

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR

BRISA RAÍSSA BARTELLT GODOY

**ANÁLISE DA ESTRUTURA E  
CONFORMAÇÃO DE ÁCIDOS SIÁLICOS**

Porto Alegre

2021

BRISA RAÍSSA BARTELLT GODOY

# **ANÁLISE DA ESTRUTURA E CONFORMAÇÃO DE ÁCIDOS SIÁLICOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Hugo Verli

Porto Alegre

2021

BRISA RAÍSSA BARTELLT GODOY

## **ANÁLISE DA ESTRUTURA E CONFORMAÇÃO DE ÁCIDOS SIÁLICOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Banca Examinadora:

---

**Prof. Dr. Hugo Verli**  
Orientador

---

**Prof. Dr. Walter Orlando Beys da Silva**  
Faculdade de Farmácia - UFRGS

---

**Prof. Dr. Rodrigo Ligabue-Braun**  
Departamento de Farmacociências - UFCSPA

---

**Prof. Dr. José Fernando Ruggiero  
Bachega**  
Departamento de Farmacociências - UFCSPA

---

**Prof. Dr. Luís Fernando Saraiva Macedo  
Timmers  
(Suplente)**  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde -  
UNIVATES

Porto Alegre, 16 de Dezembro

2021

# Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Prof. Hugo Verli, por todo o conhecimento e apoio que me fizeram crescer muito, tanto como profissional, quanto como pessoa.

Ao Centro de Biotecnologia/UFRGS pela oportunidade, principalmente à Silvia, pelo acolhimento e ajuda que foram fundamentais nesse processo.

Aos colegas do Grupo de Bioinformática Estrutural, em especial ao colega João, cuja ajuda e conhecimento foram fundamentais para que esse trabalho se concretizasse.

Aos membros da banca, agradeço por terem aceitado o convite e por contribuírem com a minha formação científica.

Aos grandes amigos que o Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular me trouxe, Lívia, Johnatan e Meiski, agradeço pela amizade e pelo suporte que tanto me ajudou nos momentos difíceis.

Agradeço à minha mãe Katiane (*in memoriam*) e à minha avó Ana Flavia por terem sempre acreditado na minha capacidade, cujo amor e dedicação são a força que me impulsionam a atingir meus objetivos.

À Prof. Jane Boeira, por desde a graduação ter me apoiado a prosseguir com a minha formação científica, agradeço pela amizade.

A todos que de certa forma contribuíram para minha formação científica, agradeço.



*"Your best and wisest refuge from all troubles is in your science."*

**Ada Lovelace**

# Resumo

Descobertos nos Deuterostômios, os ácidos siálicos (Sias) constituem uma família de carboidratos estruturalmente diversa, podendo ser encontrados frequentemente ligados por meio de seu carbono anomérico (C2) na configuração  $\alpha$  às posições C3 ou C6 da galactose ou a outro Sia aos carbonos 8 ou 9. A diversidade estrutural dos Sias é o que torna essas moléculas capazes de desempenhar importantes papéis biológicos modulatórios e estruturais. O estudo estrutural dos Sias e de seu papel biológico pode ser feito por meio da modelagem molecular dessas estruturas. Devido à sua flexibilidade, os carboidratos complexos adotam diferentes conformações em solução, sendo desafiadora a descrição de sua estrutura 3D através de métodos computacionais. A dinâmica molecular (DM) é um método computacional que descreve a variação do comportamento molecular em função do tempo. Enquanto a MD configura um exemplo de método não enviesado, a metadinâmica envolve a aplicação de um viés que pode forçar o sistema a deixar mínimos locais e explorar diferentes estados amostrais. No presente trabalho, metodologias de mecânica molecular foram aplicadas na parametrização do equilíbrio pseudo-rotacional de Sias. A validação dos parâmetros aplicados aos monossacarídeos pôde ser feita com cálculos de J de acoplamento vicinal para os monômeros que constituem a base estrutural dos ácidos siálicos, os quais demonstraram valores próximos a dados experimentais. A variação conformacional das ligações glicosídicas entre dissacarídeos foi delineada por simulações de metadinâmica. Além disso, as conformações preferenciais adotadas pelos torcionais que compõem as glicosídicas de um poliácido siálico foram determinadas através da análise de trajetórias de dinâmica molecular. Dessa forma, a partir dos resultados obtidos, pôde-se estabelecer parâmetros que possibilitem o estudo e a modelagem de carboidratos de diferentes níveis de complexidade estrutural da família dos ácidos siálicos através do GROMOS, juntamente aos parâmetros do campo de força GROMOS 53A<sub>GLYC</sub>.

**Palavras-chave:** Ácidos siálicos. Dinâmica molecular. Metadinâmica. GROMOS.

# Abstract

Discovered in the Deuterostomes, sialic acids (Sias) constitute a structurally diverse family of carbohydrates, often found linked through their anomeric carbon (C2) in the  $\alpha$  configuration at the C3 or C6 positions of the galactose or another sialic acid at the carbons 8 or 9. The structural diversity of Sias is what makes these molecules capable of playing important biological modulatory and structural roles. The structural study of sialic acids and their biological role can be done through the molecular modeling of these structures. Because of their flexibility, complex carbohydrates adopt different conformations in solution, representing a challenging class of molecules in terms of describing their 3D structure with computational methods. Molecular dynamics (DM) is a computational method that describes the variation in molecular behavior as a function of time. While MD sets up an example of an unbiased method, metadynamics involves the application of a bias that can force the system to leave local minima and sample states that represent lower probabilities. In the present work, molecular mechanics methodologies were applied in the parameterization of the pseudo-rotational equilibrium of sialic acids. The validation of the parameters applied to the monosaccharides could be done with J calculations of vicinal coupling for the monomers that constitute the structural basis of the sialic acids, which showed values close to experimental data. The conformational variation of glycosidic bonds between disaccharides was delineated by metadynamic simulations. Furthermore, the preferred conformations adopted by the torsionals that compose the glycosidics of a polysialic acid were determined through the analysis of molecular dynamics trajectories. Therefore, from the results obtained, it was possible to establish parameters that enable the study and modeling of carbohydrates of different levels of structural complexity of the sialic acid family through GROMOS, with the GROMOS 53A6<sub>GLYC</sub> force field parameters set.

**Keywords:** Sialic acids. Molecular dynamics. Metadynamics. GROMOS.

# Lista de ilustrações

Figura 1 – Variações estruturais observadas dentre os ácidos siálicos, sendo o ácido 5-N-acetilneuramínico, a estrutura química que atua como a base de formação para as demais variações . . . . .	11
Figura 2 – Representação filogenética da presença dos Sias nos três domínios da vida. Os Sias cuja expressão foi estabelecida por métodos físico-químicos estão representados por um círculo fechado e a expressão putativa, a qual é determinada a partir da análise de sequências de DNA, por um círculo aberto.	12
Figura 3 – Perda evolutiva do Neu5Gc. . . . .	14
Figura 4 – A ligação entre Siglecs e ácidos siálicos promove a evasão imunológica de células cancerígenas e organismos patogênicos. . . . .	15
Figura 5 – Etapas que envolvem a ligação entre o SARS-CoV-2 e o receptor contendo ácido siálico . . . . .	17
Figura 6 – Conjunto de equações gerais que compõem um campo de força. . . . .	23
Figura 7 – Ilustração representativa de uma simulação de metadinâmica . . . . .	25
Figura 8 – Representação da esfera de Cremer-Pople, utilizando-se como exemplo uma $\beta$ -Glicose para ilustrar as 38 conformações que podem ser adotadas por um anel de piranose. . . . .	26
Figura 9 – Numeração dos átomos analisados no <i>puckering</i> dos monossacarídeos, usando-se como exemplo o $\alpha$ -D-Neu5Ac. . . . .	30

# Lista de tabelas

Tabela 1 – Ligações glicosídicas observadas em dissacarídeos envolvendo a presença de Sias e seus respectivos ângulos, assim como a sequência de átomos relacionada a cada ângulo diedral. . . . .	32
--	----

# Sumário

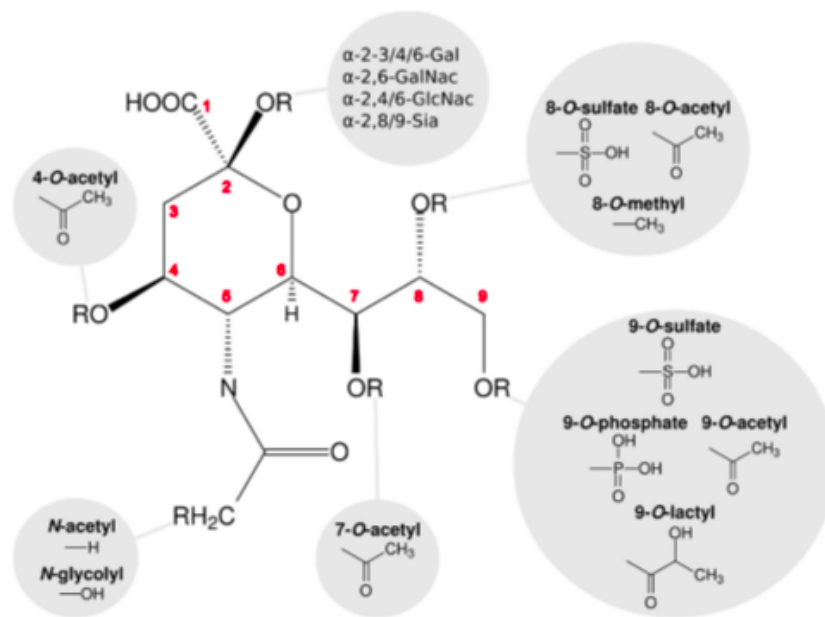
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>1.1</b>	<b>Ácidos siálicos</b>	<b>11</b>
<b>1.2</b>	<b>Distribuição evolutiva dos ácidos siálicos</b>	<b>12</b>
1.2.1	Perda evolutiva do Neu5Gc	13
<b>1.3</b>	<b>Papéis funcionais dos ácidos siálicos</b>	<b>13</b>
1.3.1	Receptores intrínsecos	14
1.3.2	Receptores extrínsecos	16
<b>1.4</b>	<b>Análises estruturais e conformacionais de carboidratos</b>	<b>16</b>
1.4.1	Cristalografia de Raios-X	17
1.4.2	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	18
1.4.2.1	Constantes de acoplamento	19
<b>1.5</b>	<b>Métodos de mecânica molecular</b>	<b>20</b>
1.5.1	Dinâmica molecular (DM)	21
1.5.1.1	Campos de força	22
1.5.2	Metadinâmica	24
1.5.2.1	Puckering	25
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b>	<b>27</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Programas utilizados</b>	<b>28</b>
<b>3.2</b>	<b>Dinâmica molecular (DM)</b>	<b>28</b>
3.2.1	Construção de topologias	29
3.2.2	Obtenção de estruturas tridimensionais	29
3.2.3	Protocolo de simulação	29
3.2.4	Análise dos resultados	30
<b>3.3</b>	<b>Metadinâmica</b>	<b>31</b>
3.3.1	Protocolo de simulação	31
3.3.2	Variáveis coletivas	31
<b>3.4</b>	<b>Cálculos de J acoplamento vicinal</b>	<b>32</b>
3.4.1	Análise do ácido polissialico	32
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>33</b>

4.1	Capítulo I: <i>JCalc: A Python module for vicinal coupling constants calculation from molecular dynamics</i> . . . . .	34
4.2	Capítulo II: <i>Molecular modeling of novel sialic acids</i> . . . . .	39
5	DISCUSSÃO GERAL . . . . .	59
6	CONCLUSÕES . . . . .	62
7	PERSPECTIVAS . . . . .	63
	REFERÊNCIAS . . . . .	64
	<b>ANEXOS</b>	<b>71</b>
	ANEXO A – TOPOLOGIAS . . . . .	72
	CURRICULUM VITÆ . . . . .	99

# 1 Introdução

## 1.1 Ácidos siálicos

Descobertos na linhagem dos Deuterostômios<sup>1</sup>, os carboidratos da família dos ácidos siálicos (Sias) são definidos como  $\alpha$ -ceto ácidos pertencentes a uma família mais antiga de carboidratos, denominados ácidos nonulosônicos. Ao contrário de outros açúcares presentes nas cadeias de glicanos de glicoconjugados encontrados em vertebrados, que são compostos por cinco ou seis carbonos, essa família de moléculas apresenta nove carbonos. Além disso, há um notável número de grupos químicos que podem ser encontrados em uma única molécula (Figura 1), incluindo uma cadeia lateral exocíclica de 3 carbonos, um ou mais grupos amino acetilados e um ácido carboxílico [Angata e Varki 2002].



