O algoritmo utilizado para esse tipo de integração foi o já citado Velocity-Verlet. Essas simulações foram realizadas a uma temperatura de 298,15 K, mantida pelo algoritmo de velocity-rescaling<sup>93</sup> com uma constante de acoplamento de 0,1 ps. Também foi mantida uma pressão de 1,0 bar com o algoritmo de Parrinello-Rahman<sup>94</sup> (a constante de acoplamento utilizada foi de 2,0 ps). Nessa etapa o ensemble utilizado foi o isotérmico-isobárico (NpT). A rigidez das ligações químicas foram mantidas pelo algoritmo LINCS<sup>95</sup>. As interações eletrostáticas intermoleculares foram calculadas pelo método PME<sup>96</sup>

com um raio de corte de 1,25 nm. Essas simulações foram realizadas em etapas curtas até que foi atingida a agregação em um tempo de 1 ns.

Nas imagens abaixo, podemos ver os sistemas construídos ao simular aminoácidos no vácuo após a sua agregação.



**Figura 13.** Visualização do sistema de 8 cisteínas obtida pelo programa VMD.



**Figura 14.** Visualização do sistema de 4 cisteínas obtida pelo programa VMD.

Foram realizadas também simulações apenas com os pares iônicos e água, como consta nos sistemas A, B, C e D, sem a presença dos aminoácidos. Os sistemas foram simulados no ensemble isotérmico-isobárico (NpT) e seguindo a mesma metodologia que foi utilizada para a simulação das proteínas. Todavia, nesse caso foram realizadas simulações curtas (com intervalos de tempo inferiores a 1 ns) com o intuito de equilibrar o sistema. Após essa etapa de equilíbrio, uma simulação utilizando o algoritmo Steepest-Descent foi realizada. O intuito dessa etapa é a minimização da energia potencial do sistema. As condições de temperatura, pressão, rigidez das ligações químicas e as interações eletrostáticas intermoleculares foram idênticas às realizadas para o cálculo das proteínas.

Os cálculos envolvendo apenas líquidos iônicos e água foram realizados até um tempo final de 100 ns. Divididos em cinco etapas de 20 ns cada, para cada sistema: A, B, C, D. O passo de integração desse tipo de simulação também foi de 2,0 fs, ou seja, em cada etapa de 20 ns foram necessários 10 milhões de passos de simulação. Após essa simulação, os tamanhos das caixas foram ajustados para cubos com 7 nm de aresta, de tal forma que ficassem com o volume idêntico ao simulado anteriormente para as proteínas.

A etapa seguinte consistiu em juntar os sistemas A, B, C e D sem os aminoácidos com os aminoácidos previamente simulados. Nos sistemas A e C foram inseridas 4 cisteínas (Cys) e nos sistemas B e D foram inseridas 8 cistinas. Para essa etapa foi utilizado o programa `g_membed`<sup>103</sup>. O intuito desse programa é criar uma membrana do solvente desejado (neste caso, a mistura de água e líquido iônico) ao redor do aminoácido desejado (Cys ou Cys2). Quando essa metodologia é utilizada, as moléculas dos aminoácidos ficam congeladas em um eixo e as interações intraproteicas são ignoradas.

Após a implementação da membrana de solvente ao redor dos aminoácidos estudados, teremos como resultante quatro sistemas cúbicos com arestas de 7 nm. Esses sistemas formados representam o início das simulações de fato.

Partindo dos sistemas A, B, C e D foram realizadas simulações de minimização de energia potencial com o algoritmo `l-bfgs`<sup>97</sup>. Após a minimização foram realizadas simulações de 400 ps no ensemble canônico (N, V e T constantes) para cada sistema. Os primeiros 200 ps de cada simulação foram conduzidos com o movimento dos aminoácidos restritos, enquanto a membrana se movia ao redor do esqueleto da proteína. Nos 200 ps seguintes foram realizadas as mesmas simulações sem essa restrição.

Depois de realizada essa etapa de simulação sem a restrição de posição, foi iniciado o processo de simulações no ensemble isotérmico-isobárico (N, P e T constantes). Como nessa etapa de simulação não iremos ter o volume do cubo constante, para a estabilização do

sistema foram realizadas cinco simulações curtas, para cada sistema. A primeira simulação consistiu em fazer o cálculo em um tempo de 1000 ps, a segunda 5000 ps, e as outras três simulações foram realizadas em intervalos de 10000 ps. Passados esses 36000 ps os cubos de aresta 7 nm foram diminuídos. O sistema A tornou-se um cubo de aresta 4,47 nm, o sistema B 4,31 nm, o sistema C 4,89 nm e o sistema D 4,62 nm.

Mantendo as mesmas condições de pressão e temperatura das etapas anteriores, foram feitas simulações de 20 ns, realizadas em 10 milhões de passos de 2,0 fs, da mesma forma a qual foram realizadas as simulações dos líquidos iônicos com água. Os sistemas A, B, C e D foram submetidos a 9 simulações de 20 ns cada uma, totalizando um tempo total de 180 ns.

Para a análise dos resultados foram utilizados dois parâmetros: a função radial de distribuição (RDF) e a função espacial de distribuição (SDF). Nas RDFs, as evoluções dos sistemas foram comparadas nos tempos de 20 ns e 180 ns. Nesse cálculo foram escolhidos para a comparação de pares os centros de massa dos cátions, ânions, água e do aminoácido estudado.

As RDFs traçadas representam os pares ânion/aminoácido, cátion/aminoácido, água/aminoácido e cátion/ânion. Todas elas foram realizadas baseadas nas posições médias das partículas do sistema nos últimos 2 ns de simulação, ou seja, em um primeiro momento foi realizado um cálculo dos 18 ns aos 20 ns do sistema. Esse primeiro cálculo foi comparado com os 2 ns finais da simulação (178 ns até 180 ns). Esse tipo de função nos permite ver como a distribuição da matéria dos sistemas muda em relação ao tempo e também a mudança na morfologia dos sistemas.

Em um primeiro momento, as RDFs foram utilizadas para compreender a evolução temporal dos sistemas estudados (20 ns até 180 ns). Podemos comparar o par cátion/ânion do começo e do final da simulação para compreender as mudanças na morfologia do líquido iônico ao decorrer da simulação. As RDFs que correspondem à relação dos íons (cátions ou ânions) com os aminoácidos, demonstram se houve aproximação ou afastamento desses pares iônicos da proteína (monômero e dímero). Da mesma forma, torna-se possível analisar a aproximação ou o afastamento das moléculas de água da estrutura proteica.

Foram traçados também gráficos de integrais de RDFs e as integrais dessa função correspondem à quantidade numérica de um par a uma distância  $r$ . Por exemplo, se escolhermos a proteína como referência e o ânion cloreto, formando o par ânion/proteína, a integral da  $G(r)$  vai representar quantos íons cloreto teremos ao redor dessa proteína em uma distância  $r$ .

Também foi realizada a comparação das integrais dos íons e da água em relação a cistina e a cisteína, para os diferentes líquidos iônicos, com o intuito de obter uma tendência de qual seria o melhor substrato para a solubilização desses aminoácidos.

Além das RDFs, foram calculadas as SDFs (função de distribuição espacial) dos sistemas estudados. Todas foram baseadas na interação entre o líquido iônico ao redor da proteína (Cys e Cys2). Com as SDFs obtemos a densidade de probabilidade de encontrar o par no espaço. Ela nos fornece uma representação mais visual das caixas sendo estudadas, e pode ser comparada com uma *snapshot* do sistema em si.

As RDFs foram calculadas pelo o programa `g_rdf` do pacote de software GROMACS e as SDFs foram calculadas pelo programa `g_spatial` do mesmo pacote.

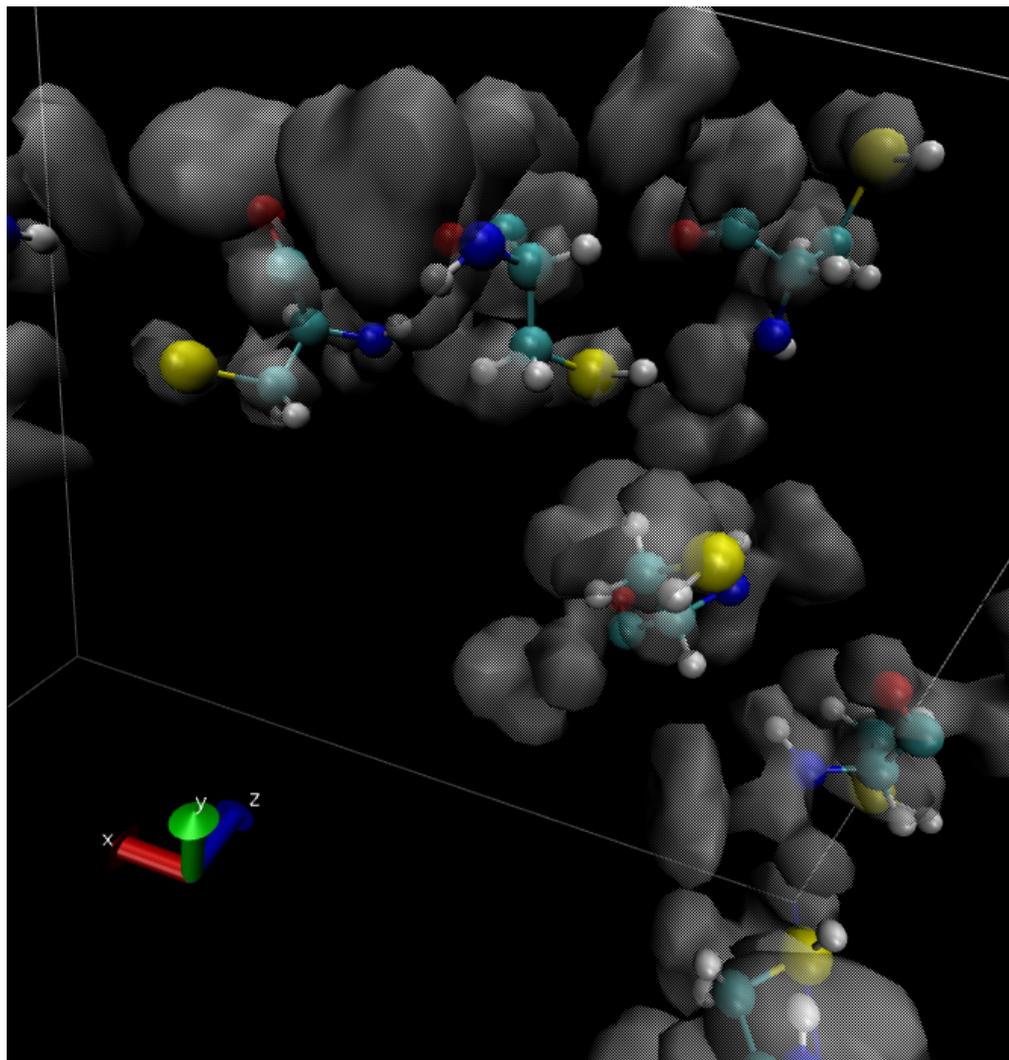
## 4 Resultados

Para a melhor compreensão dos sistemas, como citado anteriormente, foi feita a divisão do trabalho em sistemas A, B, C e D. Também para uma melhor compreensão, as sessões de resultados e a discussão dos mesmos serão apresentados de maneira separada.

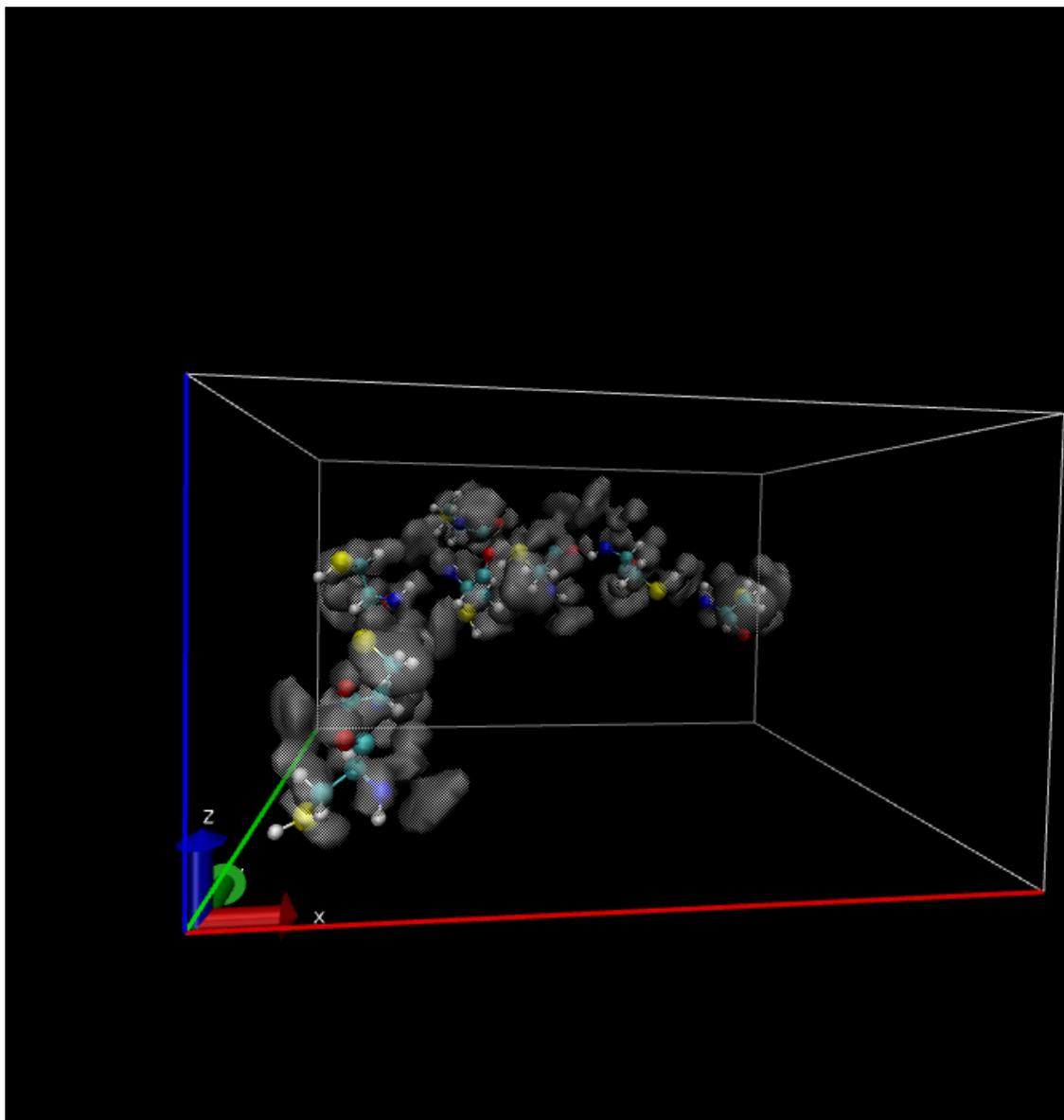
### 4.1 Sistema A: Cloreto de 1-butil-4-metilimidazólio ([C<sub>4</sub>mim][Cl]) e Cisteína (Cys)

#### 4.1.1. Função de Distribuição Espacial do sistema (SDF)

A partir da função de distribuição espacial podemos obter duas imagens do sistema, ambas geradas pelo software VMD. Essas imagens representam o mesmo sistema (180 ns), a única diferença é o zoom utilizado. As manchas opacas representam a maneira a qual o solvente (líquido iônico) se dispõe ao redor da cadeia proteica.



**Figura 15.** Função de distribuição espacial (SDF) do solvente  $[C_4mim][Cl]$  ao redor das cisteínas (Sistema A) visualizada no programa VMD (com zoom).

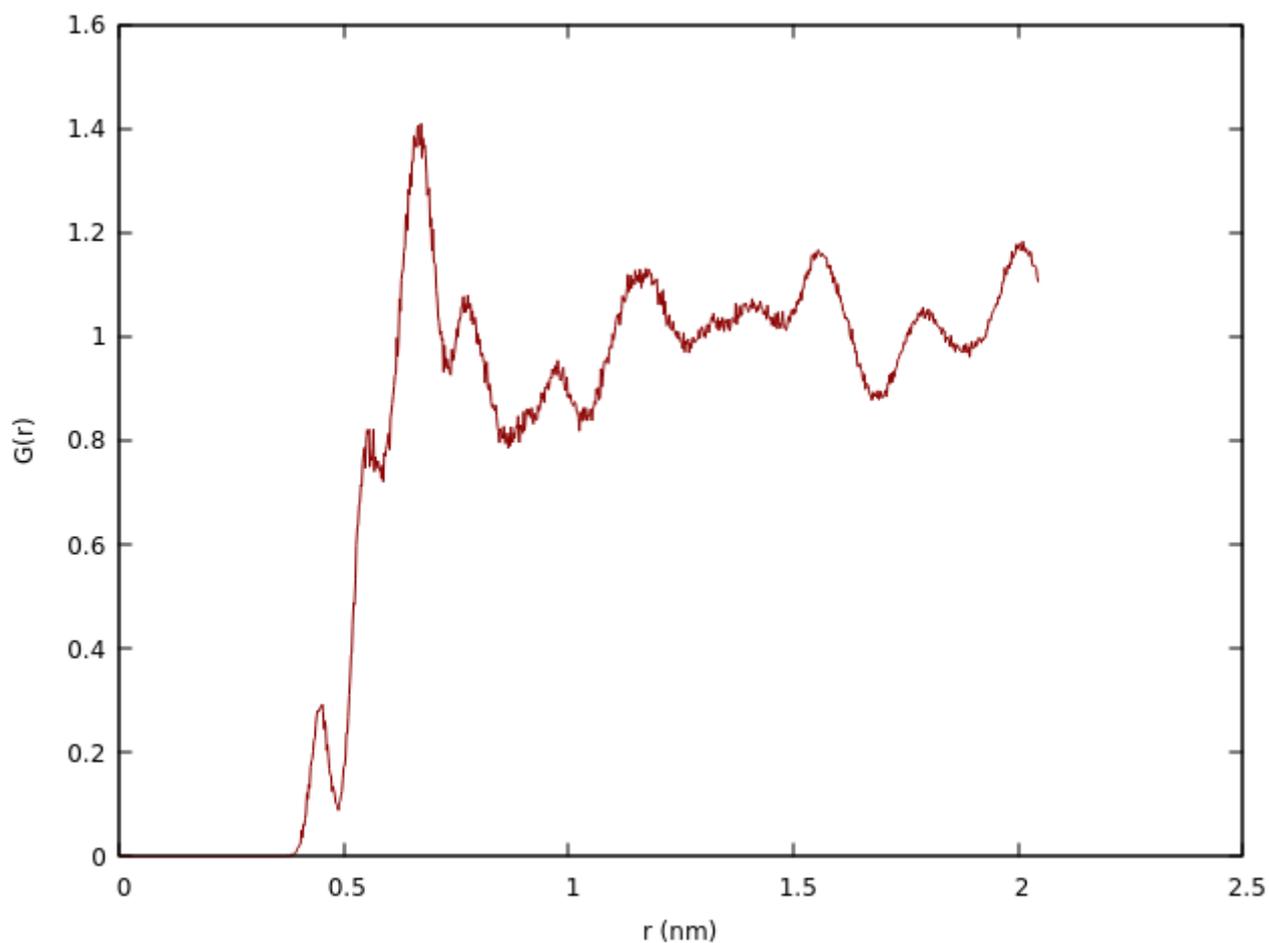


**Figura 16.** Função de distribuição espacial (SDF) do solvente  $[C_4mim][Cl]$  ao redor das cisteínas (Sistema A) visualizada no programa VMD (caixa de simulação).

Obviamente, existe a presença de solvente em toda extensão da caixa de simulação, a SDF nos fornece apenas onde há uma densidade maior desse solvente devido a interações intramoleculares.

#### 4.1.2 Função de Distribuição Radial (RDF) entre cátion e aminoácido

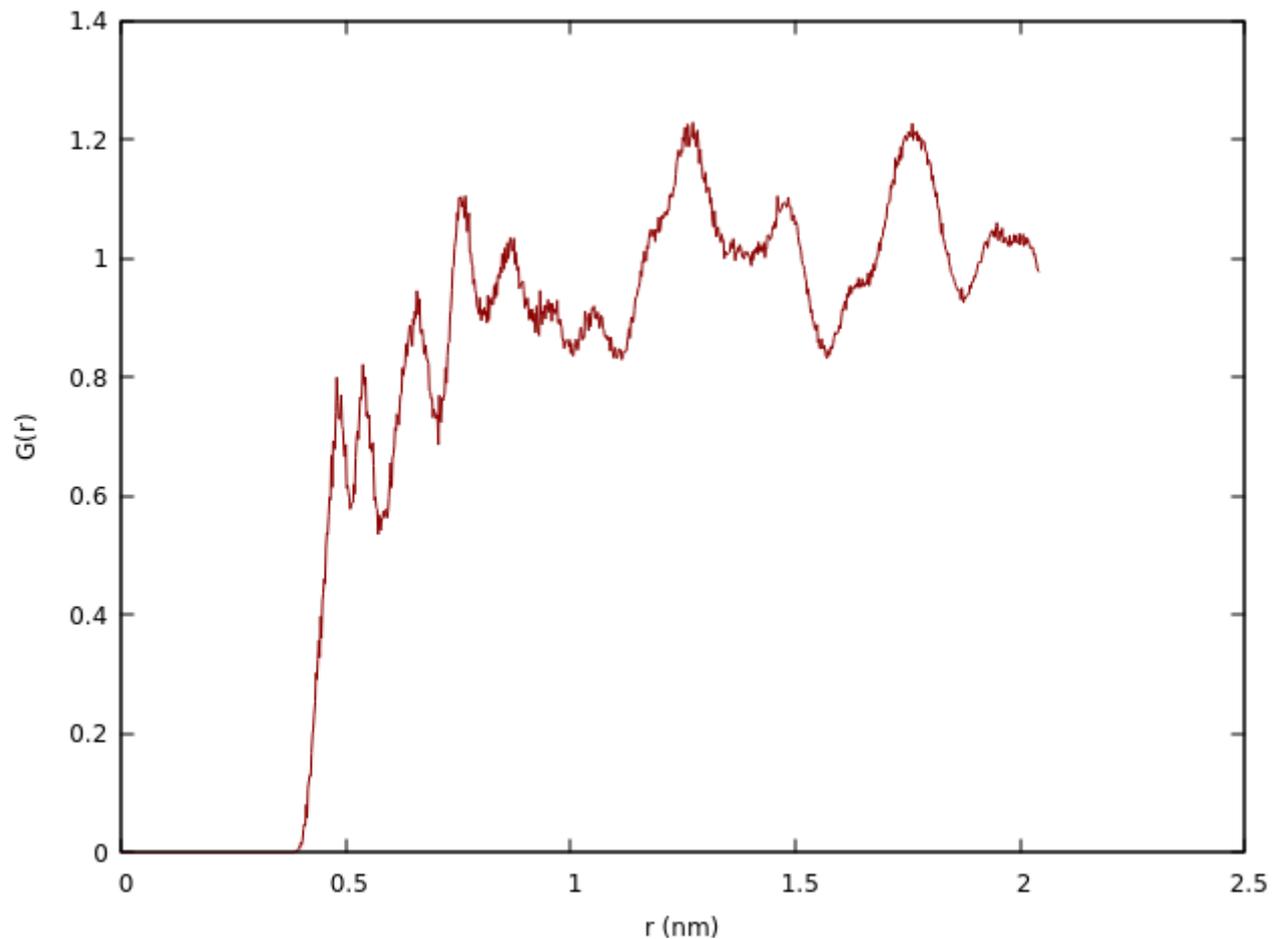
A imagem abaixo representa a função de distribuição radial entre o centro de massa do cátion  $[C_4mim]^+$  e o centro de massa da cisteína como referência, nos primeiros 20 ns de simulação.



**Figura 17.** Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do cátion  $[C_4mim]^+$  e o aminoácido cisteína (Sistema A) após 20 ns de simulação.

Podemos ver uma interação muito fraca ( $G(r) < 1$ ) em distâncias menores de 0,60 nm, indicando uma repulsão entre os centros de massa das espécies estudadas. Em 0,67 nm temos um pico com uma  $G(r)$  de cerca de 1,4. Com a integral dessa função podemos determinar que há uma média de 2,30 cátions ao redor da cisteína nessa distância de 0,67 nm.

A imagem abaixo representa a mesma função de distribuição radial, mas para o fim da simulação (tempo de 180 ns).

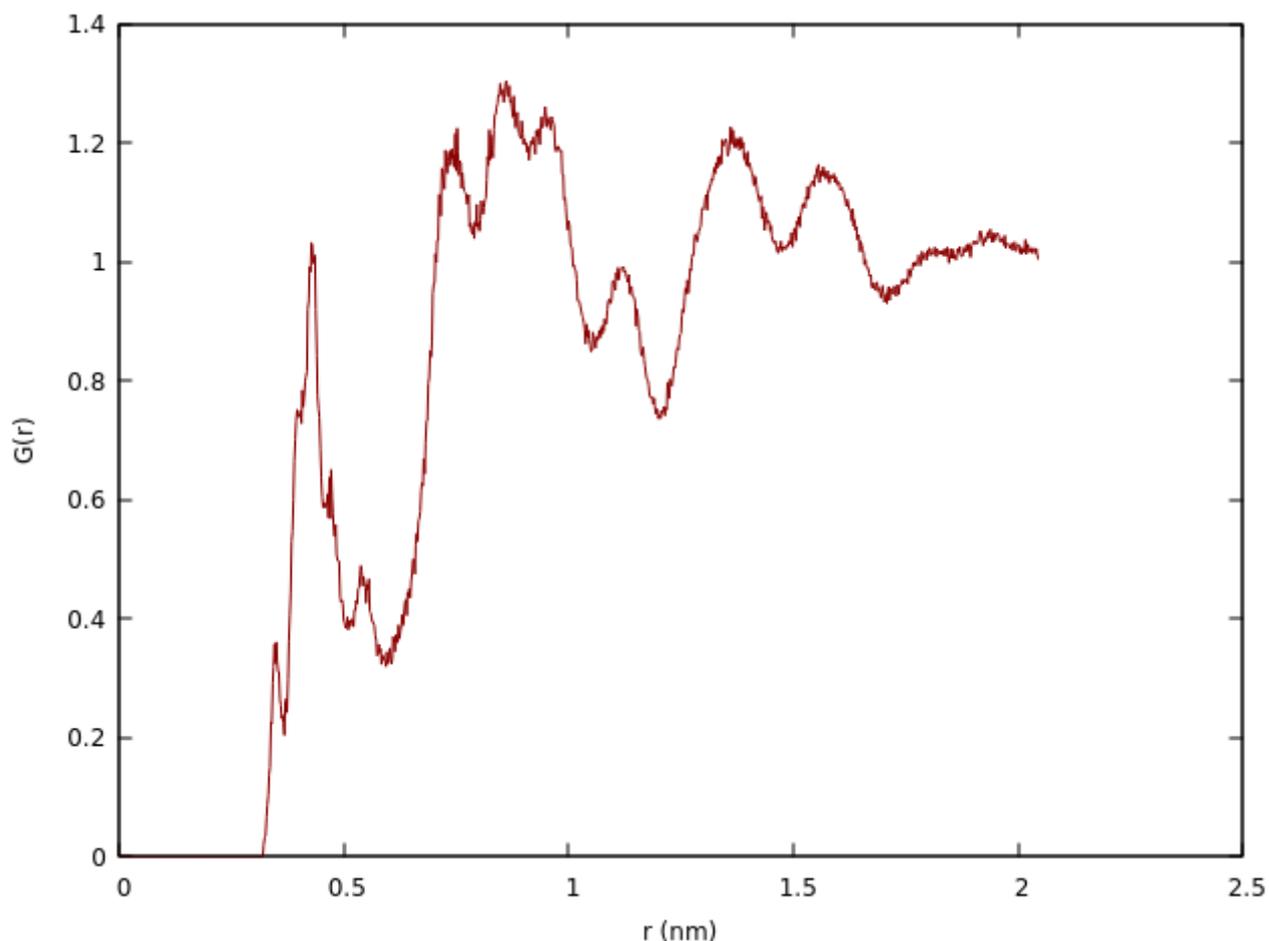


**Figura 18.** Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do cátion  $[C_4\text{mim}]^+$  e o aminoácido cisteína (Sistema A) após 180 ns de simulação.

Com base nessa RDF é possível ver que as interações continuam muito fracas ( $G(r) < 1$ ) entre os centros de massa desse par. O primeiro pico onde temos uma interação maior se encontra apenas em uma distância de 0,76 nm. Nessa distância temos uma  $G(r) = 1,1$  e uma média de 3,85 cátions ao redor do aminoácido. Na distância de 0,67 nm, na qual ocorre o primeiro pico de interação na simulação de 20 ns, temos uma integral de 2,17. O valor encontrado para integral é menor do que o encontrada nos 20 ns iniciais.

#### 4.1.3 Função de Distribuição Radial (RDF) entre ânion e aminoácido

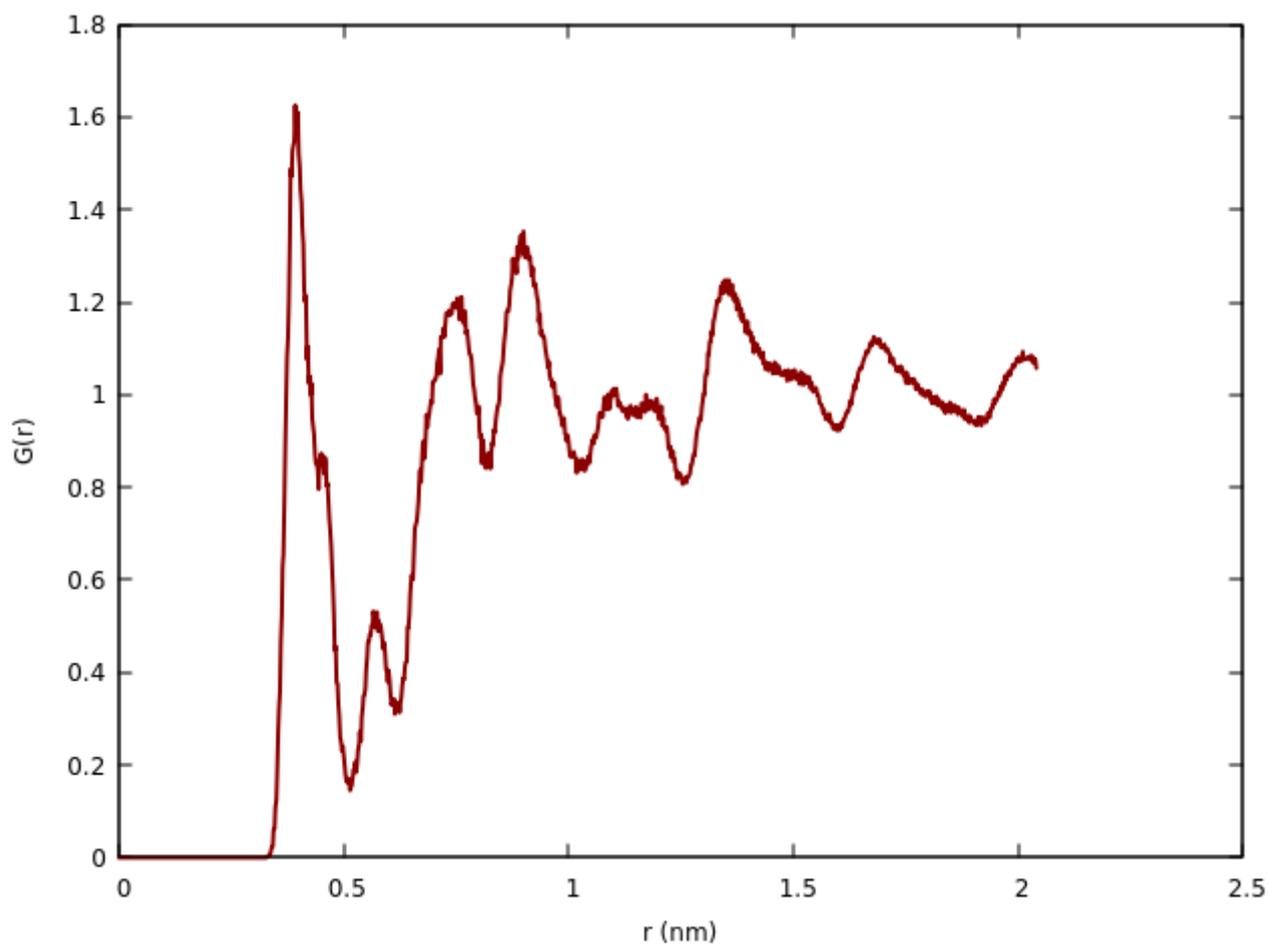
O gráfico abaixo representa a função de distribuição radial entre o centro de massa do ânion  $[Cl]^-$  em relação ao centro de massa da cisteína após 20 ns de simulação.



**Figura 19.** Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion  $[Cl]^-$  e o aminoácido cisteína (Sistema A) após 20 ns de simulação.

Como no caso do cátion, temos uma baixa interação entre os pares, com um pico inicial ( $G(r) = 1,02$ ) em uma distância de 0,43 nm. Uma interação um pouco maior é visualizada em três picos entre 0,7 nm e 1 nm. Até 0,43 nm temos uma integral de 0,33 pares de ânion ao redor da referência. Em uma distância de 0,67 nm temos uma integral de 1,71. Em 1,0 nm essa integral já representa 12,83 cloretos ao redor da cisteína.

Posto abaixo, temos o gráfico que corresponde a função de distribuição radial desses pares após o fim das simulações (180 ns).

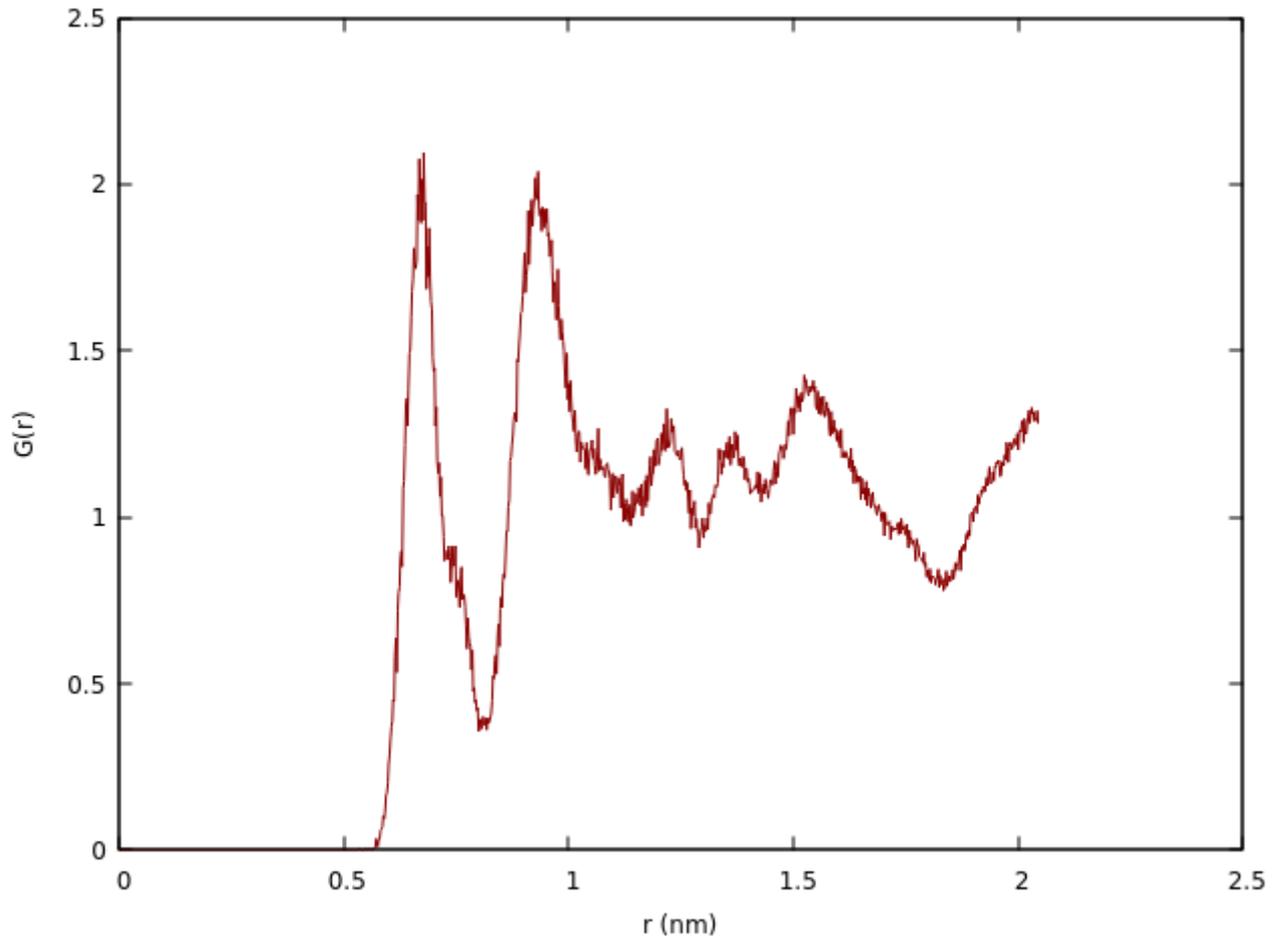


**Figura 20.** Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion  $[Cl]^-$  e o aminoácido cisteína (Sistema A) após 180 ns de simulação.

Ao analisar esse gráfico, constata-se um pico de interação muito maior ( $G(r) = 1,62$ ), ocorrendo em uma distância de 0,41 nm. Até essa distância a integral é de 0,42, consideravelmente maior do que a encontrada no primeiro pico de interação entre os pares nos primeiros 20 ns de simulação. O que indica uma aproximação dos cloretos ao centro de massa do aminoácido estudado. Em uma distância de até 0,67 nm a integral calculada foi de 2,02. Na distância de 1,0 nm já temos valores comparáveis à simulação inicial (12,63 pares).

#### 4.1.4 Função de Distribuição Radial (RDF) entre água e aminoácido

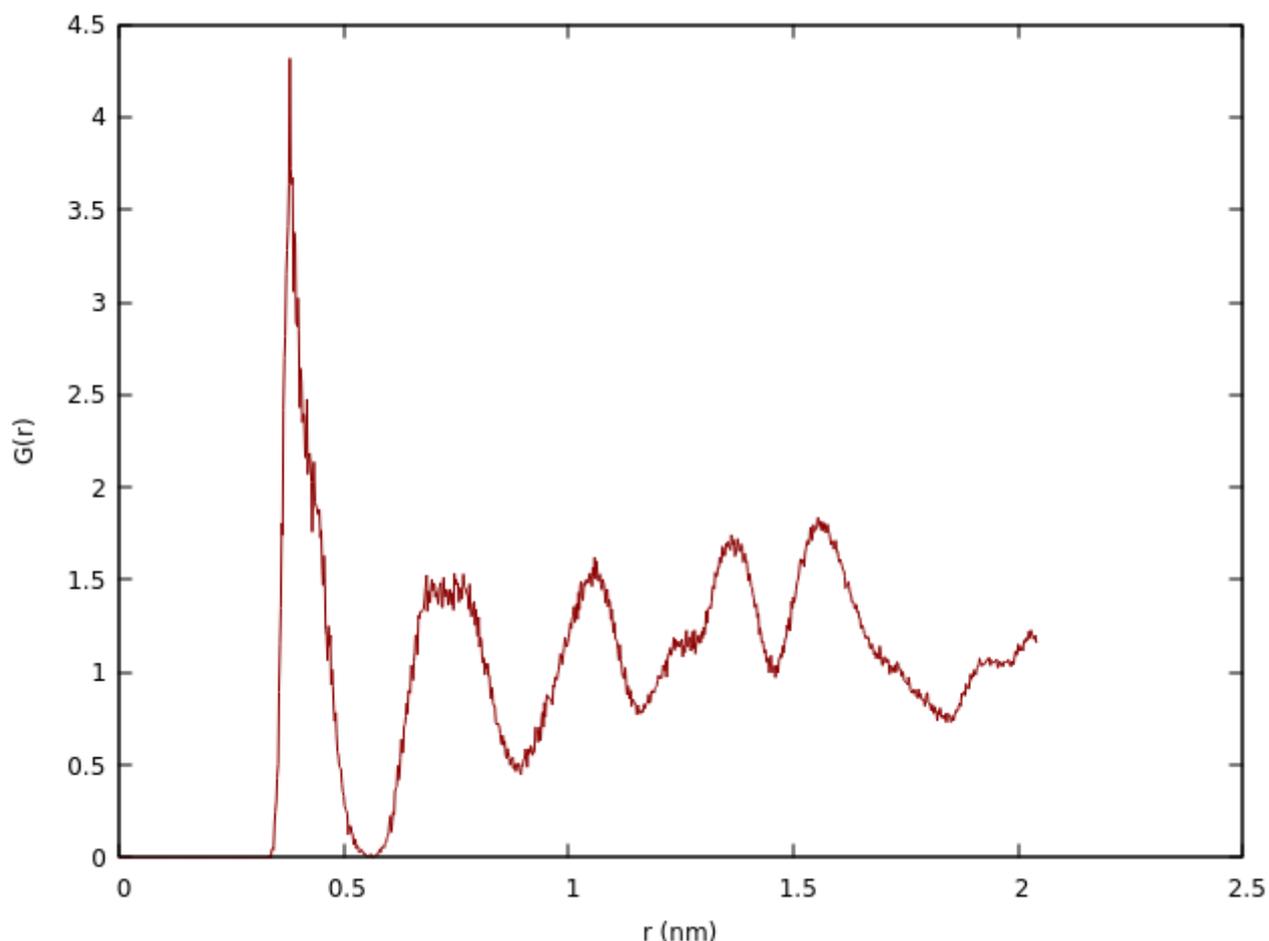
A imagem abaixo disposta representa a RDF entre o centro de massa das moléculas de água do sistema e a cisteína após a primeira simulação de 20 ns.