**Figura 1** – Variações estruturais observadas dentre os ácidos siálicos, sendo o ácido 5-N-acetilneuramínico, a estrutura química que atua como a base de formação para as demais variações [Rustmeier, Strebler e Stehle 2019]

Encontrados na natureza principalmente na forma de monossacarídeos e constituindo uma família estruturalmente diversa, a qual conta com mais de 50 componentes, os Sias estão envolvidos em diferentes processos biológicos e modulatórios essenciais, tanto à manutenção da saúde de diferentes organismos, quanto ao sucesso de mecanismos de patogenicidade. A

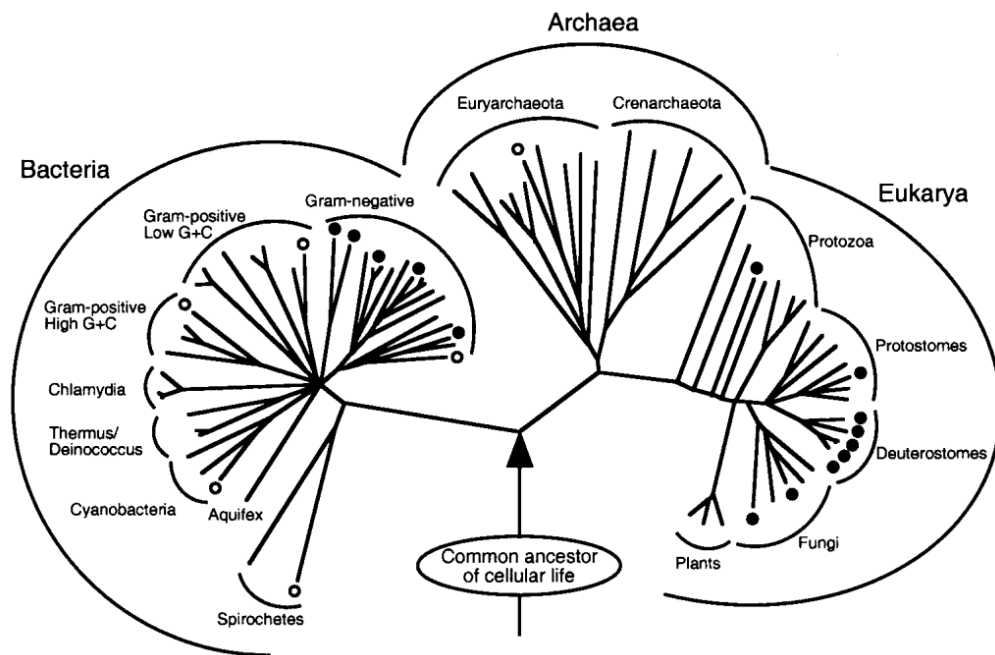
<sup>1</sup> O grupo dos Deuterostômios abrange os animais dos filos Chordata, que inclui vertebrados, tunicados e anfioxos; Ambulacraria, termo que une os filos Echinodermata e Hemichordata; [Holland 2015] e Xenacoelomorpha, abrangendo os animais dos grupos Xenoturbella, Acoela e Nemertodermatida [Cannon et al. 2016].



diversidade estrutural observada nessas moléculas é o que confere a elas as mais distintas funções, bem como a presença desses açúcares nos três domínios dos seres vivos [Schauer e Kamerling 1997].

## 1.2 Distribuição evolutiva dos ácidos siálicos

Os Sias apareceram relativamente tarde na evolução [Varki e Schauer 2009]. Amplamente apontados na literatura como moléculas predominantemente presentes nos seres do domínio Eukarya, com o avanço das técnicas de sequenciamento de genomas, foi possível estabelecer que os Sias estão também presentes nos domínios Archaea e Bacteria (Figura 2). Por serem encontrados em vírus, bactérias, protozoários e fungos patogênicos, há a suposição de que a aquisição desses monossacarídeos acelerou a diferenciação de animais superiores [Angata e Varki 2002].



**Figura 2** – Representação filogenética da presença dos Sias nos três domínios da vida. Os Sias cuja expressão foi estabelecida por métodos físico-químicos estão representados por um círculo fechado e a expressão putativa, a qual é determinada a partir da análise de sequências de DNA, por um círculo aberto. [Angata e Varki 2002]

### 1.2.1 Perda evolutiva do Neu5Gc

Tanto a molécula de ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) quanto a de ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) estão presentes, e em grandes quantidades, na maioria dos mamíferos. Em tecidos humanos normais, a molécula de Neu5Gc não é encontrada, ao passo em que está presente em abundância nos demais mamíferos. A identidade genética da humanidade é cerca de 99% similar a dos chimpanzés, assim como de outros símios africanos, compartilhando-se de uma menor similaridade com o orangotango e o gorila [Dhar, Sasmal e Varki 2019].

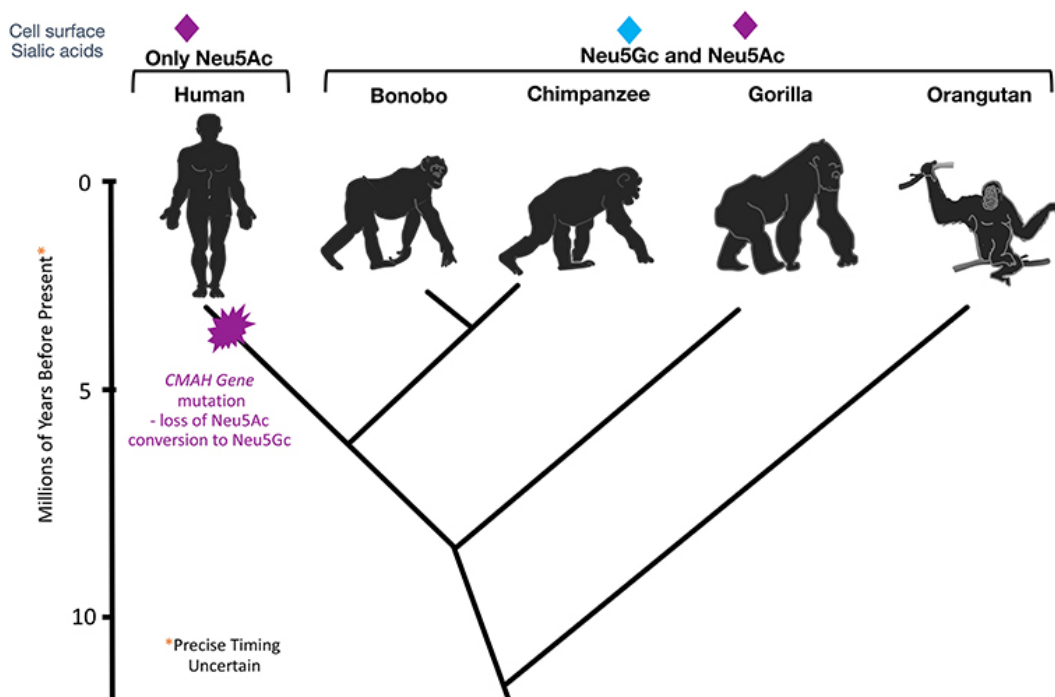
Apesar da grande similaridade genética, em contraste aos seres humanos, os macacos são capazes de expressar o Neu5Gc em elevadas quantidades (Figura 3). As moléculas de Neu5Ac e Neu5Gc se diferem apenas por um átomo de oxigênio, que no citosol é adicionado ao carbono de posição 5 do Neu5Ac, pela ação de uma hidroxilase capaz de converter CMP-Neu5Ac em CMP-Neu5Gc. Os seres humanos sofreram uma perda evolutiva do Neu5Gc em resultado a uma mutação de exclusão de um éxon no gene CMAH, que consiste no gene responsável pela codificação da enzima hidroxilase que catalisa o processo de conversão de Neu5Ac em Neu5Gc [Takahashi et al. 2015, Varki 2010].

Diversos organismos patogênicos se utilizam das estruturas dos Sias para otimizar o processo de infecção de vertebrados, sendo que muitos desses organismos se ligam preferencialmente ao Neu5Gc. Diferentes estudos presumem que o organismo causador da malária, o qual se liga ao Neu5Gc, pode ter sido a causa inicial da seleção natural do estado nulo do CMAH [Martin et al. 2005, Altman e Gagneux 2019].

Supõe-se consequências positivas atribuídas a essa perda evolutiva, como uma maior capacidade dos seres humanos em utilizar ferramentas, quando em comparação aos demais primatas. No entanto, dentre as consequências negativas, destaca-se o fato de que essa mutação tornou os humanos mais expostos a outros tipos de patógenos [Okerblom et al. 2017]. Os Sias encontram-se, principalmente, nas porções mais externas de glicoproteínas de vertebrados, facilitando não somente a ligação a patógenos, mas também tornando essas moléculas essenciais a diversos papéis funcionais [Varki, Schnaar e Schauer 2017], como veremos a seguir.

## 1.3 Papéis funcionais dos ácidos siálicos

Podendo atuar como ligantes de receptores intrínsecos, como Siglecs, ou de receptores extrínsecos, interagindo com proteínas receptoras de patógenos, essa família de carboidratos



**Figura 3** – Perda evolutiva do Neu5Gc [Dhar, Sasmal e Varki 2019]

possui a capacidade de atuar no transporte de moléculas carregadas positivamente, como o  $\text{Ca}^{2+}$ . Os Sias presentes nas glicoproteínas sialiladas da membrana de células sanguíneas, atuam em mecanismos de repulsão de células sanguíneas, uma vez que a presença do carboxilato nos ácidos siálicos gera a carga negativa que impulsiona a força de repulsão que impede a interação de eritrócitos entre si e com outros tipos celulares [Fernandes, Cesar e Barjas-Castro 2011]. Além disso, os Sias servem de escudo para que glicoproteínas não sejam clivadas por proteases ou até mesmo como moléculas imprescindíveis no sucesso de mecanismos de plasticidade neural. Diferentes características estruturais, tais como carga negativa, tamanho e hidrofiliçidade tornam os Sias moléculas versáteis e fundamentais em uma vasta gama de funções [Varki 2008, Traving e Schauer 1998].

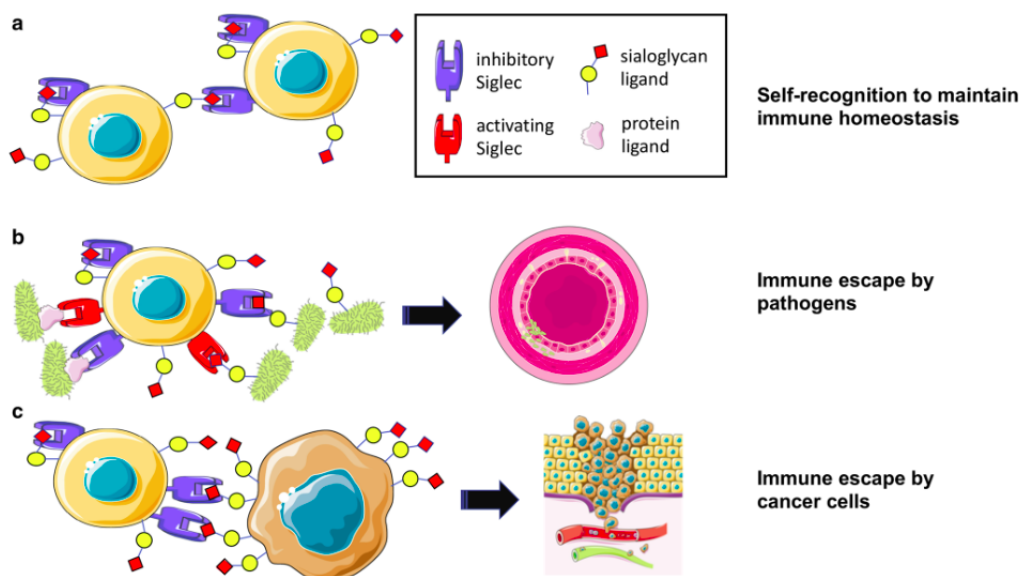
### 1.3.1 Receptores intrínsecos

As células do sistema imunológico contêm em suas superfícies diferentes glicanos que, por sua vez, se ligam a proteínas específicas [Maverakis et al. 2015]. Dentre essa variedade de glicanos de superfície celular encontram-se os ácidos siálicos, os quais atuam como receptores de moléculas como siglecs e selectinas. Siglecs são lectinas estruturalmente semelhantes a imunoglobulinas, funcionando como proteínas de adesão celular, mediadoras de processos de interação entre células e que participam da regulação de funções celulares nos sistemas imunes inato e adaptativo [Crocker, Paulson e Varki 2007].