**Figura 21.** Função de distribuição radial (RDF) entre a molécula de água e o aminoácido cisteína (Sistema A) após 20 ns de simulação.

Diferentemente das RDFs traçadas para cátions e ânions, a RDF traçada para a água tem picos de interação maior nesse sistema ( $G(r) > 2$ ). Em 0,67 nm já temos um pico com  $G(r) = 2,06$  e na distância de 0,93 nm temos um pico de  $G(r) = 2,03$ . Até 0,67 nm temos uma integral que representa uma média de 0,17 moléculas de água ao redor do nosso grupo de referência. Nota-se que como a quantidade de água no sistema é menor do que a de pares iônicos (28 moléculas em comparação a 240 cátions e 240 ânions), as integrais serão menores.

Abaixo temos a representação da função no tempo de 180 ns.

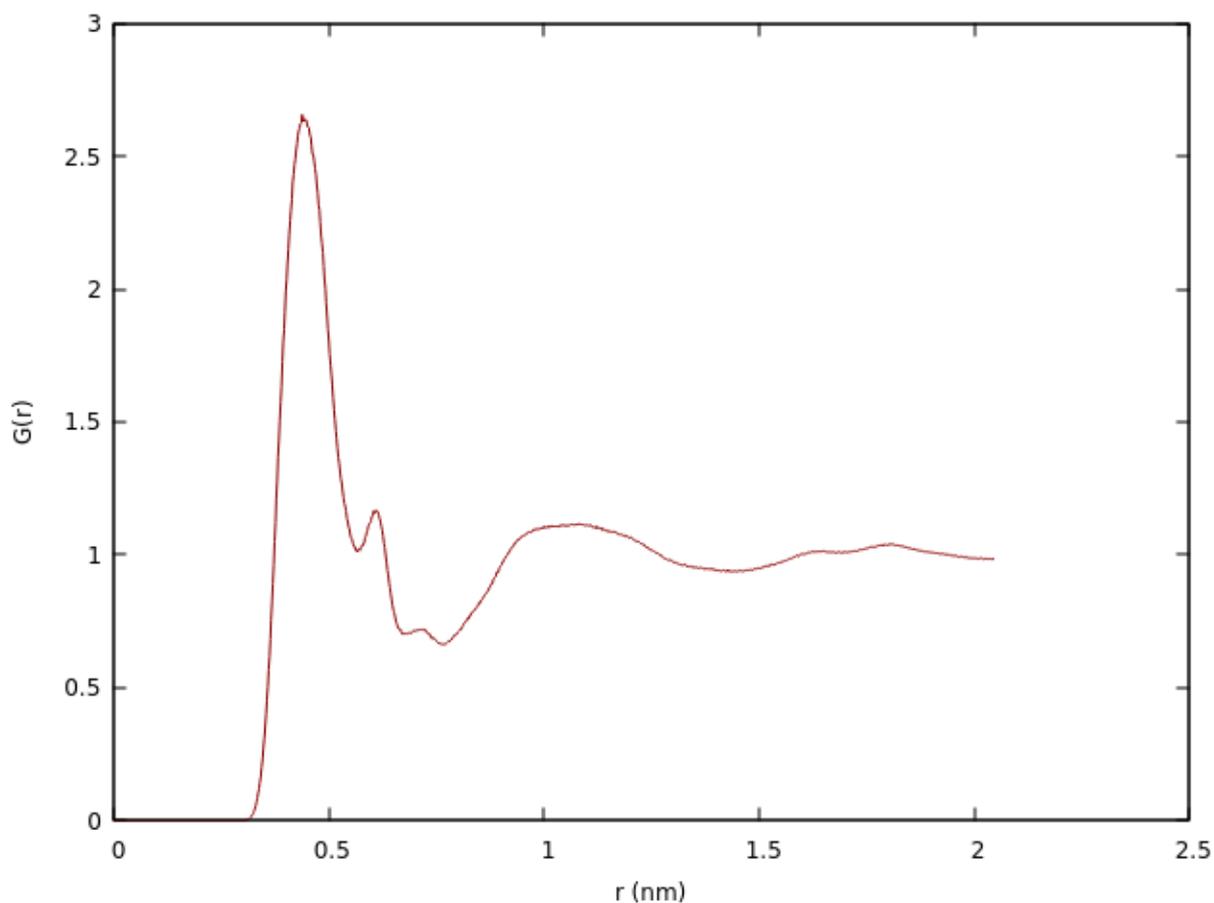


**Figura 22.** Função de distribuição radial (RDF) entre a molécula de água e o aminoácido cisteína (Sistema A) após 180 ns de simulação.

Com o passar do tempo de simulação, ocorreu uma interação muito grande entre as moléculas de água e o centro de massa da proteína. O pico mais acentuado desse gráfico ( $G(r) = 4,31$ ) se encontra em uma distância de 0,39 nm, e até essa distância temos a presença de 0,07 pares ao redor da proteína. Na distância de 0,67 nm já obtemos uma integral de 0,35, que representa praticamente o dobro de pares em comparação ao caso anterior.

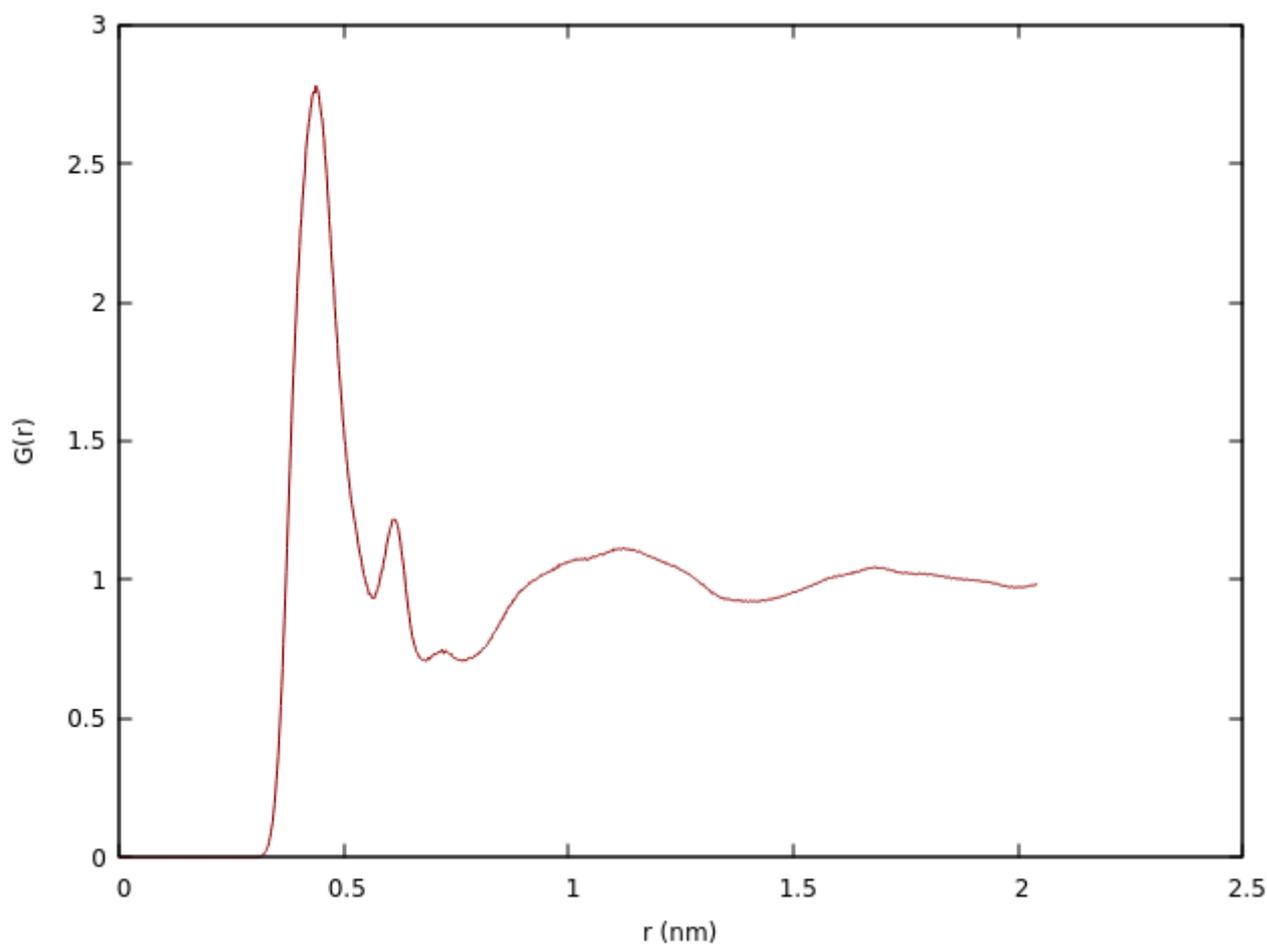
#### 4.1.5 Função de Distribuição Radial (RDF) entre cátion e ânion

Para compreender a mudança da morfologia da rede iônica do solvente, foi extraída a função de distribuição radial após os primeiros 20 ns de simulação e após os 180 ns totais.



**Figura 23.** Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion  $[\text{Cl}]^-$  e o centro de massa do cátion  $[\text{C}_4\text{mim}]^+$  após 20 ns de simulação (Sistema A).

Nessa  $G(r)$  temos o principal pico em 0,45 nm, correspondendo a um valor de 2,63 no eixo vertical. Até o topo do pico temos uma integral de 1,27 correspondendo a quantidade média de ânions ao redor do cátion  $[\text{C}_4\text{mim}]^+$  no primeiro pico de interação.



**Figura 24.** Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion  $[Cl]^-$  e o centro de massa do cátion  $[C_4mim]^+$  após 180 ns de simulação (Sistema A).

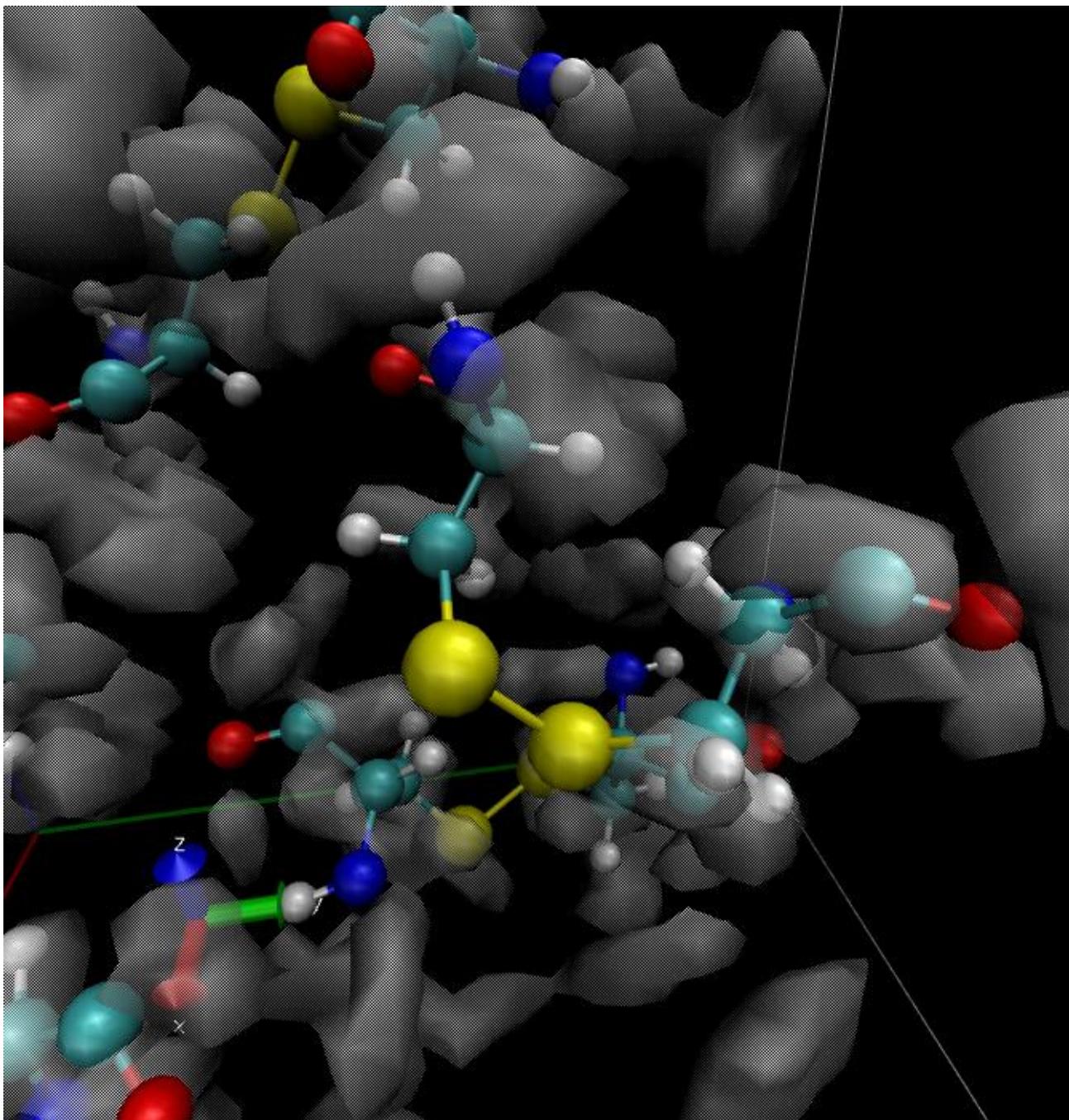
Na RDF da simulação final temos um pico de interação em 0,45 nm de  $G(r) = 2,78$ . Uma interação um pouco maior da que ocorre na simulação de 20 ns. A integral no topo do pico representa 1,36 cloretos ao redor do ânion 1-butil-4-metilimidazólio.

## 4.2 Sistema B: Cloreto de 1-butil-4-metilimidazólio ( $[C_4mim][Cl]$ ) e Cistina (Cys2)

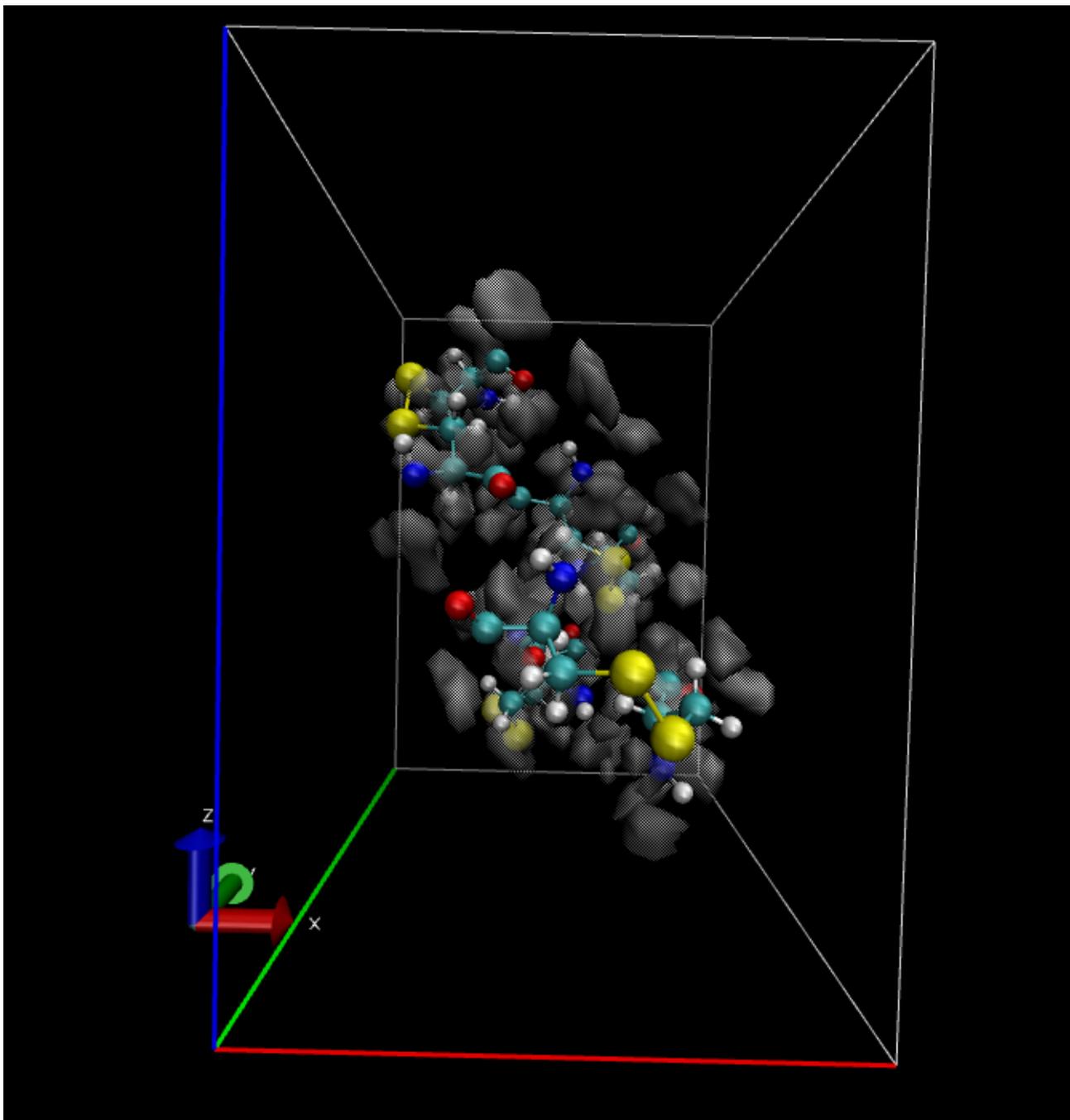
### 4.2.1 Função de Distribuição Espacial do sistema (SDF)

A partir da função de distribuição espacial, podemos obter duas imagens do sistema, ambas geradas pelo software VMD. Essas imagens representam o mesmo sistema (180 ns), a

única diferença é o zoom utilizado. As manchas opacas representam a maneira, a qual o solvente (líquido iônico) se dispõe ao redor do aminoácido.



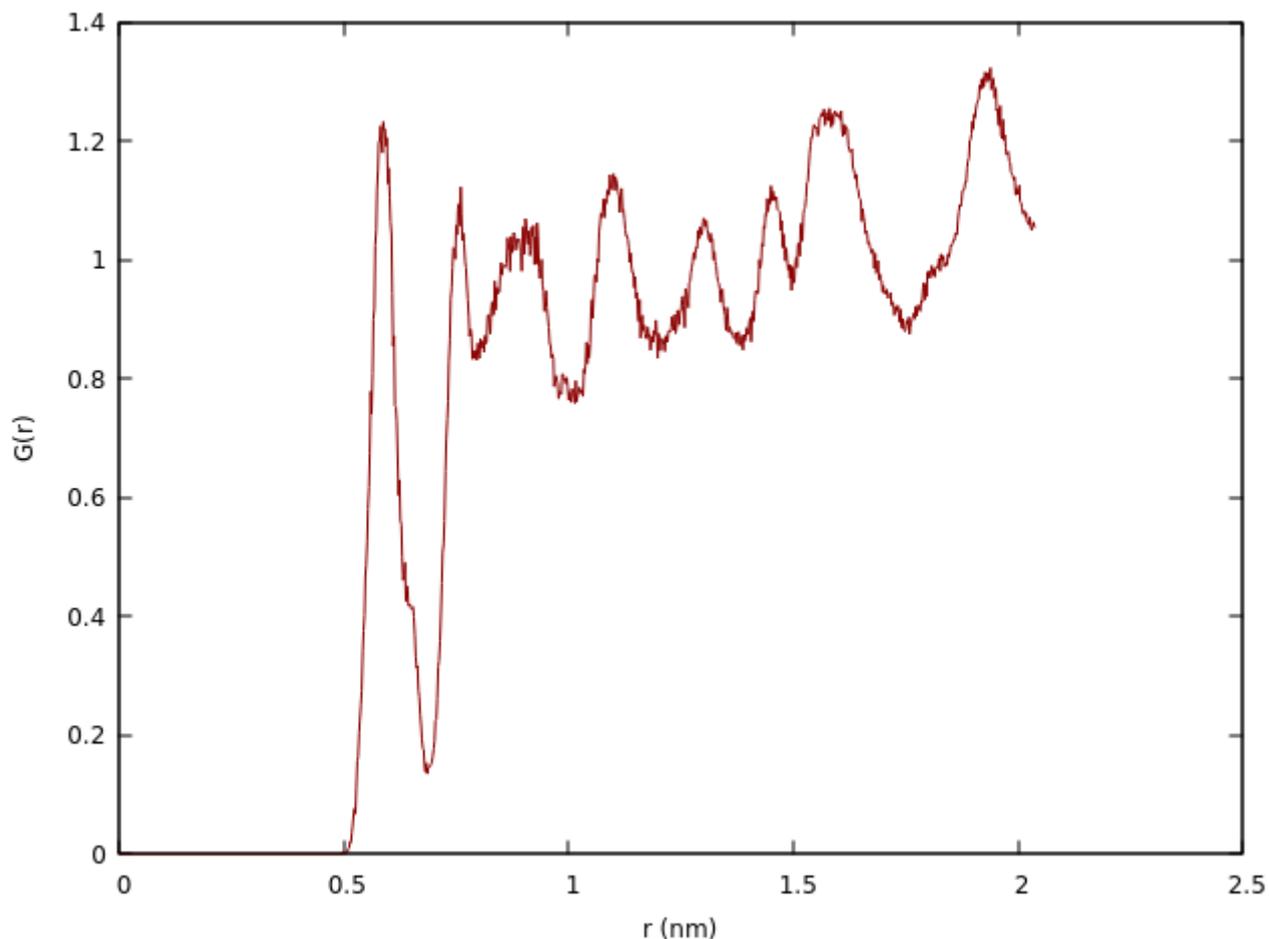
**Figura 25.** Função de distribuição espacial (SDF) do solvente  $[C_4mim][Cl]$  ao redor das cistinas (Sistema B) visualizada no programa VMD (com zoom).



**Figura 26.** Função de distribuição espacial (SDF) do solvente  $[C_4mim][Cl]$  ao redor das cistinas (Sistema B) visualizada no programa VMD (caixa de simulação).

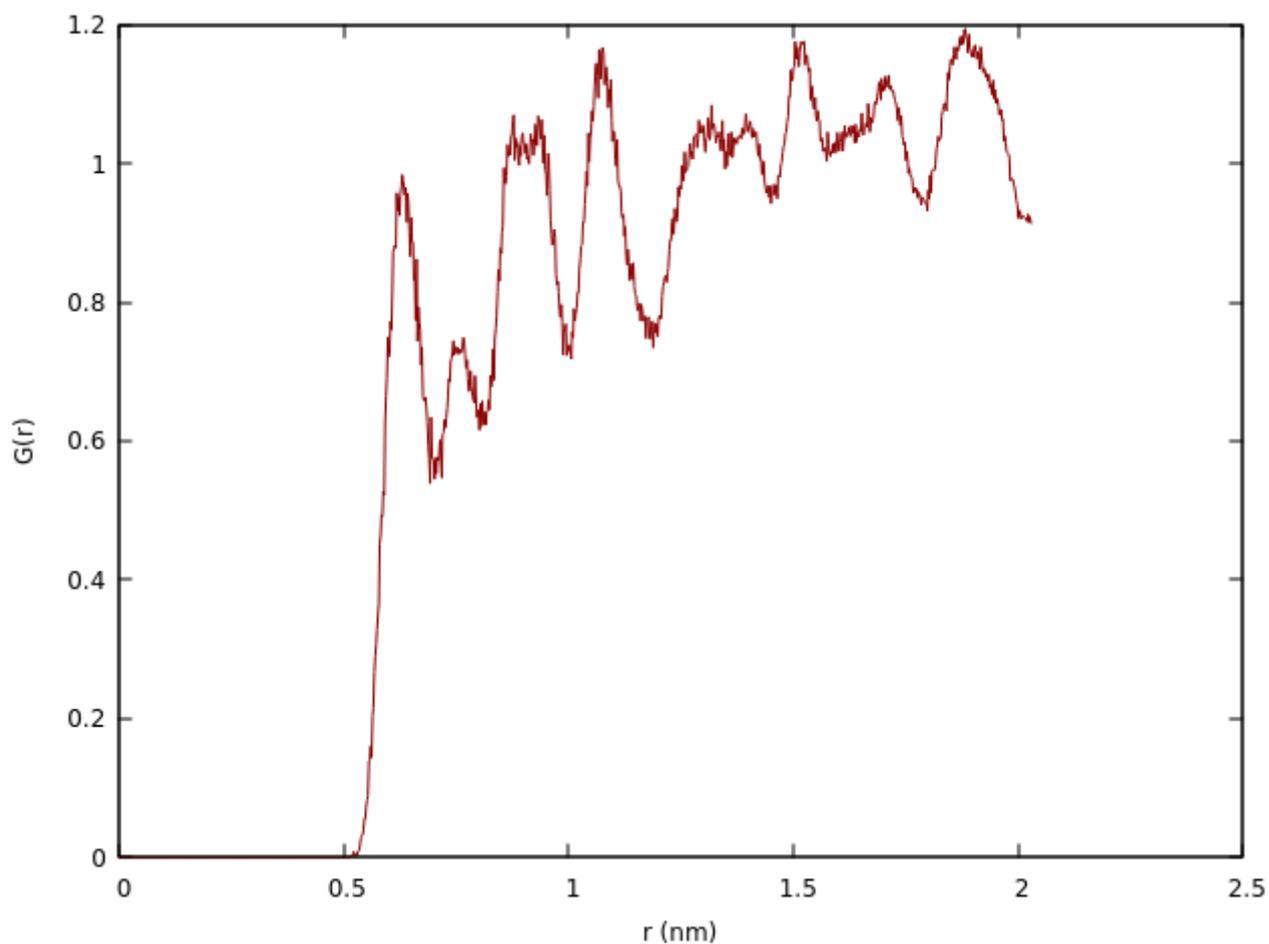
#### 4.2.2 Função de Distribuição Radial (RDF) entre cátion e aminoácido

Na imagem abaixo temos a função de distribuição radial ao final da primeira simulação (até 20 ns) entre o cátion  $[C_4mim]^+$  e a cistina.



**Figura 27.** Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do cátion  $[C_4mim]^+$  e o aminoácido cistina (Sistema B) após 20 ns de simulação.

Como no caso do monômero, não temos uma interação muito grande entre o centro de massa do aminoácido e o cátion ao redor da proteína. O primeiro pico de interação se encontra em 0,59 nm com o valor de 1,22. A integral até o pico é de 0,61 e representa a quantidade de cátions ao redor da proteína. Temos também um vale de repulsão ( $G(r) = 0,14$ ) na distância de 0,7 nm.



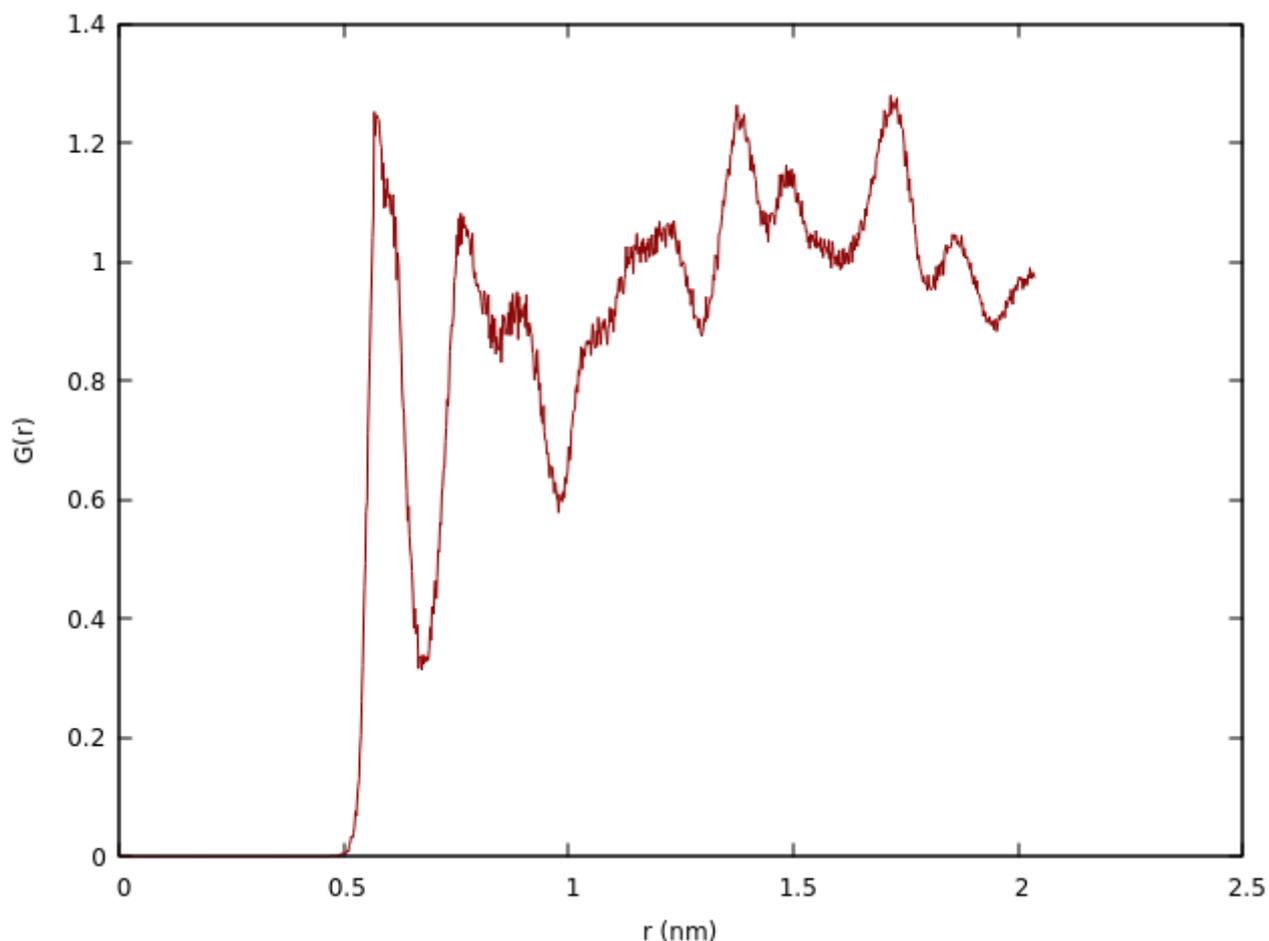
**Figura 28.** Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do cátion  $[C_4\text{mim}]^+$  e o aminoácido cistina (Sistema B) após 180 ns de simulação.

Acima temos a representação da RDF entre o cátion e o aminoácido. Após o tempo de simulação pode-se perceber que houve uma diminuição dos vales de repulsão. Porém, no primeiro pico temos uma  $G(r) < 1$  e apenas em distâncias próximas de 1 nm começamos a ter picos de interação.

Podemos calcular a integral na mesma distância do caso anterior (20 ns), que representa 0,39 a uma distância de em 0,59 nm. Visto isso, com o passar do tempo temos menos cátions ao redor do aminoácido estudado.

#### 4.2.3 Função de Distribuição Radial (RDF) entre ânion e aminoácido

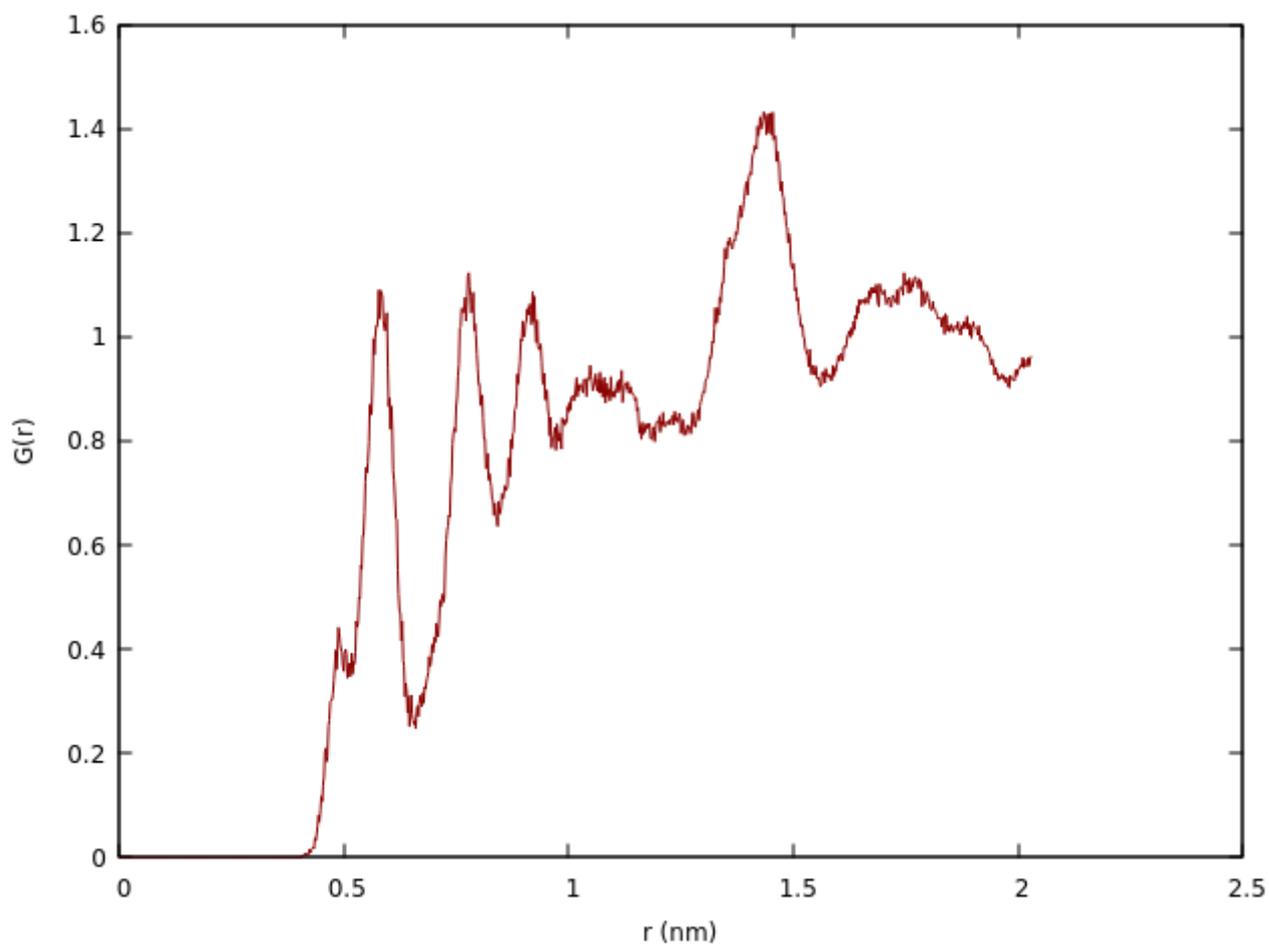
Abaixo temos o gráfico da função de distribuição radial dos 18 ns até os 20 ns da simulação realizada entre o centro de massa do ânion e o centro de massa do dímero do aminoácido.



**Figura 29.** Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion  $[Cl]^-$  e o aminoácido cistina (Sistema B) após 20 ns de simulação.

Como no caso do cátion, há um primeiro pico de interação pequeno de  $G(r) = 1,24$  a  $0,58$  nm, com uma integral de  $0,49$ . Também temos uma repulsão grande ( $G(r) = 0,32$ ) na distância de  $0,68$  nm.

Abaixo temos a representação da RDF após o tempo total de simulação.

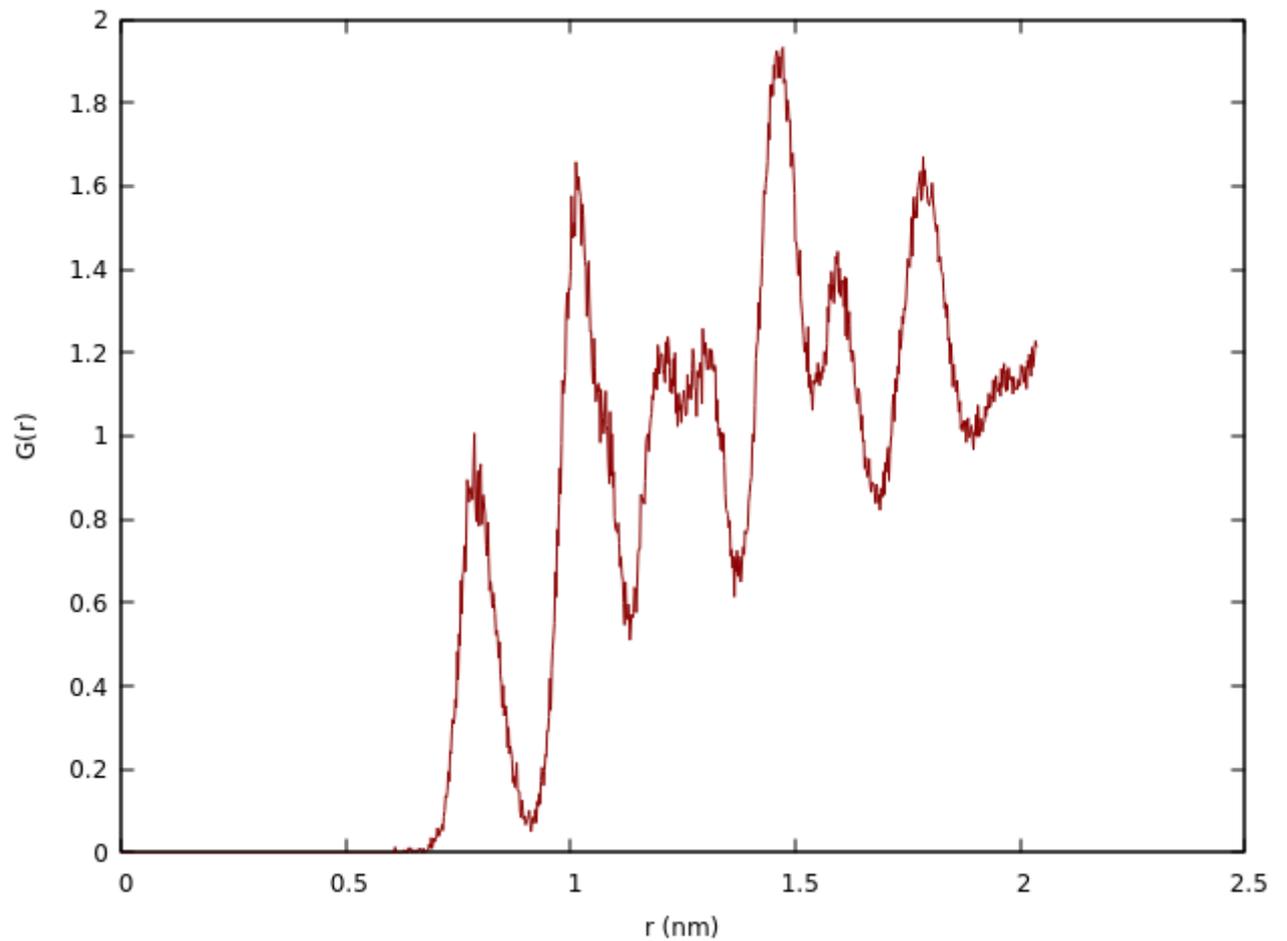


**Figura 30.** Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion  $[Cl]^-$  e o aminoácido cistina (Sistema B) após 180 ns de simulação.

Da mesma maneira que ocorre com o cátion, teremos picos de interação muito pequenos na distância de 0,58 nm. A integral até essa região é de 0,79, um aumento considerável comparado aos 20 ns iniciais. Temos também uma região de baixa interação ( $G(r) = 0,24$ ) em uma distância de 0,65 nm, que é um aumento na repulsão em função do tempo.