A interação entre as Siglecs e os Sias facilita o processo de evasão imunológica de células cancerígenas e de organismos patogênicos (Figura 4). A interação entre Sias e Siglecs impede a ativação do sistema imune e, dessa forma, patógenos conseguem evadir das células imunológicas através de mimetizadores de glicanos de Sias ou receptores de Siglecs, propiciando o desenvolvimento de infecções graves [Läubli e Varki 2020].

Células tumorais escapam do sistema imunológico de modo bastante semelhante ao dos patógenos. O glicocálice, assim como as matrizes e os fluidos extracelulares de todas as células de mamíferos, é uma região rica em sialoglicanos e, dessa forma, células tumorais podem se ligar às Siglecs presentes na superfície de células do sistema imunológico, promovendo a evasão imunológica e, conseqüentemente, uma rápida progressão do câncer e o posterior estado de metástase [Läubli e Varki 2020].

Por fim, as selectinas são proteínas transmembranas que se ligam a glicanos que contêm na sua estrutura ácidos siálicos ou fucoses. São moléculas de adesão celular e mediadoras de respostas imunes e inflamatórias. Assim como as Siglecs, as selectinas promovem a interação entre células tumorais e células sanguíneas saudáveis, como leucócitos e plaquetas, acelerando o progresso de diferentes tipos de câncer. Devido ao seu papel na interação com células tumorais, um aumento da presença de selectinas em pacientes com câncer é um indicativo de metástase aumentada, sendo portanto utilizadas como um marcador prognóstico [Borsig 2018].



**Figura 4** – A ligação entre Siglecs e ácidos siálicos promove a evasão imunológica de células cancerígenas e organismos patogênicos. a) A interação entre Sias e Siglec impedem a ativação do sistema imune. b) Patógenos podem escapar ao ataque de células imunológicas através de mimetizadores de glicanos de Sias ou receptores de Siglecs. c) Células tumorais escapam do sistema imune de maneira semelhante aos patógenos [Läubli e Varki 2020]

### 1.3.2 Receptores extrínsecos

Além de interagirem com Siglecs e selectinas, os ácidos siálicos são capazes de se ligar a bactérias, vírus, protozoários e, até mesmo, toxinas produzidas por alguns desses organismos [Schauer 2009]. Bactérias como as *Streptococcus* [Weiman et al. 2010, Charland et al. 1996], *E. coli* [Barry 1959, Vimr e Troy 1985], *Helicobacter* [Hirno et al. 1998, Unemo et al. 2005] e *Plasmodium falciparum* [Ord et al. 2012, Malpede, Lin e Tolia 2013], invadem o organismo receptor por intermédio de ácidos siálicos presentes na membrana das células do hospedeiro.

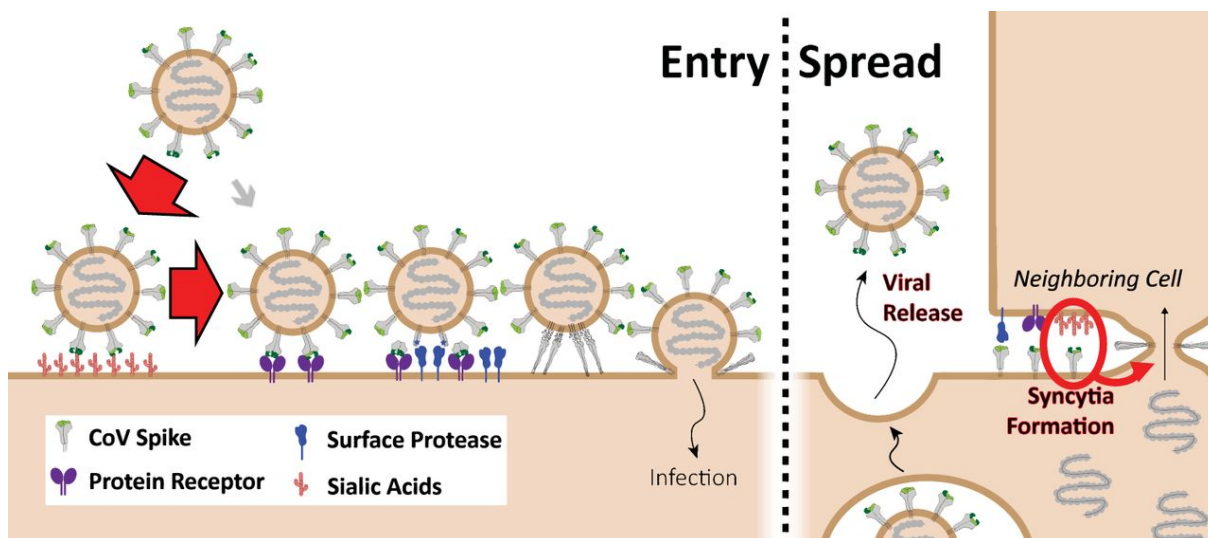
Localizados na extremidade de gangliosídeos e glicoproteínas, os Sias, principalmente o Neu5Ac, atuam como receptores de diversos tipos de vírus. Diferentes cepas do vírus Influenza humana [Cohen et al. 2013] ou aviária [Zhong et al. 2015] se ligam a Sias dos hospedeiros, assim como vírus pertencentes à família Coronaviridae, incluindo o MERS-CoV [Widagdo et al. 2019, Li et al. 2017] e o SARS-CoV-2 [Qing et al. 2020, Sun 2021].

A sequência de eventos envolvidos no processo de ligação entre receptor e SARS-CoV-2 (Figura 5) é mediada por ácidos siálicos. Na etapa envolvendo a entrada do vírus no organismo do hospedeiro, observa-se que as proteínas S, ou *spike*, permeiam interações com os diversos sialatos posicionados na superfície da membrana celular do receptor, permitindo a manutenção de uma determinada concentração viral nas células. Na sequência, as proteínas *spike* são capazes de englobar receptores proteicos, sendo ativadas de maneira proteolítica, adotando conformações que estimulem a fusão membranar. Na etapa de propagação, ocorre a fusão célula-célula, envolvendo a ligação entre os ácidos siálicos e proteínas S, ao passo em que o vírus é liberado [Qing et al. 2020].

## 1.4 Análises estruturais e conformacionais de carboidratos

Os carboidratos constituem a classe de moléculas em maior abundância na natureza. Essenciais a inúmeros processos, metabolismos e mecanismos biológicos, os carboidratos apresentam também diversas aplicações na indústria. O estudo e compreensão da estrutura dessa classe de moléculas é, dessa maneira, importante não somente ao entendimento dos processos biológicos aos quais elas contribuem, mas também é imprescindível à otimização do aproveitamento do potencial industrial apresentado por elas [Rao 1998].

Glicanos apresentam estruturas mais complexas, quando em comparação às demais macromoléculas biológicas. Até mesmo os monômeros de açúcares apresentam diferentes



**Figura 5** – Etapas que envolvem a ligação entre o SARS-CoV-2 e o receptor contendo ácido siálico [Qing et al. 2020].

configurações, podendo estar organizados em cadeias na formação de polissacarídeos e oligossacarídeos, os quais se encontram unidos por ligações glicosídicas que variam desde as mais comuns como  $\alpha$ -1,3 e  $\alpha$ -1,4, até ligações incomuns, como  $\alpha$ -2,6 e  $\alpha$ -2,8, sendo as duas últimas características de polissacarídeos que contêm monômeros de ácidos siálicos. O estudo dessas estruturas é bastante desafiador devido a variedade de conformações e isômeros apresentados por glicanos e compostos glicoconjugados. Dessa forma, a disponibilidade de dados que elucidem essas estruturas é considerado mais escasso, quando em comparação aos dados disponíveis para outras moléculas biológicas, mesmo havendo metodologias experimentais bem estabelecidas [Verli 2014, Meirelles et al. 2020].

Cristalografia de Raios-X e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) são os métodos experimentais mais utilizados e bem estabelecidos no estudo conformacional e estrutural de macromoléculas biológicas, pois demonstram precisão no fornecimento de dados acerca das possíveis interações intramoleculares e intermoleculares, e das conformações adotadas por moléculas orgânicas [Bush, Martin-Pastor e Imbery 1999].

#### 1.4.1 Cristalografia de Raios-X

Desde o início do século XX, padrões de difração de raios X têm sido usados na definição de estruturas moleculares a partir de matéria cristalizada [Huxford 2013]. Descrita pela primeira vez em 1895 por Wilhelm Röntgen, a técnica de cristalografia de raios-X tem como princípio a interação da radiação eletromagnética em uma faixa de 0,01–10 nm com um material na forma cristalina, requerendo amostras com elevada pureza [Huxford 2013, Perez 2013].

O princípio do método consiste em um feixe de raios-X que atravessa um único cristal. Em seguida, são medidos a intensidade e a posição da radiação difratada. Deve ser realizada então a combinação da intensidade medida com alguma estimativa de fases, antes da dedução do arranjo de repetição característico dos átomos da molécula cristalizada em análise seja deduzido ou de se efetuar o cálculo de um envelope tridimensional de densidade de elétrons [Huxford 2013].

Define-se como difração os padrões de interferência de natureza construtiva e destrutiva que são formados quando ocorre a interação entre a matéria e a radiação eletromagnética, podendo esta última estar na forma de luz ou raios-X. Partindo-se do pressuposto de que os cristais são sólidos nos quais um arranjo atômico se repete de maneira simétrica a fim de preencher o espaço disponível, os raios X difratados que surgem após a passagem pela matéria cristalina exibem um padrão e, conseqüentemente, o espaçamento regular e as propriedades de simetria característicos do cristal analisado [Huxford 2013, Perez 2013].

Apesar de ser um método bem estabelecido para a determinação de estruturas de macromoléculas biológicas, no que tange ao estudo de estruturas de carboidratos, a cristalografia de raios-X apresenta limitações. Sendo o método mais aplicado na caracterização das estruturas encontradas em bancos de dados como Protein Data Bank (PDB) [Berman, Henrick e Nakamura 2003], uma vez que requer cristais simétricos e a heterogeneidade conformacional em solução impede a cristalização, essa técnica não é bem reproduzida em sistemas que apresentem elevada flexibilidade, como polissacarídeos e oligossacarídeos [Perez 2013, Meirelles et al. 2020].

A dificuldade em se determinar estruturas de glicanos através de cristalografia de raios-X se reflete na carência de dados em bancos como o PDB. De acordo com levantamento feito em relação ao atual *status* das informações estruturais relativas a glicanos no PDB, estruturas de monossacarídeos livres, devido a menor flexibilidade em comparação a polissacarídeos, representam a maioria dentre toda informação relacionada a carboidratos disponível no PDB, ao passo em que estruturas de polissacarídeos ou oligossacarídeos são minoria. Apesar do progresso observado na qualidade dos dados disponíveis no PDB, devido a limitações experimentais, ainda há poucos dados elucidando a estruturas de carboidratos à disposição da comunidade científica [Meirelles et al. 2020].

#### 1.4.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é um método analítico de espectroscopia amplamente utilizado na identificação de compostos sintéticos e de biomoléculas, sendo aplicada tanto no estudo das conformações de carboidratos de estrutura já conhecidas quanto

na caracterização de estruturas desconhecidas. A RMN-1H, ou Ressonância Magnética de Prótons, e a RMN 13C, ou Ressonância Magnética de Carbono 13, têm sido as ferramentas de RMN utilizadas com maior frequência, principalmente devido ao fato de ser uma forma de determinar grupos funcionais em biomoléculas, mantendo-se a integridade das amostras nas condições empregadas [Hall 1964, Bianchi e Bauer 2011].

No processo de identificação de estruturas polissacarídicas, considera-se *a priori* os monossacarídeos que compõem a estrutura em estudo. Para que seja possível o estudo apenas das unidades monossacarídicas, é feita a hidrólise do polissacarídeo, e os monossacarídeos que o constituem são convertidos em acetatos de alditol, os quais são posteriormente observados por cromatografia gasosa. Quando a configuração absoluta é determinada, os açúcares redutores são convertidos em butil glicosídeos quirais antes da acetilação [Säwén 2011].

A determinação de componentes dos monossacarídeos, incluindo as informações relacionadas às proporções relativas e configuração absoluta podem ser realizadas a partir de espectroscopia de RMN de 1H. A identificação e caracterização desse tipo de composto químico pode também ser feita pela aplicação de derivados quirais dos monossacarídeos através da observação dos deslocamentos químicos e dos padrões de acoplamento vicinal dos diferentes spin dos átomos que compõem cada torção da molécula em estudo [Säwén 2011].

#### 1.4.2.1 Constantes de acoplamento

No final dos anos 1950, Martin Karplus estabeleceu uma relação entre os ângulos diedrais, ou torcionais, entre hidrogênios de uma determinada molécula e a constante  ${}^3J_{H,H}$  associada, a qual representa a medida da interação spin-spin entre dois prótons vizinhos. As constantes  $J$  de acoplamento consistem em valores representados em Hz, e a numeração varia de acordo com a quantidade de ligações entre prótons adjacentes, sendo  ${}^1J$ ,  ${}^2J$  e  ${}^3J$ , correspondentes aos  $J$  entre núcleos acoplado através de uma, duas e três ligações, respectivamente [Karplus 1959, Coxon 2009].

A equação de Karplus (1) [Karplus 1959] prevê a relação direta entre as constantes de acoplamento vicinais obtidas a partir de experimentos de RMN e os torcionais dos prótons de hidrogênio acoplados, sendo  $j_o^{-1} = 1$  Hz,  $\phi_o = 1^\circ$ ,  $\phi$  o ângulo diedral entre os hidrogênios acoplados,  $I$  corresponde ao número de substituintes do fragmento molecular H-C-C-H,  $\Delta\chi_i = \chi_i - \chi_H$ , onde  $\chi_i$  é constante de eletronegatividade de Huggins [Huggins 1953] para o átomo  $i$  e  $\xi_i$  o sinal oposto do fragmento do torcional H'-C-C-S $_i$  [Coxon 2009]:

$$j_o^{-1} \cdot {}^3J_{H,H} = 13.86\cos^2\phi - 0.81\cos\phi + \sum_{i=1}^I \Delta\chi_i [0.56 - 2.32\cos^2(\xi_i\phi_o^{-1}\phi + 17.9|\Delta\chi_i|)] \quad (1)$$



$${}^3J_{H,H} = 8.5 \cos^2\phi - 0.28 \text{ for } 0^\circ \leq \phi \leq 90^\circ \text{ and } 9.5 \cos^2\phi - 0.28 \text{ for } 90^\circ \leq \phi \leq 180^\circ$$

Dentre os acoplamentos entre hidrogênios observados em moléculas orgânicas, destacam-se as constantes de acoplamento geminal, que descrevem os acoplamentos de duas ligações entre prótons de CH<sub>2</sub> desproporcionais, e as constantes de acoplamento vicinal, que abrangem três ligações entre prótons de carbonos intermediários. Por ser o tipo de acoplamento que oferece a maior quantidade de conhecimentos relevantes acerca da estereoquímica molecular [Reynolds 2017], constantes de acoplamento vicinal podem ser aplicadas a calibração de potenciais torcionais de campos de força, tais como o GROMOS [Gunsteren e Berendsen 1987].

## 1.5 Métodos de mecânica molecular

Os métodos de mecânica molecular (MM) se baseiam nas formulações da mecânica clássica Newtoniana para descrever e estabelecer parâmetros que caracterizem o comportamento de sistemas moleculares. Equações como a do oscilador harmônico [Degasperis e Ruijsenaars 2001] são utilizadas para estabelecer a descrição da energia relacionada a forças intermoleculares, rotação e alongamento de ligações, assim como para a determinação da energia associada às ligações de hidrogênio e interações de van der Waals [Ramachandran, Deepa e Namboori 2008, Poltev 2012].

Atualmente, os métodos de MM consistem nas principais ferramentas através das quais a química e a bioquímica computacional desenvolvem seus estudos, uma vez que possibilita desde a modelagem de moléculas de baixa massa molecular, como monossacarídeos e hidrocarbonetos, até moléculas de elevado peso molecular, como peptídeos, segmentos de DNA e até mesmo porções de membranas [Poltev 2012].

Tendo início nos anos 1960, em uma época em que metodologias de MM se restringiam apenas a estudos teóricos, esses métodos agora fazem parte de estudos que envolvem também etapas experimentais, como as de RMN e cristalografia de raio-X, onde a modelagem molecular computacional de sistemas químicos atua possibilitando que os sistemas descritos por métodos experimentais tenham suas estruturas depositadas e disponíveis à comunidade científica em bancos de dados como o PDB [Poltev 2012]. Para tanto, diferentes técnicas de MM foram desenvolvidas, incluindo os métodos Monte Carlo, Monte Carlo com viés conformacional, Metadinâmica [Barducci, Bonomi e Parrinello 2011] e Dinâmica Molecular, sendo esta última a mais utilizada [Ramachandran, Deepa e Namboori 2008].

### 1.5.1 Dinâmica molecular (DM)

A DM é uma técnica computacional que tem como princípio a aplicação de equações de mecânica clássica para a obtenção de um conjunto conformacional, ou *ensemble* molecular. A partir desse método, é possível a descrição do movimento dos átomos de uma molécula, ou conjunto de moléculas, calculando-se as coordenadas de deslocamento em função do tempo, ou seja, ao longo de uma trajetória em relação ao tempo de simulação [Perez 2007, Namba, Silva e Silva 2008]. Dessa forma, a caracterização do espaço conformacional e a obtenção das posições e velocidades de um grupo de partículas em função do tempo por DM, baseia-se no resultado da integração da Segunda Lei de Newton (2), sendo  $a_i$  a aceleração do átomo  $i$ ,  $Fx_i$  a força aplicada sobre o átomo  $i$ ,  $m_i$  a massa do átomo  $i$  e  $V$  a energia potencial. Dessa forma, o cálculo da força  $Fx_i$  que atua sobre cada partícula do sistema é realizado através da energia potencial que resulta das interações entre os átomos do sistema molecular em estudo. A posição das partículas em um determinado período de tempo é também calculada a partir da energia potencial sendo que, este processo ordenado em escala de tempo, é replicado de modo a produzir uma trajetória molecular que é posteriormente o principal objeto de análise da DM [Verli 2005, Goel et al. 2014]:

$$a_i = \frac{d^2x_i}{dt^2} = \frac{Fx_i}{m_i}, \quad Fx_i = -\frac{dV}{dx_i} \quad (2)$$

Nesse tipo de simulação, os estados macroscópicos de um *ensemble* são comumente desempenhados como um conjunto microcanônico, onde NVE (N = número de partículas, V = volume e E = energia) são constantes, ou como um conjunto canônico a NVT (N = número de partículas, V = volume e T = temperatura) constantes. Geralmente os sistemas clássicos são caracteristicamente adiabáticos, não havendo troca de calor e, além disso, é observada na trajetória a conservação da energia total, constituindo um sistema conveniente ao cálculo de um conjunto microcanônico. Contudo, o conjunto canônico se torna de aplicação mais prática, visto que pode ser aplicado submetendo-se o sistema molecular a uma temperatura constante, reestruturando-o a velocidades atômicas que variam conforme a temperatura aplicada. Similarmente ao NVT, outra alternativa é conjunto isotérmico-isobárico, no qual o sistema se mantém a NPT (N = número de partículas, P = pressão e T = temperatura) [Perez 2007, Namba, Silva e Silva 2008].

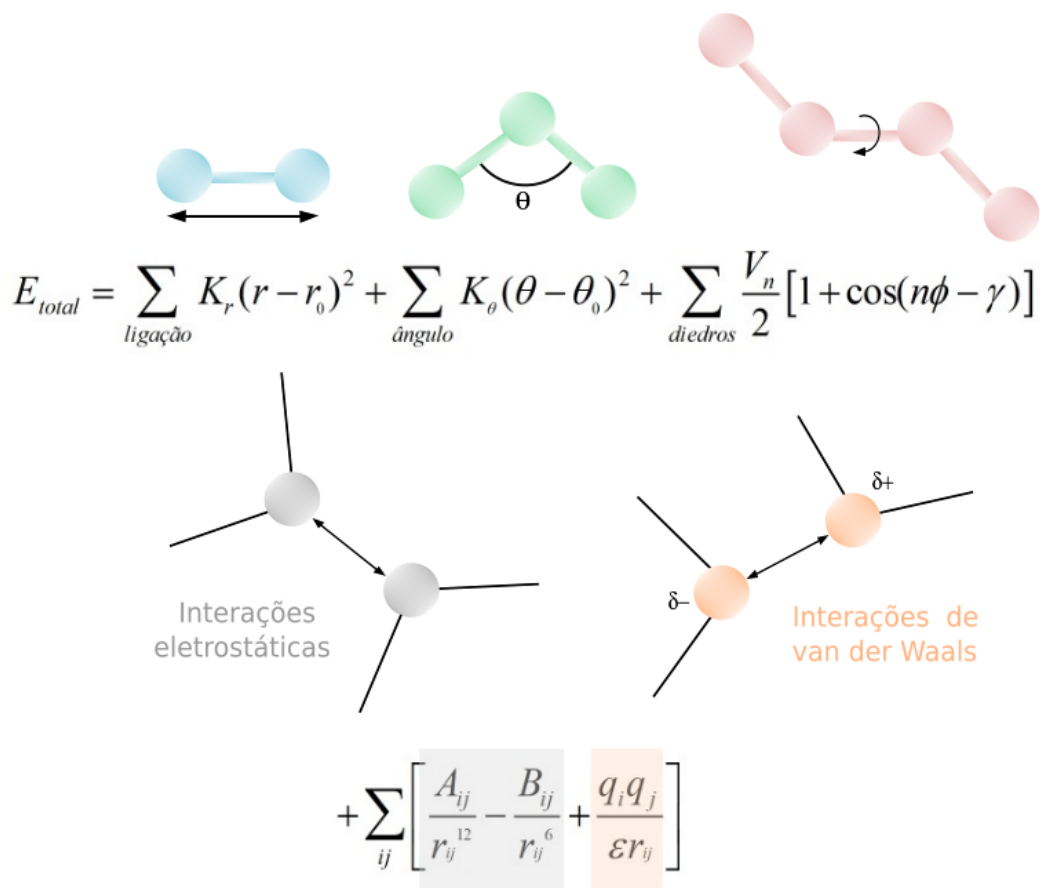
Partindo-se do princípio de que a configuração, o comportamento e a estrutura de biomoléculas em solução se modificam em função do tempo, se estabelece o fato de que esse tipo de sistema molecular é dinâmico. É exatamente essa natureza dinâmica dos sistemas moleculares e a capacidade de relacionar as variações estruturais com a variação temporal do experimento computacional, que tornam a DM uma técnica que se assemelha a metodologias

experimentais como a espectroscopia de RMN pois, ao passo em que a RMN descreve uma média conformacional temporal, a DM mostra a trajetória do deslocamento molecular em função do tempo de simulação [Verli 2005].

#### 1.5.1.1 Campos de força

De acordo com o postulado pela MM, moléculas são vistas como conjuntos de átomos, ou partículas, cujas ligações são sustentadas por forças elásticas ou harmônicas, descritas por equações provenientes da mecânica clássica. O conjunto de equações matemáticas que descrevem as funções e potenciais (Figura 6) observados nas interações entre átomos e moléculas que compõem sistemas moleculares é definido como campo de força. As equações que caracterizam cada campo de força disponível incluem parâmetros relacionados às ligações químicas, ângulos de ligação, ângulos torcionais diedrais, ou ainda às interações eletrostáticas/Coulômbicas e interações de van der Waals [Verli 2005, Namba, Silva e Silva 2008].

Juntamente com o desenvolvimento dos métodos da mecânica molecular (MM), surgiram os primeiros campos de força os quais eram voltados, principalmente, para a predição de estruturas de compostos químicos, entalpias moleculares e espectros vibracionais. Os primeiros campos de força, denominados como MM2, MM3 e MM4, foram parametrizados para o estudo de moléculas orgânicas de baixa massa molecular, sendo o primeiro deles direcionado apenas a hidrocarbonetos. Com o passar do tempo, esses primeiros conjuntos de parâmetros matemáticos foram aprimorados para o estudo de mais tipos de moléculas orgânicas, incluindo amidas, ésteres e álcoois, constituindo o princípio do que são os campos de força disponíveis na atualidade [González 2011].



**Figura 6** – Conjunto de equações gerais que compõem um campo de força. Adaptado de [Durrant e McCammon 2011].

A combinação de equações deduzidas por leis da física e a utilização de dados experimentais disponíveis em bancos de dados, somada ao desenvolvimento de métodos *ab initio*, faz com que os campos de força disponíveis na atualidade, desenvolvidos de forma sistemática por diferentes grupos de pesquisa, descrevam com precisão as estruturas, bem como as interações intramoleculares e intermoleculares observadas, inclusive, em sistemas moleculares biológicos. GROMOS, AMBER, CHARMM e OPLS são alguns dos exemplos de campos de força mais indicados e utilizados no estudo de sistemas biomoleculares [Cole et al. 2016].