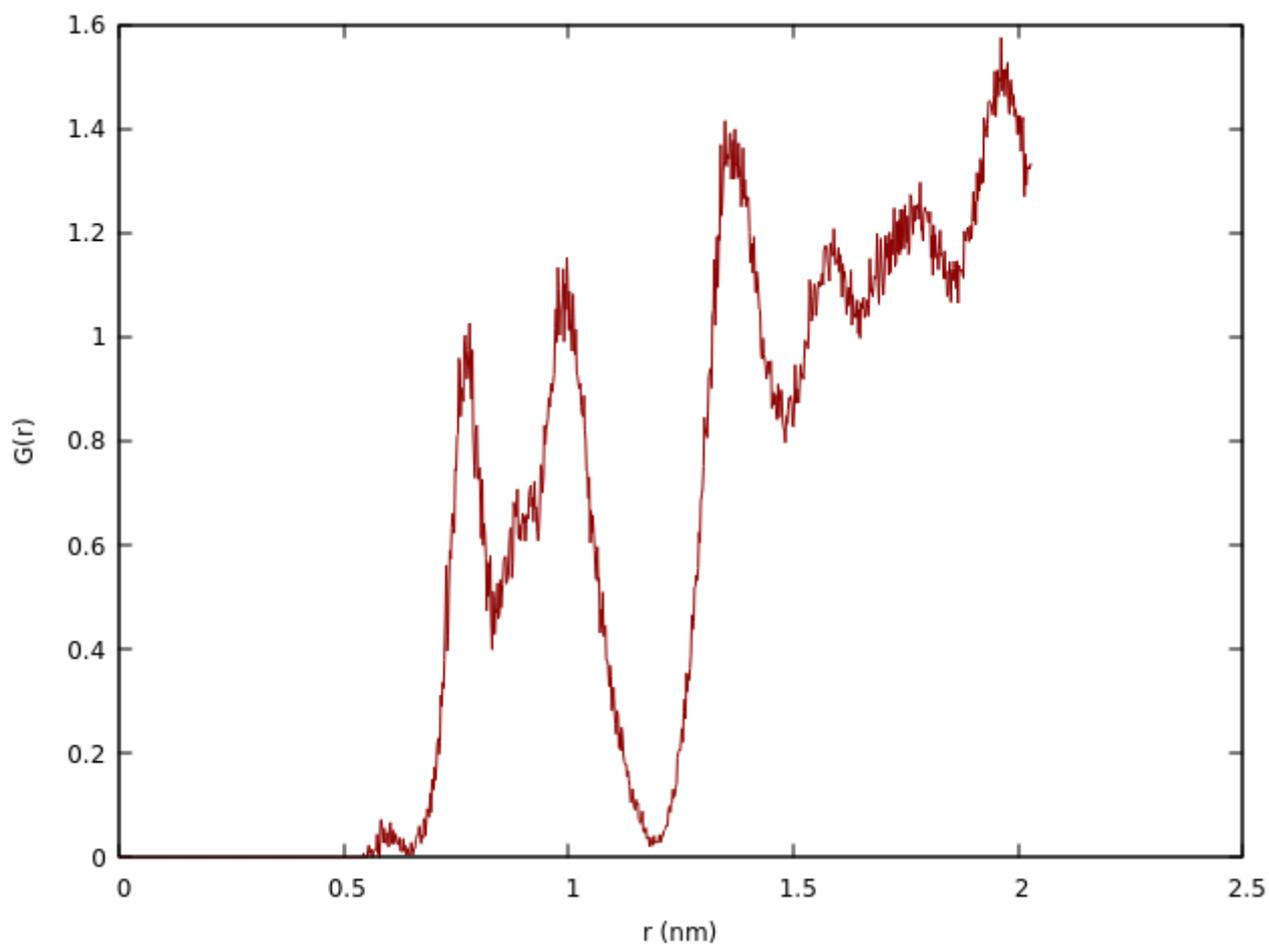
#### 4.2.4 Função de Distribuição Radial (RDF) entre água e aminoácido

Abaixo temos a RDF dos primeiros 20 ns de simulação entre os pares: centro de massa das moléculas de água e centro de massa da cistina.



**Figura 31.** Função de distribuição radial (RDF) entre a molécula de água e o aminoácido cistina (Sistema B) após 20 ns de simulação.

Diferente do caso do monômero, não temos uma grande interação com a água nos primeiros 20 ns de simulação, inclusive com o dímero temos uma zona de repulsão muito grande ( $G(r) < 1$ ), incluindo um vale na distância de 0,92 nm com  $G(r) = 0,07$ . Os picos maiores de interação ocorrem a longas distâncias.

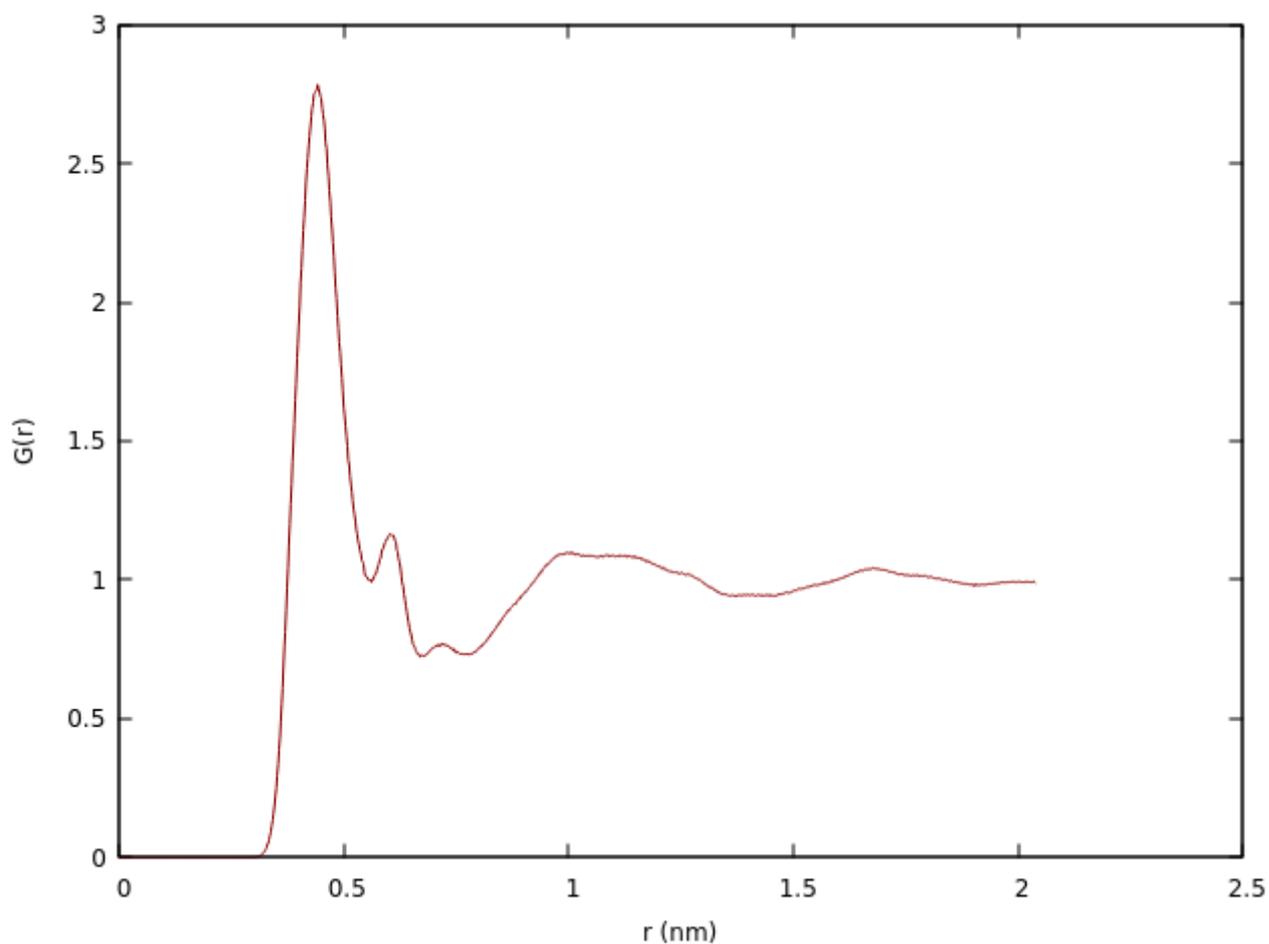


**Figura 32.** Função de distribuição radial (RDF) entre a molécula de água e o aminoácido cistina (Sistema B) após 180 ns de simulação.

Como ocorreu na simulação até 20 ns, são mínimas as zonas de interação entre os pares até distâncias longas, como no caso anterior temos uma zona de alta repulsão ( $G(r) = 0,03$ ), dessa vez a uma distância de 1,2 nm. A maior diferença são zonas de atração ( $G(r) > 1$ ) antes dessa zona de repulsão, temos um pico de 1,1 em 1,0 nm.

#### 4.2.5 Função de Distribuição Radial (RDF) entre cátion e ânion

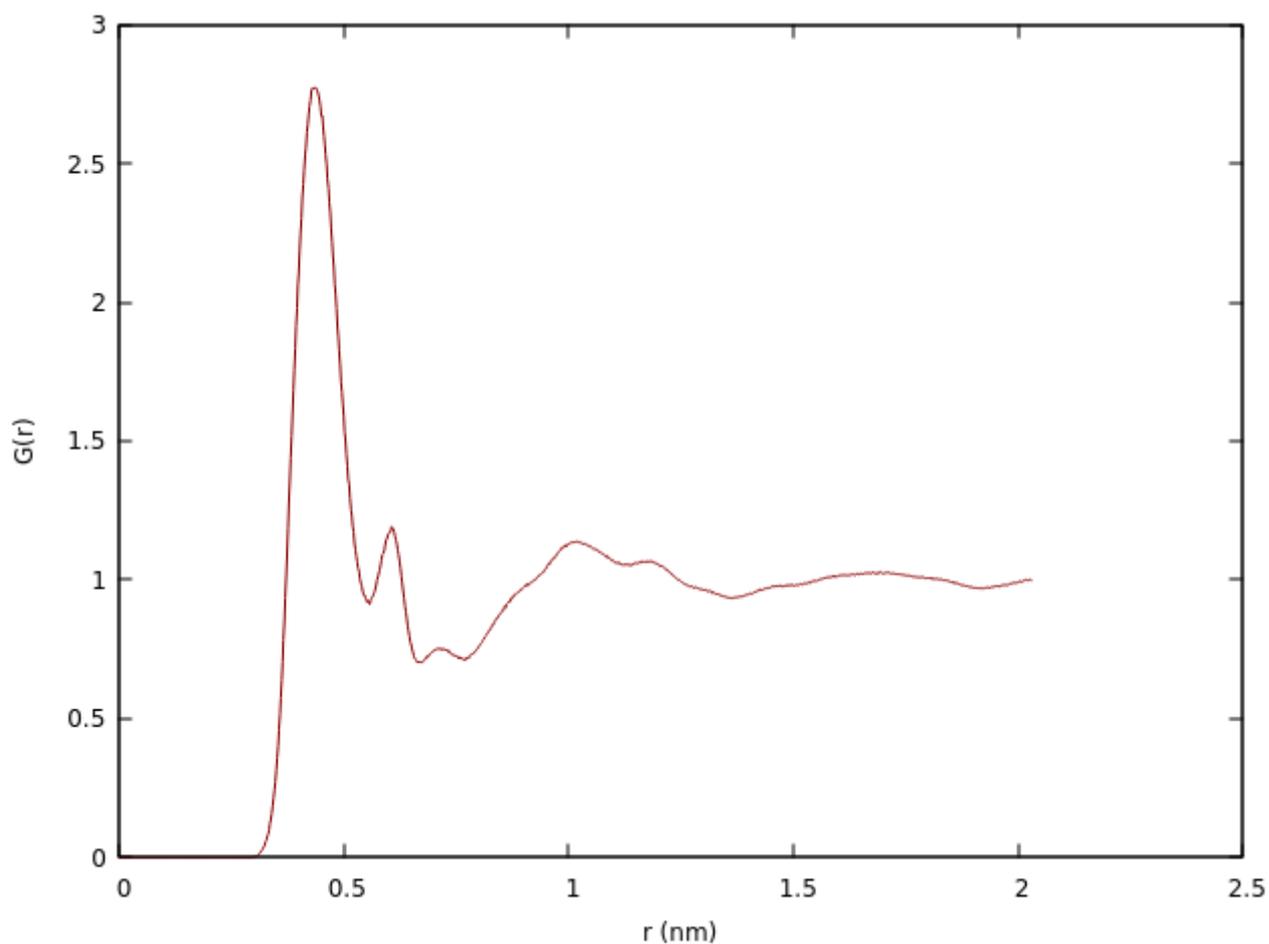
Com as funções de distribuição radial entre o centro de massa dos ânions ao redor dos centros de massa dos cátions, podemos analisar a estrutura da rede iônica ao fim de uma extensa simulação. Abaixo temos a representação dos primeiros 20 ns de simulação.



**Figura 33.** Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion  $[Cl]^-$  e o centro de massa do cátion  $[C_4mim]^+$  após 20 ns de simulação (Sistema B).

Nesse gráfico podemos identificar um pico de interação alta em 0,45 nm com valor de 2,78, a quantidade de pares até essa distância é de 1,29 (valor calculado pela integral da  $G(r)$ ).

O gráfico abaixo representa a RDF após os 180 ns de simulação e nele podemos perceber que não houve uma diferença muito grande na estrutura do líquido iônico.



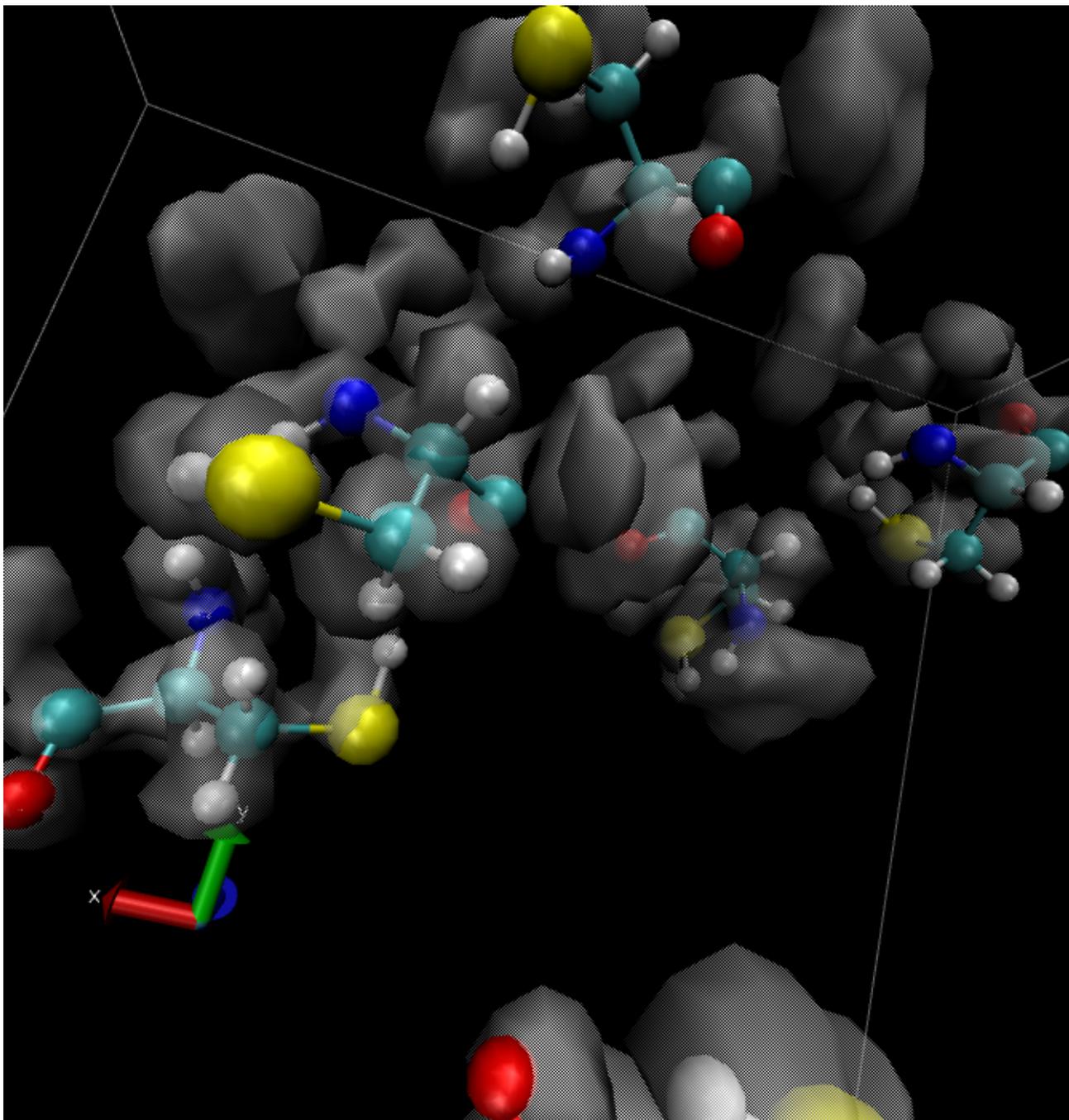
**Figura 34.** Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion  $[\text{Cl}]^-$  e o centro de massa do cátion  $[\text{C}_4\text{mim}]^+$  após 180 ns de simulação (Sistema B).

Nessa representação temos um pico inicial a uma distância de 0,45 nm com o valor de  $G(r)$  de 2,76. A integral até esse ponto representa 1,37 pares de ânions ao redor do cátion, um valor um pouco maior do que aos 20 ns, porém muito próximo. Ainda mais se tratando de um tempo tão grande de simulação.

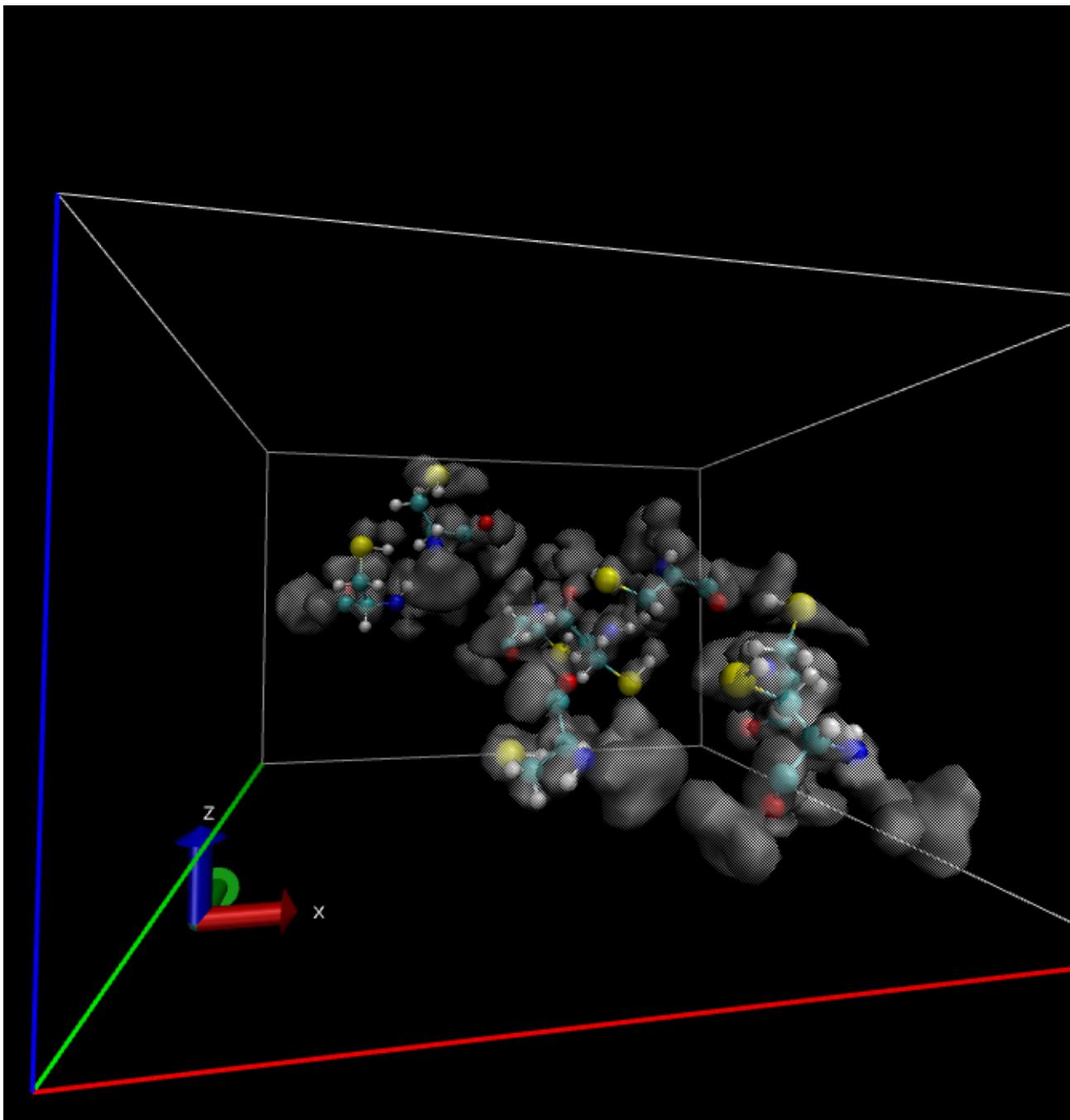
### **4.3 Sistema C: Acetato de 1-butil-4-metilimidazólio ([C<sub>4</sub>mim][Acet]) e Cisteína (Cys)**

#### *4.3.1 Função de Distribuição Espacial do sistema (SDF)*

Duas imagens do sistema estudado foram obtidas pela função de distribuição espacial, estas foram geradas pelo software de visualização VMD e representam ambos os sistemas após os 180 ns de simulação. O objetivo desse tipo de simulação é compreender como o líquido iônico interage ao redor do aminoácido estudado, nesse caso, a cisteína.



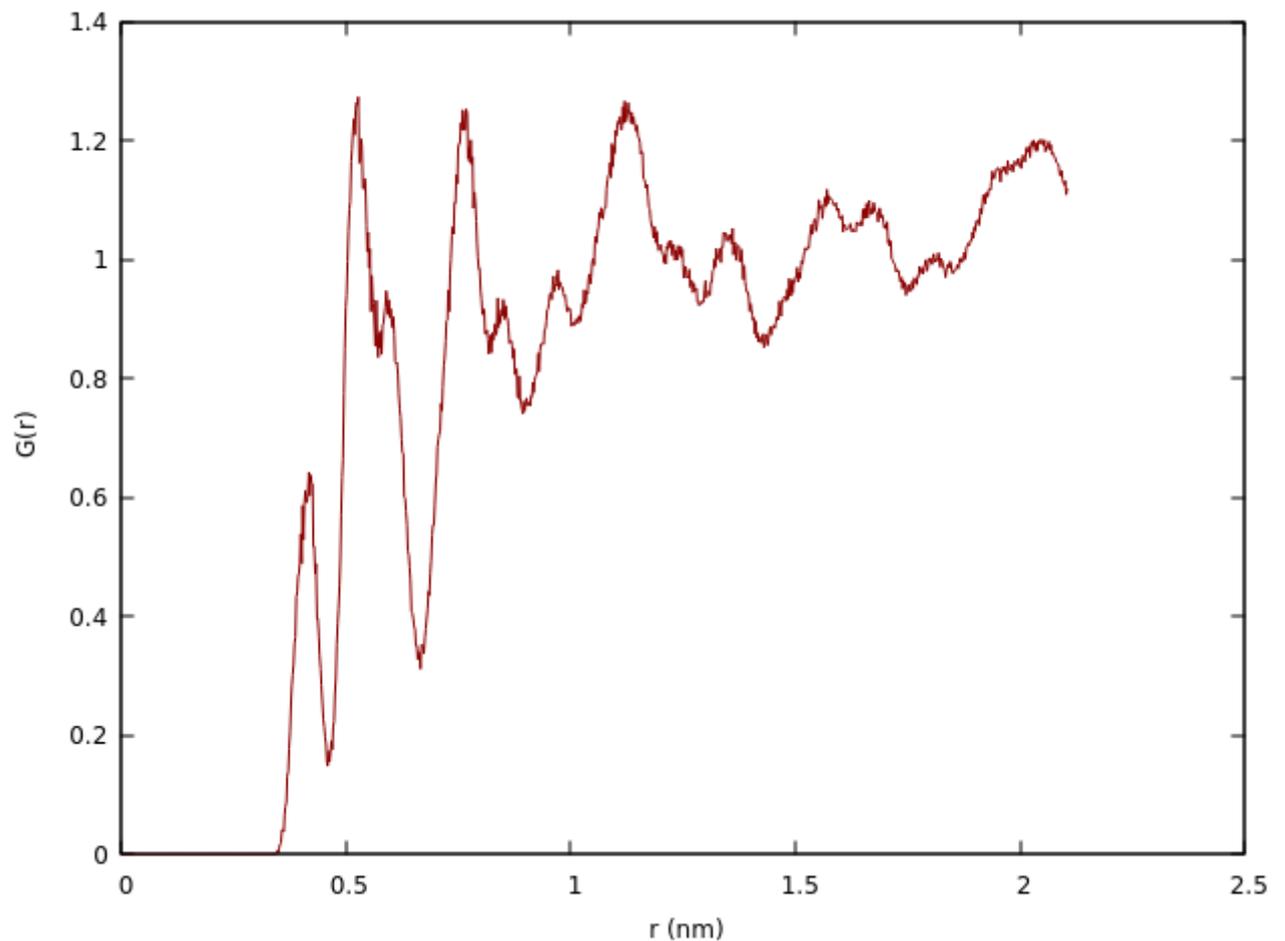
**Figura 35.** Função de distribuição espacial (SDF) do solvente  $[C_4mim][Acet]$  ao redor das cisteínas (Sistema C) visualizada no programa VMD (com zoom).



**Figura 36.** Função de distribuição espacial (SDF) do solvente  $[C_4mim][Acet]$  ao redor das cisteínas (Sistema C) visualizada no programa VMD (caixa de simulação).

#### 4.3.2 Função de Distribuição Radial (RDF) entre cátion e aminoácido

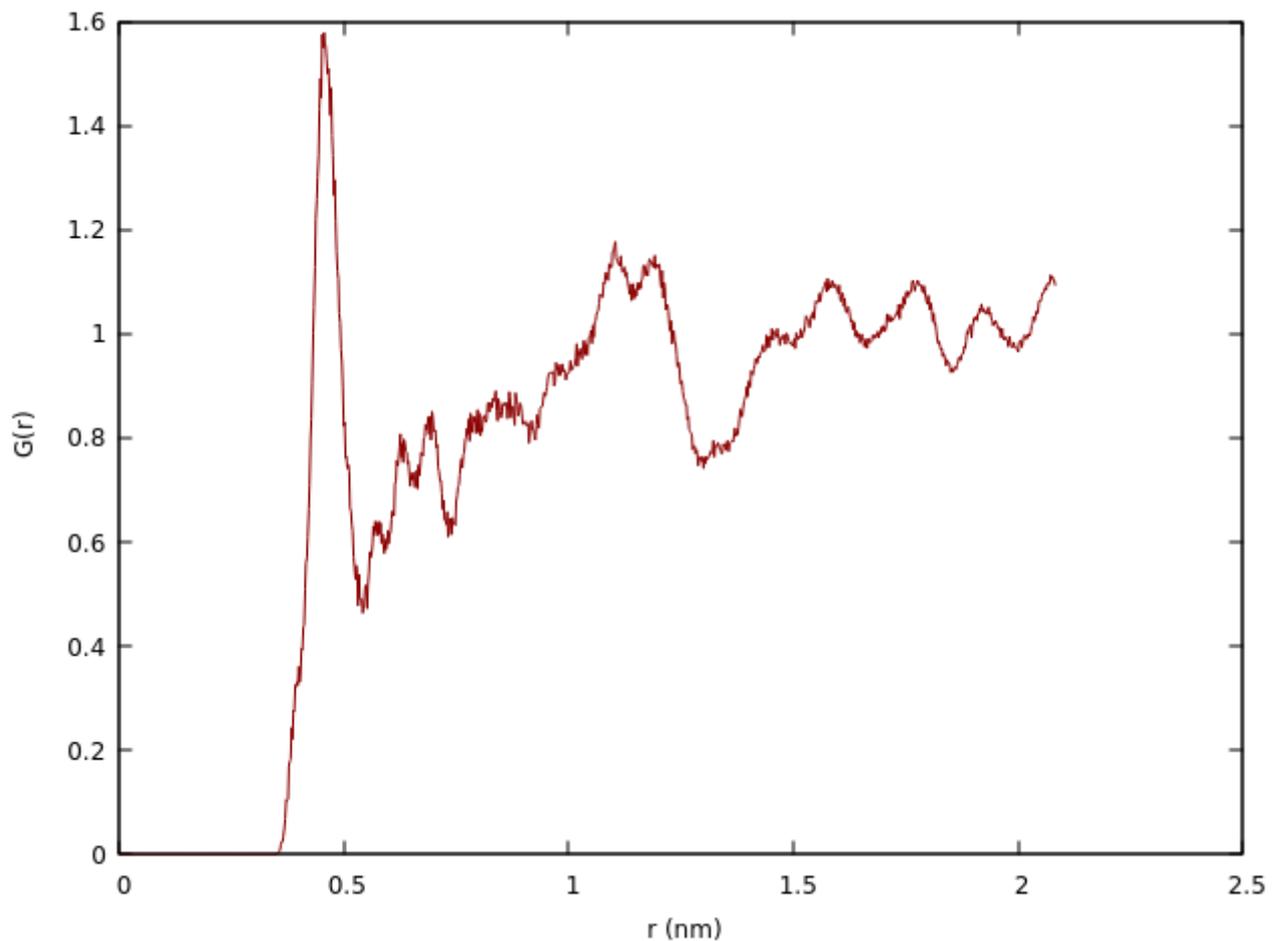
Na imagem abaixo temos a função de distribuição radial após os 20 ns iniciais de simulação entre o cátion  $[C_4mim]^+$  e a cisteína.



**Figura 37.** Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do cátion  $[C_4mim]^+$  e o aminoácido cisteína (Sistema C) após 20 ns de simulação.

Nesse gráfico temos poucos picos de interação ( $G(r) > 1$ ) entre o cátion e o aminoácido, os três picos mais pronunciados são encontrados em distâncias de 0,53 nm, 0,76 nm e 1,12 nm respectivamente, e com valores de  $G(r)$  de 1,26, 1,24 e 1,13. A integral até a distância do primeiro pico representa 0,74 cátions ao redor da proteína.

Após os 180 ns de simulação, o gráfico abaixo foi gerado pelo programa `g_rdf` do pacote de software GROMACS e representa a função de distribuição radial entre os centros de massa dos cátions e as cisteínas do sistema.

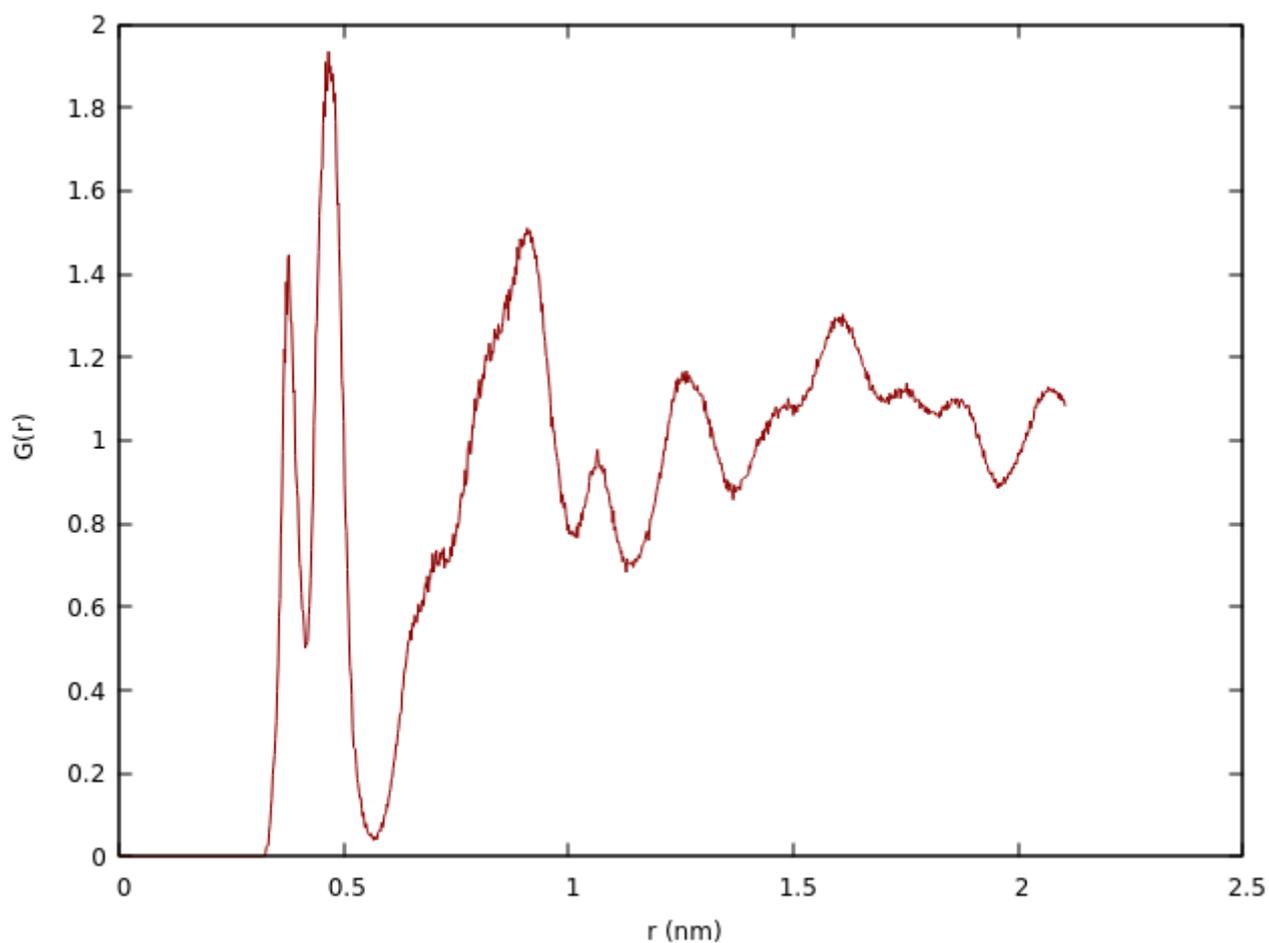


**Figura 38.** Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do cátion  $[C_4mim]^+$  e o aminoácido cisteína (Sistema C) após 180 ns de simulação.

Diferentemente da simulação inicial, podemos ver um pico de interação bastante pronunciado e uma ocorrência muito menor de vales de repulsão no gráfico da  $G(r)$ . O primeiro pico também se encontra em uma distância menor, o que implica na aproximação dos cátions ao redor das cadeias proteicas do sistema. O primeiro pico é encontrado em uma distância de 0,46 nm com um valor de 1,57 de  $G(r)$  e até esse ponto temos uma integral de 0,46. Na distância do primeiro pico da simulação de 20 ns iniciais (0,53 nm) temos uma integral de 1,14, representando uma média de 1,14 cátions ao redor do aminoácido nessa distância. Com o passar do tempo de simulação uma quantidade expressivamente maior de cátions coordenados ao redor da cisteína.

#### 4.3.3 Função de Distribuição Radial (RDF) entre ânion e aminoácido

Foi gerado um gráfico com a RDF dos primeiros 20 ns de simulação do sistema C, neste foi medida as interações entre os centros de massa dos acetatos e o centros de massa dos monômeros (cisteínas).



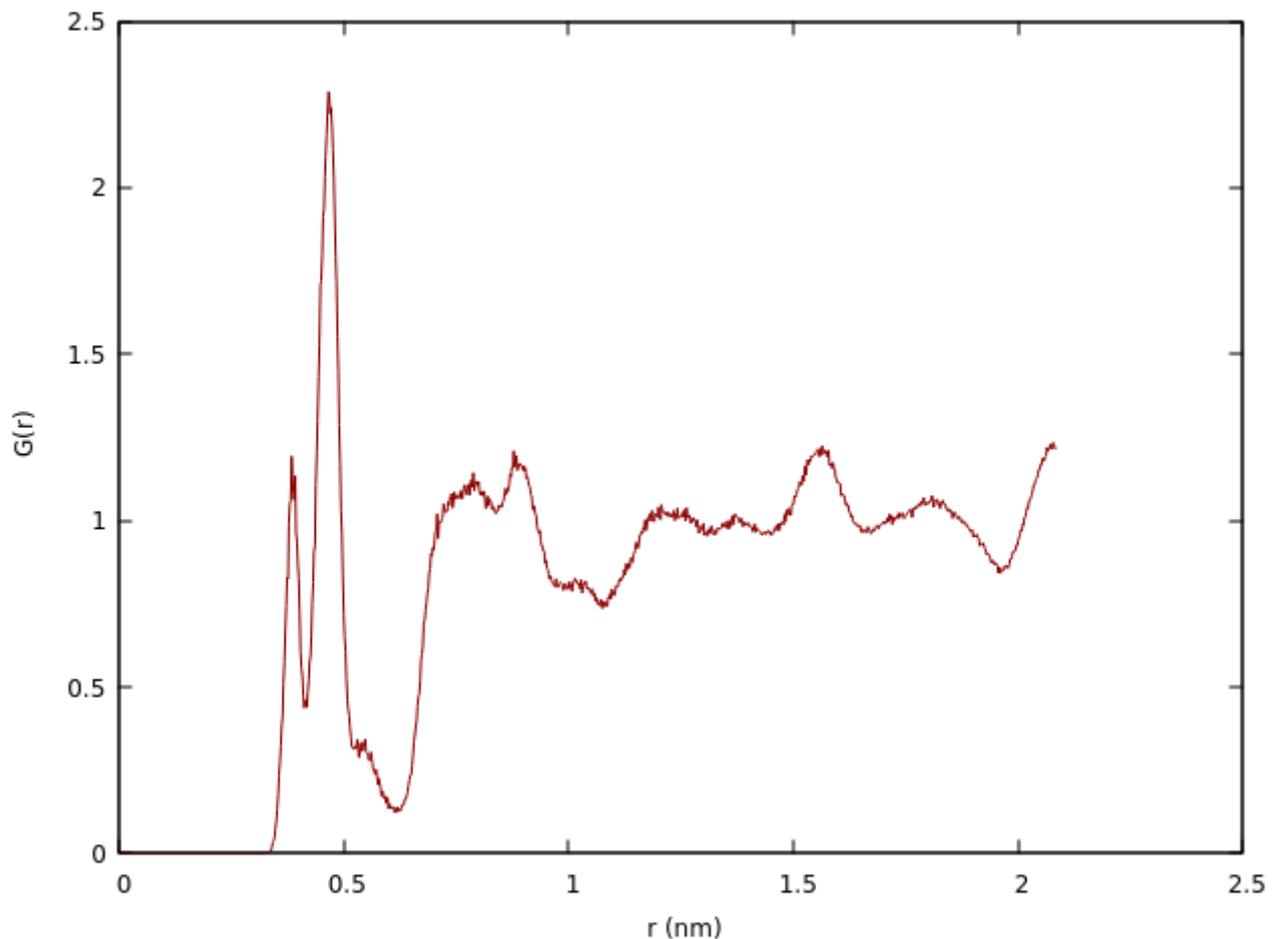
**Figura 39.** Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion  $[\text{Acet}]^-$  e o aminoácido cisteína (Sistema C) após 20 ns de simulação.

Diferentemente da interação entre os cátions e os aminoácidos no momentos iniciais de simulação do sistema, temos picos de interação maiores ( $G(r)$  próxima de 2), onde podemos destacar dois desses picos de interação  $G(r) = 1,45$  e  $G(r) = 1,92$  nas distâncias de 0,38 nm e 0,46 nm, respectivamente. Além desses picos de interação temos um grande vale de repulsão

( $G(r) = 0,03$ ) na distância de 0,57 nm. Esse vale representa um pico de interação do cátion com o aminoácido, como consta na figura 37.

A integral no pico de maior interação nessa RDF tem o valor de 0,60 e representa a quantidade média de íons cloreto ao redor da cisteína nessa distância ( $r = 0,46$  nm) e na distância de 0,57 nm temos uma integral de 1,39.

No gráfico abaixo temos a RDF do mesmo sistema, após o tempo final de simulação (180 ns).



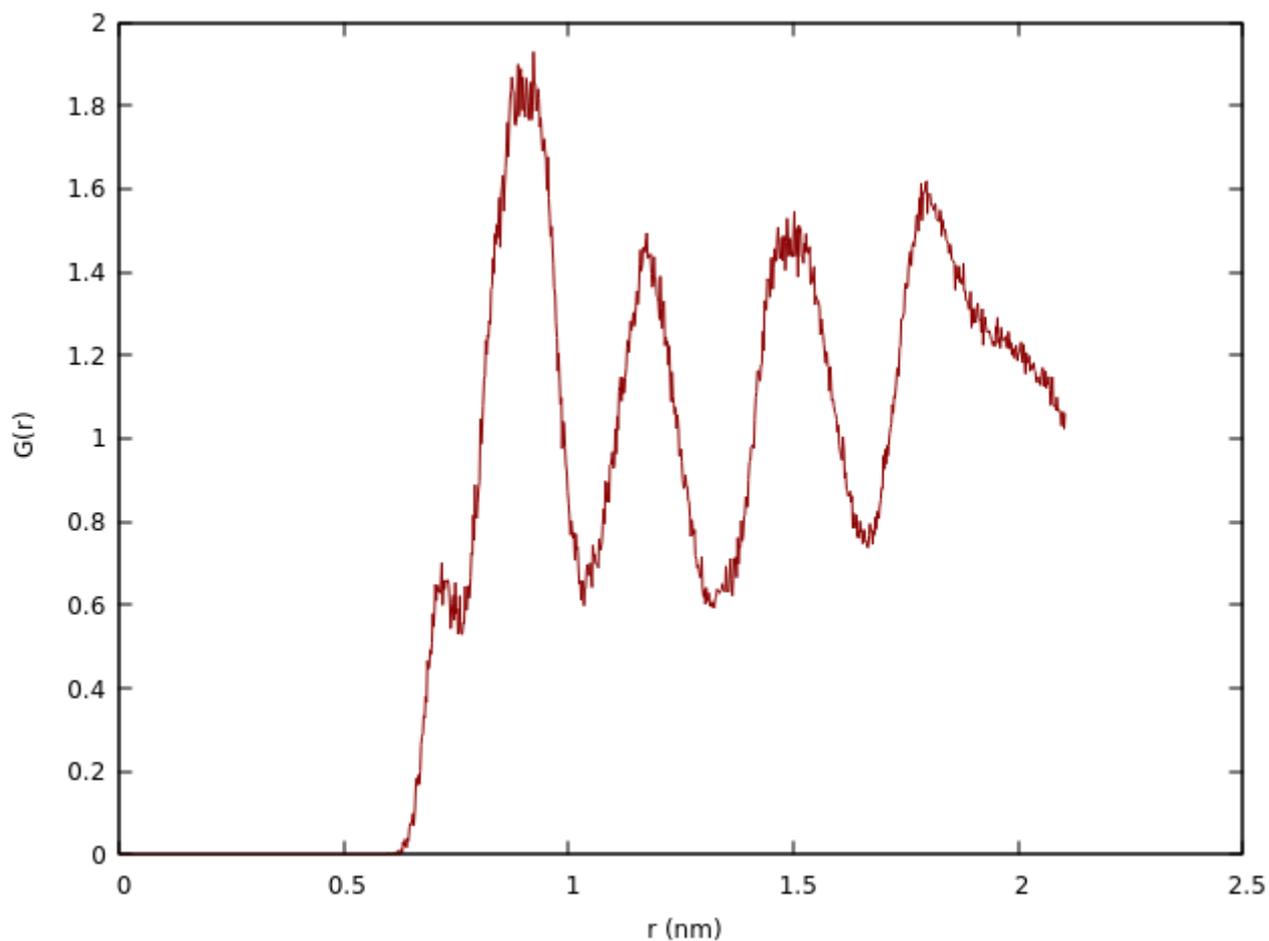
**Figura 40.** Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion  $[\text{Acet}]^-$  e o aminoácido cisteína (Sistema C) após 180 ns de simulação.