Além da classe química que envolve as moléculas que constituirão um possível objeto de estudo, outro parâmetro imprescindível à avaliação do campo de força que deverá ser utilizado é o nível de simplificação das ligações interatômicas. GROMOS é um campo de força *united atom*, ou seja, parte do princípio de que os hidrogênios são os átomos em maior quantidade em compostos orgânicos, e simplifica as ligações entre os inúmeros hidrogênios apolares e seus respectivos carbonos vizinhos, unindo essas ligações e, por isso, sendo denominado um campo de força de átomo unido [Verli 2014].

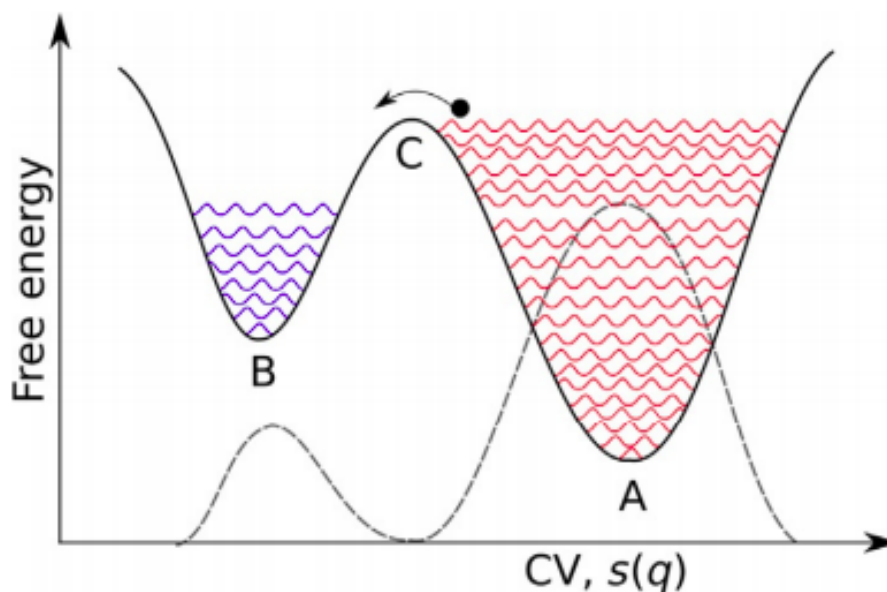
Devido ao fato de que os campos de força GROMOS 45A4 e GROMOS 53A6, os quais são amplamente utilizados na parametrização de estruturas de ácidos nucleicos, peptídeos, lipídeos e glicanos, apresentavam limitações no que tange à reprodução da conformação, ou *puckering*, de anéis de piranoses, fez-se necessária a adição de novos parâmetros ao campo de força GROMOS 53A6, ao qual foi atribuído o nome GROMOS 53A6<sub>GLYC</sub>, sendo este último voltado à parametrização de glicanos. Para que se promovesse um refinamento da capacidade de reprodução do *puckering* de anéis de piranoses, sem que houvesse perda da capacidade de estudo de outras moléculas biológicas a partir desse campo de força, foram aplicados cálculos de mecânica quântica para o ajuste dos perfis de energia dos torcionais, resultando em parâmetros que propiciam uma descrição precisa acerca da conformação energeticamente mais estável de aldohexopiranoses, tornando o GROMOS 53A6<sub>GLYC</sub>, um dos campos de força mais adequados ao estudo de *ensembles* conformacionais de glicanos, dentre os campos de força disponíveis atualmente [Pol-Fachin et al. 2012].

### 1.5.2 Metadinâmica

A metadinâmica consiste em uma técnica na qual o estudo do comportamento molecular em relação ao tempo de simulação é feito a partir da introdução de uma força ou viés ao sistema. Essa força ou viés potencial é uma função das variáveis coletivas e atua sobre determinados graus de liberdade. A metadinâmica é aplicada à uma simulação padrão de DM, onde o viés é adicionado ao Hamiltoniano do sistema, resultando em uma soma de curvas Gaussianas que descrevem a trajetória da simulação de forma a contornar as barreiras energéticas elevadas em superfícies de energia livre [Barducci, Bonomi e Parrinello 2011].

Na figura 7 tem-se uma representação esquemática de uma simulação por metadinâmica. Na ilustração, os preenchimentos em azul (B) e vermelho (A) representam as gaussianas que vão sendo depositadas ao longo da trajetória de simulação no espaço das variáveis coletivas. Em A observa-se, portanto, a exploração sistemática de energias mais elevadas, cruzando-se um estado de transição em C, até a região indicada em B, em um estado energético menos elevado que, após preenchido, resulta no achatamento da superfície de energia livre. As curvas tracejadas em cinza correspondem à parcela negativa da superfície de energia livre, cuja pressuposição parte do somatório das forças depositadas. Desse modo, na metadinâmica, os potenciais depositados encorajam o sistema a explorar configurações energeticamente desfavoráveis [Liao 2020].

As variáveis coletivas abordadas por essa metodologia podem ser ângulos diedrais, números de coordenação, ângulos de ligações glicosídicas ou ainda coordenadas do *puckering* de anéis de piranoses e furanoses [Barducci, Bonomi e Parrinello 2011].

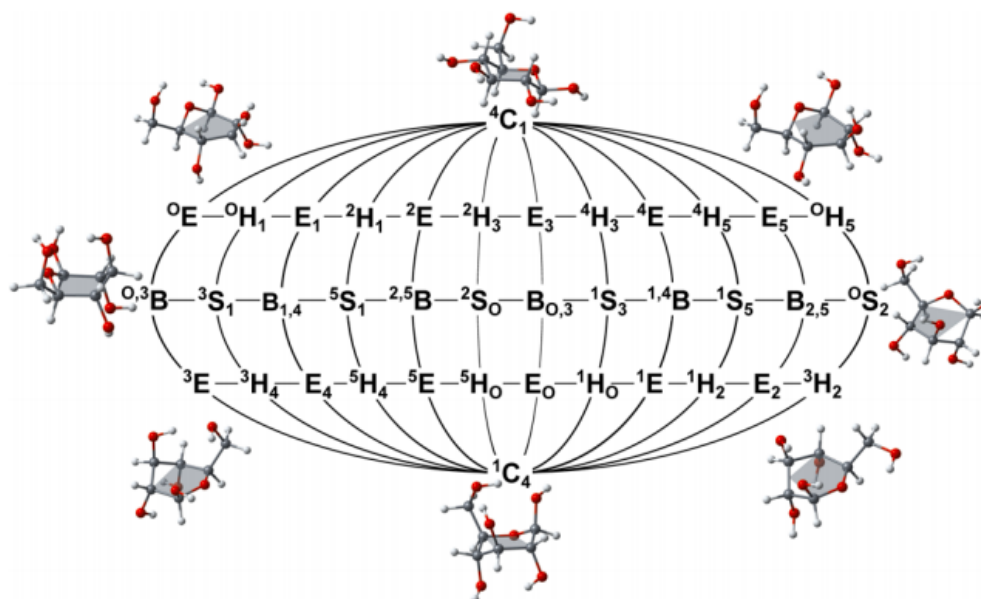


**Figura 7** – Ilustração representativa de uma simulação de metadinâmica. [Liao 2020]

#### 1.5.2.1 Puckering

Anéis de piranoses e furanoses adotam diferentes conformações quando em solução, estando os monossacarídeos derivados da hidrólise de oligossacarídeos presentes majoritariamente na forma de piranoses. Devido ao fato de que essa classe de moléculas pode pertencer a diferentes famílias de diastereoisômeros, a estabilidade relacionada a cada uma dessas formas irá variar de acordo com o monossacarídeo em estudo [Rao 1998].

As diferentes conformações que podem ser adotadas por piranoses, assim como suas nomenclaturas foram primeiramente estabelecidas pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) [IUPAC-IUB 1981]. As coordenadas esféricas relacionadas às 38 diferentes conformações (Figura 8) que podem ser adotadas por anéis de piranoses foram postuladas por Cremer e Pople [Cremer e Pople 1975], as quais podem adotar as seguintes formas: cadeira (C), envelope (E), meia-cadeira ou *half-chair* (H), bote-torcido ou *skew* (S) ou bote (B). [Mayes, Broadbelt e Beckham 2014]



**Figura 8** – Representação da esfera de Cremer-Pople, utilizando-se como exemplo uma  $\beta$ -Glicose para ilustrar as 38 conformações que podem ser adotadas por um anel de piranose. As letras designam as diferentes conformações [Mayes, Broadbelt e Beckham 2014]

Partindo-se do princípio de que o estudo da conformação de anéis de monossacarídeos contribui para o entendimento da estereoquímica das reações químicas características dessa classe molecular, assim como na elucidação de diversas propriedades químicas, a observação da dinâmica do *puckering* de anéis de carboidratos em solução contribui para a compreensão da gama de atividades biológicas desempenhadas por essas macromoléculas [Rao 1998, Panczyk e Plazinski 2018].

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Considerando a diversidade estrutural e conformacional apresentada pelos ácidos siálicos, o presente estudo tem como objetivo a parametrização do equilíbrio pseudo-rotacional dessa família molecular, através da aplicação das seguintes técnicas e ferramentas:

### 2.2 Objetivos Específicos

- Construção de topologias de ácidos siálicos de diferentes níveis de complexidade estrutural;
- Implementação e validação dos parâmetros do campo de força GROMOS53A6<sub>GLYC</sub> disponíveis para ácidos siálicos;
- Ajuste do *puckering* dos anéis monossacarídicos;
- Validação dos cálculos de dinâmica molecular através do estudo dos  $^3J_{H,H}$  de acoplamento vicinal de diferentes monossacarídeos, bem como a comparação dos valores obtidos *in silico* com os  $^3J_{H,H}$  provenientes de experimentos de Ressonância Magnética Nuclear;
- Análises da variação conformacional de diferentes dissacarídeos através de cálculos de metadinâmica, introduzindo como variáveis coletivas os ângulos torcionais das ligações glicosídicas;
- Estudo e parametrização das conformações preferenciais das ligações glicosídicas de um ácido polissialico através de dinâmica molecular.



## 3 Metodologia

Nesta sessão serão abordadas as diferentes ferramentas e metodologias aplicadas no estudo das questões que constituíram o objeto de estudo da presente dissertação, os quais foram descritos previamente nos objetivos.

### 3.1 Programas utilizados

Os diferentes programas, bibliotecas e as ferramentas de visualização que constituíram a base para a realização de cálculos de DM, metadinâmica e de J de acoplamento vicinal, estão listados abaixo:

- Dinâmica molecular: GROMACS 5.1.4 [Bekker et al. 1993].
- Metadinâmica: PLUMED 2.5.1 [Bonomi et al. 2009] e GROMACS 5.1.4.
- Cálculos de J de acoplamento vicinal ( ${}^3J_{H,H}$ ): Python 3.7.6 [Rossum e Drake 2009] (bibliotecas Numpy 1.19.4, Statistics 1.0.3.5, Biopython 1.78, Argparse 1.4.0, Pathlib 1.0.1 e Flake8 3.9.0) e OpenBabel v2.3.1 [O'Boyle et al. 2011].
- Ferramentas de visualização e construção de modelos moleculares em 3D: Avogadro 1.2.0 [Hanwell et al. 2012], PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.1, Schrödinger, LLC), Grace 5.1.25 [Stambulchik 2000] e VMD 1.9.4a48 [Humphrey, Dalke e Schulten 1996].
- Ferramentas de elaboração de imagens, fórmulas matemáticas e moléculas em 2D: Inkscape [Kirsanov 2009], MathType [Hoover 1999] e MarvinSketch 20.20.0 (ChemAxon).
- Caracterização de populações conformacionais: ConfID [Polêto et al. 2020].
- Visualização e análise de redes: Cytoscape 3.9.0 [Shannon et al. 2003].

### 3.2 Dinâmica molecular (DM)

Nesta subseção serão descritos os parâmetros, programas e ferramentas utilizados para a construção de topologias, obtenção das estruturas moleculares tridimensionais, bem como o protocolo de simulação e análise dos resultados obtidos através de cálculos de DM.

### 3.2.1 Construção de topologias

A construção de topologias foi realizada de acordo com os parâmetros estabelecidos para o  $\alpha$ -Neu5Ac por [Ligabue-Braun et al. 2015] e com os parâmetros disponíveis para glicanos no campo de força GROMOS53A6<sub>GLYC</sub> [Pol-Fachin et al. 2012]. Para o estudo de ácidos siálicos contendo sulfatos e fosfatos dentre seus grupos exocíclicos, foram utilizados parâmetros para oligossacarídeos [Arantes et al. 2019] contendo esses grupos químicos, os quais foram também estabelecidos através do GROMOS. Foram construídas topologias de 12 monossacarídeos, 4 dissacarídeos e 1 polissacarídeo (Anexo A), cuja escolha foi feita baseada na diversidade estrutural descrita no trabalho de [Angata e Varki 2002].