Nesse gráfico temos um perfil de picos semelhante ao caso das simulações iniciais, porém com valores mais elevados de  $G(r)$ , onde podemos destacar 2 picos nas distâncias de 0,38 nm e 0,46 nm (mesmas distâncias do caso inicial) e esses picos representam valores de  $G(r)$  de 1,20 e 2,30, respectivamente. Temos também um vale de repulsão, dessa vez com valor de 0,15 na distância de 0,62 nm. A integral dessa RDF em uma distância de 0,46 nm é de 0,67,

um valor um pouco maior do que no caso anterior. Na distância de 0,57 nm temos uma média de 1,57 acetatos ao redor da cisteína.

#### 4.3.4 Função de Distribuição Radial (RDF) entre água e aminoácido

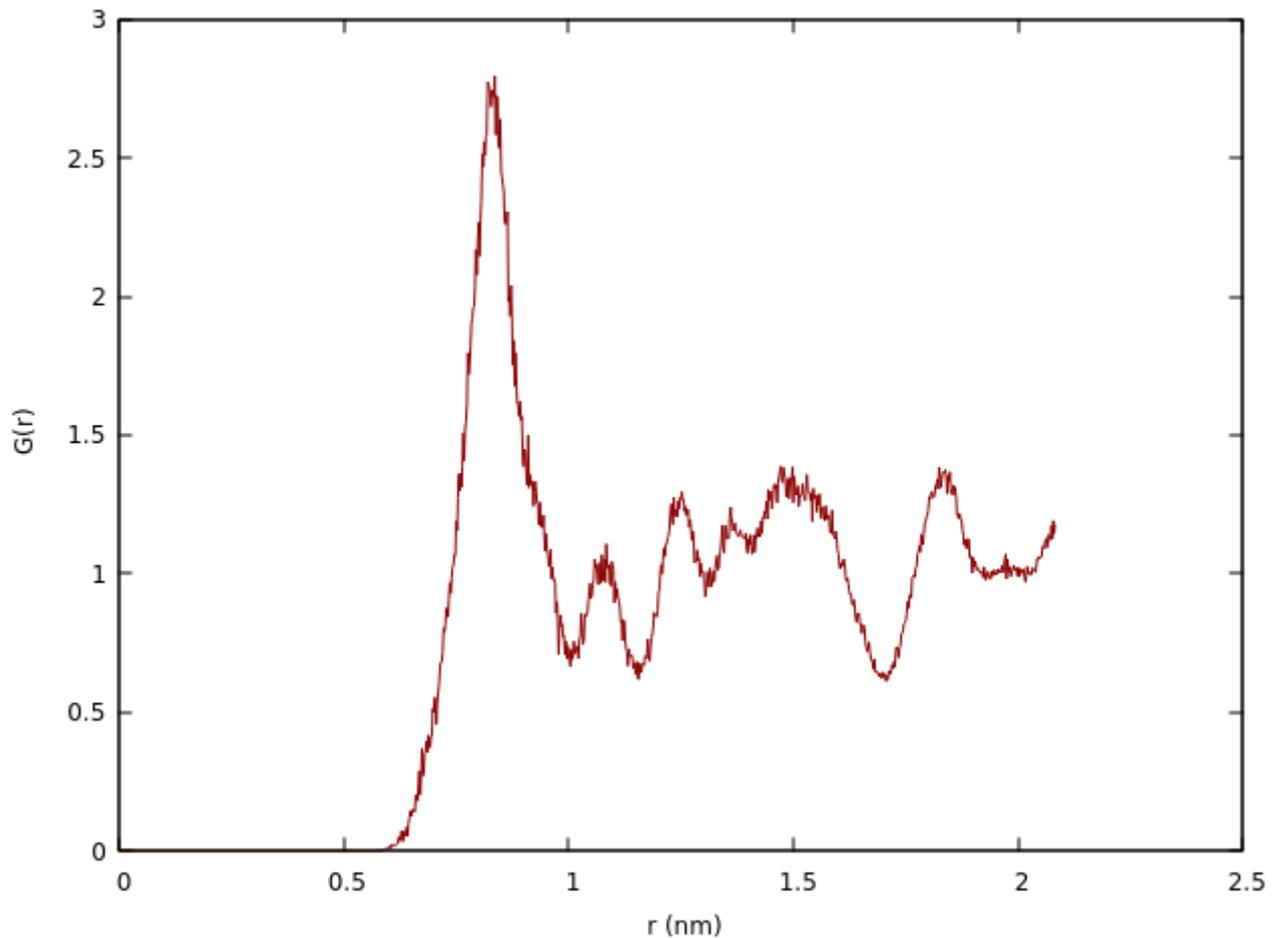
Foi gerado um gráfico de RDF entre o centro de massa das moléculas de água e o centro de massa dos monômeros do sistema após os 20 ns iniciais de simulação.



**Figura 41.** Função de distribuição radial (RDF) entre a molécula de água e o aminoácido cisteína (Sistema C) após 20 ns de simulação.

Nesse gráfico podemos ver zonas de interação entre esses pares em distâncias entre 0,83 nm e 0,96 nm, com o maior pico sendo  $G(r) = 1,93$  na distância de 0,93 nm. Em 1,02 nm temos um vale ( $G(r) = 0,61$ ) na função de distribuição radial, até essa distância temos em média 1,39 moléculas de água ao redor da proteína.

Abaixo temos o gráfico que demonstra a mesma relação entre esses pares, mas após os 180 ns de simulação.

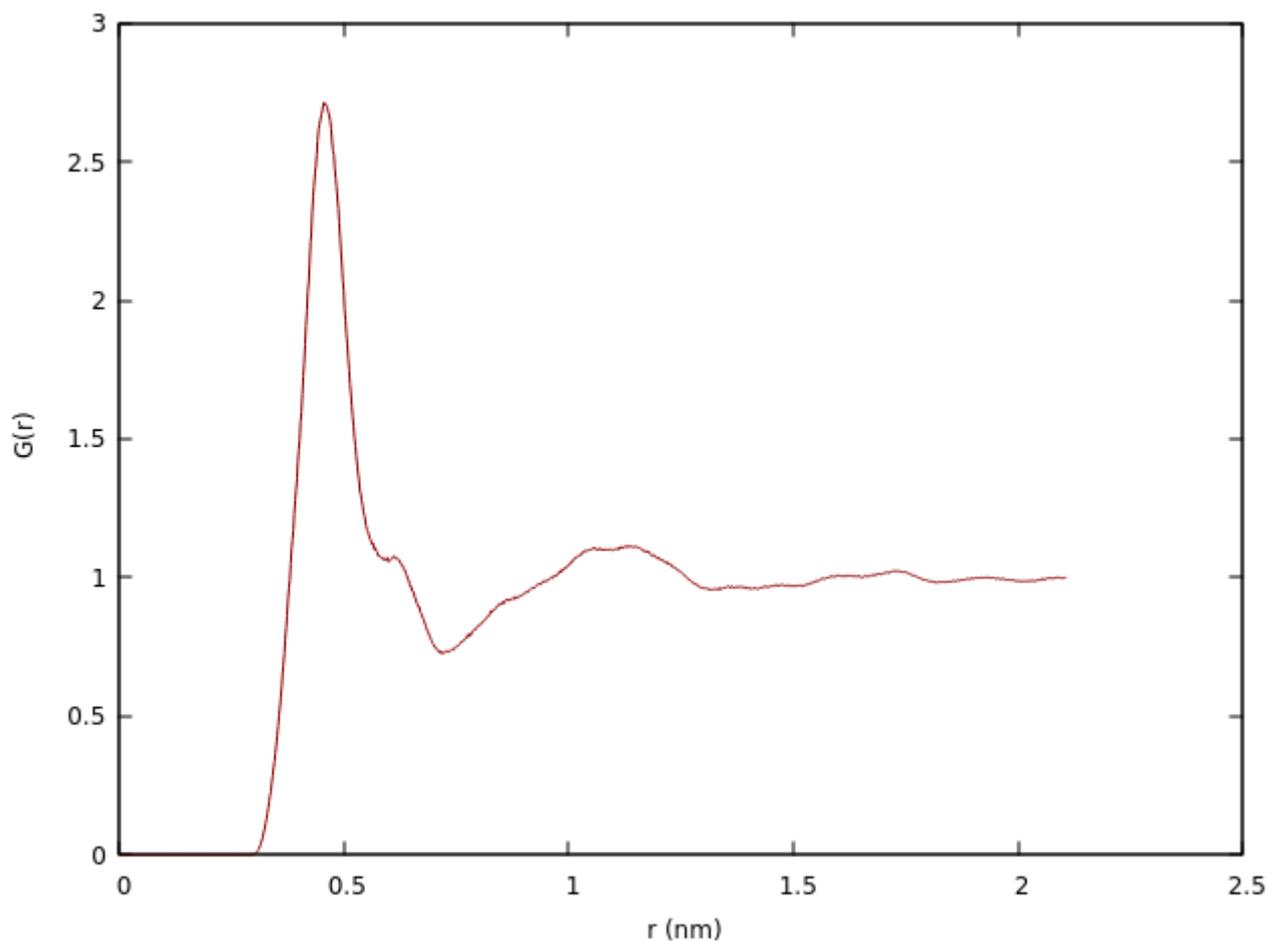


**Figura 42.** Função de distribuição radial (RDF) entre a molécula de água e o aminoácido cisteína (Sistema C) após 180 ns de simulação.

Após o final das simulações, já é possível destacar a presença de um pico muito pronunciado ( $G(r) = 2,75$ ) na distância de 0,83 nm, o que demonstra uma organização maior das moléculas de água ao redor da proteína. Na distância de 1,02 nm temos um vale ( $G(r) = 0,70$ ), assim como na simulação inicial. Até esse ponto temos uma integral de 1,66, o que representa uma maior interação após o decorrer do tempo.

#### 4.3.5 Função de Distribuição Radial (RDF) entre cátion e ânion

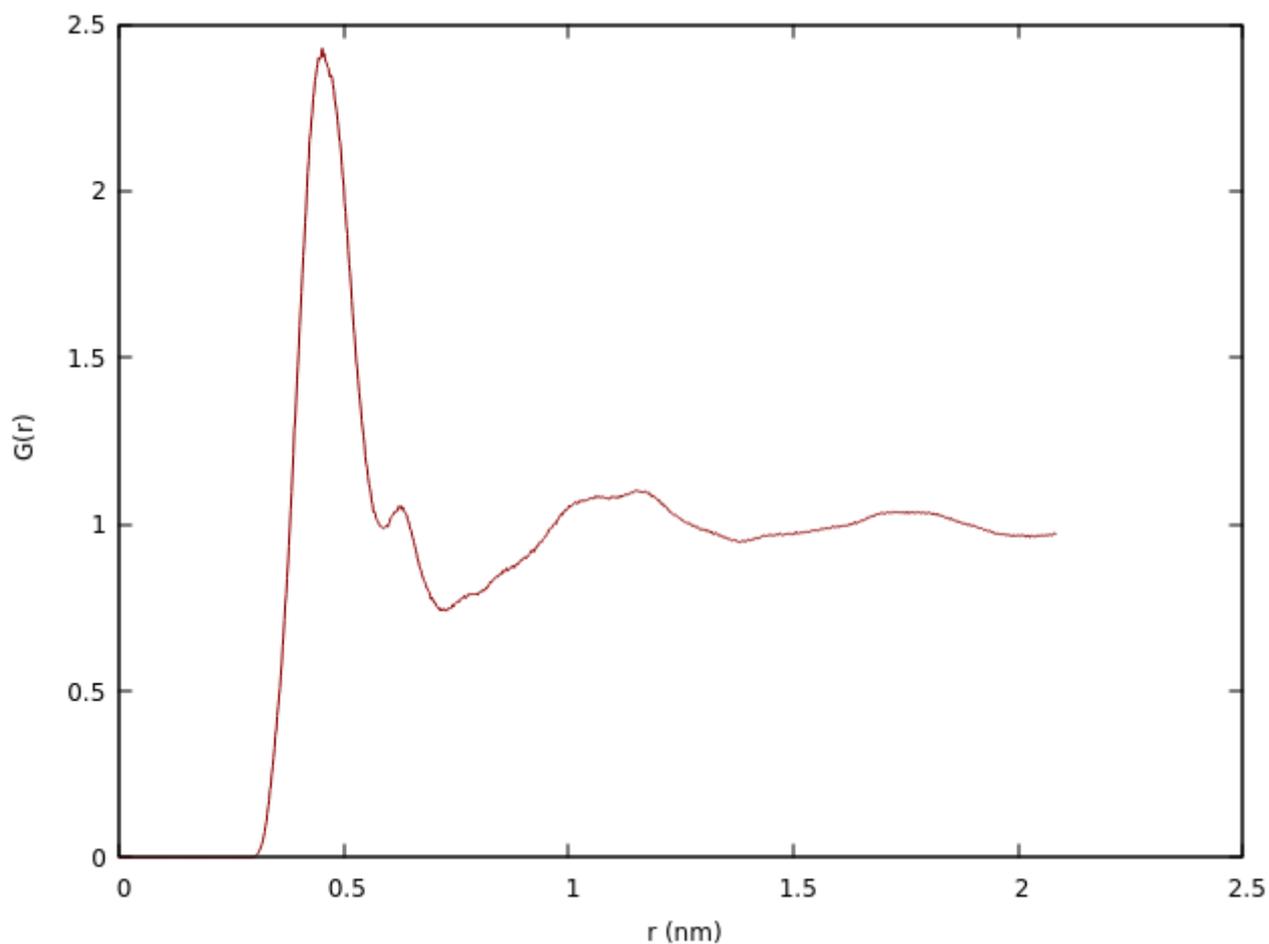
Foram também traçadas RDFs entre os acetatos ao redor dos cátions de  $[C_4mim]^+$ , nos tempos de 20 ns e 180 ns de simulação, com a intenção de analisar mudanças na morfologia da rede iônica do  $[C_4mim][Acet]$  após 180 ns. Abaixo temos o gráfico que representa os primeiros 20 ns.



**Figura 43.** Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion  $[Acet]^-$  e o centro de massa do cátion  $[C_4mim]^+$  após 20 ns de simulação (Sistema C).

Em 0,47 nm temos um pico de interação entre as espécies iônicas do sistema, com uma  $G(r)$  de 2,79. No ápice dessa interação temos 1,46 ânions ao redor do cátion central.

Abaixo temos o gráfico que representa o final das simulações do sistema C.



**Figura 44.** Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion  $[\text{Acet}]^-$  e o centro de massa do cátion  $[\text{C}_4\text{mim}]^+$  após 180 ns de simulação (Sistema C).

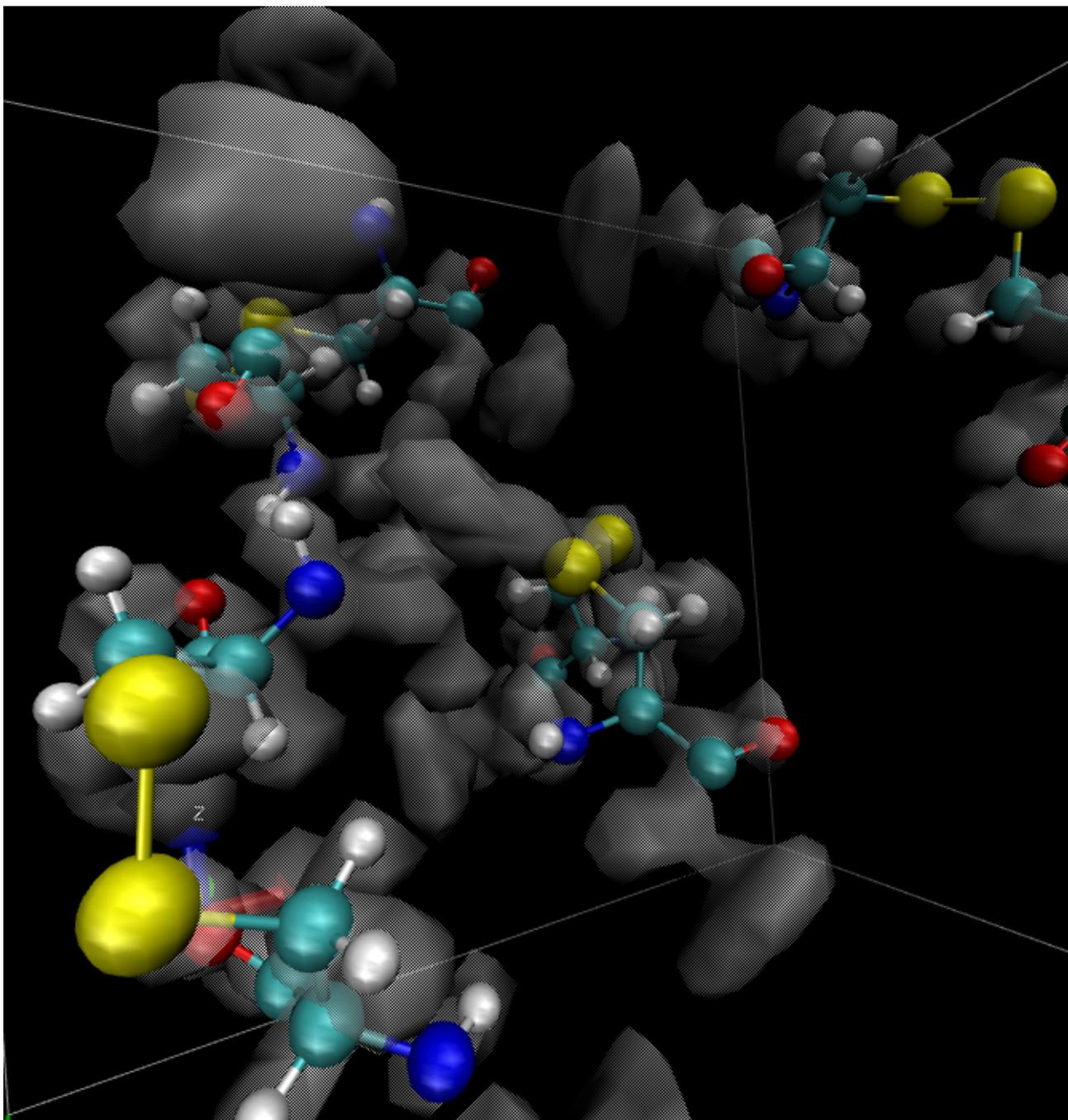
Assim como nos 20 ns iniciais, temos o principal pico de interação entre essas duas espécies na distância de 0,46 nm com  $G(r) = 2,42$  e uma pequena diminuição na interação entre os íons. Como percebido nos casos anteriores a estrutura dos picos é praticamente idêntica, indicando a manutenção da morfologia do sistema, em respeito aos íons.

A integral na distância de 0,45 nm, é de 1,04, representando uma quantidade relativamente menor de ânions ao redor do cátion, em comparação aos 20 ns de simulação.

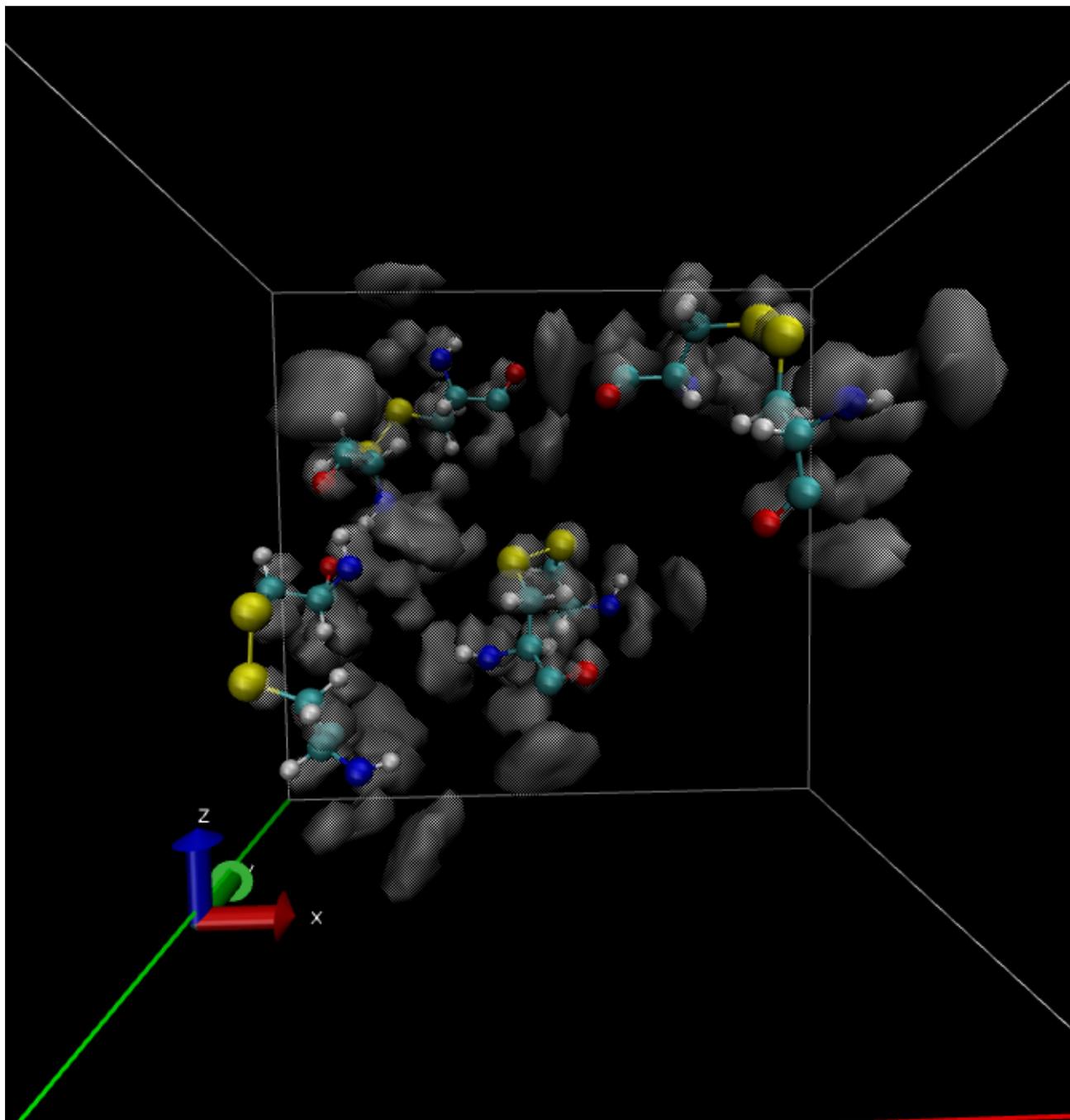
#### 4.4 Sistema D: Acetato de 1-butil-4-metilimidazólio ([C<sub>4</sub>mim][Acet]) e Cistina (Cys2)

##### 4.4.1 Função de Distribuição Espacial do sistema (SDF)

Com o uso do software *g\_spatial*, geramos duas imagens do sistema. Para visualização foi utilizado software VMD e essas imagens representam o mesmo sistema (180 ns), a única diferença é o zoom utilizado (maior na primeira imagem).



**Figura 45.** Função de distribuição espacial (SDF) do solvente [C<sub>4</sub>mim][Acet] ao redor das cistinas (Sistema D) visualizada no programa VMD (com zoom).

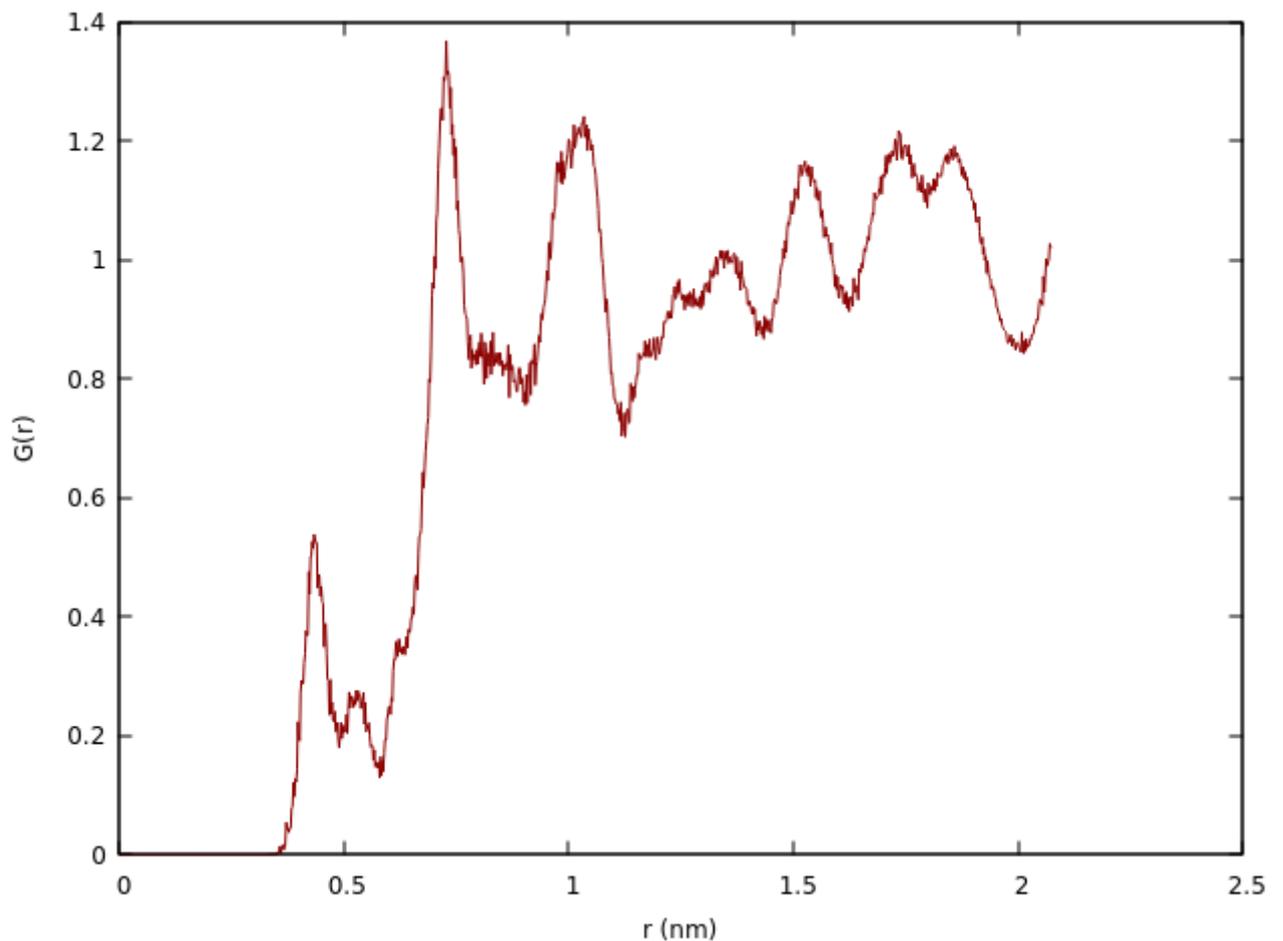


**Figura 46.** Função de distribuição espacial (SDF) do solvente [C<sub>4</sub>mim][Acet] ao redor das cistinas (Sistema D) visualizada no programa VMD (caixa de simulação).

As manchas opacas representam a probabilidade de encontrar o solvente em uma distância  $r$  da cadeia proteica. Como indicado anteriormente, há solvente em toda extensão da caixa de simulação e as zonas indicadas representam apenas a maior interação entre líquido iônico e aminoácido.

#### 4.4.2 Função de Distribuição Radial (RDF) entre cátion e aminoácido

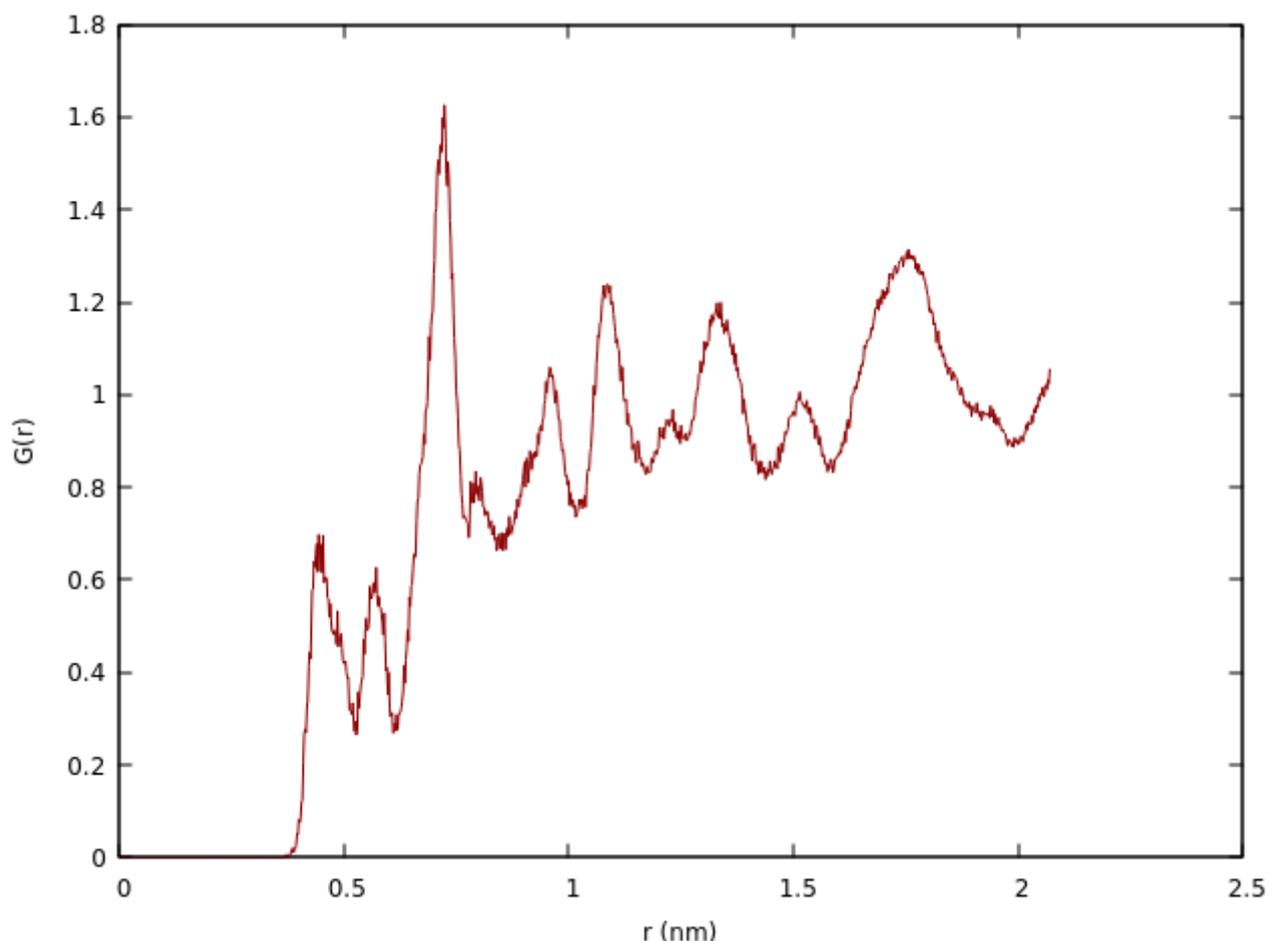
Na imagem abaixo temos a função de distribuição radial após os 20 ns iniciais de simulação entre o cátion  $[C_4mim]^+$  e do dímero do aminoácido (cistina).



**Figura 47.** Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do cátion  $[C_4mim]^+$  e o aminoácido cistina (Sistema D) após 20 ns de simulação.

No gráfico indicado acima, temos poucos picos de interação e muitas regiões de repulsão entre os dois pares escolhidos. Em uma distância de 0,72 nm temos o pico de maior intensidade, representando um valor de  $G(r)$  de 1,36. A integral até essa distância corresponde a 1,81 cátions ao redor da proteína de referência.

O gráfico abaixo demonstra a mesma função de distribuição radial após os 180 ns totais de simulação.

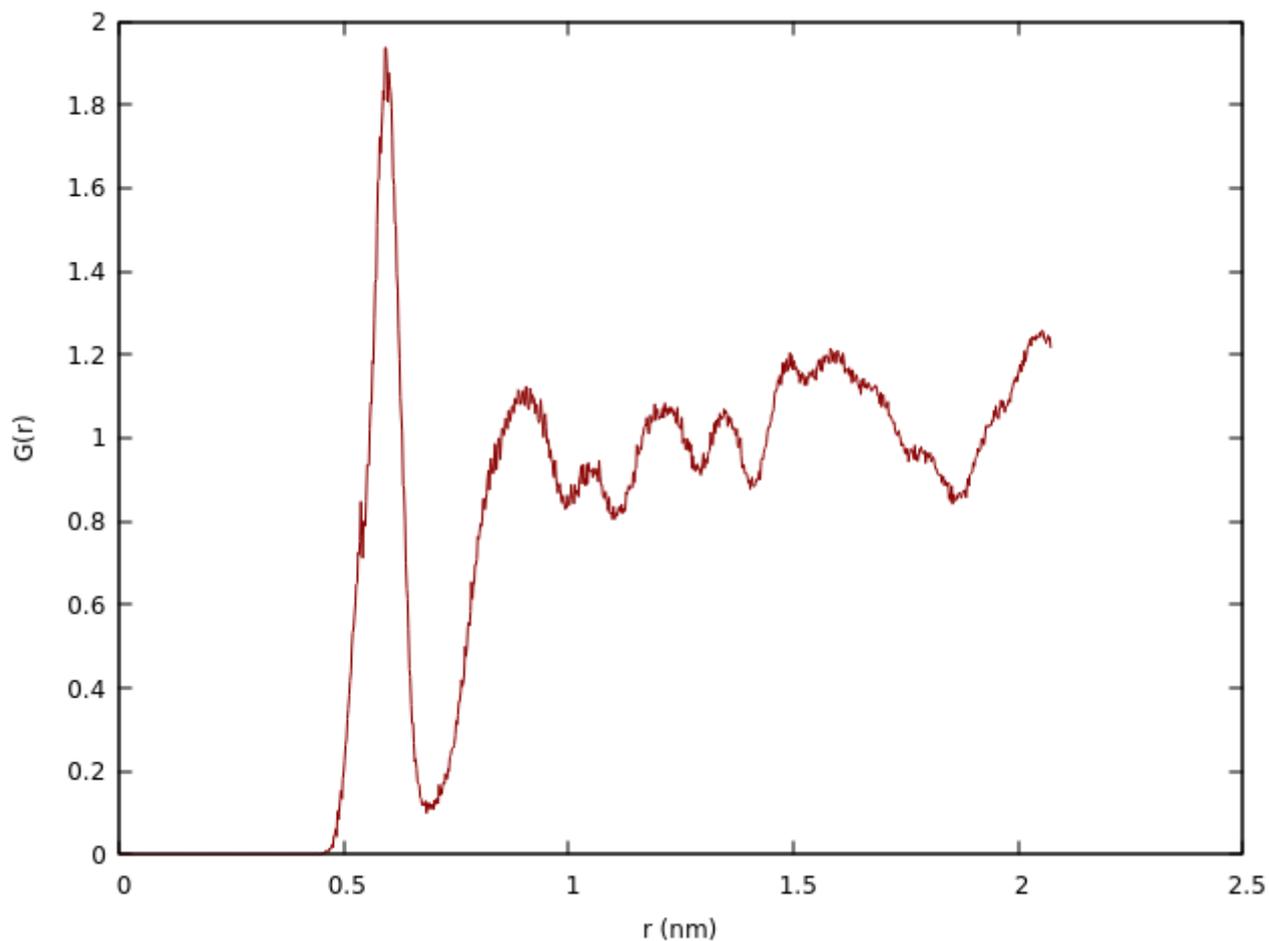


**Figura 48.** Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do cátion  $[C_4mim]^+$  e o aminoácido cistina (Sistema D) após 180 ns de simulação.

Após o final das simulações, temos um perfil de interação bem semelhante aos 20 ns iniciais, com zonas de repulsão ( $G(r) < 1$ ) e com um pico de interação mais pronunciado. Dessa vez esse pico tem valor de 1,62 e se encontra em uma distância de 0,72 nm. Até esse pico inicial, a integral da RDFs nos fornece o valor de 2,94 cátions ao redor do aminoácido. Esse valor é consideravelmente maior do que no início da simulação, indicando uma aproximação dos íons de  $[C_4mim]^+$  ao redor da cistina.

#### 4.4.3 Função de Distribuição Radial (RDF) entre ânion e aminoácido

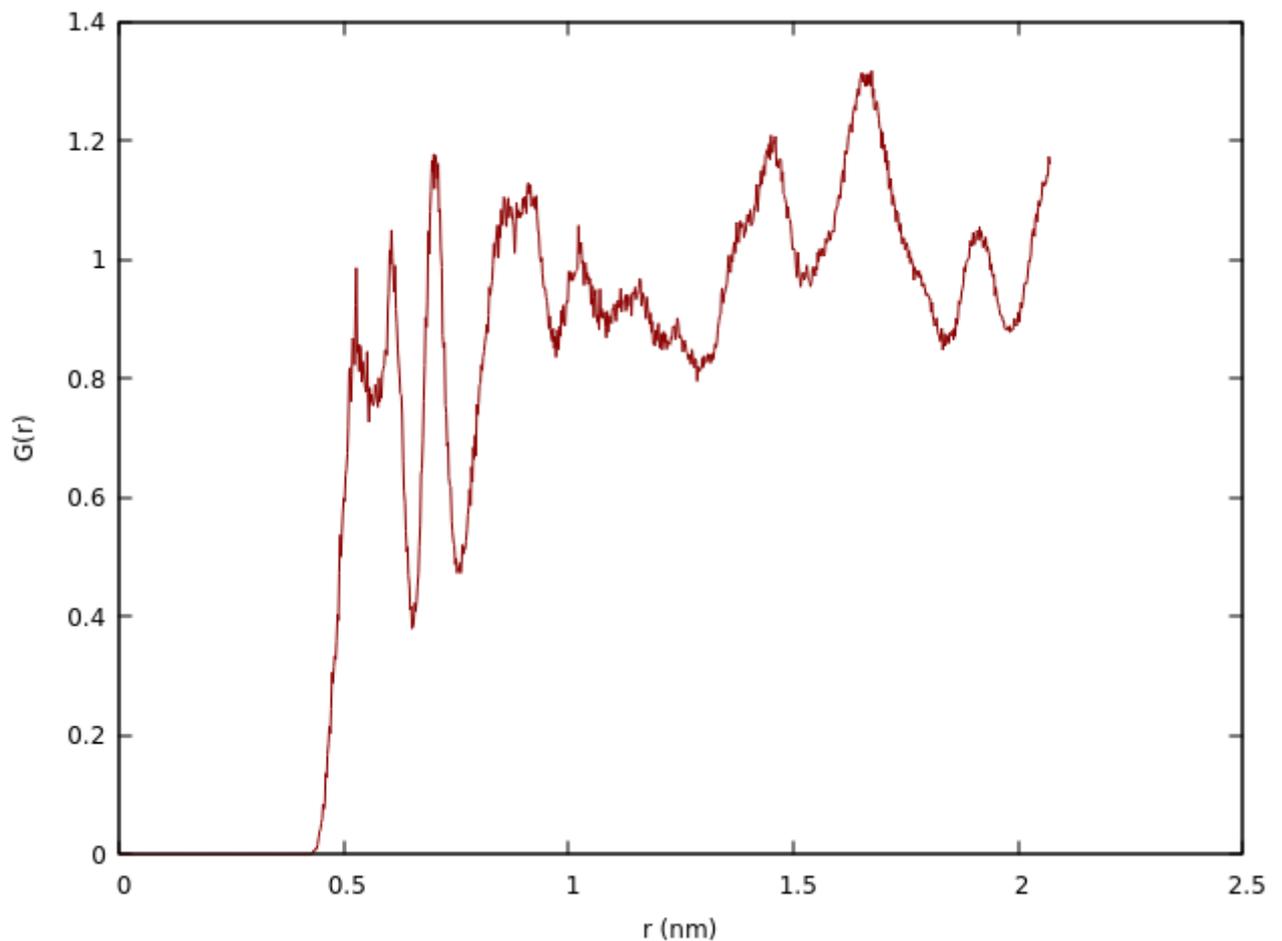
Da mesma forma, foram extraídas funções de distribuição radial entre o centro de massa do acetato e o centro de massa da proteína de referência. Abaixo temos a demonstração gráfica dessa distribuição ao fim dos 20 ns iniciais.



**Figura 49.** Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion  $[\text{Acet}]^-$  e o aminoácido cistina (Sistema D) após 20 ns de simulação.

Como vemos na imagem acima, não temos as zonas de repulsão iniciais como havia no caso da interação entre o cátion e a proteína. Também pode-se perceber um pico de interação muito pronunciado a uma distância de 0,60 nm com o valor de 1,93. A integral até esse pico, que representa a quantidade de pares até essa distância, é de 1,30.

Na imagem seguinte, temos a representação da RDF desses pares após o término das simulações de dinâmica molecular do sistema.

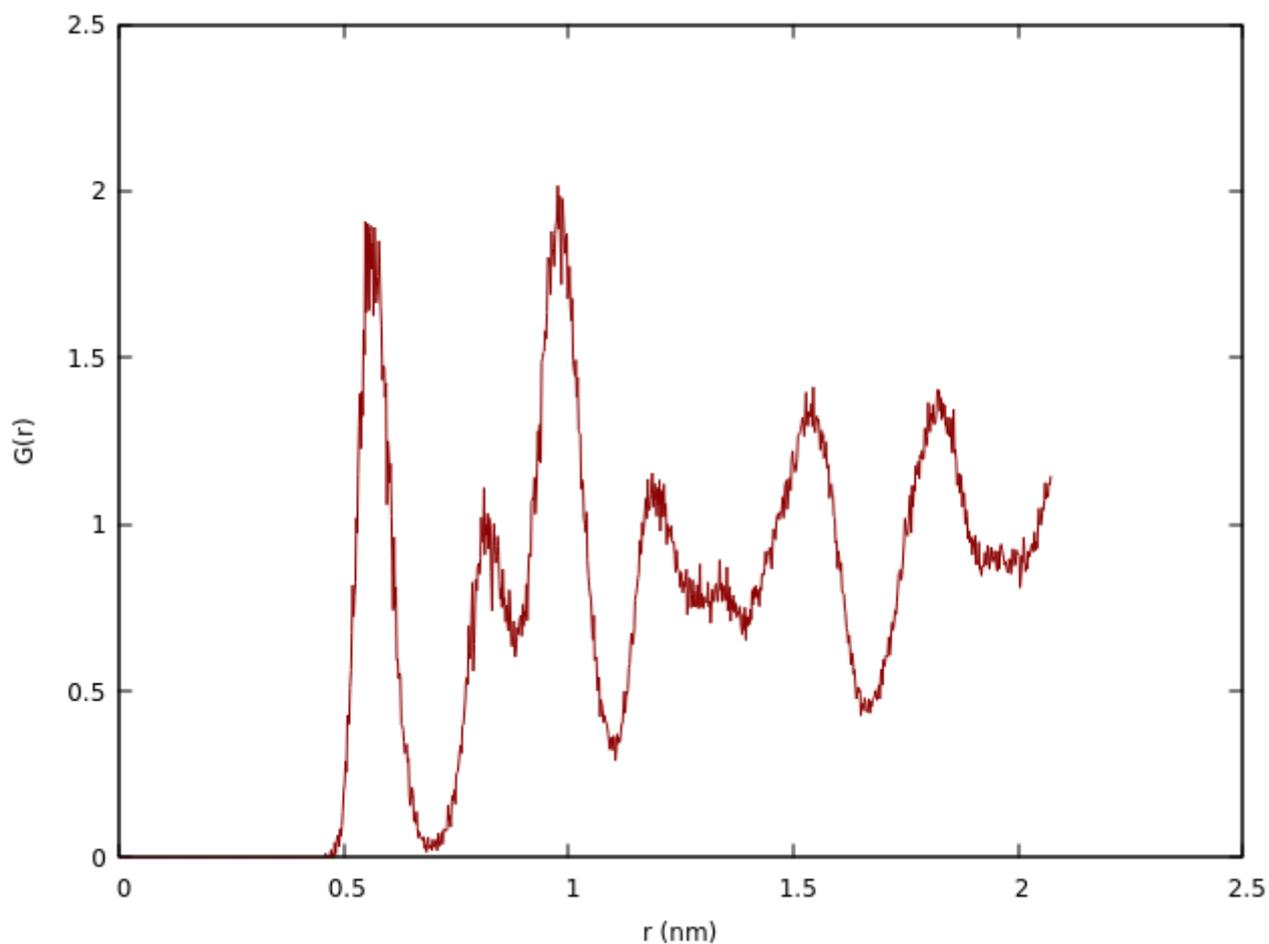


**Figura 50.** Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion  $[\text{Acet}]^-$  e o aminoácido cistina (Sistema D) após 180 ns de simulação.

Na função de distribuição radial do par ânion-proteína após o tempo total de simulação, temos um perfil muito diferente do inicial, indicando uma grande mudança na coordenação desse par. Aliado a isso, não temos um pico de interação tão pronunciado quanto no tempo inicial. Na distância de 0,60, onde temos um pico da simulação dos 20 ns, temos uma  $G(r)$  de 1,03. Nessa distância temos uma integral de 1,10, uma quantidade um pouco menor se comparada com a da simulação inicial.

#### 4.4.4 Função de Distribuição Radial (RDF) entre água e aminoácido

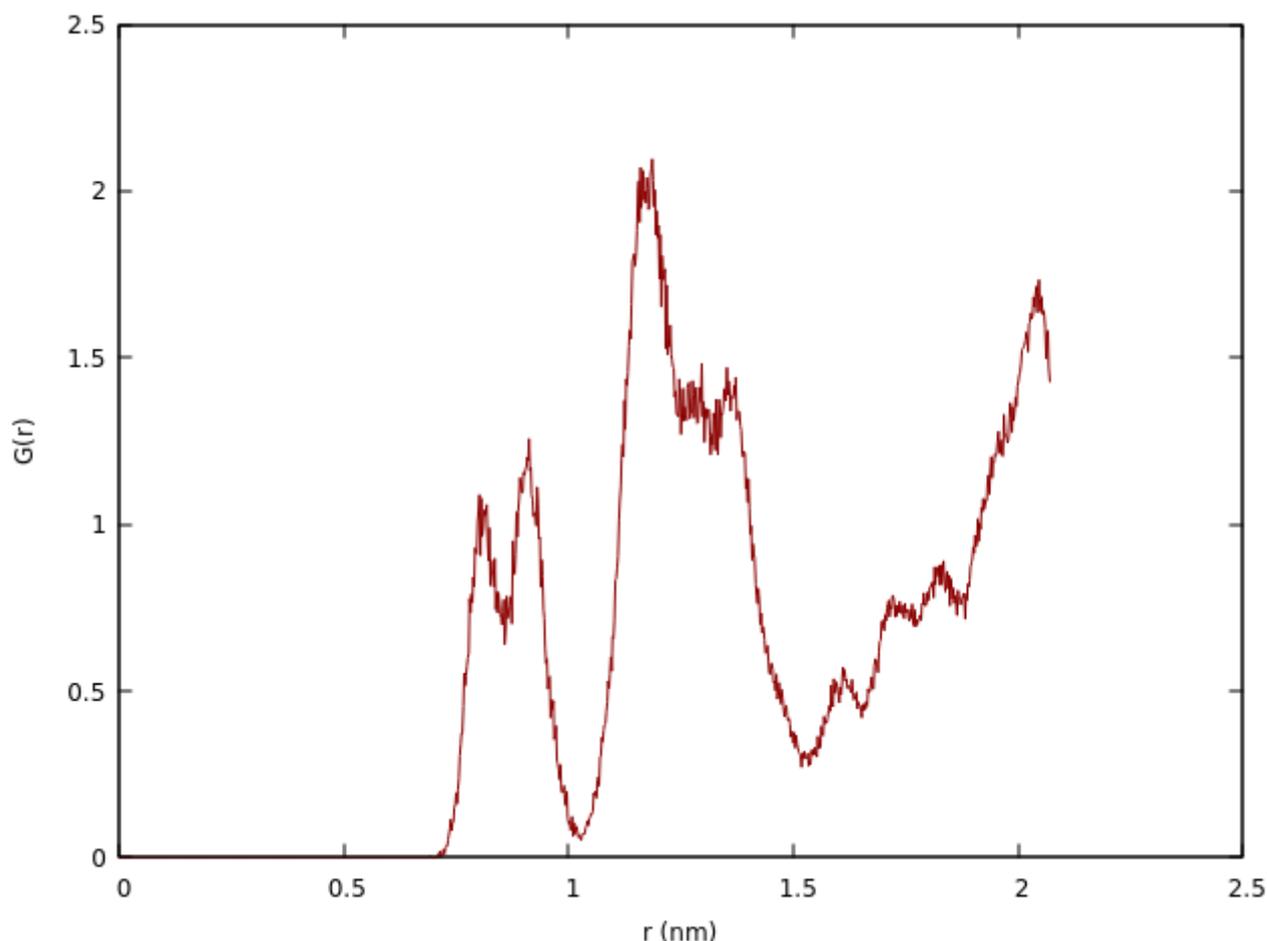
Foram também extraídas RDFs entre os centros de massa das moléculas de água em relação ao centro de massa das cistinas. No gráfico abaixo temos a representação após os primeiros 20 ns de simulação.



**Figura 51.** Função de distribuição radial (RDF) entre a molécula de água e o aminoácido cistina (Sistema D) após 20 ns de simulação.

Nesse gráfico temos 2 picos de interação mais pronunciados, um encontrado na distância de 0,56 nm e o outro na de 0,98 nm. Os valores de  $G(r)$  desses picos são de 1,90 e 2,01, respectivamente. A integral até 0,56 nm representa 0,09 moléculas de água ao redor da proteína e a integral até 0,98 nm representa 1,09 moléculas ao redor da proteína de referência.

Abaixo temos a representação da mesma RDF após os 180 ns totais de simulações.



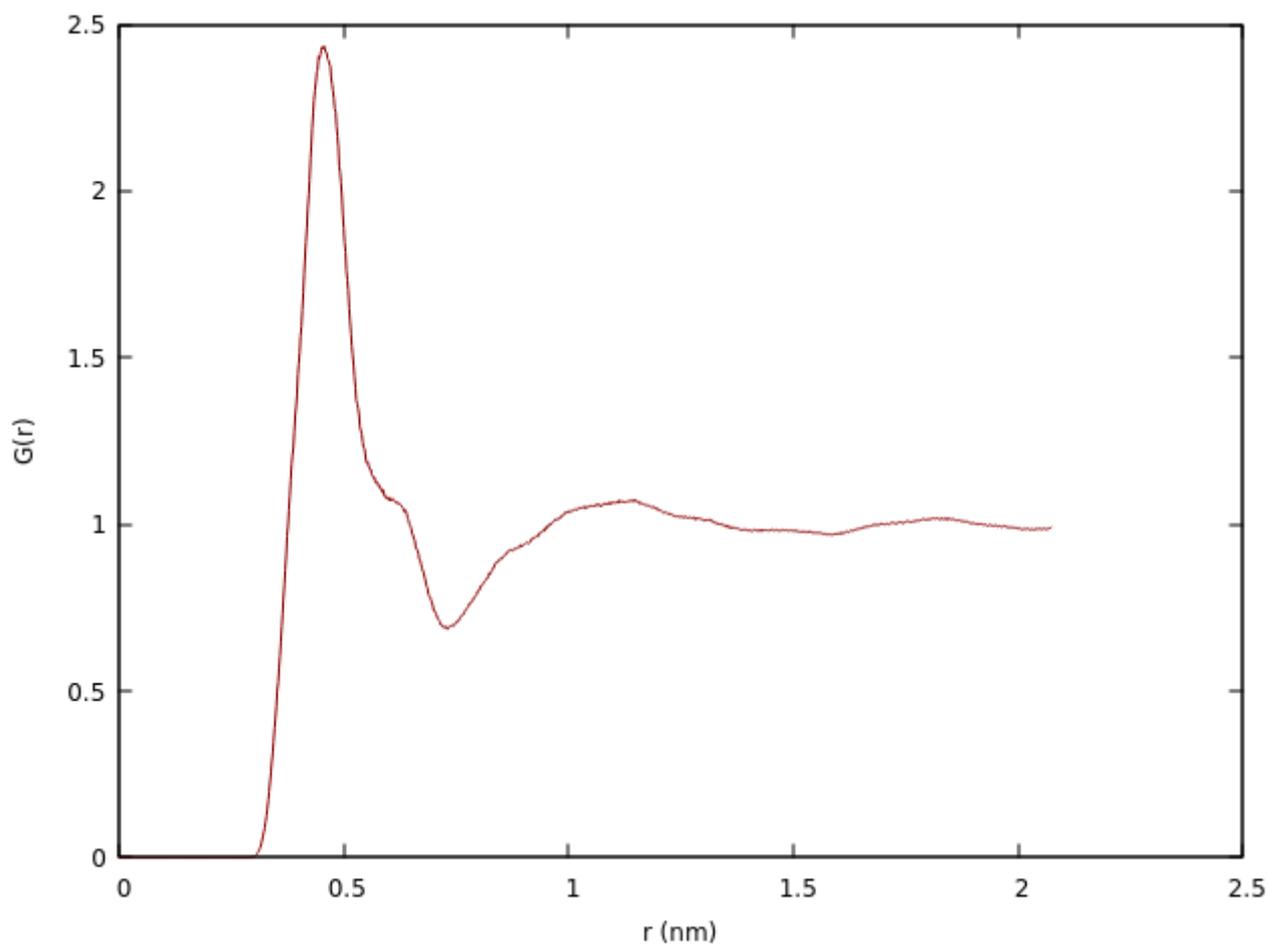
**Figura 52.** Função de distribuição radial (RDF) entre a molécula de água e o aminoácido cistina (Sistema D) após 180 ns de simulação.

Diferentemente do caso anterior, temos zonas de pouca interação entre as moléculas de água e as cistinas do sistema. Em distâncias maiores que 1 nm começamos a ter uma zona maior de interação com um pico bastante pronunciado na distância de 1,19 nm com valor de 2,09 no eixo y. Para as distâncias de 0,56 nm e 0,98 nm as integrais calculadas foram de 0 e 0,66, valores que indicam um afastamento das moléculas de água das cistinas após o tempo de simulação.

#### 4.4.5 Função de Distribuição Radial (RDF) entre cátion e ânion

Para checar a morfologia da rede iônica do líquido  $[C_4mim][Acet]$ , foram realizados dois cálculos de função radial de distribuição do ânion ao redor do cátion. O primeiro foi calculado após os primeiros 20 ns de simulação e o segundo após o fim das simulações (180 ns).

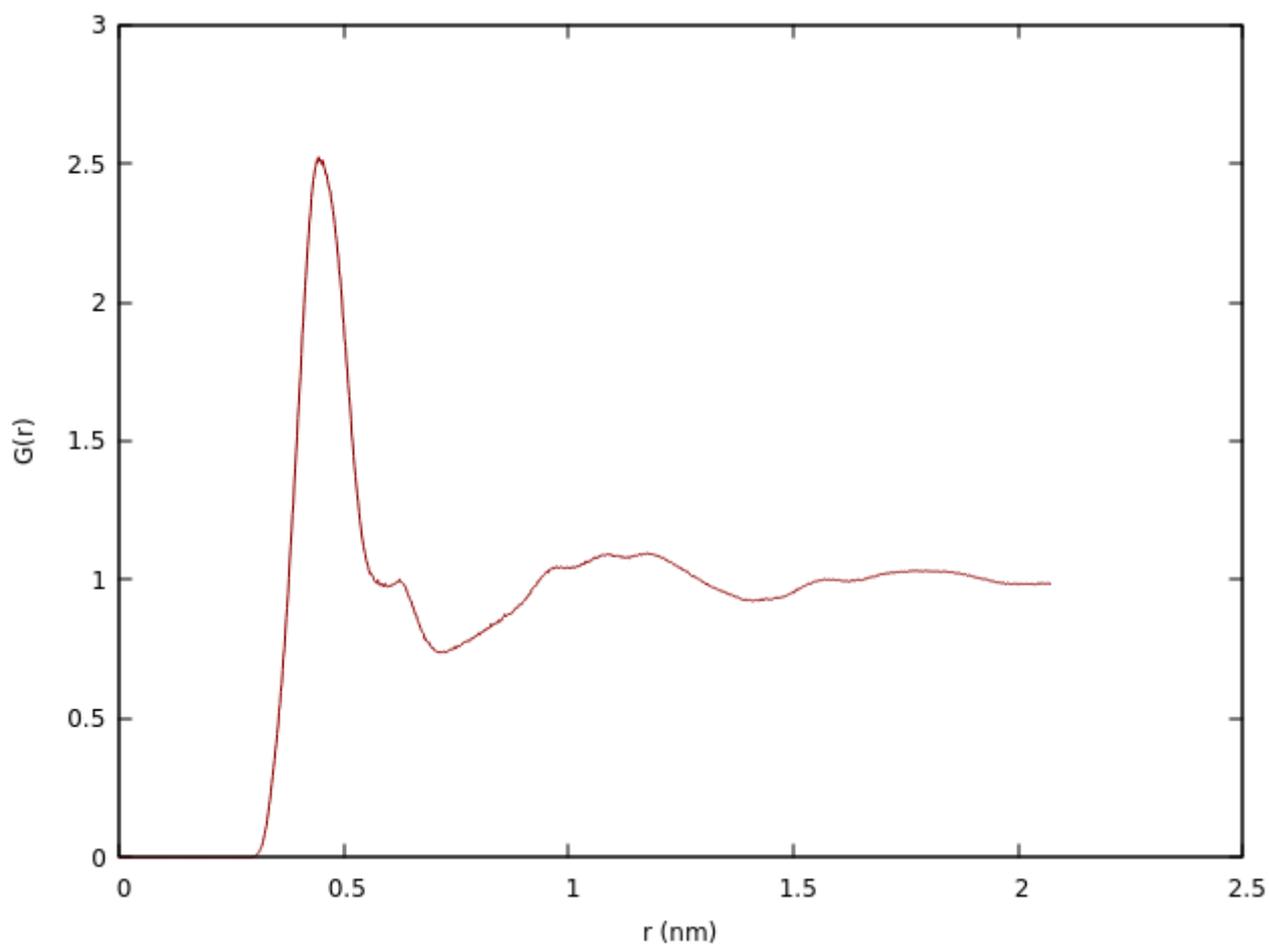
No gráfico abaixo temos a representação dos primeiros 20 ns.



**Figura 53.** Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion  $[\text{Acet}]^-$  e o centro de massa do cátion  $[\text{C}_4\text{mim}]^+$  após 20 ns de simulação (Sistema D).

Na representação acima temos um pico muito pronunciado de interação ( $G(r) = 2,42$ ) na distância de 0,46 nm. A integral até esse pico representa a quantidade de ânions ao redor do cátion de referência e tem o valor de 1,24.

A representação da RDF até os 180 ns finais dessa simulação se encontra no gráfico abaixo.



**Figura 54.** Função de distribuição radial (RDF) entre o centro de massa do ânion  $[\text{Acet}]^-$  e o centro de massa do cátion  $[\text{C}_4\text{mim}]^+$  após 180 ns de simulação (Sistema D).

Após os 180 ns finais de simulação temos um gráfico muito semelhante ao anterior, com um pico na distância de 0,45 com um valor de 2,52. Uma interação apenas um pouco maior do que nos 20 ns iniciais de simulação, a integral até esse ponto tem o valor de 1,11. Como os valores são muito próximos, podemos inferir que não houve uma mudança muito grande na estrutura da rede iônica.

## 5 Discussão

Para melhor compreensão dos resultados obtidos, a seguinte sessão de discussão foi apresentada de forma separada.

São inúmeras as conclusões que podem ser obtidas pelas análises das funções de distribuição radial e espacial dos sistemas estudados. Podemos avaliar a maneira a qual os solventes se aproximam dos aminoácidos estudados (cistina e cisteína) no início e no final da simulação, comparar a eficácia dos líquidos iônicos escolhidos: cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio e acetato de 1-butil-3-metilimidazólio e também como a rede iônica muda em cada sistema.

### 5.1 Funções de distribuição espacial

Nas figuras 25 e 45 temos a função de distribuição espacial dos líquidos iônicos ao redor dos dímeros (cistinas). Nessas imagens podemos perceber que a densidade de probabilidade para encontrar o solvente ao redor da proteína é maior longe da ligação dissulfeto, o que indica que o líquido iônico pode não ter a função de clivagem. Na literatura temos casos<sup>98</sup> onde, aliado ao uso do líquido iônico, temos a presença de um composto polar apto à quebra da ligação S-S, como é o caso do sulfito de sódio.

De forma genérica, temos que o Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> pode realizar a clivagem de ligações da seguinte maneira:



**Figura 55.** Clivagem de uma ligação dissulfeto realizada pelo sal sulfito de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>).

Em outros estudos<sup>99</sup> a mesma clivagem é realizada por um composto semelhante, o metabissulfito de sódio Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Podemos relacionar o R'S<sup>-</sup> resultante da clivagem da cistina com a cisteína (seu monômero). Como vemos nas figuras 15 e 35 representando a função de distribuição espacial dos líquidos iônicos ao redor da cadeia proteica da cisteína, diferentemente do caso da cistina, temos que o solvente encontra-se muito ao redor dos átomos de enxofre.

Em outros artigos temos que a solubilização da queratina da lã de ovelha pode ocorrer em duas etapas, a primeira sendo a quebra da ligação dissulfeto para a solubilização seguida da

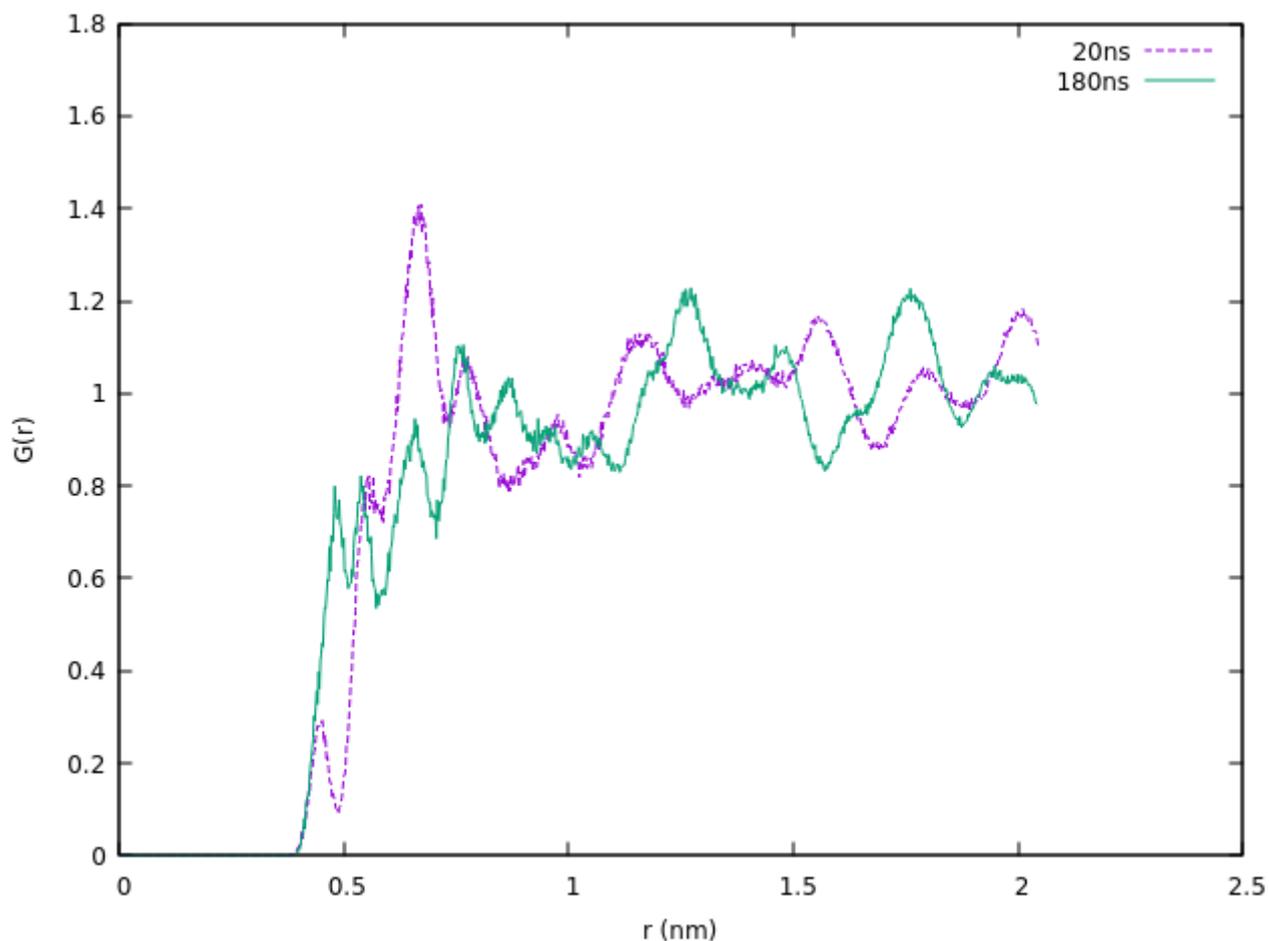
etapa de recuperação da queratina com álcool ou acetona. Essa recuperação acontece com a dimerização dos monômeros livres em solução.

Podemos relacionar as SDFs das cisteínas com a etapa de dimerização, indicando que os líquidos iônicos, como na etapa anterior, podem servir como um co-solvente.

## 5.2 Evolução temporal dos sistemas

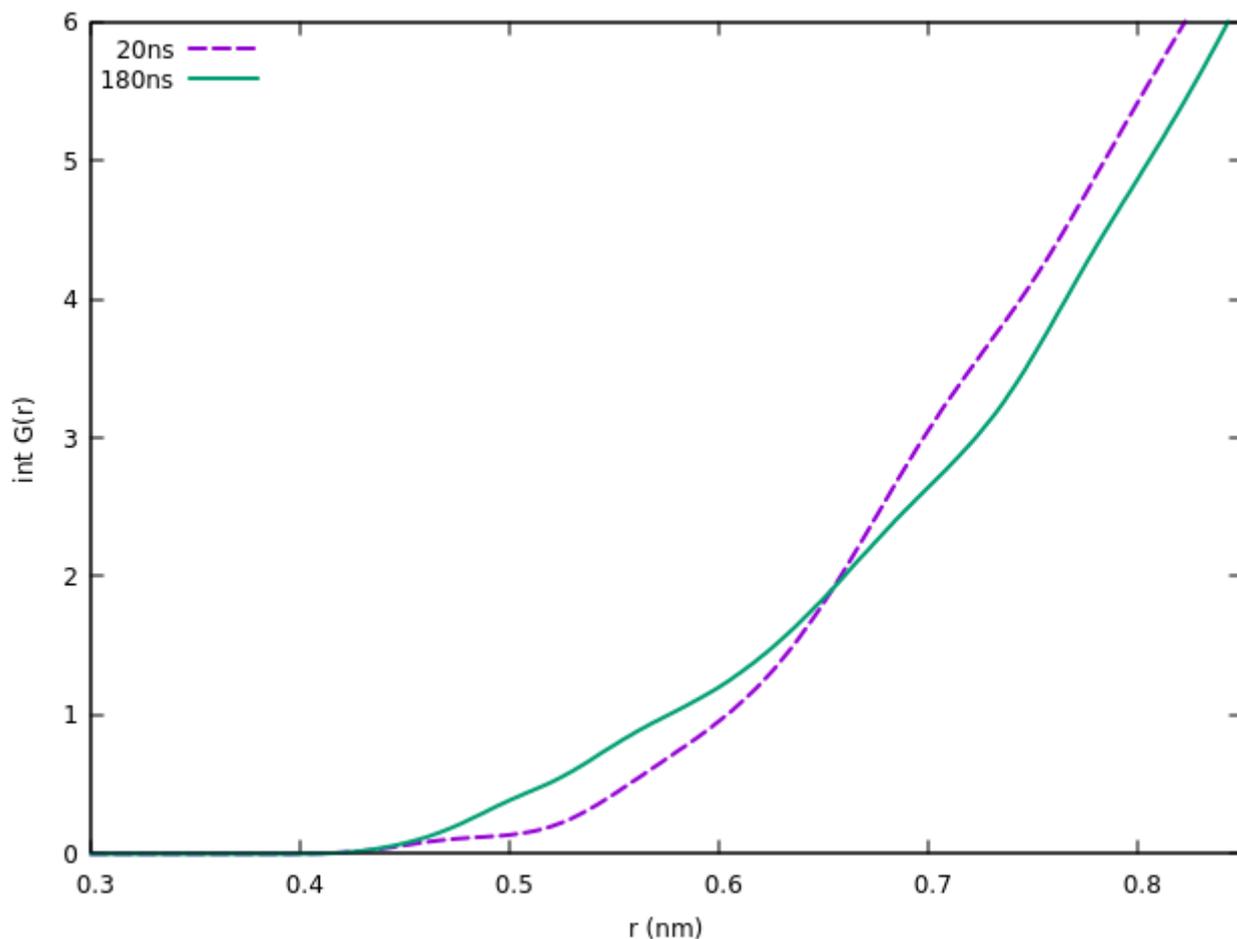
### 5.2.1 Evolução temporal do sistema A

Foram gerados gráficos combinando os sistemas do monômero com o líquido iônico baseado no ânion cloreto. Nessa análise foram realizadas as combinações dos gráficos de função de distribuição radial dos cátions com a proteína, dos ânions com a proteína e da água com o aminoácido, respectivamente.



**Figura 56.** Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o cátion  $[C_4mim]^+$  e a cisteína (Sistema A) em 20 ns e 180 ns.

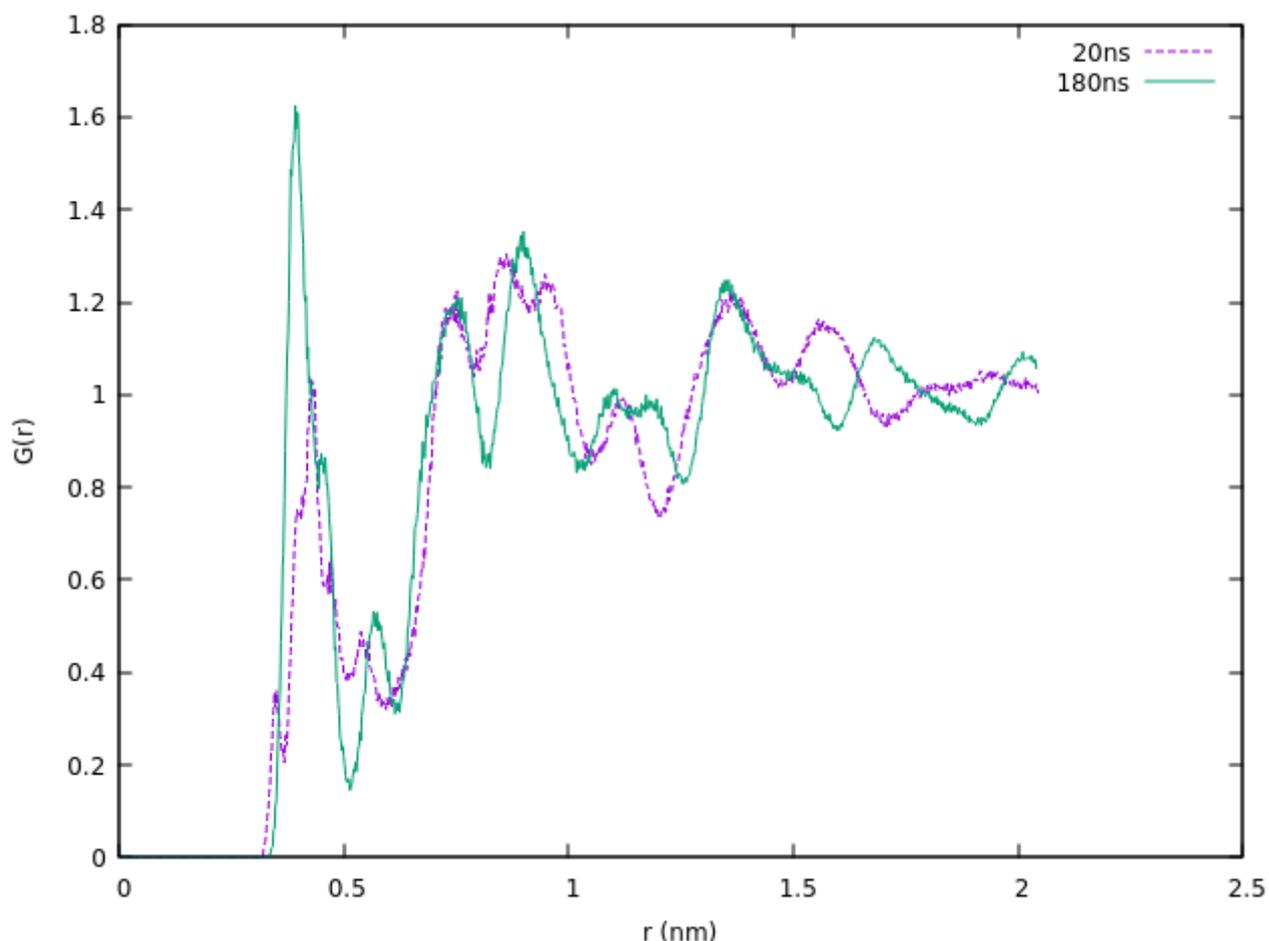
O gráfico acima representa as RDFs entre os cloretos e os centros de massa do monômero cisteína. Nos primeiros 20 ns de simulação temos uma área de repulsão em distâncias menores que de 0,6 nm, mesmo assim, se calcularmos a integral até a distância do primeiro pico relevante (0,67 nm) temos para 20ns o valor de 2,30 cátions ao redor do aminoácido e para 180 ns o valor de 2,17. Indicando que com o tempo, mesmo que de forma marginal, os cátions foram se afastando da cisteína.



**Figura 57.** Integral da sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o cátion  $[C_4mim]^+$  e a cisteína (Sistema A) em 20 ns e 180 ns.

O gráfico acima demonstra como as integrais das duas RDFs se comportaram em relação ao tempo de simulação e, como demonstrado anteriormente, temos uma repulsão em menores distâncias para o tempo inicial de 20 ns, mas ao alcançarmos os primeiros picos (0,67 nm) temos que há uma aproximação maior do cátion em um tempo menor de simulação.

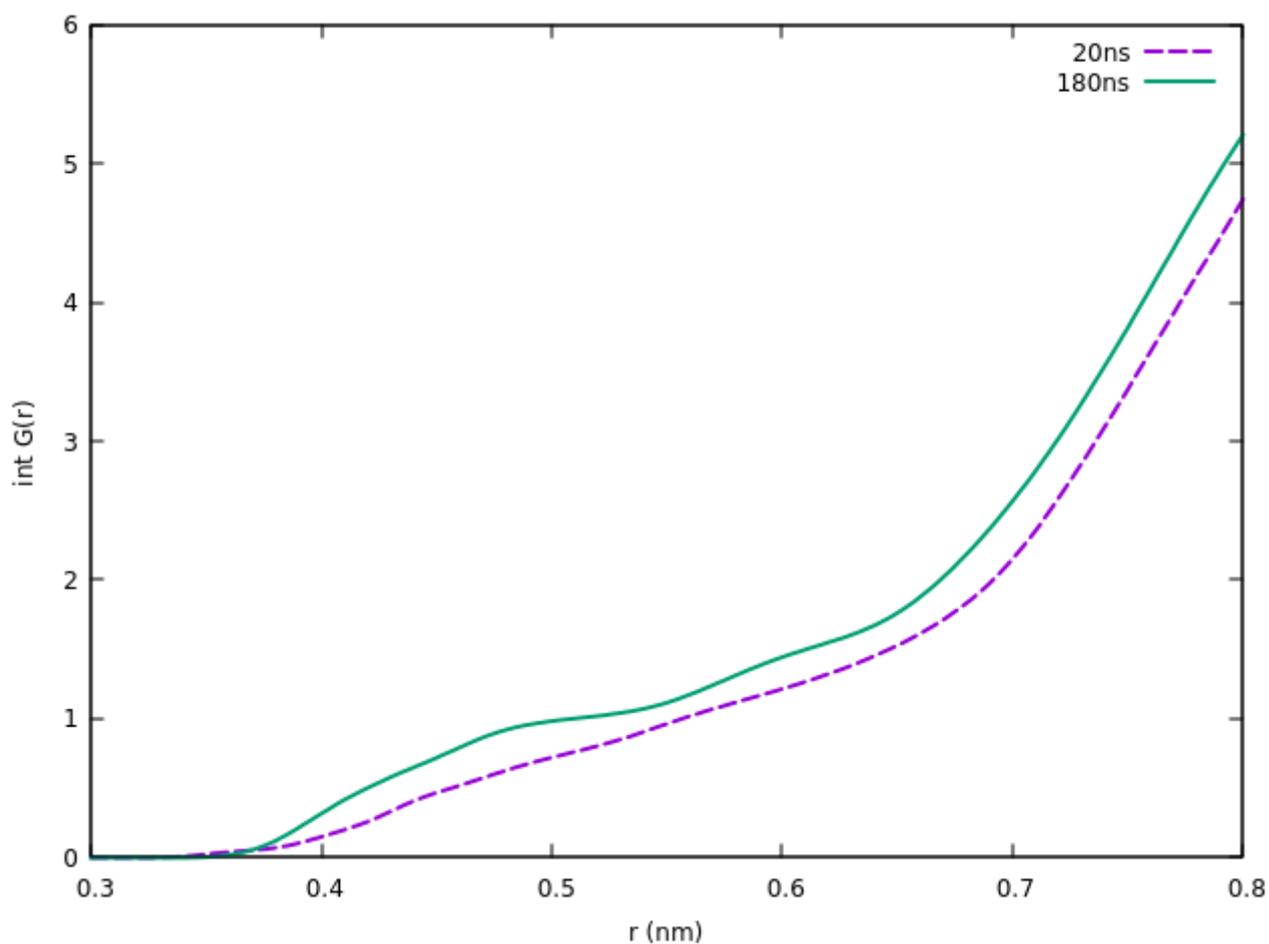
Abaixo temos o gráfico do ânion:



**Figura 58.** Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o ânion  $[Cl]^-$  e a cisteína (Sistema A) em 20 ns e 180 ns.

Diferentemente do caso anterior, há um aumento significativo no valor da  $G(r)$  em menores distâncias: em distâncias entre 0,41 nm e 0,43 nm temos os primeiros picos de atração, nos 20 ns iniciais de simulação (0,43 nm) temos um pico com valor de  $G(r)$  1,02 e com integral de 0,33. Já ao final da simulação temos numa distância semelhante (0,41 nm) um pico de  $G(r)$  de 1,62, indicando uma atração maior entre os pares com uma integral de 0,42. Se compararmos a integral da RDF nas duas situações temporais em uma distância de 0,67 nm, temos o valor de 1,71 para os 20 ns iniciais e 2,02 ao fim dos 180 ns.

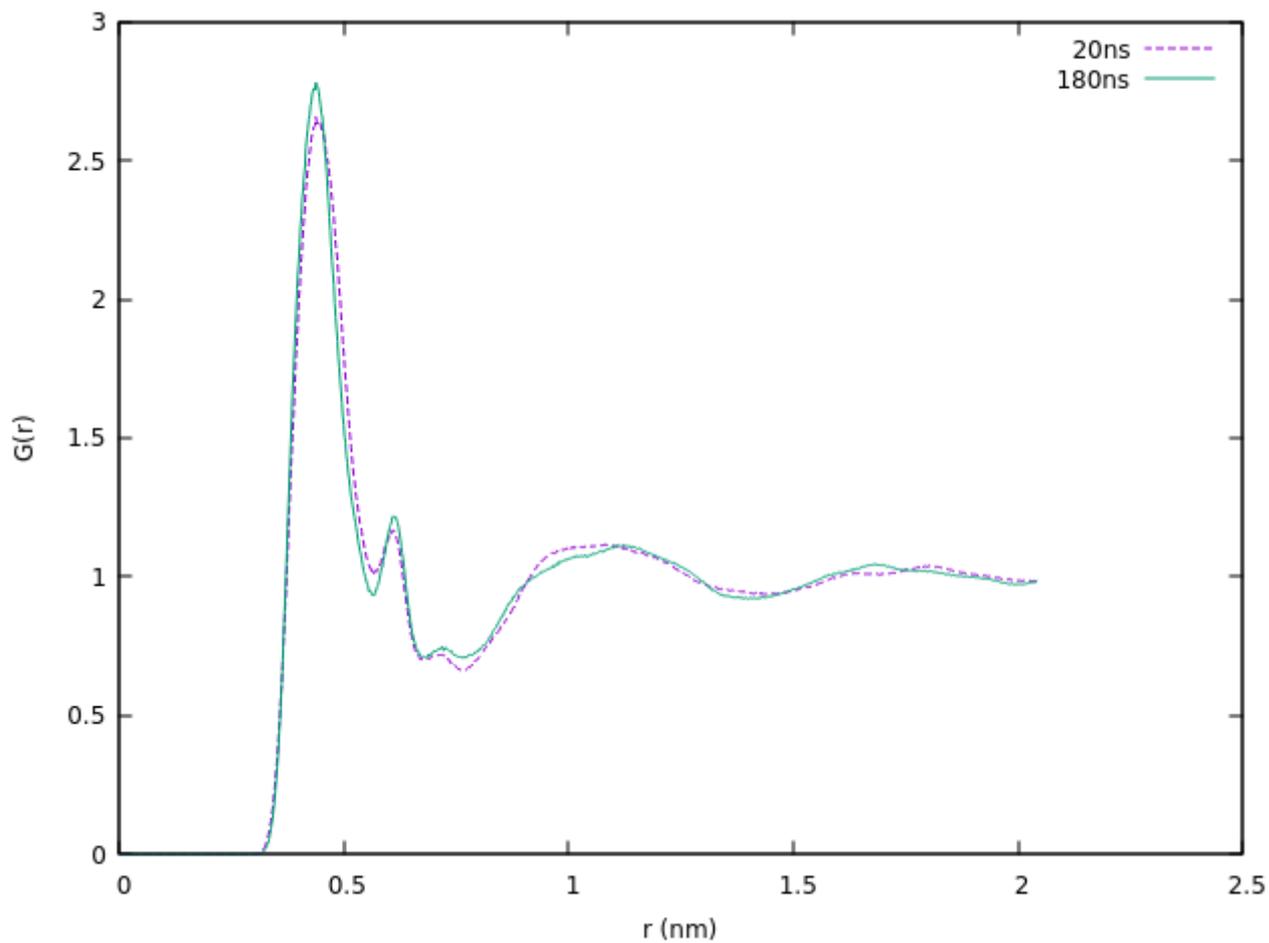
Isso indica que, para esse líquido iônico, houve uma aproximação muito relevante do ânion com o passar do tempo, indicada pela RDF. No gráfico abaixo temos a representação das integrais das RDFs entre o ânion e a cisteína nos tempos de 20 ns e 180 ns.