### 3.2.2 Obtenção de estruturas tridimensionais

A estrutura em 3D do  $\alpha$ -D-Neu5Ac foi obtida a partir de um PDB no qual essa estrutura se encontra complexada com uma proteína ligante de Sia de *Pasturella multocida* [Setty et al. 2014]. A estrutura do ácido heptassiálico foi obtida a partir de um arquivo PDB onde a estrutura se encontra complexada com um anticorpo anti-ácido polissíálico [Nagae et al. 2013]. As estruturas do  $\alpha$ -D-Neu5Ac e do ácido heptassiálico foram removidas de seus respectivos complexos proteína-ligante com a utilização do PyMOL. As alterações estruturais que incumbem aos outros Sias discutidos neste trabalho, foram realizadas com as ferramentas Avogadro e PyMOL. A adição de diferentes grupos exocíclicos foi realizada com a utilização do Avogadro e, em seguida, os hidrogênios apolares foram removidos no PyMOL.

### 3.2.3 Protocolo de simulação

A realização de todas as simulações foi feita mantendo-se os sistemas à temperatura de 298 K e pressão de 1 bar constantes, utilizando-se o termostato de V-rescale [Bussi, Donadio e Parrinello 2007] e o barostato de Parrinello-Rahman [Parrinello e Rahman 1981]. Os sistemas foram mantidos em caixas cúbicas e solvatados com o modelo de água específico SPC/E [Gunsteren e Berendsen 1987], aplicando-se condições periódicas de contorno. Íons  $\text{Na}^+$  foram acrescentados para a neutralização da carga negativa característica dos ácidos siálicos. Devido à baixa massa molecular e volume de estruturas como as de monossacarídeos e dissacarídeos, não se fez necessária a aplicação de etapas de equilíbrio para o ajuste da temperatura, densidade e pressão desses sistemas. Para a equilíbrio do ácido heptassiálico foram realizadas primeiramente uma simulação de 1 ns com *ensemble* canônico (NVT) a fim de ajuste da temperatura do sistema e 4 etapas com um *ensemble* isobárico-isotérmico (NPT),

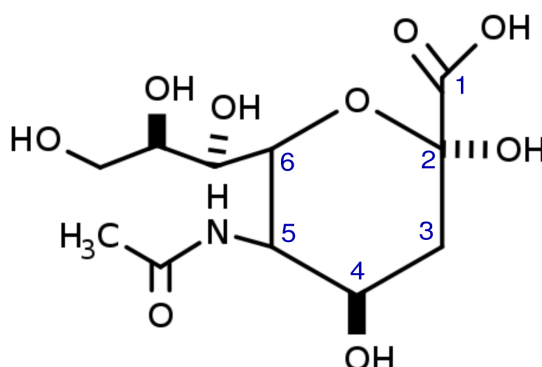
cada etapa também a 1 ns, para promover o ajuste da densidade e pressão do sistema, cujas forças de restrição foram aplicadas variando entre  $5 \times 10^3$  a 0 kJ/mol.

Para a restrição de ligações covalentes, foi utilizado o método de LINCS [Hess et al. 1997] com passos de integração de 2 fs, e o cálculo das interações eletrostáticas foi feito com a aplicação do método Particle-Mesh Ewald [Darden, York e Pedersen 1993]. As caixas contendo os Sias solvatados em água e cátions  $\text{Na}^+$  tiveram sua energia minimizada pela aplicação do algoritmo de Steepest Descent, por cerca de 10.000 passos, os quais variaram conforme a necessidade de cada sistema em estudo. As estruturas minimizadas foram então submetidas a simulações e DM, todas com o tempo de duração de 1  $\mu\text{s}$ .

### 3.2.4 Análise dos resultados

As trajetórias obtidas na forma de arquivos de extensão XTC foram utilizadas para análise da conformação preferencial de cada monossacarídeo estudado, sendo o programa Grace 5.1.25 a ferramenta utilizada para confecção dos gráficos de análise das diferentes conformações do *puckering* dos anéis das piranoses estudadas.

Devido à presença de um ácido carboxílico na posição de carbono 1, segundo o proposto pela IUPAC [McNaught et al. 1997], a numeração dos átomos de carbono do anel de monossacarídeos da família dos ácidos siálicos segue a ordem indicada na Figura 9. O carbono do ácido carboxílico foi considerado como sendo o carbono 1, desse modo, a numeração dos átomos do anel de piranose foi feita do carbono 2 em diante, constituindo  $\theta = \text{O6-C2-C3-C4-C5-C6}$  o torcional analisado em todos os anéis de piranoses estudados no presente trabalho.



**Figura 9** – Numeração dos átomos analisados no *puckering* dos monossacarídeos, usando-se como exemplo o  $\alpha$ -D-Neu5Ac.

### 3.3 Metadinâmica

O protocolo de simulação, assim como a descrição das variáveis coletivas abordadas para os sistemas analisados através de cálculos de metadinâmica, estão descritas nos seguintes tópicos.

#### 3.3.1 Protocolo de simulação

Para a exploração dos diferentes estados energéticos conformacionais e obtenção dos mapas de superfície de energia livre dos sistemas analisados, foi utilizado o pacote PLUMED 2.5. O fator de *bias* 10 foi aplicado, estando este valor dentro da faixa indicada para o estudo de moléculas biológicas, o qual varia entre 10 a 15, visto que barreiras entre 20 a 30 kJ/mol devem ser transpostas nesse tipo de sistema. A altura e o comprimento das Gaussianas foram mantidos em 0.5 kJ/mol e 0.1 rad, respectivamente.

Posto que a metadinâmica é aplicada à uma simulação de DM, parâmetros de temperatura, pressão, análise de interações eletrostáticas, assim como o modelo de água e íons adicionados à etapa de solvatação, condições periódicas de contorno e metodologia de minimização do sistema, foram mantidos equivalentes aos procedimentos abordados no protocolo de DM.

#### 3.3.2 Variáveis coletivas

Para a realização de metadinâmicas dos dissacarídeos, foram consideradas os ângulos  $\phi$  e  $\psi$  no caso das ligações glicosídicas  $\alpha$ -2,3 e  $\alpha$ -2,4. No caso das glicosídicas  $\alpha$ -2,6 e  $\alpha$ -2,8, foram considerados os ângulos  $\phi$ ,  $\psi$  e  $\omega$ . Os ângulos diedrais considerados nas simulações dos diferentes dissacarídeos analisados no presente estudo, estão descritos na Tabela 1. As glicosídicas das ligações  $\alpha$ -2,3 e  $\alpha$ -2,4 e  $\alpha$ -2,6 foram determinadas de acordo com os torcionais das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 parametrizadas por [Meirelles et al. 2020], enquanto os ângulos  $\phi$ ,  $\psi$ ,  $\omega_7$  e  $\omega_8$  da glicosídica  $\alpha$ -2,8, foram estabelecidos segundo o proposto por [Turupcu et al. 2020].

**Tabela 1** – Ligações glicosídicas observadas em dissacarídeos envolvendo a presença de Sias e seus respectivos ângulos, assim como a sequência de átomos relacionada a cada ângulo diedral.

Glicosídicas	$\phi$	$\psi$	$\omega$
$\alpha$ -2→3	O6-C2-O2-C2'	C2-O2-C2'-C1'	-
$\alpha$ -2→4	O6-C2-O2-C4'	C2-O2-C4'-C3'	-
$\alpha$ -2→6	O6-C2-O2-C6'	C2-O2-C6'-C5'	O6-C6-C5-C4
$\alpha$ -2→8	O6-C2-O8'-C8'	C2-O8'-C8'-C7'	$\omega_7 = \text{O7-C7-C6-O6}$ ; $\omega_8 = \text{O8-C8-C7-O7}$

### 3.4 Cálculos de J acoplamento vicinal

A fim de promover a validação dos cálculos de dinâmica molecular realizados, bem como validar os parâmetros disponíveis no campo de força GROMOS 53A6<sub>GLYC</sub> para ácidos siálicos, foi desenvolvida uma ferramenta para o cálculo de  $^3J_{H,H}$ . A JCalc consiste em uma ferramenta desenvolvida em Python 3.7.6, cuja calibração foi realizada baseando-se na generalização empírica da equação de Karplus [Karplus 1959], elaborada por [Haasnoot, Leeuw e Altona 1980]. Os cálculos de  $^3J_{H,H}$  são feitos a partir de arquivos de trajetória, tais como o de extensão XTC, obtidos através de experimentos de dinâmica molecular. Os *outputs* incluem um arquivo TXT com uma lista de valores de  $^3J_{H,H}$ , bem como arquivos TSV mostrando a flutuação desses valores ao longo do tempo de simulação.

O campo de força GROMOS 53A6<sub>GLYC</sub> é conhecido por ser um campo de força de átomo unido, dessa forma, para os cálculos de  $^3J_{H,H}$ , os quais envolvem diedros entre prótons de hidrogênios apolares, a adição desses átomos aos sistemas foi realizada com o auxílio da biblioteca OpenBabel v2.3.1.

#### 3.4.1 Análise do ácido polissialico

As conformações preferenciais do ácido heptassialico foram determinadas a partir dos arquivos XTC de trajetória relacionados a cada ângulo diedral, os quais foram submetidos à análise pelo ConflD. Os resultados obtidos com o ConflD foram visualizados em redes com o auxílio do Cytoscape 3.9.0. Conformações com menos de 1% de relevância foram removidas das redes.

## 4 Resultados

Os resultados da presente dissertação serão divididos em dois capítulos, ambos escritos em formato de manuscritos prontos para submissão.

Capítulo I: Este capítulo é direcionado ao desenvolvimento e validação de uma ferramenta para cálculos de J de acoplamento vicinal, denominada JCalc.

Capítulo II: No segundo capítulo serão abordados os resultados obtidos a partir dos parâmetros do campo de força GROMOS 53A6<sub>GLYC</sub> e de simulações de mecânica molecular estabelecidos para a obtenção da descrição do equilíbrio pseudo-rotacional de Sias de diferentes níveis de complexidade molecular.

## 4.1 Capítulo I: JCalc: A Python module for vicinal coupling constants calculation from molecular dynamics

Bioinformatics

doi.10.1093/bioinformatics/xxxxx

Advance Access Publication Date: Day Month Year

Manuscript Category

OXFORD

Structural bioinformatics

### JCalc: A python module for vicinal coupling constants calculation from molecular dynamics

Brisa Raíssa Bartelt Godoy<sup>1,\*</sup>, João Luiz de Meirelles<sup>1,\*</sup>, Hugo Verli<sup>1</sup><sup>1</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 91509-900, Brazil

\*To whom correspondence should be addressed.

Associate Editor: XXXXXXXX

Received on XXXXX; revised on XXXXX; accepted on XXXXX

#### Abstract

**Motivation:** JCalc is a python module to calculate vicinal coupling constants ( $^3J$ ) derived from 3D structures of organic compounds, including molecular dynamics simulations, as a tool to validate molecular models and methods in comparison to experimental results from NMR, including the development and validation of new force fields. It has full compatibility with GROMACS output and its most used force fields, such as GROMOS, AMBER and CHARMM, while also accepting the Protein Data Bank (PDB) format.

**Results:** JCalc was able to predict  $^3J$  values for different pyranoses through molecular dynamics, helping to validate force field topologies with experimental data from NMR.

**Availability:** JCalc is free to use, available at <https://github.com/JoaoDemeirelles/jcalc>.

**Contact:** [jldemeirelles@gmail.com](mailto:jldemeirelles@gmail.com)

**Supplementary information:** Supplementary data are available at *Bioinformatics* online.

#### 1 Introduction

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy is one of the most analytical methodologies applied in the identification of biological or synthetic compounds, as well as in the analysis of the structural configuration and different conformations that those kind of chemical molecules can adopt. This method can provide a deep insight into the dynamical aspects of three dimensional structures (Palmer *et al.*, 1996).

The characterization of monosaccharides, including the information related to relative proportions and absolute configuration, can be performed using  $^1H$  NMR spectroscopy. The determination of this type of chemical compounds can also be done by applying chiral monosaccharide derivatives through the observation of chemical shifts and vicinal coupling patterns of the different spin of the atoms that compose each torsional of the molecule under study (Hall, 1964; Bianchi and Bauer, 2011).