**Figura 59.** Integral da sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o ânion  $[Cl]^-$  e a cisteína (Sistema A) em 20 ns e 180 ns.

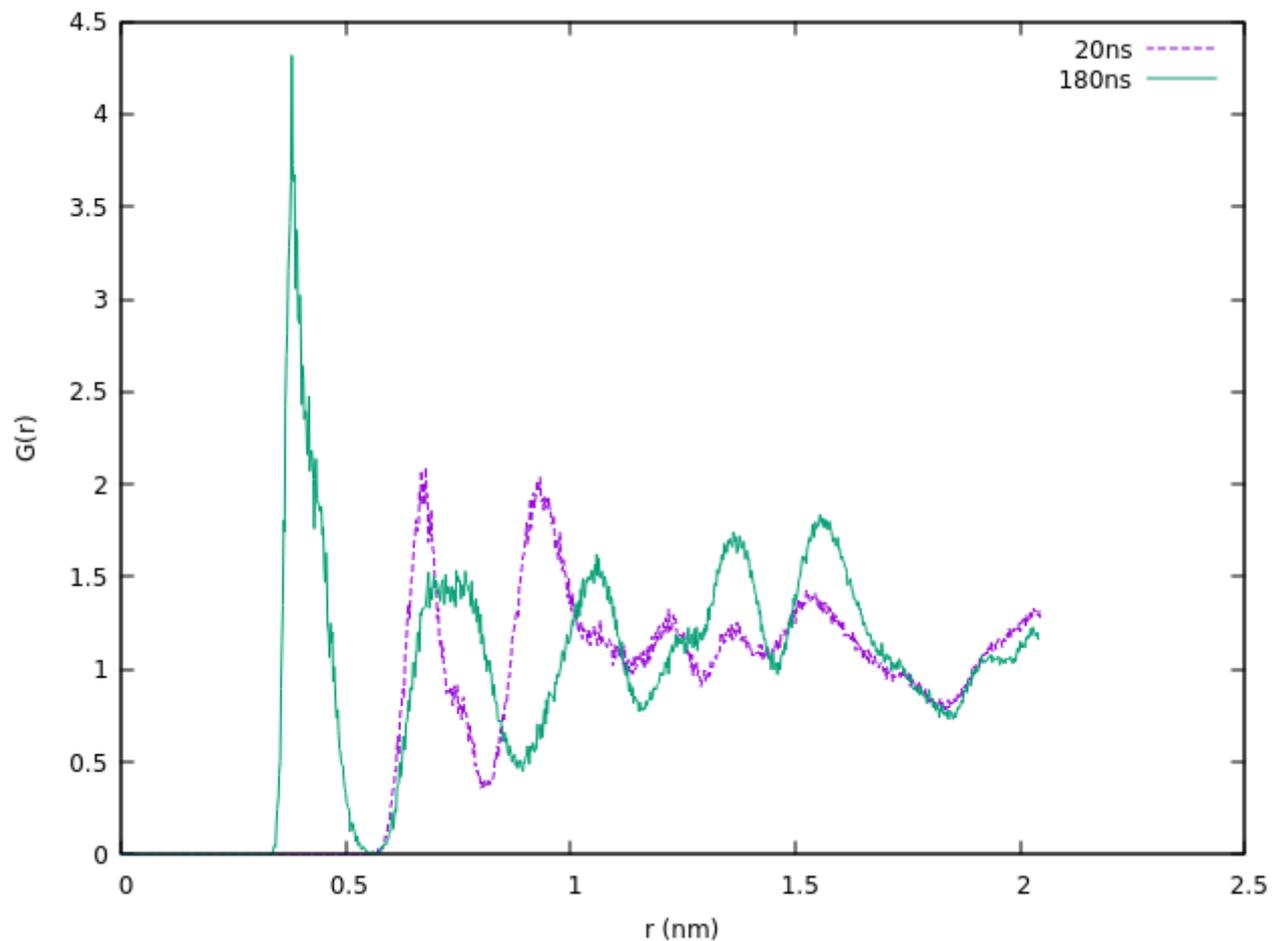
Como demonstrado pelas RDFs, as integrais demonstram que houve uma aproximação muito maior dos ânions com o passar da simulação.

Abaixo temos as RDFs entre os cátions e ânions do sistema, em relação ao tempo. Como comentado anteriormente, a evolução temporal do sistema não leva a mudanças significativas na rede iônica do líquido utilizado.



**Figura 60.** Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o ânion  $[\text{Cl}]^-$  e o cátion  $[\text{C}_4\text{mim}]^+$  (Sistema A) em 20 ns e 180 ns.

Foi também realizado o mesmo estudo para as RDFs da água do sistema A e foi obtido o seguinte gráfico:



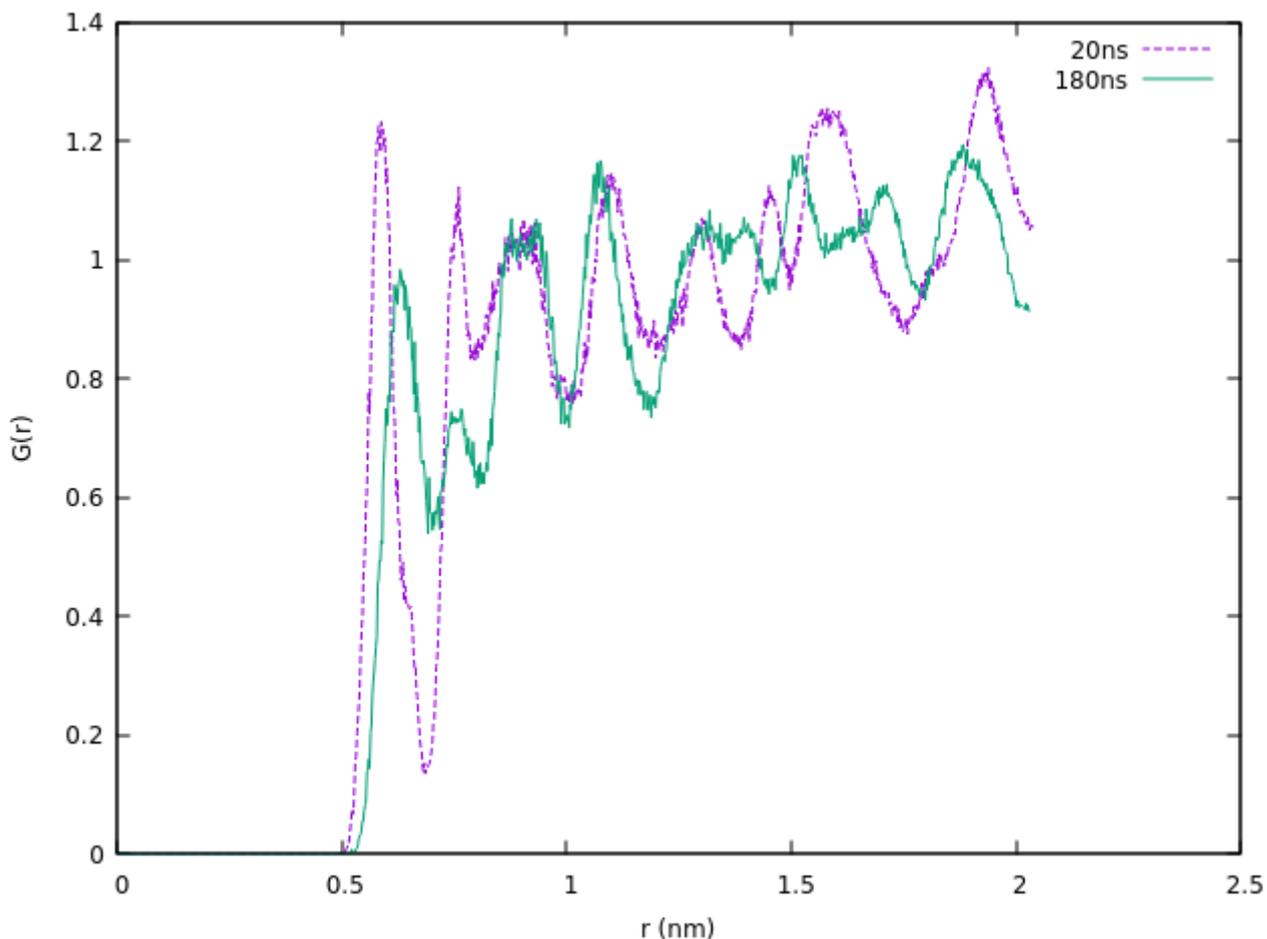
**Figura 61.** Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre a molécula de água e o aminoácido cisteína (Sistema A) em 20 ns e 180 ns.

Esse gráfico é relevante pois demonstra um acúmulo muito grande de água em relação ao tempo de simulação. Nos 20ns iniciais não temos água ao redor da proteína em distâncias menores do que 0,6 nm, já ao fim das simulações temos um pico de água em 0,41nm com uma  $G(r)$  de 4,31. Comparando as integrais em uma distância de 0,67, temos no caso inicial uma integral de 0,17, já no fim das simulações a integral dessa  $G(r)$  representa 0,35, indicando que a essa distância temos mais do que o dobro de água ao redor do aminoácido.

### 5.2.2 Evolução temporal do sistema B

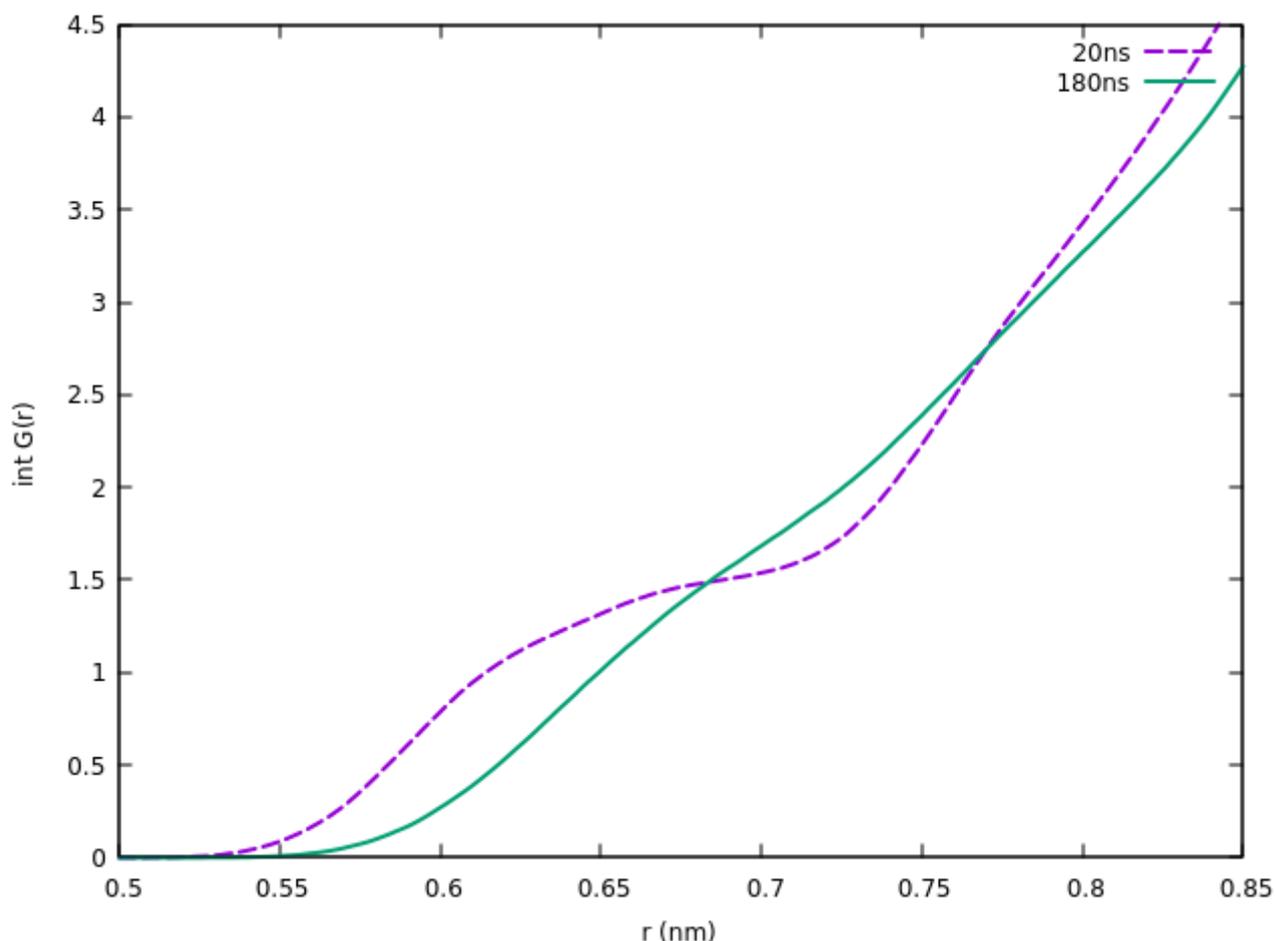
Já no sistema B temos o líquido iônico com o ânion cloreto na presença do dímero cistina. A primeira combinação de pares é entre os centros de massa do cátion e o centro de massa da cistina, e abaixo podemos ver o gráfico que representa a sobreposição dessas RDFs ao fim dos

primeiros 20 ns de simulação em comparação com os 20 ns finais (após tempo total de 180 ns).



**Figura 62.** Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o cátion  $[C_4mim]^+$  e a cistina (Sistema B) em 20 ns e 180 ns.

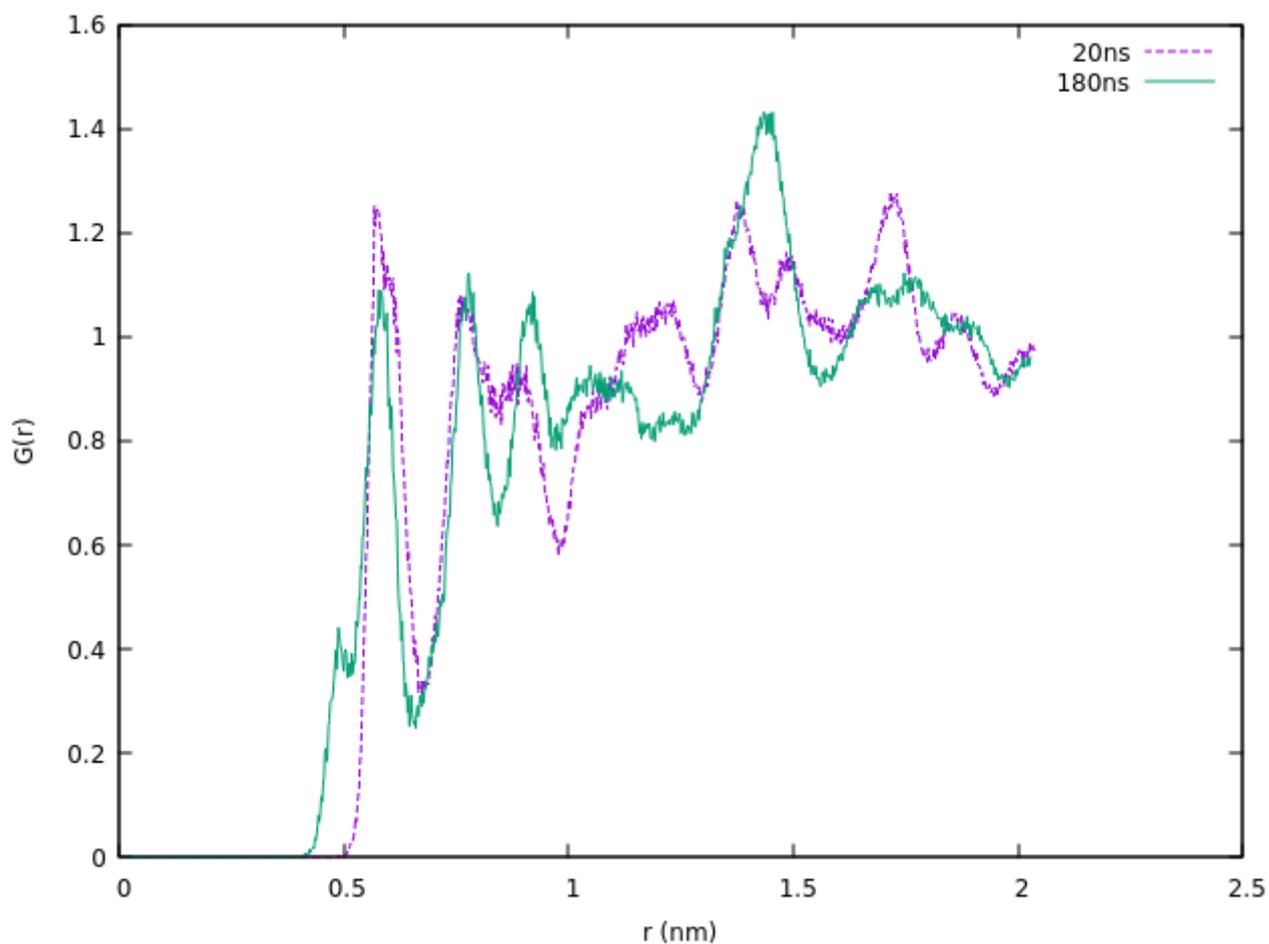
Como podemos ver na imagem, temos um pico mais pronunciado no início da simulação (em pontilhado) com valor de  $G(r)$  de 1,22 e se encontra em uma distância de 0,59 nm. Se fizermos a comparação das integrais até essa distância, temos que para os 20 ns iniciais a integral representa 0,61 cátions ao redor do aminoácido e ao fim da simulação até essa distância temos a presença de 0,39 cátions ao redor da cistina. Essa diminuição é significativa e é consistente com o que foi encontrado para o mesmo líquido iônico interagindo com a cisteína. Abaixo temos o gráfico que compara as integrais das RDFs no começo e no final das simulações:



**Figura 63.** Integral da sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o cátion  $[C_4mim]^+$  e a cistina (Sistema B) em 20 ns e 180 ns.

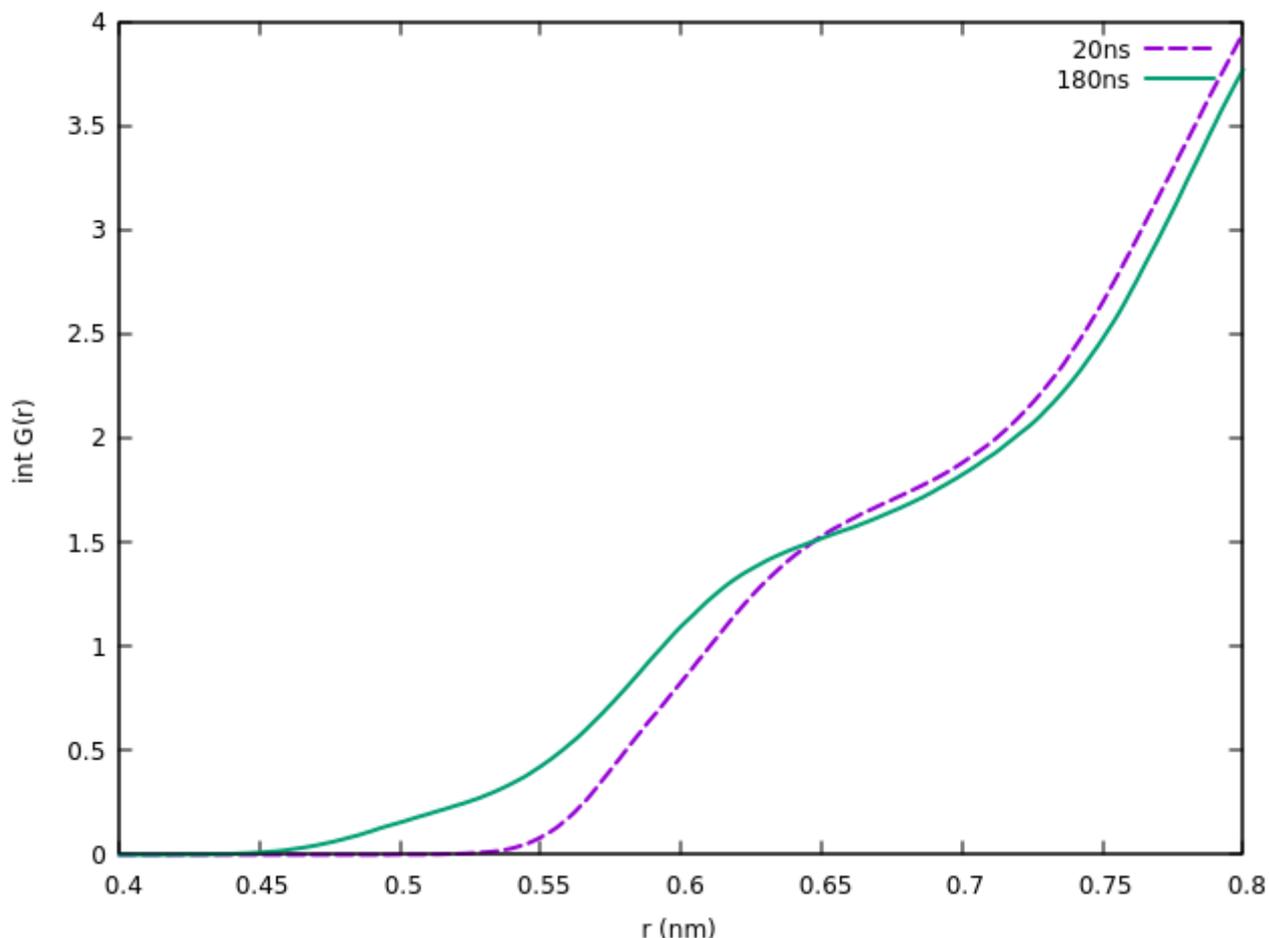
O gráfico acima demonstra como em distâncias menores as integrais dos 20 ns representam valores maiores, indicando que no início da simulação os cátions estavam mais próximos do centro de massa da proteína, e com o passar do tempo houve um afastamento desses cátions. Caso similar ao ocorrido com o monômero cisteína quando ocorreu a simulação com o mesmo líquido iônico.

No gráfico abaixo, podemos ver como interagem os cloretos em relação ao centro de massa do dímero. Se nos basearmos no comportamento dos ânions em relação ao monômero, teríamos um aumento significativo da quantidade de cloretos próximos ao aminoácido.



**Figura 64.** Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o ânion  $[Cl]^-$  e a cistina (Sistema B) em 20 ns e 180 ns.

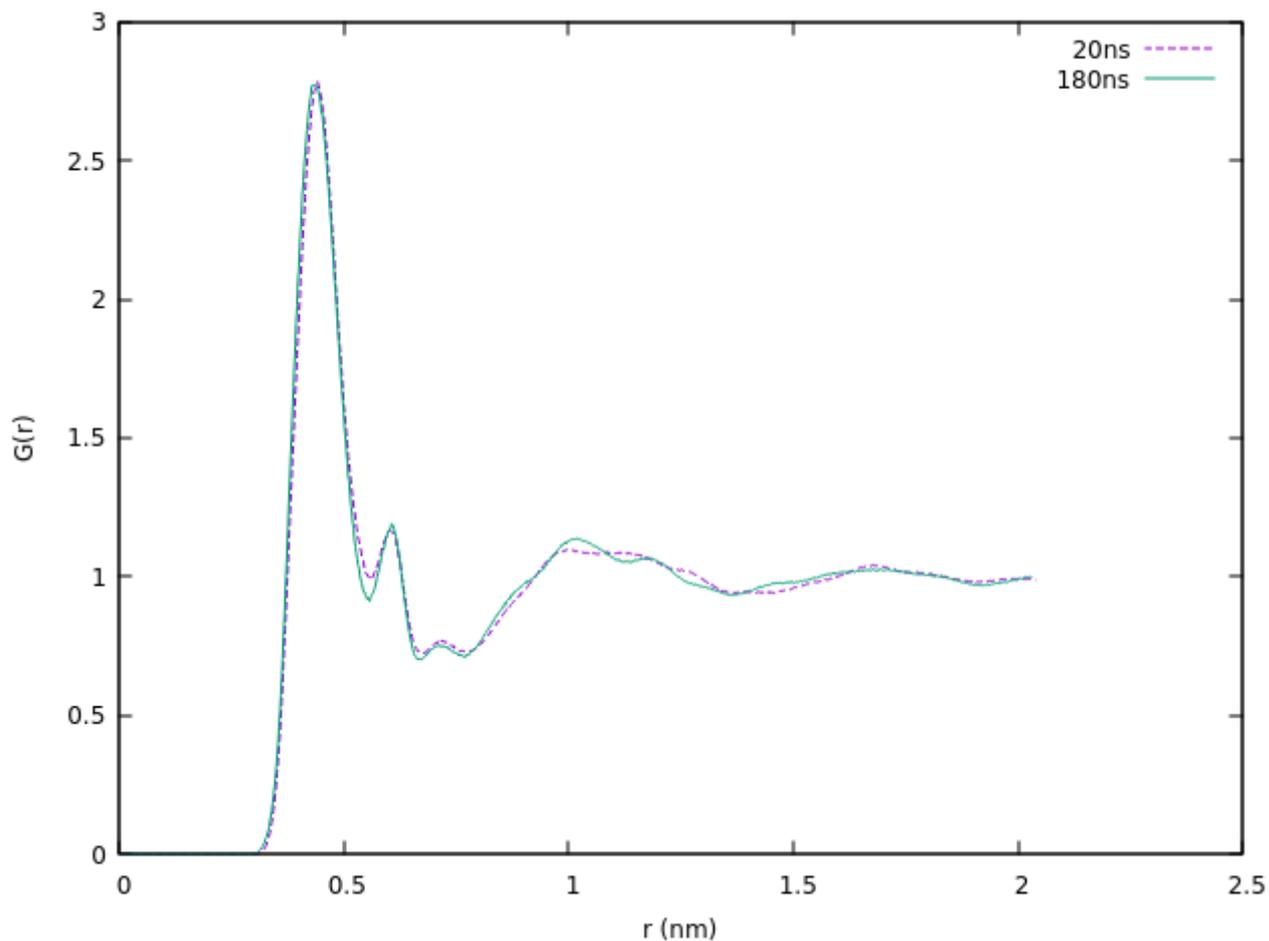
Como no caso do monômero, podemos observar uma aproximação dos ânions em relação ao aminoácido no decorrer do tempo de simulação. Se escolhermos a distância de 0,58 nm, podemos comparar as duas integrais. Em 20 ns, essa integral representa 0,49 ânions ao redor da cistina, já após 180 ns temos uma integral que representa 0,79 ânions ao redor do aminoácido. Um aumento significativo, indicando a aproximação das espécies carregadas negativamente com o centro de massa do dímero em questão (mesmo demonstrando um pico com  $G(r)$  inferior ao da simulação inicial). Abaixo temos a comparação das integrais em relação às distâncias para os primeiros 20 ns de simulação e os 180 ns finais:



**Figura 65.** Integral da sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o ânion  $[Cl]^-$  e a cistina (Sistema B) em 20 ns e 180 ns.

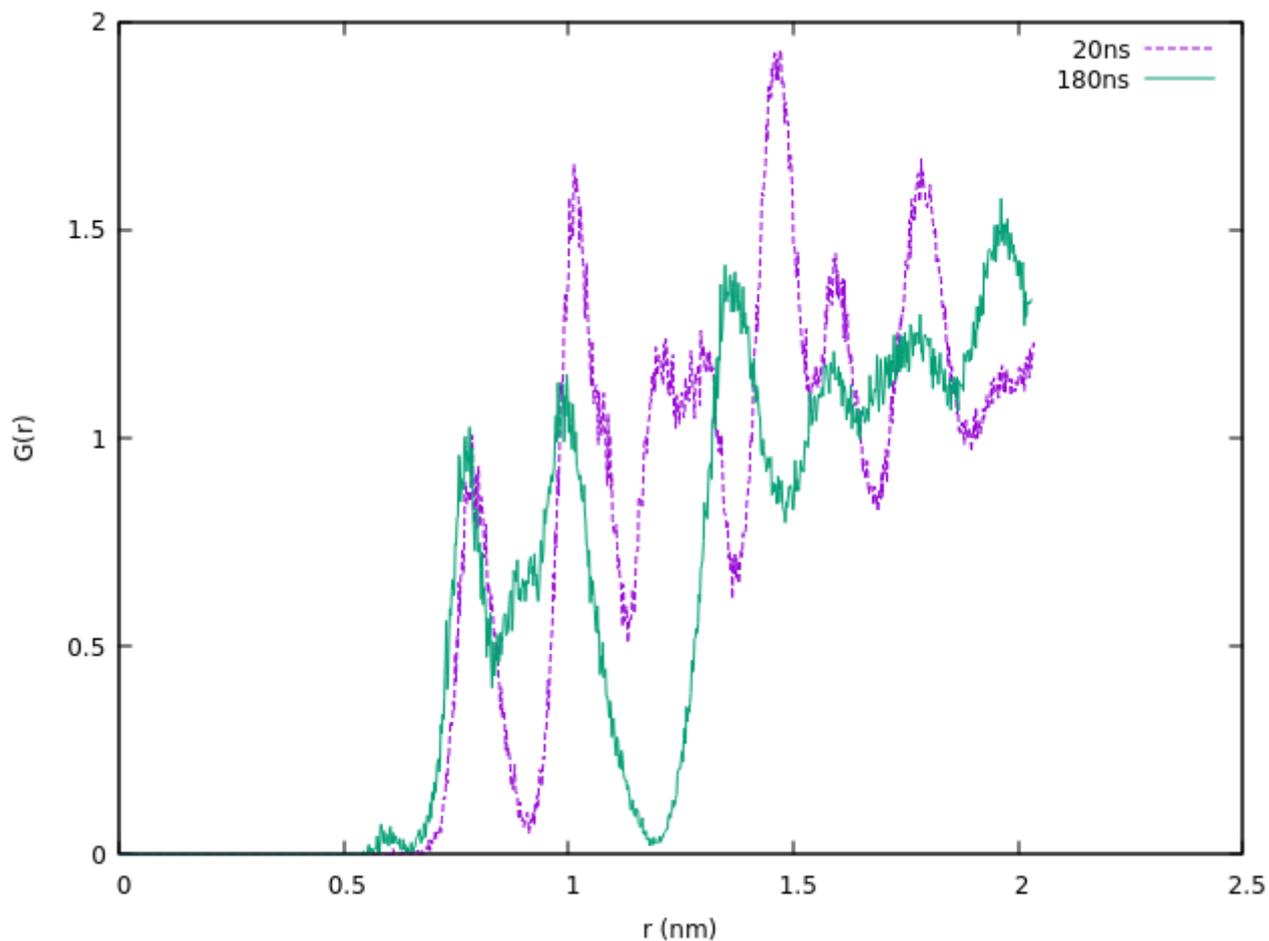
Podemos perceber pelas integrais que representam a quantidade de cloretos próximos ao aminoácido que, em pequenas distâncias, temos uma quantidade muito maior de ânions no fim das simulações, indicando a aproximação dessas espécies negativamente carregadas ao centro de massa da cisteína, como demonstrado anteriormente na sobreposição das  $G(r)$ .

Abaixo temos a sobreposição das funções de distribuição radial entre os cátions e os ânions do líquido iônico no sistema B. Como no sistema A, temos que o tempo de simulação não alterou a morfologia do líquido iônico, mantendo praticamente o mesmo gráfico com picos de intensidade semelhantes.



**Figura 66.** Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o ânion  $[\text{Cl}]^-$  e o cátion  $[\text{C}_4\text{mim}]^+$  (Sistema B) em 20 ns e 180 ns.

No gráfico abaixo temos como os centros de massa das moléculas de água interagem com os centros de massa das cistinas do sistema após os 20 ns de simulação inicial em relação aos 20 ns finais de simulação (180 ns). Diferentemente do caso do monômero, não temos uma aproximação tão grande das moléculas de água com o passar do tempo de simulação, temos o oposto, com os maiores picos de  $G(r)$  ocorrendo em diferentes distâncias, porém todos na simulação inicial (linha pontilhada).

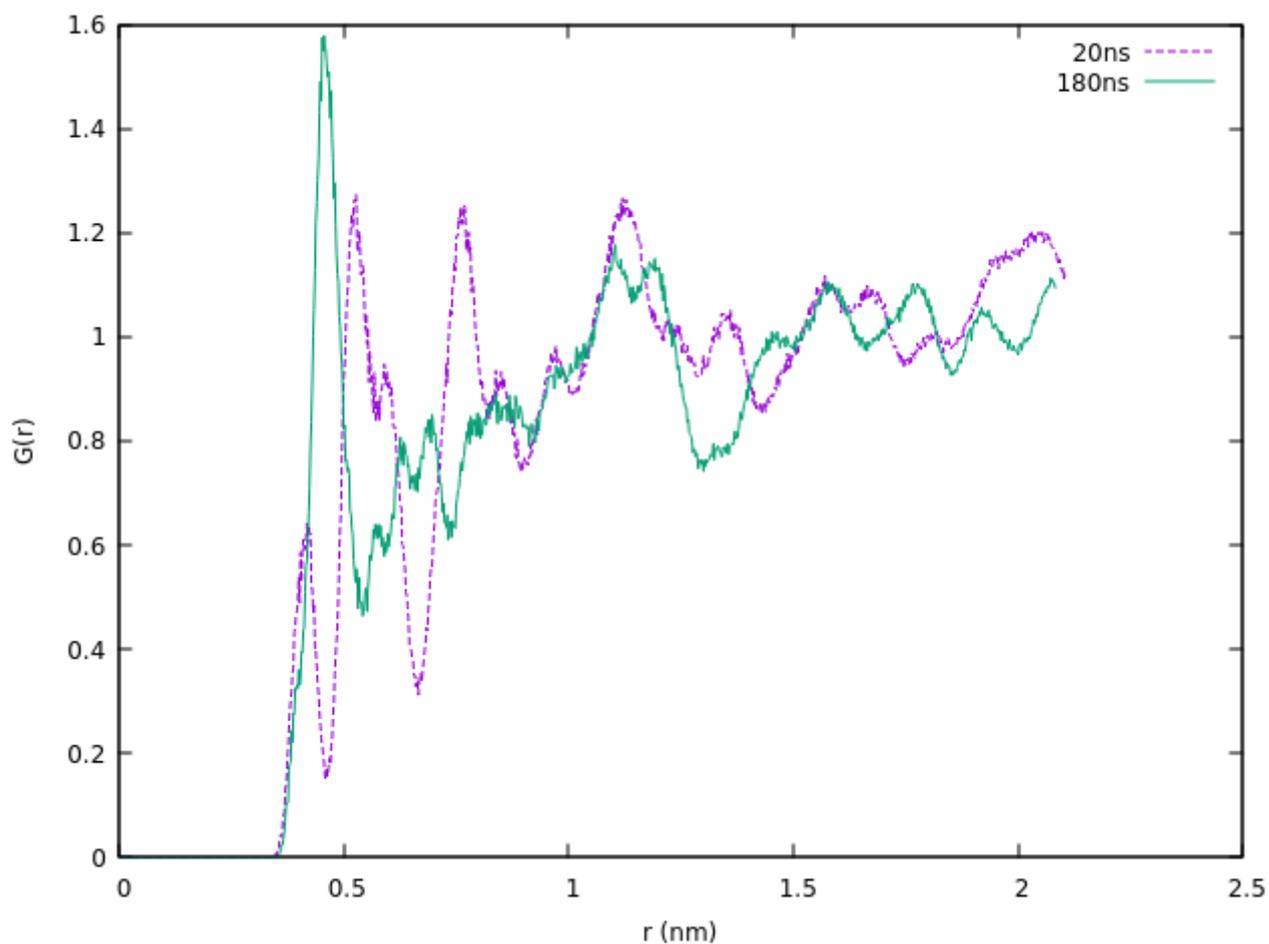


**Figura 67.** Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre a molécula de água e o aminoácido cistina (Sistema B) em 20 ns e 180 ns.

### 5.2.3 Evolução temporal do sistema C

Foram realizadas as comparações entre as funções de distribuição radial do sistema envolvendo o monômero cisteína com o líquido iônico que possui o ânion acetato. Foram comparadas as RDFs no começo e no final das simulações, ou seja, após 20 ns de simulação e após 180 ns.

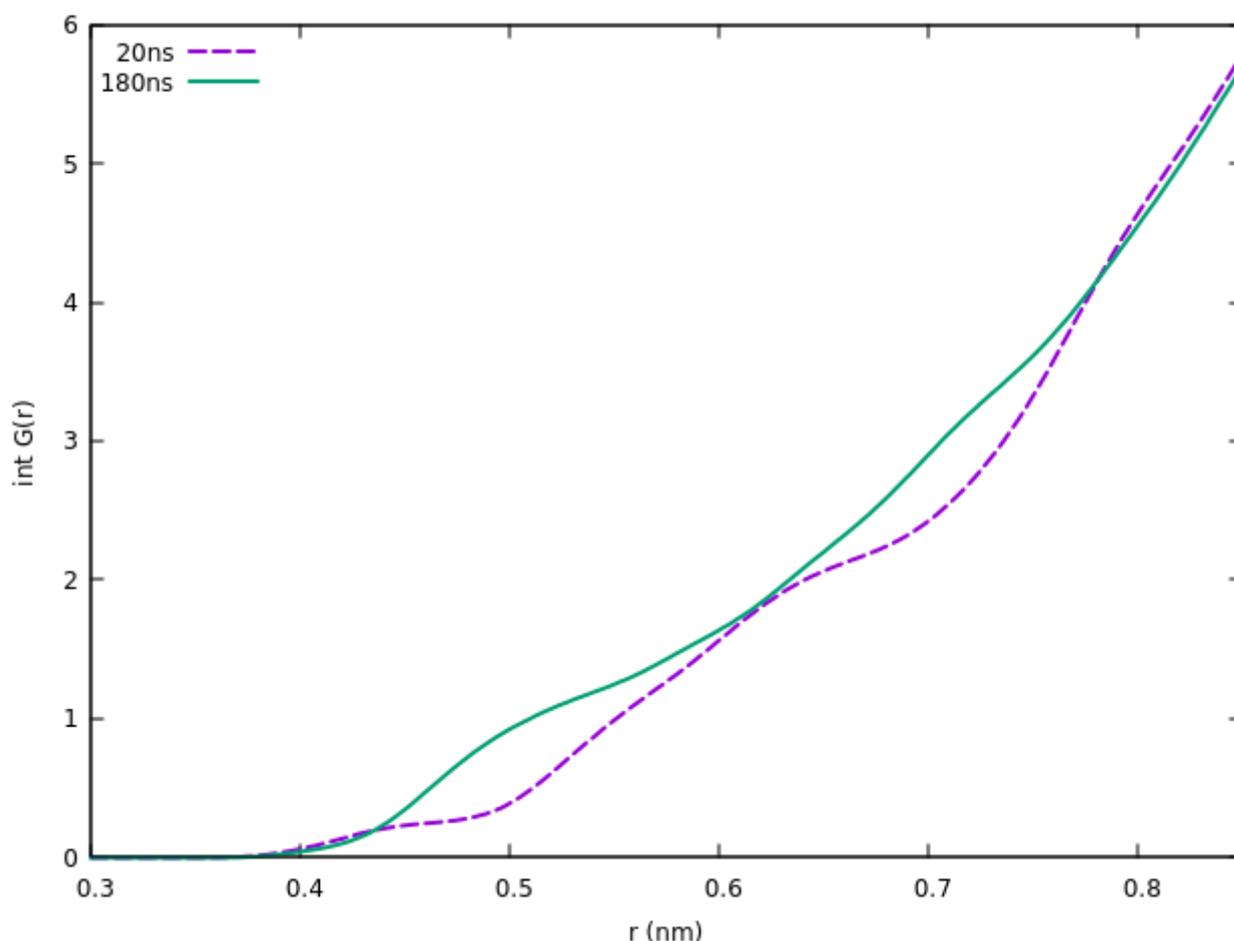
Primeiramente foram sobrepostos os gráficos da RDF, a qual temos o par dos cátions  $[C_4mim]^+$  ao redor dos aminoácidos.



**Figura 68.** Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o cátion  $[C_4mim]^+$  e a cisteína (Sistema C) em 20 ns e 180 ns.

No gráfico acima, podemos ver a presença de um pico muito pronunciado na linha sólida, que representa o sistema após os 180 ns de simulação. No gráfico dos primeiros 20 ns temos um pico consideravelmente menor em uma distância de 0,53 nm. A integral até os 0,53 nm para os 20 ns iniciais foi de 0,74 e para a simulação após 180 ns foi de 1,14. Esse aumento é significativo e demonstra que em pequenas distâncias houve uma aproximação muito grande dos cátions ao redor do centro de massa dos monômeros estudados.

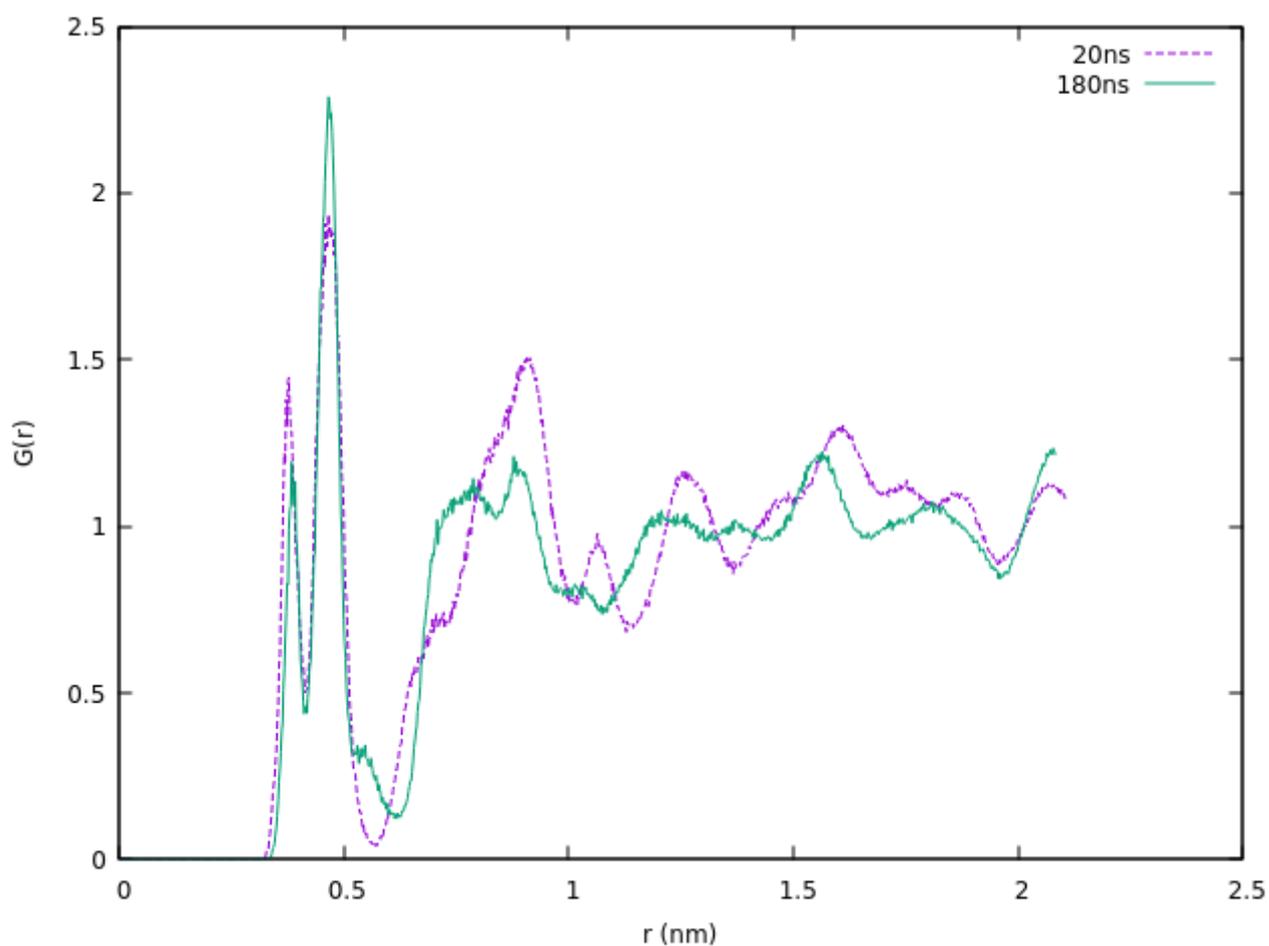
Esse resultado é muito diferente do encontrado no sistema A, onde houve uma pequena diminuição nessa integral com o passar do tempo de simulação. Abaixo temos um gráfico onde são comparadas as integrais dessa RDF em relação ao tempo de simulação:



**Figura 69.** Integral da sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o cátion  $[C_4mim]^+$  e a cisteína (Sistema C) em 20 ns e 180 ns.

Como discutido anteriormente, podemos ver uma integral consideravelmente maior em distâncias menores para a simulação em seu tempo final. Dessa forma, temos uma aproximação dos cátions ao redor da cisteína.

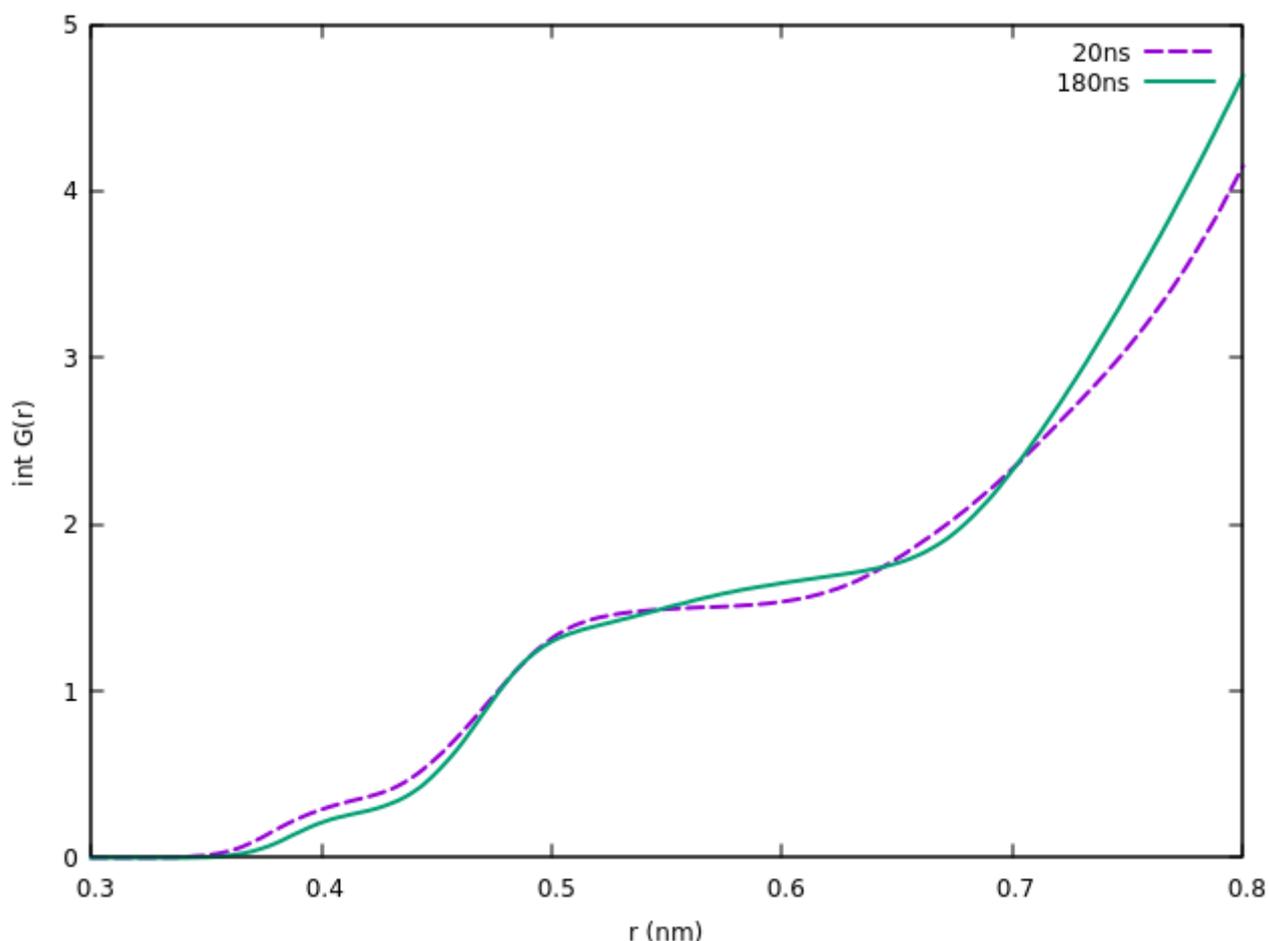
Além da análise das RDFs entre cátions e monômeros do sistema, foi também realizada a sobreposição entre as RDFs dos ânions e dos monômeros nos tempos de 20 ns e 180 ns. Abaixo temos o gráfico que representa essa sobreposição:



**Figura 70.** Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o ânion  $[\text{Acet}]^-$  e a cisteína (Sistema C) em 20 ns e 180 ns.

Nessa sobreposição temos um perfil de picos muito semelhante no início e no final das simulações. Em ambos os casos vemos um pico principal em uma distância de 0,57 nm, e calculando temos que no tempo inicial a integral representa 1,39 pares ao redor do substrato, e no tempo final temos um aumento, com 1,57. Esse aumento é menos significativo do que o encontrado no sistema A (líquido iônico com ânion cloreto).

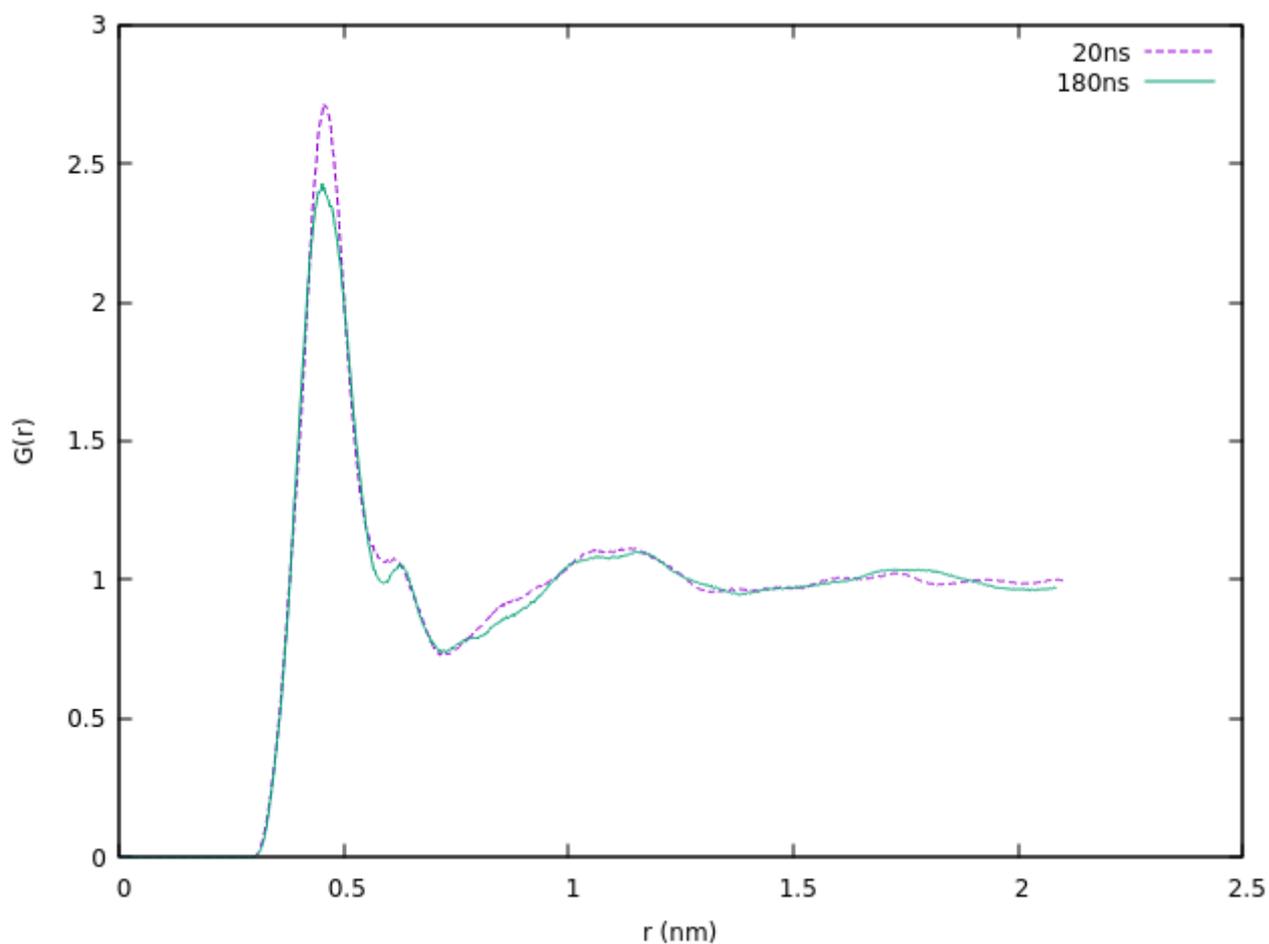
Abaixo, como feito anteriormente, temos o gráfico da sobreposição das integrais da  $G(x)$  entre os ânions e aminoácidos do sistema C:



**Figura 71.** Integral da sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o ânion  $[\text{Acet}]^-$  e a cisteína (Sistema C) em 20 ns e 180 ns.

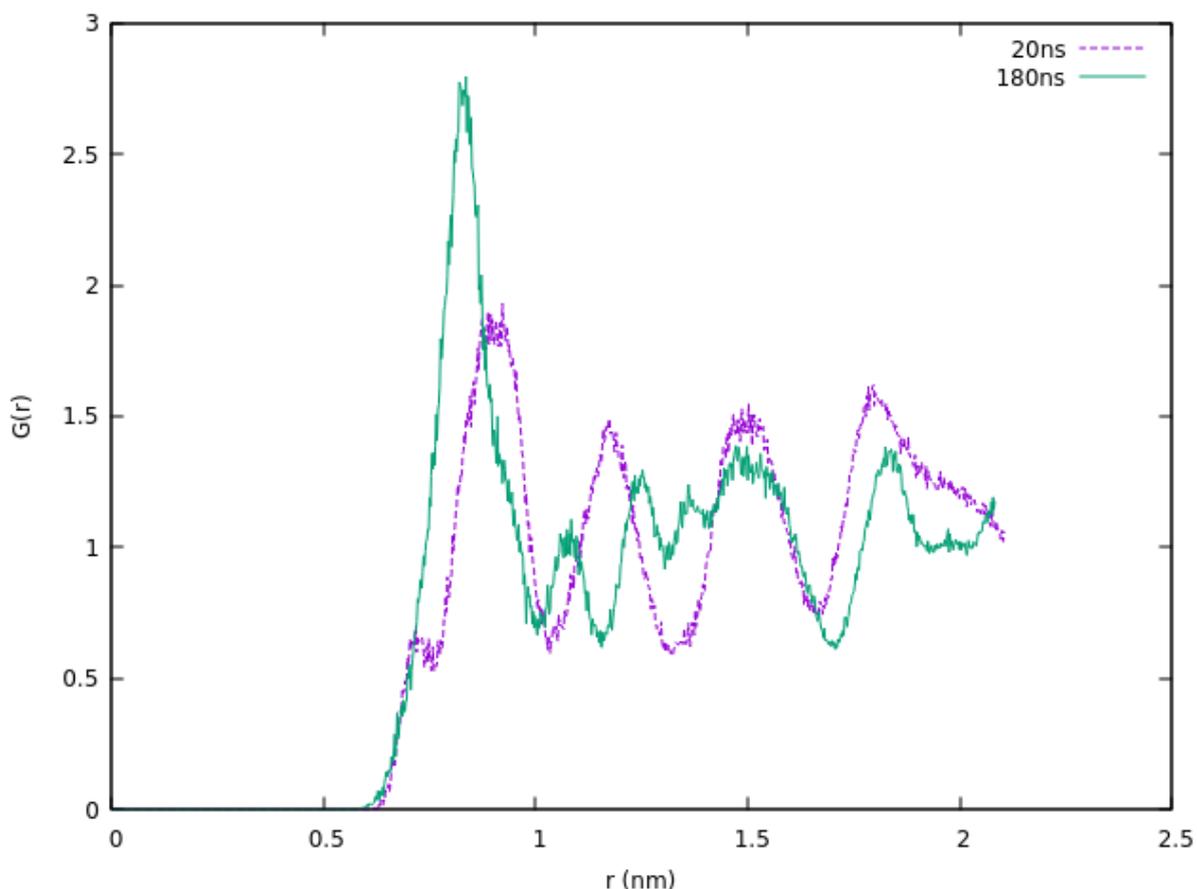
Diferentemente do caso do cátion, não conseguimos ver um grande padrão de aproximação. Temos áreas onde a integral predominante é a de 20 ns em menores distâncias, que se alterna em uma predominância das integrais de 180 ns, até que em uma distância de cerca de 0,72 nm temos um aumento do módulo da integral para o tempo final de simulação.

Na imagem abaixo temos a sobreposição das  $G(r)$  dos ânions ao redor dos cátions do sistema C. Como na discussão e nos sistemas anteriores, a evolução temporal do sistema de 20 ns até 180 ns não muda a morfologia do líquido iônico. Temos nesse gráfico os picos na mesma posição, e no caso dos 20 ns temos uma intensidade um pouco maior da  $G(r)$ .



**Figura 72.** Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o ânion  $[\text{Acet}]^-$  e o cátion  $[\text{C}_4\text{mim}]^+$  (Sistema C) em 20 ns e 180 ns.

Finalmente, temos a sobreposição das  $G(r)$  que representam as moléculas de água ao redor do aminoácido. Nesse caso, como mostra a imagem abaixo, temos uma aproximação muito grande de moléculas de água com o passar do tempo em pequenas distâncias. Em distâncias próximas de 1,02 nm no gráfico de linha pontilhada (20 ns) temos um pico largo. Se compararmos as integrais de 20 ns e 180 ns nessa distância, temos 1,39 para 20 ns e 1,66 para 180 ns. Esse resultado demonstra que com o passar do tempo mais moléculas de água se aproximaram do aminoácido. Esse resultado é consistente com o encontrado no sistema A, onde houve o aumento dessa integral.

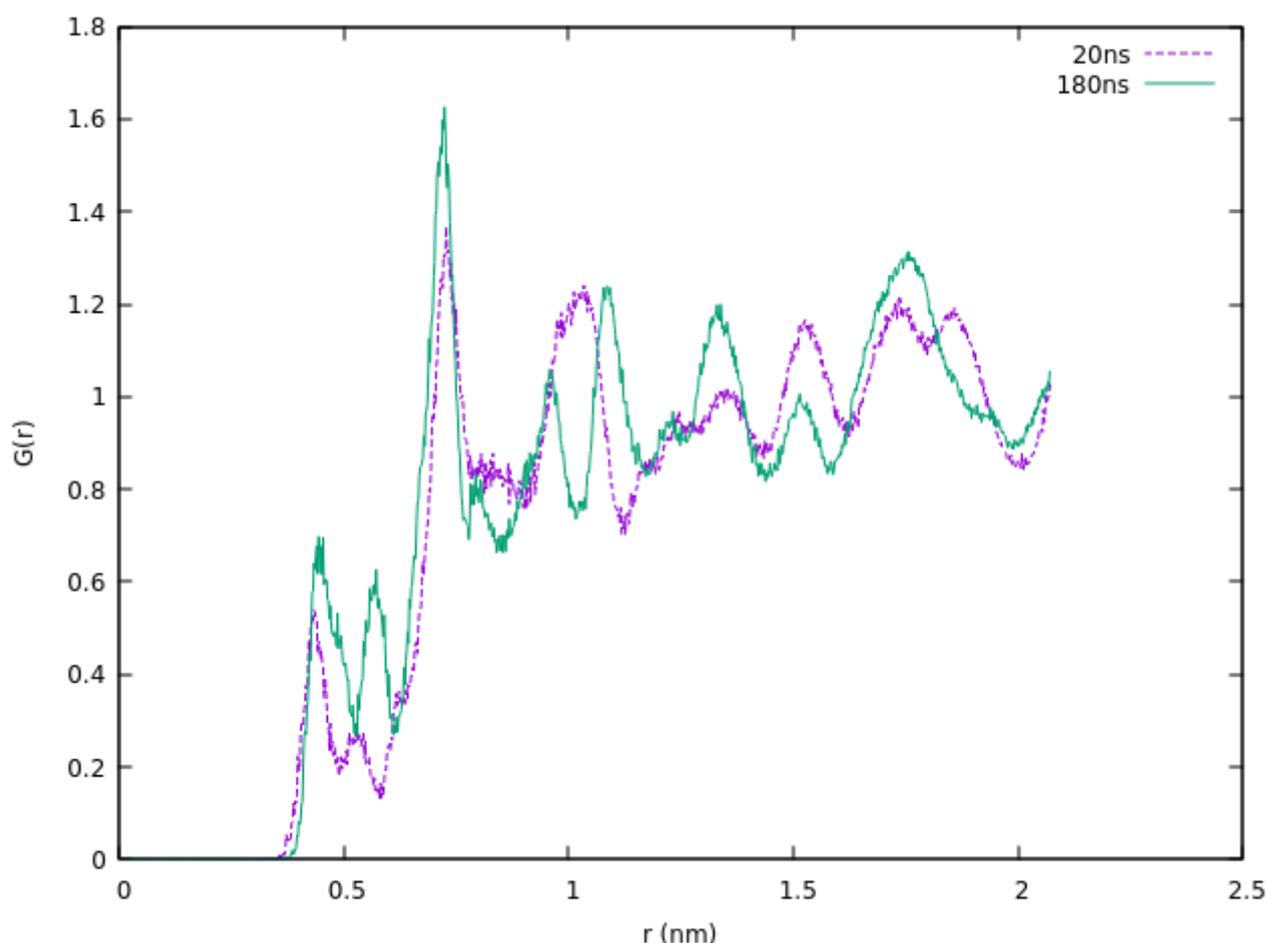


**Figura 73.** Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre a molécula de água e o aminoácido cisteína (Sistema C) em 20 ns e 180 ns.

#### 5.2.4 Evolução temporal do sistema D

Foram realizadas as comparações entre as funções de distribuição radial do sistema envolvendo o dímero cistina e o líquido iônico que possui o ânion acetato. Foram comparadas as RDFs no começo e no final das simulações, ou seja, após 20 ns de simulação e após 180 ns.

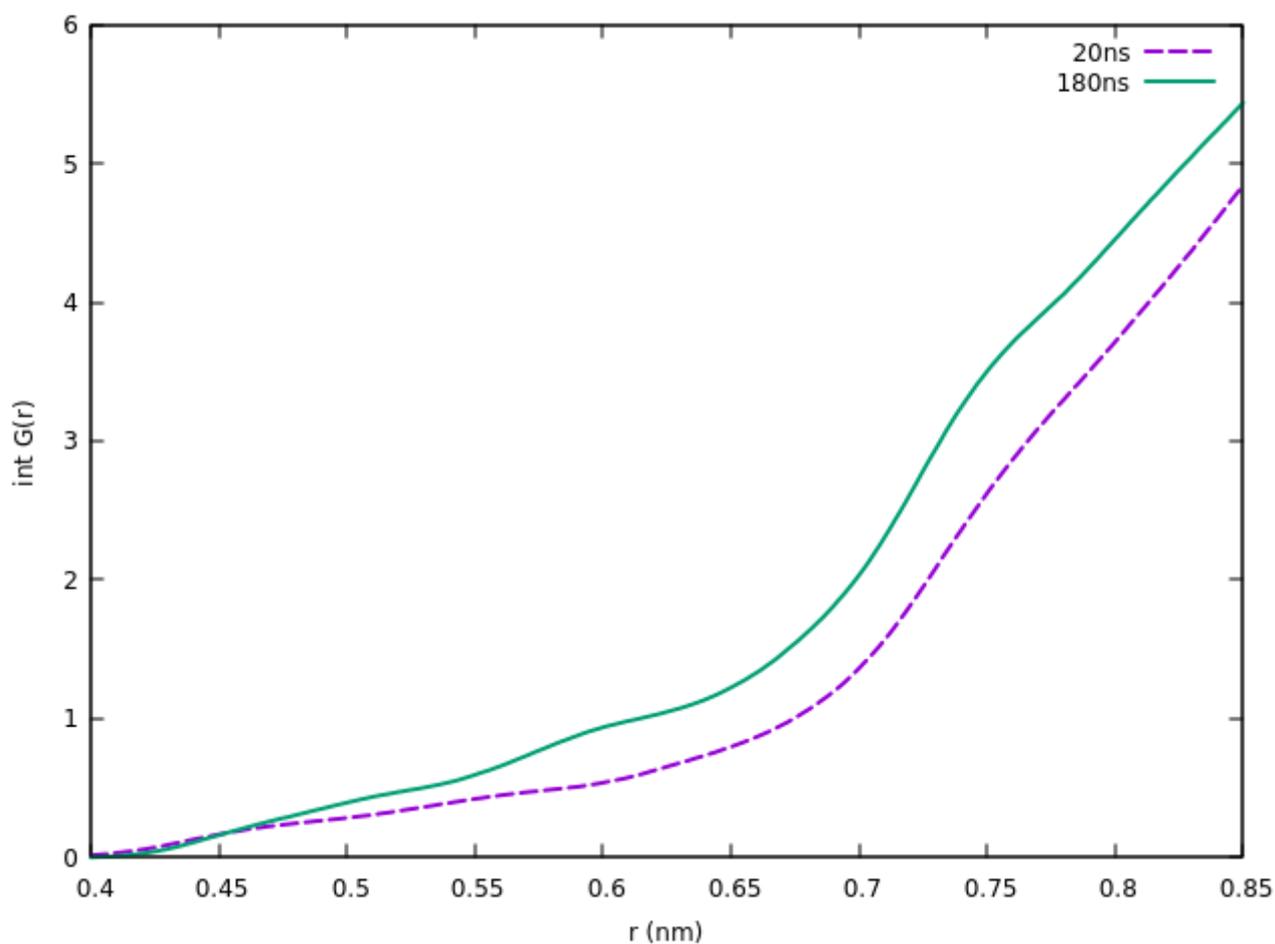
Primeiramente foram sobrepostos os gráficos da RDF, a qual temos o par dos cátions  $[C_4mim]^+$  ao redor dos aminoácidos:



**Figura 74.** Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o cátion  $[C_4mim]^+$  e a cistina (Sistema D) em 20 ns e 180 ns.

No gráfico acima percebe-se um aumento nos picos de RDF em relação ao tempo. Em uma distância de 0,72 temos um pico em comum entre os diferentes tempos (20 ns e 180 ns). O cálculo da integral até esse pico representou a presença de 1,81 pares do cátion ao redor da cistina após 20 ns de simulação. Ao fim dos 180 ns essa integral teve um valor de 2,94, indicando um aumento significativo de cátions ao redor da proteína, comportamento diferente do encontrado no sistema B, onde temos uma diminuição da quantidade de cátions no mesmo tipo de análise.

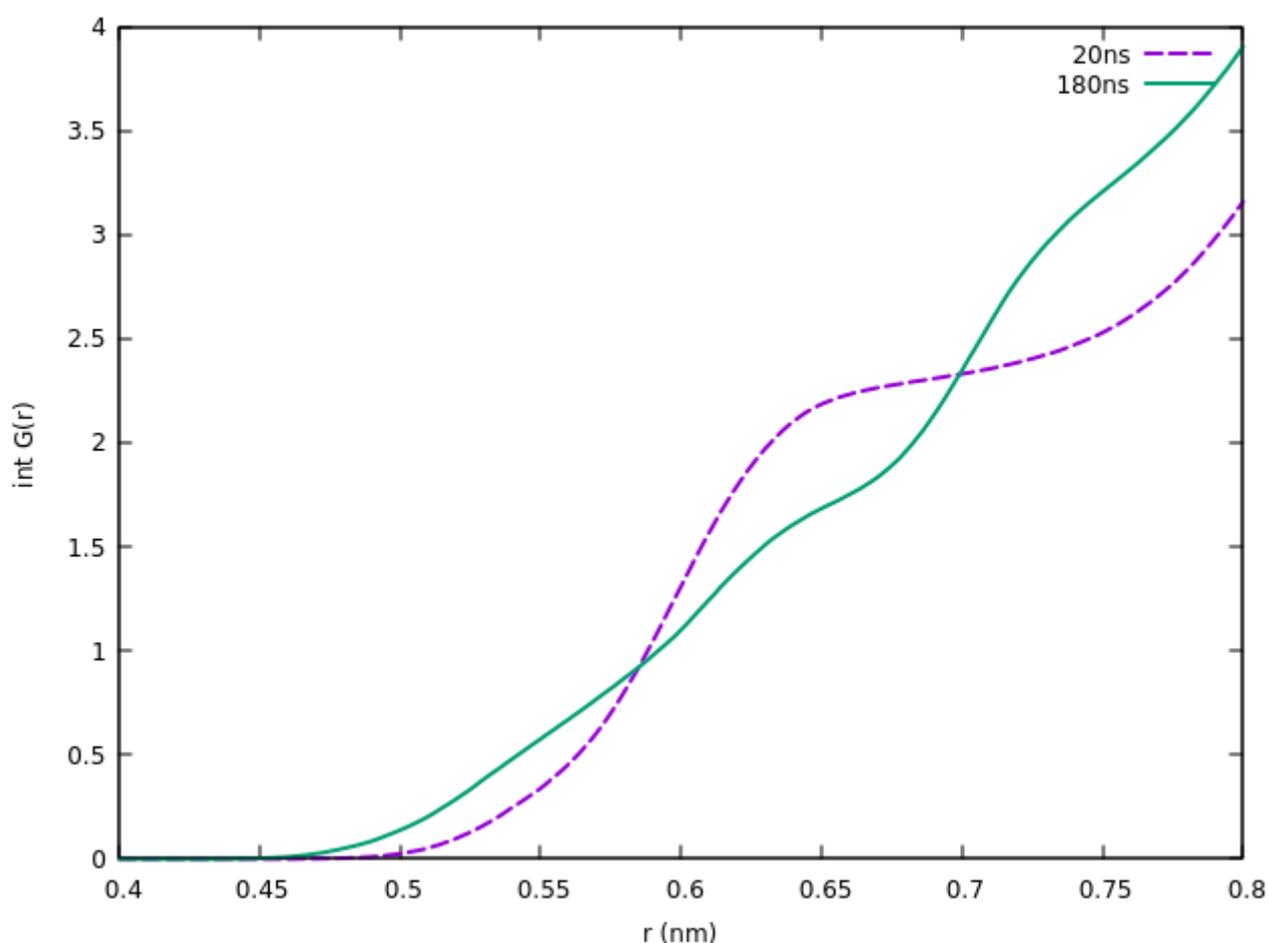
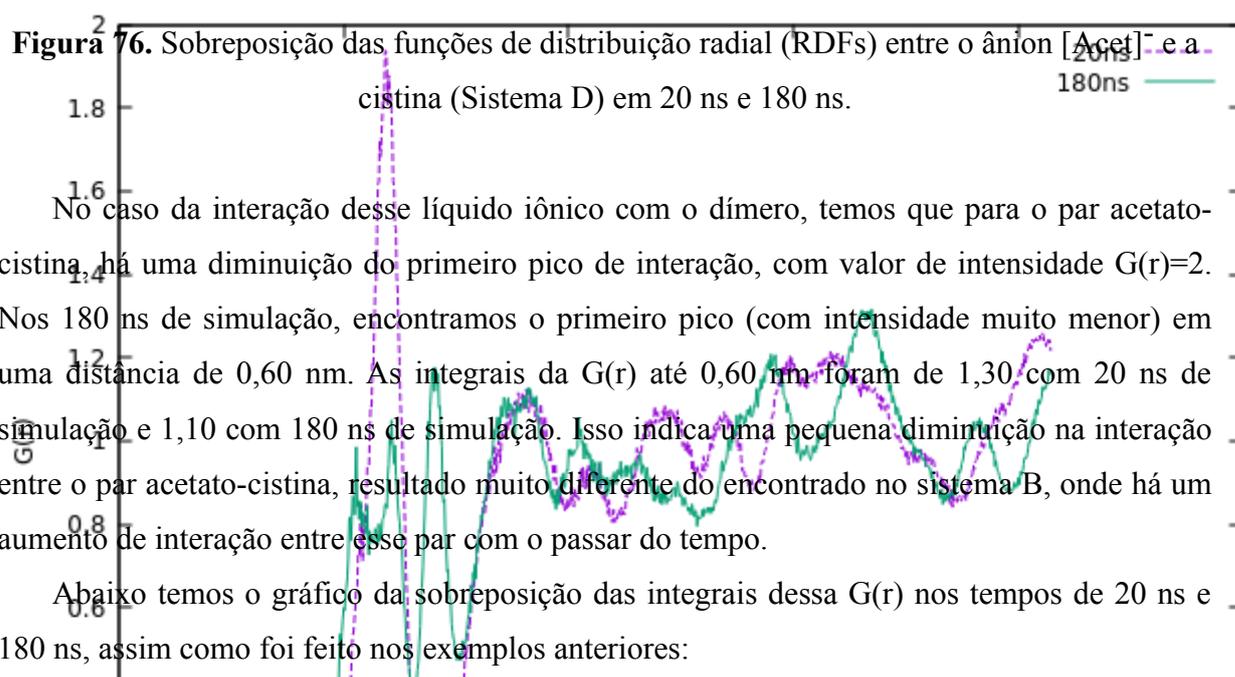
Abaixo temos um gráfico que demonstra a sobreposição das integrais de  $G(r)$  em diferentes distâncias para os tempos de 20 ns e 180 ns:



**Figura 75.** Integral da sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o cátion  $[C_4mim]^+$  e a cistina (Sistema D) em 20 ns e 180 ns.

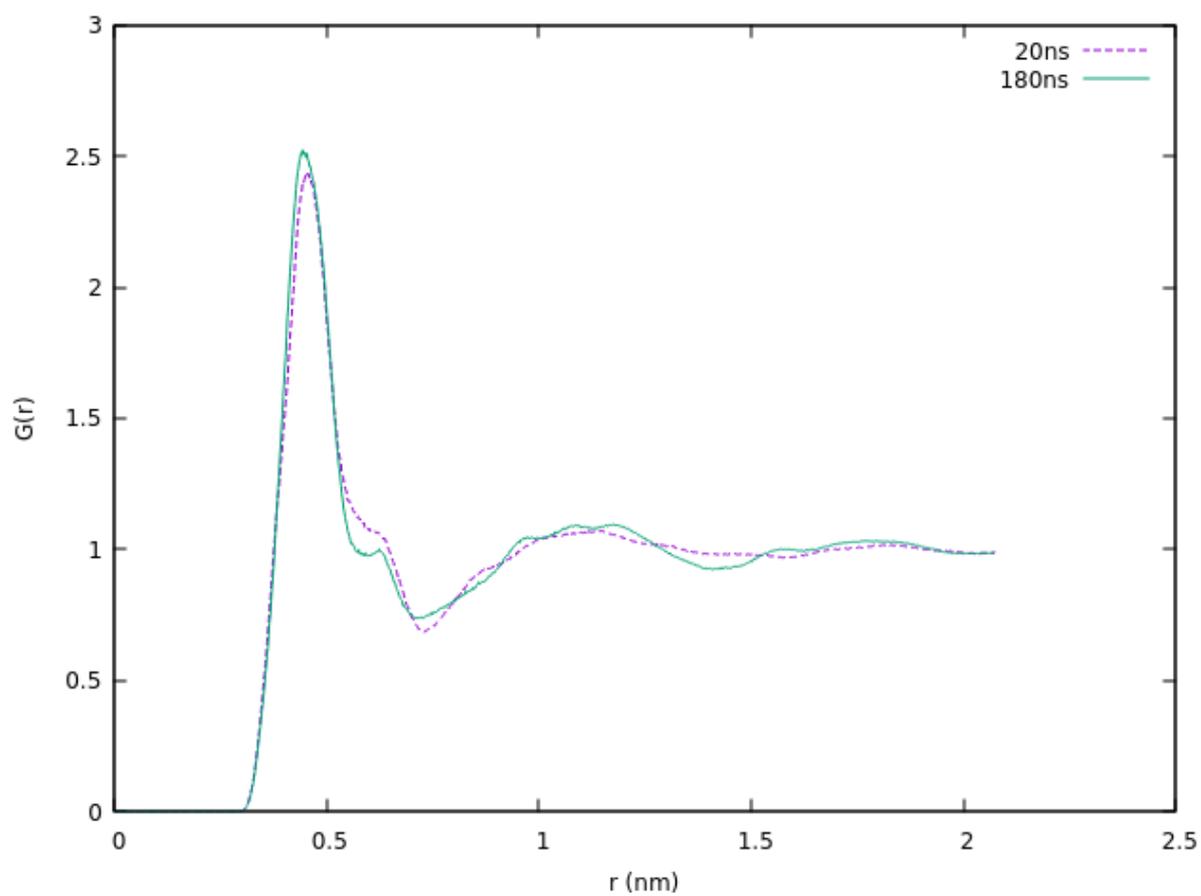
Como demonstrado na sobreposição das funções  $G(r)$  em diferentes tempos, temos um aumento da quantidade de cátions ao redor da cistina em praticamente em todas as distâncias inferiores a 0,85 nm, com o passar do tempo de simulação.

Foi realizada também a sobreposição das  $G(r)$  que representam o par do ânion acetato ao redor do dímero cistina em dois tempos de simulação distintos. Abaixo temos o gráfico que representa essa sobreposição:

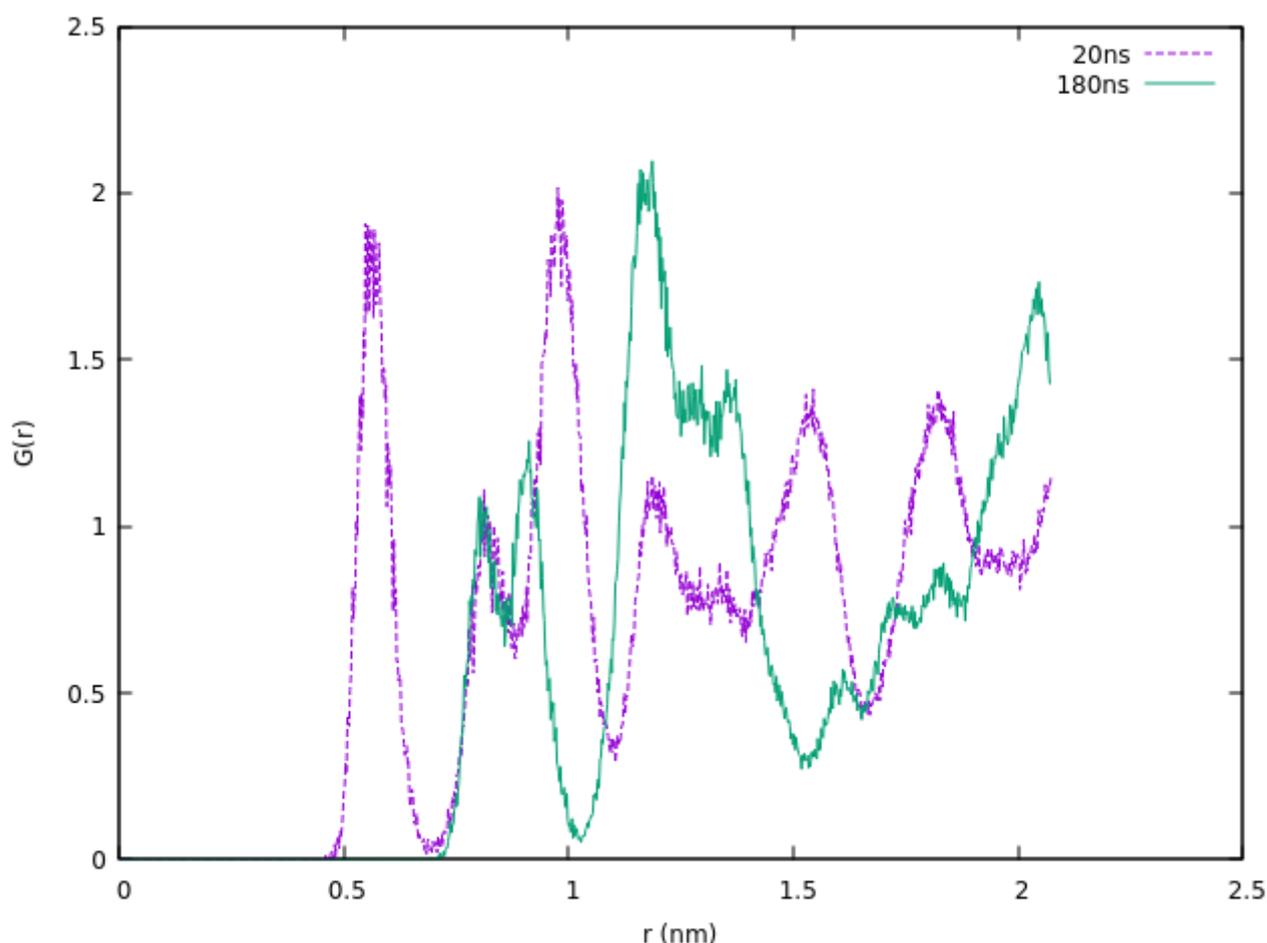


As integrais das RDFs nos tempos diferentes de simulação demonstram que, em até cerca de 0,57 nm, temos uma integral maior no final das simulações, e em distâncias maiores temos que a integral após 20 ns é maior até cerca de 0,70 nm. Após essa distância temos que as integrais têm módulos maiores em distâncias maiores após o fim das simulações. Esse perfil é diferente do encontrado entre o par cátion-aminoácido, onde em pequenas distâncias temos as maiores integrais no tempo final de simulação.