The interaction between neighboring protons creates a phenomena called the spin-spin coupling effect. This effect can be measured into a coupling constant, abbreviated to  $J$ , which is the difference expressed in Hz between two adjacent sub-peaks in a split signal (Balci, 2005).  $J$  values are numerated by number of bonds between neighboring protons, such as coupling over one ( $^1J$ ), two ( $^2J$ ) and three ( $^3J$ ) bonds. The most useful coupling effect to the study and determination of monosaccharides, is the one observed between three bonds coupling, also known as vicinal proton

coupling ( $^3J$ ), retaining information about spacial orientation between the two protons (Coxon, 2009).

Martin Karplus established a relationship between the torsional angles of vicinal hydrogens of a given molecule and its constant  $^3J_{H,H}$  which represents the measure that explains the spin-spin interaction event between two neighboring hydrogen protons. Based on the observation that  $^3J$  values will be maximal when the fragment dihedral angle is  $180^\circ$  and  $0^\circ$ , while being minimal when the angle is  $90^\circ$ , Karplus (Karplus, 1959) developed an equation to predict  $^3J_{H,H}$  values, which is based on the direct correlation between the coupling constants obtained by NMR experiments and the dihedral angles of each coupled hydrogen protons (Coxon, 2009):

$$^3J_{H,H} = 8.5 \cos^2\phi - 0.28 \text{ for } 0^\circ \leq \phi \leq 90^\circ \text{ and } 9.5 \cos^2\phi - 0.28 \text{ for } 90^\circ \leq \phi \leq 180^\circ,$$

with  $\phi$  representing the torsion angle between the coupled atoms.

Most of the studies related to the obtaining of coupling constants from different compounds are still exclusively in experimental the sphere. In this work, we present JCalc: a tool developed with the aim to calculate, with an *in silico* methodology, the vicinal coupling constant values from biomolecules, in a faster and simpler way, that shows the ability to obtain values approximated to the experimental NMR data. The validation of the tool was made by molecular dynamics of monosaccharides whom experimental J vicinal coupling constants were available in the literature.

## 2 Approach

JCalc is a terminal-based software. The algorithm starts with a trajectory file, such as GROMACS (Van Der Spoel *et al.*, 2005) XTC file, or a directory with frames as PDB files. To calculate  ${}^3J_{H,H}$  values from molecular dynamics frames, the Haasnoot-Altona (Haasnoot *et al.*, 1980) equation is used:

$$\sum_{i=1}^I j_o^{-1} \cdot {}^3J_{H,H} = 13.86 \cos^2 \phi - 0.81 \cos \phi + \Delta\chi_i [0.56 - 2.32 \cos^2 (\xi_i \phi_o^{-1} \phi + 17.9 |\Delta\chi_i|)],$$

where  $j_o^{-1} = 1 \text{ Hz}$ ,  $\phi_o = 1^\circ$ ,  $\phi$  is the dihedral angle between coupled hydrogens,  $I$  is the number of substituents from the torsional fragment H-C-C-H,  $\Delta\chi_i = \chi_i - \chi_H$ , being  $\chi_i$  the Huggins electronegativity constant (Huggins, 1953) from atom  $i$  and  $\xi_i$  is the opposite signal from H'-C-C-S<sub>i</sub> dihedral angle fragment.

The electronegativity constants and Haasnoot-Altona equations can be changed from default values.

## 3 Methods

### 3.1 JCalc installation

Installation guide, illustrative examples and tutorials are available at the public github repository: <https://github.com/Joaoedemeirelles/jcalc>. A general workflow of the tool is represented at Supplementary Figure 1.

### 3.2 Input preparation

JCalc accepts, as input, frames from a molecular dynamics simulation and an index file. Frames from the simulation can be obtained using the `gmx trjconv` command and, in case of an united atom force field trajectory, the apolar hydrogen atoms can be add with OpenBabel (O'Boyle *et al.*, 2011). In the index file, each line will contain the number of the four atoms of the dihedral angles that will be analyzed.

### 3.3 Program outputs

To each J value input, the program will create a text file with the calculated J values in each frame. A text file will store the mean J value found through the trajectory. The fluctuation of the J coupling values for each dihedral will be in the outputs as TSV files.

## 4 Discussion

To validate the tool, we calculated  ${}^3J_{H,H}$  values from different carbohydrates simulations, which are significant for the comprehension of biological phenomena and/or pharmaceutical applications with available NMR data on literature (Coxon, 1983; Snyder *et al.*, 1989). To test which torsional parameter is closest to the empirical data (NMR), calculations were made with JCalc by applying different dihedral torsional constants (K). Table 1 shows  $\alpha$ -D-Glucose data for different torsional parameters.

Due to their flexibility in solution, the determination of torsional parameters for pyranose rings can be challenging. Although, NMR data offers a safe and well established method to study those dihedrals. Glucose is one of the monosaccharides most found in nature. In both  $\alpha$  and  $\beta$  configurations, glucose rings in solution are characterized by a high ring pucker interconversion, and different states on their enthalpy landscapes (Mayes *et al.*, 2014).

Despite this structural instability, the  ${}^3J_{H,H}$  values obtained by the calculations based on Haasnoot-Altona equation (Table 2) were capable to get close to the values observed on NMR data available on the literature, even on the glucose's  $\beta$  configuration, which is the one with the highest levels of interconversions.

Molecular dynamics were carried out using GROMACS 5.1.4 (Bekker *et al.*, 1993). To represent the carbohydrates, the GROMOS 53A6GLYC (Pol-Fachin *et al.*, 2012) force field was used. The  ${}^3J_{H,H}$  values from these trajectories were calculated using Jcalc. With the coupling values from the trajectory, we can compare the force field representation of the structural behavior with the results from NMR data. This enables the validation of the force field parameters with empirical data.

Table 1. Calculated  ${}^3J_{H,H}$  for different dihedral torsional constants (K) of  $\alpha$ -D-Glucose.

K	${}^3J_{1,2}$		${}^3J_{2,3}$		${}^3J_{3,4}$		${}^3J_{4,5}$		${}^3J_{5,6}$	
	exp	calc	exp	calc	exp	calc	exp	calc	exp	calc
0.1	3.6	3.9	9.7	9.9	8.7	9.9	9.7	9.5	2.3/5.0	3.7/5.2
0.13	3.6	3.9	9.7	9.9	8.7	9.9	9.7	9.5	2.3/5.0	3.7/5.1
0.17	3.6	3.8	9.7	9.8	8.7	9.7	9.7	9.3	2.3/5.0	3.6/5.3
0.25	3.6	3.7	9.7	9.1	8.7	9.0	9.7	8.4	2.3/5.0	3.5/5.9
0.5	3.6	2.6	9.7	4.7	8.7	4	9.7	2.0	2.3/5.0	2.5/10.0
1.0	3.6	2.6	9.7	4.9	8.7	4.5	9.7	2.4	2.3/5.0	2.7/10.0

Talose, when in comparison with another hexopyranoses, is known as the monosaccharide with the major capability of disrupt the structure of the water of solvation (Abraham *et al.*, 2021). Another important characteristic of this pyranose is that, in both  $\alpha$  and  $\beta$  configurations, the talose anomers show conformational similarity, which was revealed by NMR experimental data (Snyder *et al.*, 1989).

Table 2. Experimental and calculated  ${}^3J_{H,H}$  values for D-Glucose e D-Talose  $\alpha$  and  $\beta$  anomers.

Res	${}^3J_{1,2}$		${}^3J_{2,3}$		${}^3J_{3,4}$		${}^3J_{4,5}$		${}^3J_{5,6}$	
	exp	calc	exp	calc	exp	calc	exp	calc	exp	calc
$\alpha$ -D-Glc	3.6	3.7	9.7	10	8.7	10	9.7	9.6	2.3/5.0	3.6/5.3
$\beta$ -D-Glc	7.7	8.5	8.9	10	8.5	10	9.4	9.6	2.2/5.9	3.5/5.5
$\alpha$ -D-Tal	1.9	3.4	3.2	2.7	3.2	2.6	1.3	1.7	4.5/7.6	4.6/6.0
$\beta$ -D-Tal	1.2	2.6	3.2	2.7	3.3	2.7	1.2	1.7	4.4/7.8	4.8/6.0

The  ${}^3J_{H,H}$  results obtained by JCalc could reproduce the characteristic conformational similarity of talose anomers, but the values observed in the J vicinal coupling calculations for the torsionals of talose are a reflection of the solvent disruption effect promoted by those molecules, which added to the reactivity of the anomeric and the primary hydroxyls (Marchiori, 2018), results in the higher standard deviation observed (Supplementary Table 1), mostly in the dihedrals formed by C1 and C6.

JCalc could with the time of simulation of only 1  $\mu\text{s}$  obtain  ${}^3J_{H,H}$  vicinal coupling constants with values close to the experimental NMR data available at the literature. For better describing torsionals involving the most reactive hydroxyls and torsionals of the most unstable and reactive pyranoses as well, the time of the molecular dynamics simulations will be increased.

## 5 Conclusion

Jcalc attends to the need of a tool that can, in a short time, promote the *in silico* validation of carbohydrate molecular dynamics data, through the possibility of studying an experimentally established parameter.



Furthermore, it consists of a tool based on command lines, easy to install, requiring little computational performance and presenting the accuracy of a tool calibrated with the Karplus equation.

## Funding

This work has been supported by CAPES and CNPq.

## References

- Abraham, R. J. *et al.* (2021). The use of mm/qm calculations of  $^{13}\text{C}$  chemical shifts in the conformational analysis of some monosaccharides and sucrose. *New Journal of Chemistry*, **45**(4), 2001–2009.
- Balci, M. (2005). *Basic  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy*. Elsevier.
- Bekker, H. *et al.* (1993). Gromacs-a parallel computer for molecular-dynamics simulations. In *4th International Conference on Computational Physics (PC 92)*, pages 252–256. World Scientific Publishing.
- Bianchi, T. and Bauer, J. (2011). 5.03–particulate organic carbon cycling and transformation. *Treatise on estuarine and coastal science*, **5**, 69–117.
- Coxon, B. (1983). Two-dimensional j-resolved proton nuclear magnetic resonance spectrometry of hydroxyl-coupled.  $\alpha$ - and  $\beta$ -d-glucose. *Analytical Chemistry*, **55**(14), 2361–2366.
- Coxon, B. (2009). Developments in the karplus equation as they relate to the nmr coupling constants of carbohydrates. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, **62**, 17–82.
- Haasnoot, C. A. *et al.* (1980). The relationship between proton-proton NMR coupling constants and substituent electronegativities-I. An empirical generalization of the karplus equation. *Tetrahedron*, **36**(19), 2783–2792.
- Hall, L. (1964). Nuclear magnetic resonance. *Advances in carbohydrate chemistry*, **19**, 51–93.
- Huggins, M. L. (1953). Bond energies and polarities. *Journal of the American Chemical Society*, **75**(17), 4123–4126.
- Karplus, M. (1959). Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments. *The Journal of Chemical Physics*, **30**(1), 11–15.
- Marchiori, M. F. (2018). *Síntese de glicopeptídeo de mucina, contendo análogo de antígeno tumoral, com possíveis aplicações terapêuticas em câncer*. Ph.D. thesis, Universidade de São Paulo.
- Mayes, H. B. *et al.* (2014). How sugars pucker: electronic structure calculations map the kinetic landscape of five biologically paramount monosaccharides and their implications for enzymatic catalysis. *Journal of the American Chemical Society*, **136**(3), 1008–1022.
- O’Boyle, N. M. *et al.* (2011). Open babel: An open chemical toolbox. *Journal of cheminformatics*, **3**(1), 1–14.
- Palmer, A. G. *et al.* (1996). Nuclear magnetic resonance studies of biopolymer dynamics. *Journal of Physical Chemistry*, **100**(31), 13293–13310.
- Pol-Fachin, L. *et al.* (2012). Gromos 53a6glyc, an improved gromos force field for hexopyranose-based carbohydrates. *Journal of chemical theory and computation*, **8**(11), 4681–4690.
- Snyder, J. R. *et al.* (1989). D-talose anomerization: Nmr methods to evaluate the reaction kinetics. *Journal of the American Chemical Society*, **111**(7), 2681–2687.
- Van Der Spoel, D. *et al.* (2005). GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, **26**(16), 1701–1718.