Como demonstrado nos sistemas anteriores, o par cátion-ânion mantém praticamente a mesma morfologia independente do tempo de simulação, e em 180 ns temos apenas um pequeno aumento na intensidade do pico nessa RDF. Abaixo temos o gráfico que representa a interação entre o par  $[C_4mim]^+ - [Acet]^-$  no sistema  $[C_4mim][Acet]$ , cistina e água:



**Figura 78.** Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre o ânion  $[\text{Acet}]^-$  e o cátion  $[\text{C4mim}]^+$  (Sistema D) em 20 ns e 180 ns.



**Figura 79.** Sobreposição das funções de distribuição radial (RDFs) entre a molécula de água e o aminoácido cistina (Sistema D) em 20 ns e 180 ns.

O gráfico acima demonstra um afastamento das moléculas de água em relação ao aminoácido cistina. O resultado encontrado é bastante diferente do sistema B, onde o líquido iônico é o  $[C_4mim][Cl]$  e há uma aproximação das moléculas de água em relação ao dímero. Para comparação, temos um pico de intensidade 1,85 nos 20 ns iniciais, já após os 180 ns não há presença de água nessa distância. Se compararmos as integrais nessa distância, temos 0,09 para os 20 ns iniciais e 0 após o fim das simulações. Foi também calculada a integral em uma distância de 0,98 nm, onde temos picos na RDF para os 180 ns de simulação. Nessa distância temos uma integral de 1,09 após 20 ns e para os 180 ns temos uma integral de 0,66, o que indica um afastamento das moléculas de água do sistema em relação ao tempo.

### 5.3 Comparação entre os sistemas

Como indicado anteriormente, foram concebidos quatro sistemas contendo os líquidos iônicos, moléculas de água e um aminoácido. Nos sistemas A e B temos o líquido iônico [C<sub>4</sub>mim][Cl], com o monômero cisteína no sistema A e com o dímero cistina no sistema B.

Nos sistemas C e D temos o líquido iônico [C<sub>4</sub>mim][Acet] com a cisteína no sistema C e com a cistina no sistema D.

A comparação foi realizada para os cátions, ânions e moléculas de água e sua interação com a proteína escolhida. Para essa comparação foram utilizados os dados de RDF e suas integrais, as interpretando como afastamento ou aproximação dos pares da  $G(r)$  em relação ao tempo. O uso das RDFs entre os cátions e os ânions não é relevante nesse exercício pois não há uma mudança significativa na morfologia dos líquidos iônicos estudados em relação ao tempo de simulação.

Nessas comparações podemos perceber a diferença dos módulos das integrais nos diferentes líquidos, e dessa forma podemos ter a tendência de qual seria o líquido iônico mais adequado para a solubilização da queratina da lã de ovelha.

Também podemos fazer uma análise do que devemos levar mais em conta, a interação com a cisteína ou com a cistina. Dentro da queratina temos monômeros livres e monômeros conectados por ligações S-S, nessas simulações representados pelo dímero cistina. Com a comparação das integrais das RDFs dos diferentes sistemas podemos ver se as interações mais intensas entre os pares ocorrem para o dímero ou para o monômero, onde o mais indicado para essa análise é escolher uma distância  $r$  fixa.

#### 5.3.1. Comparação das integrais das RDFs dos cátions.

Na primeira tabela temos os resultados discutidos na sessão anterior demonstrando a aproximação ou afastamento dos cátions em relação aos aminoácidos:

**Tabela 2.** Comparação entre os valores das integrais das RDFs do par cátion/aminoácido para todos os sistemas.

Sistema	Distância	Integral (20 ns)	Integral (180 ns)	Diferença
A	0,67 nm	2,30	2,17	-5,6%
B	0,59 nm	0,61	0,39	-36,1%
C	0,53 nm	0,74	1,14	+54,1%
D	0,72 nm	1,81	2,94	+62,43%

Podemos ver uma diferença principal nos sistemas A e B em comparação com os sistemas C e D. Nos sistemas com o líquido iônico que possui o ânion cloreto, temos um afastamento do par  $[C_4mim]^+$  / aminoácido, e no caso do sistema A (com o monômero cistina) temos um afastamento pequeno, com uma diferença de apenas 5,6% de pares a menos.

**Tabela 3.** Comparação entre os valores das integrais das RDFs do par cátion/aminoácido para todos os sistemas em uma distância fixa (0,72 nm).

Sistema	Distância	Integral (20 ns)	Integral (180 ns)	Diferença
A	0,72 nm	3,49	2,95	-15,5%
B	0,72 nm	1,66	1,92	-13,5%
C	0,72 nm	2,71	3,20	+18,8%
D	0,72 nm	1,81	2,94	+62,4%

Quando fixamos a distância em 0,72 nm (maior distância calculada na etapa anterior) podemos ver a mesma tendência inicial, o afastamento dos cátions  $[C_4mim]^+$  dos aminoácidos quando o ânion do líquido iônico é o cloreto. Podemos também analisar e comparar que a interação atrativa entre o cátion e o monômero na mesma distância é maior do que a encontrada entre o cátion e o dímero em todas as distâncias.

Também percebemos que ao fim das simulações temos que, nos líquidos iônicos contendo o ânion acetato, a aproximação entre o cátion e a cistina/cisteína é maior do que nos líquidos iônicos contendo o íon cloreto.

### 5.3.2. Comparação das integrais das RDFs dos ânions.

Na seguinte tabela temos os resultados discutidos na sessão anterior demonstrando a aproximação ou afastamento dos ânions em relação aos aminoácidos:

**Tabela 4.** Comparação entre os valores das integrais das RDFs do par ânion/aminoácido para todos os sistemas.

Sistema	Distância	Integral (20 ns)	Integral (180 ns)	Diferença
A	0,67 nm	1,71	2,02	+18,1%
B	0,58 nm	0,49	0,79	+61,2%
C	0,57 nm	1,39	1,57	+12,9%
D	0,60 nm	1,30	1,10	-15,4%

Temos um aumento mais significativo no módulo das integrais da interação entre ânions e centros de massa dos aminoácidos para os líquidos iônicos contendo o íon cloreto. A diferença é mais significativa em relação ao dímero onde temos um aumento de 61,2% no sistema B que representa o par  $[\text{Cl}]^-$  /cistina. Esse resultado é comparado ao sistema B da sessão 5.3.1, onde temos um enorme afastamento dos cátions em relação ao centro de massa da cistina, indicando que para o líquido iônico  $[\text{C}_4\text{mim}][\text{Cl}]$  a interação predominante é entre o ânion e o aminoácido.

Diferentemente das RDFs dos cátions, temos apenas em um sistema a repulsão entre o íon e o aminoácido (no sistema D), com uma diferença de -15,4% em relação à simulação de 20 ns. Esse resultado também pode ser comparado ao encontrado na sessão anterior, pois nela temos uma aproximação entre o cátion  $[\text{C}_4\text{mim}]^+$  e a cistina de 62,4%, indicando a predominância da interação do cátion  $[\text{C}_4\text{mim}]^+$  se compararmos com a interação entre o acetato e o dímero.

Outra diferença interessante é que as maiores interações em relação ao tempo ocorreram para os líquidos iônicos com o íon cloreto. Diferentemente do que ocorreu no caso anterior, onde as maiores interações ocorreram entre o líquido iônico  $[\text{C}_4\text{mim}][\text{Acet}]$ .

Foi também escolhida a distância de 0,72 nm (maior distância encontrada na tabela inicial da sessão 5.3.1) e foi construída uma tabela similar à sessão anterior:

**Tabela 5.** Comparação entre os valores das integrais das RDFs do par ânion/aminoácido para todos os sistemas em uma distância fixa (0,72 nm).

Sistema	Distância	Integral (20 ns)	Integral (180 ns)	Diferença
A	0,72 nm	2,59	3,02	+16,1%
B	0,72 nm	2,09	2,02	-3,3%
C	0,72 nm	2,60	2,71	+4,2%
D	0,72 nm	2,38	2,78	+16,8%

Como no caso anterior, para o monômero, temos que o líquido iônico com o ânion cloreto (sistema A) foi o mais eficiente nessa distância após os 180 ns de simulação em comparação com o acetato (sistema C). Nessa distância já vemos uma diminuição pequena entre a interação do ânion com o aminoácido no sistema B, diferentemente das integrais das RDFs dos cátions, onde o módulo das integrais é sempre maior para o monômero (sistemas A e C da sessão 5.3.1), na distância de 0,72 nm. No caso atual temos uma grande interação entre o cloreto e o monômero no sistema A em comparação à essa mesma situação para o sistema B. Para os sistemas C e D temos um valor de integral semelhante para o monômero e para o dímero interagindo com o ânion acetato após os 180 ns de simulação.

## 6 Conclusão

Neste trabalho buscou-se compreender um fenômeno que ocorre em uma escala muito maior do que a do sistema estudado. Foi utilizada a Dinâmica Molecular para compreender em um nível microscópico as interações entre os aminoácidos e os íons de diferentes líquidos iônicos. Essas interações tentam explicar o fenômeno da dissolução da lã de ovelha em um solvente para a extração de queratina. Foram dois os líquidos iônicos utilizados: o cloreto ( $[Cl]^-$ ) e o acetato ( $[Acet]^-$ ). O cátion escolhido para esse estudo foi o 1-butil-3-metilimidazólio ( $[C_4mim]^+$ ).

Um ponto interessante a se levar em conta nesse estudo é que a metodologia de Dinâmica Molecular se limita a interações eletrônicas de espécies carregadas, portanto o fenômeno da reação química não é contemplado nessa dissertação. Sabendo disso, podemos encontrar tendências de possíveis sítios reativos observando alguns dados obtidos nas simulações, como a função de distribuição radial (RDF) e a função de distribuição espacial (SDF).

No estudo realizado foi também mantida a temperatura constante. Isso se deve ao fato de que esse estudo também serve como base para o estudo da interação dos substratos com campo elétrico. Essa interação com o campo elétrico acaba por substituir o aquecimento do sistema em alguns estudos conduzidos com biomoléculas<sup>100,101</sup>. A escolha da pressão atmosférica e a presença da água nas simulações seguem a mesma lógica. O estudo foi conduzido com o objetivo que possa ser replicado experimentalmente com a presença do campo elétrico, condições comuns para o estudo de solubilização de biomoléculas com atmosfera inerte e temperaturas diferentes das encontradas na CNTPs não foram conduzidos.

Com as funções de distribuição espacial (SDFs) temos uma descrição gráfica de como o solvente envolve o aminoácido após os 180 ns de simulação. Nos sistemas A e C, ambos envolvendo o monômero cisteína, tivemos um aumento significativo na densidade de solvente ao redor dos átomos de enxofre (S). Já nos sistemas envolvendo os líquidos iônicos e a cistina temos uma densidade menor de solvente ao redor do enxofre. Como visto anteriormente, o processo de extração da queratina se dá em duas etapas: a primeira ocorre no dímero (sistemas B e D) e é a dissolução, onde não temos uma densidade muito grande do solvente ao redor da ligação dissulfeto, já na segunda etapa temos a recuperação realizada com acetona ou álcool. Como percebemos pelas SDFs, os líquidos iônicos têm papel mais importante na etapa de recuperação, visto que a densidade de solvente em uma mesma distância para os átomos de enxofre é maior no caso dos monômeros.

As RDFs extraídas ao final de 180 ns de simulação corroboram com os resultados obtidos nas SDFs. Pelas integrais dos gráficos obtidas, temos módulos maiores nas interações dos sistemas A e C que envolvem a interação entre a cisteína (monômero) e um dos íons de cada líquido iônico. Esse resultado é confirmado tanto para os cátions quanto para os ânions, com exceção apenas da situação envolvendo o ânion acetato no sistema D ([C<sub>4</sub>mim][Acet] e cistina) com uma integral de 2,78 comparada com a interação do sistema C onde temos o mesmo líquido iônico interagindo com a cisteína e com um módulo de 2,71, na mesma distância de 0,72 nm.

Um resultado consistente encontrado para as RDFs dos cátions com os aminoácidos foi que os líquidos iônicos baseados no ânion acetato (sistemas C e D) apresentaram um aumento significativo da densidade do cátion [C<sub>4</sub>mim]<sup>+</sup> ao redor da cisteína (sistema C) e da cistina (sistema D) com a evolução temporal do sistema (de 20 ns para 180 ns). Os líquidos iônicos que continham o ânion cloreto demonstraram uma diminuição numa distância de 0,72 nm tanto para o monômero (cisteína) e para o dímero (cistina), e essa diferença ficou em cerca de 15% em ambos os casos.

Já para as RDFs dos ânions temos módulos maiores nas integrais relacionando os íons cloreto com o aminoácido cisteína (sistema A) em comparação aos íons acetato do sistema C, com a mesma biomolécula. No caso do dímero temos o resultado já comentado onde no sistema D temos uma grande quantidade de íons acetato ao redor da cistina nessa distância (0,72 nm).

Diante dos resultados anteriormente apresentados, temos que com o passar do tempo os cátions dos líquidos iônicos com o ânion acetato têm uma facilidade maior de interação com o substrato proteico. Se compararmos as integrais dos cátions e dos ânions na mesma distância, temos que para os líquidos iônicos baseados no ânion cloreto há uma quantidade maior de ânions em relação a cátions. Já nos líquidos iônicos baseados no ânion acetato temos uma quantidade maior de cátions em relação a ânions, ao redor do aminoácido.

Se consideramos o íon [Cl]<sup>-</sup> como um agente do processo de oxidação da cisteína em cistina, podemos validar os resultados encontrados. Pelos módulos da integrais temos que há um valor significativamente maior para o cloreto em relação ao acetato para o monômero. A recíproca é verdadeira, então podemos constatar que existe uma tendência maior do acetato agindo no processo de redução da cistina em cisteína.

Como temos o processo de extração da queratina da lã da ovelha em duas etapas, sendo o primeiro a solubilização e o segundo a recuperação, o líquido iônico mais adequado para o processo inicial é o [C<sub>4</sub>mim][Acet], onde ocorre a quebra da ligação dissulfeto. Para a etapa

de recuperação, o líquido iônico mais adequado é o  $[C_4mim][Cl]$ , que teria uma parcela maior no processo de oxidação da cisteína.

Como perspectiva futura nesse trabalho, poderiam ser utilizadas metodologias quântico-clássicas para identificar quebra e formação de novas ligações químicas. Também temos como uma perspectiva o uso de uma metodologia que consiga descrever a presença de um campo elétrico nos sistemas A, B, C e D.

## 7 Referências

- (1) Alberto, F. J.; Boyer, F.; Orozco-terWengel, P.; Streeter, I.; Servin, B.; de Villemereuil, P.; Benjelloun, B.; Librado, P.; Biscarini, F.; Colli, L.; Barbato, M.; Zamani, W.; Alberti, A.; Engelen, S.; Stella, A.; Joost, S.; Ajmone-Marsan, P.; Negrini, R.; Orlando, L.; Rezaei, H. R. Convergent Genomic Signatures of Domestication in Sheep and Goats. *Nature Communications* **2018**, 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03206-y>.
- (2) Smith M.S. , Barbara; Mark Aseltine; Gerald Kennedy (1997). *Beginning Shepherd's Manual* (Second ed.). Ames, IA: Iowa State University Press. ISBN.
- (3) Aaron, D.; Ely, D. UKnowledge Agriculture and Natural Resources Publications Cooperative Extension Service an Introduction to Sheep Repository Citation; **2014**.
- (4) Doyle, E. K.; Preston, J. W. V.; McGregor, B. A.; Hynd, P. I. The Science behind the Wool Industry. The Importance and Value of Wool Production from Sheep. *Animal Frontiers* **2021**, 11 (2), 15–23. <https://doi.org/10.1093/af/vfab005>.
- (5) Moeller, M. and Popescu, C. (2009), ‘Natural fibres’. In R, *Sustainable Solutions for Modern Economies*, ed. R. Hoeffner. Cambridge: Royal Society of Chemistry, pp. 368–393.
- (6) Popescu, C.; Höcker, H. Hair—the Most Sophisticated Biological Composite Material. *Chemical Society Reviews* **2007**, 36 (8), 1282. <https://doi.org/10.1039/b604537p>.
- (7) Sukumar, A.; Subramanian, R. Elements in the Hair of Non-Mining Workers of a Lignite Open Mine in Neyveli. *Industrial Health* **2003**, 41 (2), 63–68. <https://doi.org/10.2486/indhealth.41.63>.
- (8) Pauling, L.; Corey, R. B.; Branson, H. R. The Structure of Proteins: Two Hydrogen-Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1951**, 37 (4), 205–211. <https://doi.org/10.1073/pnas.37.4.205>.

- (9) Ramakrishnan, N.; Sharma, S.; Gupta, A.; Alashwal, B. Y. Keratin Based Bioplastic Film from Chicken Feathers and Its Characterization. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, 111, 352–358.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.037>.
- (10) Barone, J. R.; Schmidt, W. F.; Liebner, C. F. E. Thermally Processed Keratin Films. *Journal of Applied Polymer Science* **2005**, 97 (4), 1644–1651.  
<https://doi.org/10.1002/app.21901>.
- (11) Goddard, D. R.; Michaelis, L. Derivatives of Keratin. *Journal of Biological Chemistry* **1935**, 112 (1), 361–371. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)74993-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)74993-4).
- (12) Zeng, C. H.; Lu, Q. Study on the Recovery of Waste Wool by Combining Reduction and Metallic Salt Methods. *Advanced Materials Research* **2014**, 881-883, 551–555.  
<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.881-883.551>.
- (13) Zhou, L.-T.; Yang, G.; Yang, X.-X.; Cao, Z.-J.; Zhou, M.-H. Preparation of Regenerated Keratin Sponge from Waste Feathers by a Simple Method and Its Potential Use for Oil Adsorption. *Environmental Science and Pollution Research* **2014**, 21 (8), 5730–5736. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2513-8>.
- (14) Patterson, W. I.; Geiger, W. B.; Mizell, L. R.; Harris, M. The Rôle of Cystine in the Structure of the Fibrous Protein, Wool. *Textile Research* **1941**, 11 (9), 379–393.  
<https://doi.org/10.1177/004051754101100901>.
- (15) Schrooyen, P. M. M.; Dijkstra, P. J.; Oberthür, R. C.; Bantjes, A.; Feijen, J. Stabilization of Solutions of Feather Keratins by Sodium Dodecyl Sulfate. *Journal of Colloid and Interface Science* **2001**, 240 (1), 30–39.  
<https://doi.org/10.1006/jcis.2001.7673>.
- (16) Nakamura, A.; Arimoto, M.; Takeuchi, K.; Fujii, T. A Rapid Extraction Procedure of Human Hair Proteins and Identification of Phosphorylated Species. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2002**, 25 (5), 569–572. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.569>.

- (17) C. Earland and C. S. Knight; Studies on the structure of keratin. I. The analysis of fractions isolated from wool oxidized with peracetic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, **1955**, 17, 457–461.
- (18) Blackburn, S.; Lee, G. R. The Reaction of Wool Keratin with Alkali. *Biochimica et Biophysica Acta* **1956**, 19, 505–512. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(56\)90474-7](https://doi.org/10.1016/0006-3002(56)90474-7).
- (19) Nagai, Y.; Nishikawa, T. Alkali Solubilization of Chicken Feather Keratin. *Agricultural and biological chemistry* **1970**.
- (20) Zoccola, M.; Aluigi, A.; Patrucco, A.; Vineis, C.; Forlini, F.; Locatelli, P.; Sacchi, M. C.; Tonin, C. Microwave-Assisted Chemical-Free Hydrolysis of Wool Keratin. *Textile Research Journal* **2012**, 82 (19), 2006–2018. <https://doi.org/10.1177/0040517512452948>.
- (21) Chen, J.; Ding, S.; Ji, Y.; Ding, J.; Yang, X.; Zou, M.; Li, Z. Microwave-Enhanced Hydrolysis of Poultry Feather to Produce Amino Acid. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* **2015**, 87, 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2014.11.017>.
- (22) Xie, H.; Li, S.; Zhang, S. Ionic Liquids as Novel Solvents for the Dissolution and Blending of Wool Keratin Fibers. *Green Chemistry* **2005**, 7 (8), 606. <https://doi.org/10.1039/b502547h>.
- (23) Wang, H.; Gurau, G.; Rogers, R. D. Dissolution of Biomass Using Ionic Liquids. *Structure and Bonding* **2013**, 79–105. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-38619-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-38619-0_3).
- (24) Li, R.; Wang, D. Preparation of Regenerated Wool Keratin Films from Wool Keratin-Ionic Liquid Solutions. *Journal of Applied Polymer Science* **2012**, 127 (4), 2648–2653. <https://doi.org/10.1002/app.37527>.
- (25) Zhang, Z.; Nie, Y.; Zhang, Q.; Liu, X.; Tu, W.; Zhang, X.; Zhang, S. Quantitative Change in Disulfide Bonds and Microstructure Variation of Regenerated Wool Keratin

- from Various Ionic Liquids. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2017**, 5 (3), 2614–2622. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b02963>.
- (26) Zainal-Abidin, M. H.; Hayyan, M.; Hayyan, A.; Jayakumar, N. S. New Horizons in the Extraction of Bioactive Compounds Using Deep Eutectic Solvents: A Review. *Analytica Chimica Acta* **2017**, 979, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.012>.
- (27) Katoh, K.; Tanabe, T.; Yamauchi, K. Novel Approach to Fabricate Keratin Sponge Scaffolds with Controlled Pore Size and Porosity. *Biomaterials* **2004**, 25 (18), 4255–4262. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.11.018>.
- (28) Wang, J.; Hao, S.; Luo, T.; Cheng, Z.; Li, W.; Gao, F.; Guo, T.; Gong, Y.; Wang, B. Feather Keratin Hydrogel for Wound Repair: Preparation, Healing Effect and Biocompatibility Evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2017**, 149, 341–350. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.10.038>.
- (29) Ganesan, P. Natural and Bio Polymer Curative Films for Wound Dressing Medical Applications. *Wound Medicine* **2017**, 18, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.wndm.2017.07.002>.
- (30) Reichl, S.; Borrelli, M.; Geerling, G. Keratin Films for Ocular Surface Reconstruction. *Biomaterials* **2011**, 32 (13), 3375–3386. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.052>.
- (31) Su, C.; Gong, J.; Ye, J.; He, J.; Li, R.; Jiang, M.; Geng, Y.; Zhang, Y.; Chen, J.; Xu, Z.; Shi, J. Enzymatic Extraction of Bioactive and Self-Assembling Wool Keratin for Biomedical Applications. *Macromolecular Bioscience* **2020**, 20 (9), 2000073. <https://doi.org/10.1002/mabi.202000073>.
- (32) Salem Allafi, F. A.; Hossain, M. S.; Ab Kadir, M. O.; Hakim Shaah, M. A.; Lalung, J.; Ahmad, M. I. Waterless Processing of Sheep Wool Fiber in Textile Industry with Supercritical CO<sub>2</sub>: Potential and Challenges. *Journal of Cleaner Production* **2021**, 285, 124819. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124819>.

- (33) Walden, P.; Molecular Weights and Electrical Conductivity of Several Fused Salts. *Bull. Acad. Imper. Sci. (St. Petersburg)* **1914**, 1800.
- (34) Yoke, J. T.; Weiss, J. F.; Tollin, G. Reactions of Triethylamine with Copper(I) and Copper(II) Halides. *Inorganic Chemistry* **1963**, 2 (6), 1210–1216.  
<https://doi.org/10.1021/ic50010a028>.
- (35) Chum, H. L.; Koch, V. R.; Miller, L. L.; Osteryoung, R. A. Electrochemical Scrutiny of Organometallic Iron Complexes and Hexamethylbenzene in a Room Temperature Molten Salt. *Journal of the American Chemical Society* **1975**, 97 (11), 3264–3265.  
<https://doi.org/10.1021/ja00844a081>.
- (36) Fuller, J.; Carlin, R. T.; De Long, H. C.; Haworth, D. Structure of 1-Ethyl-3-Methylimidazolium Hexafluorophosphate: Model for Room Temperature Molten Salts. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, No. 3, 299.  
<https://doi.org/10.1039/c39940000299>.
- (37) Jung, J.; Hyun Suh, E.; Jeong, Y.; Yun, D.-J.; Chan Park, S.; Gyu Oh, J.; Jang, J. Ionic-Liquid Doping of Carbon Nanotubes with [HMIM][BF<sub>4</sub>] for Flexible Thermoelectric Generators. *Chemical Engineering Journal* **2022**, 438, 135526.  
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.135526>.
- (38) Biswas, A.; Shogren, R. L.; Stevenson, D. G.; Willett, J. L.; Bhowmik, P. K. Ionic Liquids as Solvents for Biopolymers: Acylation of Starch and Zein Protein. *Carbohydrate Polymers* **2006**, 66 (4), 546–550.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.04.005>.
- (39) Hasib-ur-Rahman, M.; Siaj, M.; Larachi, F. Ionic Liquids for CO<sub>2</sub> Capture—Development and Progress. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* **2010**, 49 (4), 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.ccep.2010.03.008>.
- (40) Every, H. A.; Bishop, A. G.; MacFarlane, D. R.; Orädd, G.; Forsyth, M. Transport Properties in a Family of Dialkylimidazolium Ionic Liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, 6 (8), 1758–1765. <https://doi.org/10.1039/b315813f>.

- (41) Rogers, R. D. Reflections on Ionic Liquids. *Nature* **2007**, 447 (7147), 917–918.  
<https://doi.org/10.1038/447917a>.
- (42) Liu, H.; Liu, Y.; Li, J. Ionic Liquids in Surface Electrochemistry. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, 12 (8), 1685. <https://doi.org/10.1039/b921469k>.
- (43) Tiago, G. A. O.; Matias, I. A. S.; Ribeiro, A. P. C.; Martins, L. M. D. R. S. Application of Ionic Liquids in Electrochemistry—Recent Advances. *Molecules* **2020**, 25 (24), 5812. <https://doi.org/10.3390/molecules25245812>.
- (44) Nockemann, P.; Binnemans, K.; Driesen, K. Purification of Imidazolium Ionic Liquids for Spectroscopic Applications. *Chemical Physics Letters* **2005**, 415 (1-3), 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2005.08.128>.
- (45) Marszał, M. P.; Kaliszan, R. Application of Ionic Liquids in Liquid Chromatography. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2007**, 37 (2), 127–140.  
<https://doi.org/10.1080/10408340601107847>.
- (46) Ding, J.; Welton, T.; Armstrong, D. W. Chiral Ionic Liquids as Stationary Phases in Gas Chromatography. *Analytical Chemistry* **2004**, 76 (22), 6819–6822.  
<https://doi.org/10.1021/ac049144c>.
- (47) Paul, A.; Muthukumar, S.; Prasad, S. Review—Room-Temperature Ionic Liquids for Electrochemical Application with Special Focus on Gas Sensors. *Journal of The Electrochemical Society* **2019**, 167 (3), 037511. <https://doi.org/10.1149/2.0112003jes>.
- (48) Tang, S.; Liu, S.; Guo, Y.; Liu, X.; Jiang, S. Recent Advances of Ionic Liquids and Polymeric Ionic Liquids in Capillary Electrophoresis and Capillary Electrochromatography. *Journal of Chromatography A* **2014**, 1357, 147–157.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.03>.

- (49) Chiappe, C.; Pomelli, C. S. Hydrogen Sulfide and Ionic Liquids: Absorption, Separation, and Oxidation. *Topics in Current Chemistry Collections* **2017**, 265–289. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-89794-3\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-89794-3_10).
- (50) Zhao, Z.; Dong, H.; Zhang, X. The Research Progress of CO<sub>2</sub> Capture with Ionic Liquids. *Chinese Journal of Chemical Engineering* **2012**, 20 (1), 120–129. [https://doi.org/10.1016/s1004-9541\(12\)60371-1](https://doi.org/10.1016/s1004-9541(12)60371-1).
- (51) Ferreira, T. J.; Ribeiro, R. P. P. L.; Mota, J. P. B.; Rebelo, L. P. N.; Esperança, J. M. S. S.; Esteves, I. A. A. C. Ionic Liquid-Impregnated Metal–Organic Frameworks for CO<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub> Separation. *ACS Applied Nano Materials* **2019**, 2 (12), 7933–7950. <https://doi.org/10.1021/acsanm.9b01936>.
- (52) Wang, H.; Gurau, G.; Rogers, R. D. Ionic Liquid Processing of Cellulose. *Chemical Society Reviews* **2012**, 41 (4), 1519. <https://doi.org/10.1039/c2cs15311d>.
- (53) Tolesa, L. D.; Gupta, B. S.; Lee, M.-J. Chitin and Chitosan Production from Shrimp Shells Using Ammonium-Based Ionic Liquids. *International Journal of Biological Macromolecules* **2019**, 130, 818–826. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.018>.
- (54) Rieland, J. M.; Love, B. J. Ionic Liquids: A Milestone on the Pathway to Greener Recycling of Cellulose from Biomass. *Resources, Conservation and Recycling* **2020**, 155, 104678. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2019.104678>.
- (55) Anugwom, I.; Mäki-Arvela, P.; Virtanen, P.; Willför, S.; Sjöholm, R.; Mikkola, J.-P. . Selective Extraction of Hemicelluloses from Spruce Using Switchable Ionic Liquids. *Carbohydrate Polymers* **2012**, 87 (3), 2005–2011. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.10.006>.
- (56) Szalaty, T. J.; Klapiszewski, Ł.; Jesionowski, T. Recent Developments in Modification of Lignin Using Ionic Liquids for the Fabrication of Advanced Materials—a Review. *Journal of Molecular Liquids* **2020**, 301, 112417. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.112417>.

- (57) Feroz, S.; Muhammad, N.; Dias, G.; Alsaiani, M. A. Extraction of Keratin from Sheep Wool Fibres Using Aqueous Ionic Liquids Assisted Probe Sonication Technology. *Journal of Molecular Liquids* **2022**, 350, 118595.  
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.118595>.
- (58) Ren, F.; Wang, J.; Xie, F.; Zan, K.; Wang, S.; Wang, S. Applications of Ionic Liquids in Starch Chemistry: A Review. *Green Chemistry* **2020**, 22 (7), 2162–2183.  
<https://doi.org/10.1039/c9gc03738a>.
- (59) Chen, M.; Lahaye, M. Natural Deep Eutectic Solvents Pretreatment as an Aid for Pectin Extraction from Apple Pomace. *Food Hydrocolloids* **2021**, 115, 106601.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106601>.
- (60) Vassilev, S. V.; Baxter, D.; Andersen, L. K.; Vassileva, C. G. An Overview of the Chemical Composition of Biomass. *Fuel* **2010**, 89 (5), 913–933.  
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2009.10.022>.
- (61) IRENA (2021), Renewable capacity statistics **2021** International Renewable Energy Agency (IRENA), Abu Dhabi
- (62) Swatloski, R. P.; Spear, S. K.; Holbrey, J. D.; Rogers, R. D. Dissolution of Cellulose with Ionic Liquids. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124 (18), 4974–4975. <https://doi.org/10.1021/ja025790m>.
- (63) Zhu, S.; Wu, Y.; Chen, Q.; Yu, Z.; Wang, C.; Jin, S.; Ding, Y.; Wu, G. Dissolution of Cellulose with Ionic Liquids and Its Application: A Mini-Review. *Green Chemistry* **2006**, 8 (4), 325. <https://doi.org/10.1039/b601395c>.
- (64) Kosan, B.; Michels, C.; Meister, F. Dissolution and Forming of Cellulose with Ionic Liquids. *Cellulose* **2007**, 15 (1), 59–66. <https://doi.org/10.1007/s10570-007-9160-x>.
- (65) Bagheri, M.; Rodríguez, H.; Swatloski, R. P.; Spear, S. K.; Daly, D. T.; Rogers, R. D. Ionic Liquid-Based Preparation of Cellulose–Dendrimer Films as Solid Supports for

- Enzyme Immobilization. *Biomacromolecules* **2008**, 9 (1), 381–387.  
<https://doi.org/10.1021/bm701023w>.
- (66) Yue, W.; Zhang, L.; Deng, L.; Guo, Y.; Xu, Q.; Peng, W.; Chen, P.; Xie, H.; Zou, G.; Liang, S. Co-Dissolution of Cellulose and Silk Fibroin in Levulinic Acid-Derived Protic Ionic Liquids for Compositing Membrane and Fiber Preparation. *Green Chemistry* **2021**, 23 (23), 9669–9682. <https://doi.org/10.1039/D1GC02837E>.
- (67) Qin, J.; Wang, Z.; Hu, J.; Yuan, Y.; Liu, P.; Cheng, L.; Kong, Z.; Liu, K.; Yan, S.; Zhang, J. Distinct Liquid Crystal Self-Assembly Behavior of Cellulose Nanocrystals Functionalized with Ionic Liquids. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2022**, 632, 127790.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127790>.
- (68) Kujawa, J.; Rynkowska, E.; Fatyeyeva, K.; Knozowska, K.; Wolan, A.; Dzieszkowski, K.; Li, G.; Kujawski, W. Preparation and Characterization of Cellulose Acetate Propionate Films Functionalized with Reactive Ionic Liquids. *Polymers* **2019**, 11 (7), 1217. <https://doi.org/10.3390/polym11071217>.
- (69) Cai, T.; Zhang, H.; Guo, Q.; Shao, H.; Hu, X. Structure and Properties of Cellulose Fibers from Ionic Liquids. *Journal of Applied Polymer Science* **2010**, 115 (2), 1047–1053. <https://doi.org/10.1002/app.31081>.
- (70) Muhammad, N.; Man, Z.; Bustam Khalil, M. A. Ionic Liquid—a Future Solvent for the Enhanced Uses of Wood Biomass. *European Journal of Wood and Wood Products* **2011**, 70 (1-3), 125–133. <https://doi.org/10.1007/s00107-011-0526-2>.
- (71) Pu, Y.; Jiang, N.; Ragauskas, A. J. Ionic Liquid as a Green Solvent for Lignin. *Journal of Wood Chemistry and Technology* **2007**, 27 (1), 23–33.  
<https://doi.org/10.1080/02773810701282330>.
- (72) Xie, H.; Li, S.; Zhang, S. Ionic Liquids as Novel Solvents for the Dissolution and Blending of Wool Keratin Fibers. *Green Chemistry* **2005**, 7 (8), 606.  
<https://doi.org/10.1039/b502547h>.

- (73) Berendsen, H.; *Simulating the Physical World*; Cambridge University Press, **2007**.
- (74) Born, M.; Oppenheimer, R. Zur Quantentheorie Der Molekeln. *Annalen der Physik* **1927**, 389 (20), 457–484. <https://doi.org/10.1002/andp.19273892002>.
- (75) On the Determination of Molecular Fields.—I. From the Variation of the Viscosity of a Gas with Temperature. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character* **1924**, 106 (738), 441–462. <https://doi.org/10.1098/rspa.1924.0081>.
- (76) Alder, B. J.; Wainwright, T. E. Phase Transition for a Hard Sphere System. *The Journal of Chemical Physics* **1957**, 27 (5), 1208–1209. <https://doi.org/10.1063/1.1743957>.
- (77) Rahman, A.; Stillinger, F. H. Molecular Dynamics Study of Liquid Water. *The Journal of Chemical Physics* **1971**, 55 (7), 3336–3359. <https://doi.org/10.1063/1.1676585>.
- (78) Verlet, L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Physical Review* **1967**, 159 (1), 98–103. <https://doi.org/10.1103/physrev.159.98>.
- (79) Hockney, R. W.; Eastwood, J. W. *Computer Simulation Using Particles*; Hilger: Bristol, **1989**.
- (80) H.J.C. Berendsen, D. van der Spoel, and R. van Drunen, “GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation,” *Comp. Phys. Comm.*, 91 43–56 (**1995**)
- (81) Swope, W. C.; Andersen, H. C.; Berens, P. H.; Wilson, K. R. A Computer Simulation Method for the Calculation of Equilibrium Constants for the Formation of Physical Clusters of Molecules: Application to Small Water Clusters. *The Journal of Chemical Physics* **1982**, 76 (1), 637–649. <https://doi.org/10.1063/1.442716>.

- (82) Berendsen, H. J.; Van Gunsteren, W. F.; Zwinderman, H. R.; Geurtsen, R. G. Simulations of Proteins in Water. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1986**, 482, 269–286. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1986.tb20961.x>.
- (83) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath. *The Journal of Chemical Physics* **1984**, 81 (8), 3684–3690. <https://doi.org/10.1063/1.448118>.
- (84) Evans, D. J.; Holian, B. L. The Nose–Hoover Thermostat. *The Journal of Chemical Physics* **1985**, 83 (8), 4069–4074. <https://doi.org/10.1063/1.449071>.
- (85) Andersen, H. C. Molecular Dynamics Simulations at Constant Pressure And/or Temperature. *The Journal of Chemical Physics* **1980**, 72 (4), 2384–2393. <https://doi.org/10.1063/1.439486>.
- (86) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath. *The Journal of Chemical Physics* **1984**, 81 (8), 3684–3690. <https://doi.org/10.1063/1.448118>.
- (87) Parrinello, M.; Rahman, A. Polymorphic Transitions in Single Crystals: A New Molecular Dynamics Method. *Journal of Applied Physics* **1981**, 52 (12), 7182–7190. <https://doi.org/10.1063/1.328693>.
- (88) Pierlot, A. P. Water in Wool. *Textile Research Journal* **1999**, 69 (2), 97–103. <https://doi.org/10.1177/004051759906900204>.
- (89) Gaussian 16, Revision C.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y.

- Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2016**.
- (90) Kim, K.; Jordan, K. D. Comparison of Density Functional and MP2 Calculations on the Water Monomer and Dimer. *The Journal of Physical Chemistry* **1994**, 98 (40), 10089–10094. <https://doi.org/10.1021/j100091a024>.
- (91) Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Chabalowski, C. F.; Frisch, M. J. Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields. *The Journal of Physical Chemistry* **1994**, 98 (45), 11623–11627. <https://doi.org/10.1021/j100096a001>.
- (92) Lindorff-Larsen et al., *Proteins* 78, 1950-58, **2010**
- (93) Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. Canonical Sampling through Velocity Rescaling. *The Journal of Chemical Physics* **2007**, 126 (1), 014101. <https://doi.org/10.1063/1.2408420>.
- (94) Parrinello, M.; Rahman, A. Polymorphic Transitions in Single Crystals: A New Molecular Dynamics Method. *Journal of Applied Physics* **1981**, 52 (12), 7182–7190. <https://doi.org/10.1063/1.328693>.
- (95) Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H.J.C. and Fraaije, J.G.E.M. (1997), LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.*, 18: 1463-1472.
- (96) Ewald, P. P. Die Berechnung Optischer Und Elektrostatischer Gitterpotentiale. *Annalen der Physik* **1921**, 369 (3), 253–287. <https://doi.org/10.1002/andp.19213690304>.

- (97) Zhu, C.; Byrd, R. H.; Lu, P.; Nocedal, J. Algorithm 778: L-BFGS-B. *ACM Transactions on Mathematical Software* **1997**, 23 (4), 550–560.  
<https://doi.org/10.1145/279232.279236>.
- (98) Shavandi, A.; Bekhit, A. E.-D. A.; Carne, A.; Bekhit, A. Evaluation of Keratin Extraction from Wool by Chemical Methods for Bio-Polymer Application. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **2016**, 32 (2), 163–177.  
<https://doi.org/10.1177/0883911516662069>.
- (99) Rajabinejad, H.; Zoccola, M.; Patrucco, A.; Montarsolo, A.; Rovero, G.; Tonin, C. Physicochemical Properties of Keratin Extracted from Wool by Various Methods. *Textile Research Journal* **2017**, 88 (21), 2415–2424.  
<https://doi.org/10.1177/0040517517723028>.
- (100) Han, Z.; Zeng, X. A.; Yu, S. J.; Zhang, B. S.; Chen, X. D. Effects of Pulsed Electric Fields (PEF) Treatment on Physicochemical Properties of Potato Starch. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2009**, 10 (4), 481–485.  
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.07.003>.
- (101) Li, Q.; Wu, Q.-Y.; Jiang, W.; Qian, J.-Y.; Zhang, L.; Wu, M.; Rao, S.-Q.; Wu, C.-S. Effect of Pulsed Electric Field on Structural Properties and Digestibility of Starches with Different Crystalline Type in Solid State. *Carbohydrate Polymers* **2019**, 207, 362–370. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.001>.
- (102) Jones de Andrade; Böes, E. S.; Stassen, H. Computational Study of Room Temperature Molten Salts Composed by 1-Alkyl-3-Methylimidazolium Cations Force-Field Proposal and Validation. *Journal of Physical Chemistry B* **2002**, 106 (51), 13344–13351. <https://doi.org/10.1021/jp0216629>.
- (103) Wolf, M. G.; Hoefling, M.; Aponte-Santamaría, C.; Grubmüller, H.; Groenhof, G. G<sub>membed</sub>: Efficient Insertion of a Membrane Protein into an Equilibrated Lipid Bilayer with Minimal Perturbation. *Journal of Computational Chemistry* **2010**, 31 (11), 2169–2174. <https://doi.org/10.1002/jcc.21507>.