# JCalc: A python module for vicinal coupling constants calculation from molecular dynamic

Supplementary Material

Brisa Raíssa Bartellt Godoy, João Luiz de Meirelles, Hugo Verli

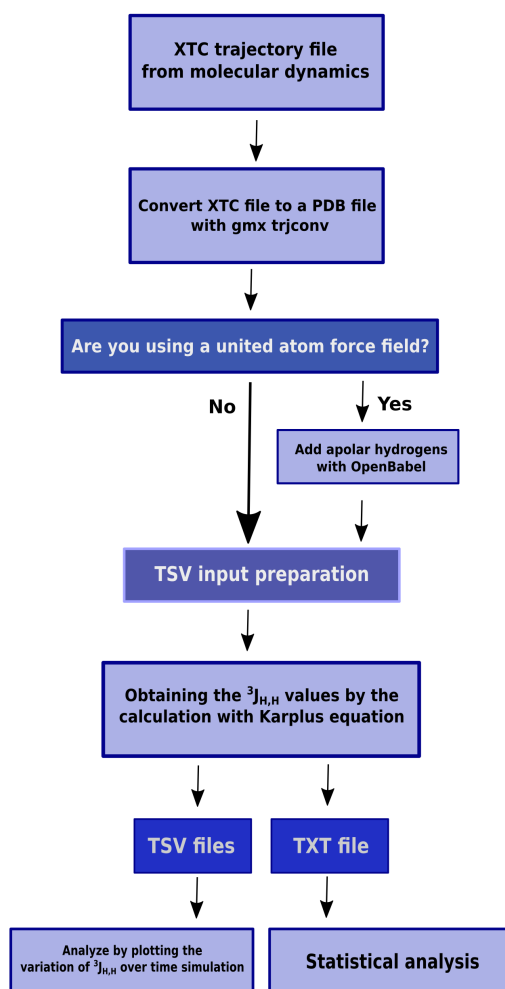


Figure S1: JCalc general workflow.

Res	${}^3J_{1,2}$		${}^3J_{2,3}$		${}^3J_{3,4}$		${}^3J_{4,5}$		${}^3J_{5,6}$	
	exp	calc	exp	calc	exp	calc	exp	calc	exp	calc
$\alpha$ -D-Glc	3.6	$3.7 \pm 0.64$	9.7	$10 \pm 0.13$	8.7	$10 \pm 0.13$	9.7	$9.6 \pm 0.08$	2.3/5.0	$3.6/5.3 \pm 1.21/4.02$
$\beta$ -D-Glc	7.7	$8.5 \pm 0.08$	8.9	$10 \pm 0.12$	8.5	$10 \pm 0.13$	9.4	$9.6 \pm 0.08$	2.2/5.9	$3.5/5.5 \pm 1.21/4.04$
$\alpha$ -D-Tal	1.9	$3.4 \pm 0.82$	3.2	$2.7 \pm 0.58$	3.2	$2.6 \pm 0.54$	1.3	$1.7 \pm 0.82$	4.5/7.6	$4.6/6.0 \pm 2.99/3.95$
$\beta$ -D-Tal	1.2	$2.6 \pm 0.78$	3.2	$2.7 \pm 0.56$	3.3	$2.7 \pm 0.54$	1.2	$1.7 \pm 0.86$	4.4/7.8	$4.8/6.0 \pm 3.13/3.92$

Table S1: Experimental, calculated  ${}^3J_{H,H}$  for D-Glucose and D-Talose anomers and standard deviation values.

## 4.2 Capítulo II: *Molecular modeling of novel sialic acids*

### **Molecular modeling of novel sialic acids**

Brisa Raíssa Bartellt Godoy,\* João Luiz de Meirelles, Laís Bath Arend, and

Hugo Verli\*

*Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil*

E-mail: [brisabartellt@hotmail.com](mailto:brisabartellt@hotmail.com); [hugoverli@gmail.com](mailto:hugoverli@gmail.com)

#### **Abstract**

Sialic acids (Sias) are  $\alpha$ -keto acids which are impressive for the ability of carrying different molecular groups in a single monosaccharide, being subject to several modifications and resulting in a structurally diverse family of more than 50 carbohydrates. This structural diversity of Sias is what makes these molecules capable of playing important modulatory and structural roles in cell biology and pathology. The study of the structure of sialic acids can be done through the molecular modeling of these structures with molecular mechanics methodologies, such as molecular dynamics (MD) and metadynamics. In this work we aimed, using MD and metadynamics simulations, to establish parameters that describe the pseudo-rotational equilibrium of the conformational ensemble of Sias. The validation of the parameters applied to the monosaccharides was done with calculations of J vicinal coupling of the monomers that constitute the structural basis of the sialic acids, which showed values close to experimental data. The conformational variation of glycosidic bonds between disaccharides was described by well-tempered metadynamic simulations. Furthermore, the preferred conformations adopted by the torsional angles that compose the glycosidics of a polysialic acid were determined through the analysis of molecular dynamics trajectories. Therefore, from the results obtained, it was possible to establish parameters that enable the study and

modeling of carbohydrates of different levels of structural complexity of the sialic acid family with the GROMOS 53A6<sub>GLYC</sub> force field parameters set.

## Introduction

Discovered in the lineage of Deuterostomes, sialic acids (Sias) are  $\alpha$ -keto acids that belong to an ancient family of carbohydrates named nonulosonic acids. Unlike the other sugars found in glycan chains of vertebrate glycoconjugates, that are composed of five- and six-carbons, the Sias family has a characteristic nine-carbon backbone and is impressive for the number of components that can be found in one molecule, including a 3-carbon exocyclic side chain, one or more acylated amino groups and a carboxylic acid.<sup>1</sup>

Due to their ability of carrying different molecular groups in a single monosaccharide, Sias are subject to several modifications, resulting in a structurally diverse family of more than 50 carbohydrates, that can be found frequently linked via their C-2 anomeric carbon in  $\alpha$ -configuration to the C-6 of N-acetylgalactosamine, building the precursors of gangliosides, to the C-3 or C-6 positions of a galactose or to another sialic acid at the positions of carbons 8 or 9.<sup>2,3</sup>

The structural diversity of Sias, found linked as monomers or polymers present in various complex carbohydrates of different organisms, is what makes these molecules capable of playing important modulatory and structural roles in cell biology and pathology, including blood cell charge repulsion and neural plasticity. Mostly located at the surface of cell membranes, Sias are molecules with characteristic hydrophilicity and negative charge, being capable of acting like components of binding sites for intrinsic receptors, as siglecs, factor H or selectins, also as extrinsic receptors for many pathogens and toxins, such as cholera toxin, Influenza viruses, rotavirus and coronavirus.<sup>3-5</sup>

The study of the structure of sialic acids and their biological role can be done through the molecular modeling of these structures. Because of their flexibility, complex carbohydrates

adopt different conformations in solution, representing a challenging class of molecules in terms of describing their 3D structures through computational methods. Molecular dynamics (MD) is a computational method that describes the variation of the molecular behavior as a function of the time, which approximates MD to experimental methods, such as nuclear magnetic resonance.<sup>6,7</sup> While MD configures an example of methodology that is usually unbiased, metadynamics involves the use of a biased potential that can force the system to leave a local minima and sample states that represent lower probabilities.<sup>8</sup> In this work, we applied GROMOS 53A6<sub>GLYC</sub> parameters for sialic acids and performed molecular mechanics simulations to describe the pseudo-rotational equilibrium of sialic acids and to evaluate the conformational behavior of these carbohydrates in solution, what can be one key to understand the plethora of activities performed by this biomolecules.

## Results and discussion

### Outline

In the present work, the study of sialic acids of different levels of structural complexity was performed and, with the aim to parametrize the pseudo-rotational equilibrium of this family of molecules, molecular mechanics methodologies were applied. Topologies were constructed for 12 monosaccharides, 4 disaccharides and a polysaccharide. The conformational ensemble was obtained by applying the parameters available at the force field GROMOS 53A6<sub>GLYC</sub>.<sup>9</sup>

All molecules were submitted to molecular dynamics calculations of 1  $\mu$ s, carried out with GROMACS 5.1.4. To obtain free energy landscapes of the conformational space over simulation time, 100 ns well-tempered metadynamics calculations of the disaccharides were performed with PLUMED 2.5.1.<sup>10</sup> To test and validate the GROMOS 53A6<sub>GLYC</sub> parameters for sialic acids, J vicinal coupling constants of the torsional angles of the pyranose rings were calculated with the Karplus equation.<sup>11</sup> The dihedral distribution and the relevant conformations observed in the glycosidic linkages of the polysialic acid were obtained by

the analysis of the molecular dynamics trajectory with ConfID,<sup>12</sup> and the conformational distribution was analyzed by networks plotted with Cytoscape 3.9.0.<sup>13</sup>

## Monosaccharides analysis

The Sias are present in nature, mainly, in their monomeric form. Thus, the conformational study of the rings of these pyranoses was made because, from the understanding of the conformations of monosaccharides in solution, it is possible to have relevant information about the stereochemistry of chemical reactions and properties. Also, the plethora of biological functions and activities performed by these macromolecules can be understood, since it is these conformations, as well as the variety of exocyclic groups associated with these structures, the main reason why this molecular family plays so many different roles.<sup>14,15</sup>

In order to implement and validate the GROMOS 53A6<sub>GLYC</sub> force field parameters for sialic acids, topologies were constructed for 12 monosaccharides of this family of molecules, using as base the parameters described for monosaccharides by Pol-Fachin et al.<sup>9</sup> and for  $\alpha$ -Neu5Ac by Ligabue-Braun et al.<sup>16</sup> The charges and torsional parameters for exocyclic groups containing sulfates and phosphates were applied as the parameters proposed for oligosaccharides containing those groups, by Arantes et al.<sup>17</sup> Due to the fact that 1  $\mu$ s is a well established simulation time<sup>9,18</sup> for the observation of the molecular behavior and the conformational states of carbohydrates with the GROMOS 53A6<sub>GLYC</sub> parameters set, that simulation time was applied to each molecular dynamics calculation.

The molecules to be studied were chosen according to their structural diversity and biological relevance, described in the work of Angata and Varki.<sup>1</sup> The diversity of exocyclic groups that sialic acids can carry in one monosaccharide was explored to study the effect of the variation of those chemical groups in the conformation of the ring pucker.

The rigidity and stability of pyranose rings, when in solution, are characteristics commonly observed in that type of chemical compounds.<sup>19</sup> As observed by Ligabue-Braun et al.,<sup>16</sup> the  $\alpha$ -Neu5Ac pyranose ring has a preferential ring pucker conformation at  $\theta =$

180°. In this work, this behavior was replicated, not only in  $\alpha$ -Neu5Ac pyranose ring, but also in most of the other monosaccharide rings analyzed (Supplementary Figure 1).

$\alpha$ -Neu5,9Ac<sub>2</sub> was the only monosaccharide that showed a transition in the conformational state, being in the <sup>5</sup>C<sub>2</sub> puckering conformation at the beginning of the simulation, but quickly returning to the <sup>2</sup>C<sub>5</sub> conformational state, which was shown to be the preferential conformation for the other sialic acids. Acetyltions in glycans increase the molecular hydrophobicity.<sup>20</sup> Due to the acetylations at the carbons C5 and C9, the presence of one more acetyl group could lead to more hydrophobic interactions between these acetyl groups and the solvent, which can contribute to a conformational instability of the ring, resulting in the observation of a transitional state. The Figure 1 shows a representation of 3 ring pucker analyzed, between the 12 monosaccharides parametrized, showing the analysis of XTC trajectory files obtained by 1  $\mu$ s molecular dynamics calculations.

### <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> vicinal coupling calculations

To validate the results obtained by molecular dynamics, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> calculations were made based on the empirical generalization of the Karplus<sup>11</sup> equation, proposed by<sup>21</sup> (1), which establishes a correlation between the vicinal coupling constants obtained from NMR experiments and the torsionals of the coupled hydrogen protons. Where  $j_o^{-1} = 1$  Hz,  $\phi_o = 1^\circ$ ,  $\phi$  the dihedral angle between the coupled hydrogens,  $I$  corresponds to the number of substituents of the molecular fragment H-C-C-H,  $\Delta\chi_i = \chi_i - \chi_H$ , where  $\chi_i$  is the Huggins electronegativity constant<sup>22</sup> for the atom  $i$  and  $\xi_i$  is the opposite sign atom of the torsional fragment H'-C-C-S<sub>*i*</sub>:<sup>23</sup>

$$j_o^{-1} \cdot {}^3J_{H,H} = 13.86\cos^2\phi - 0.81\cos\phi + \sum_{i=1}^I \Delta\chi_i [0.56 - 2.32\cos^2(\xi_i\phi_o^{-1}\phi + 17.9|\Delta\chi_i|)] \quad (1)$$

The Table 1 shows <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> values from experimental NMR data<sup>24</sup> and the calculated ones, specifically the J vicinal coupling values related to the ring dihedrals, which are the main interest of this work.



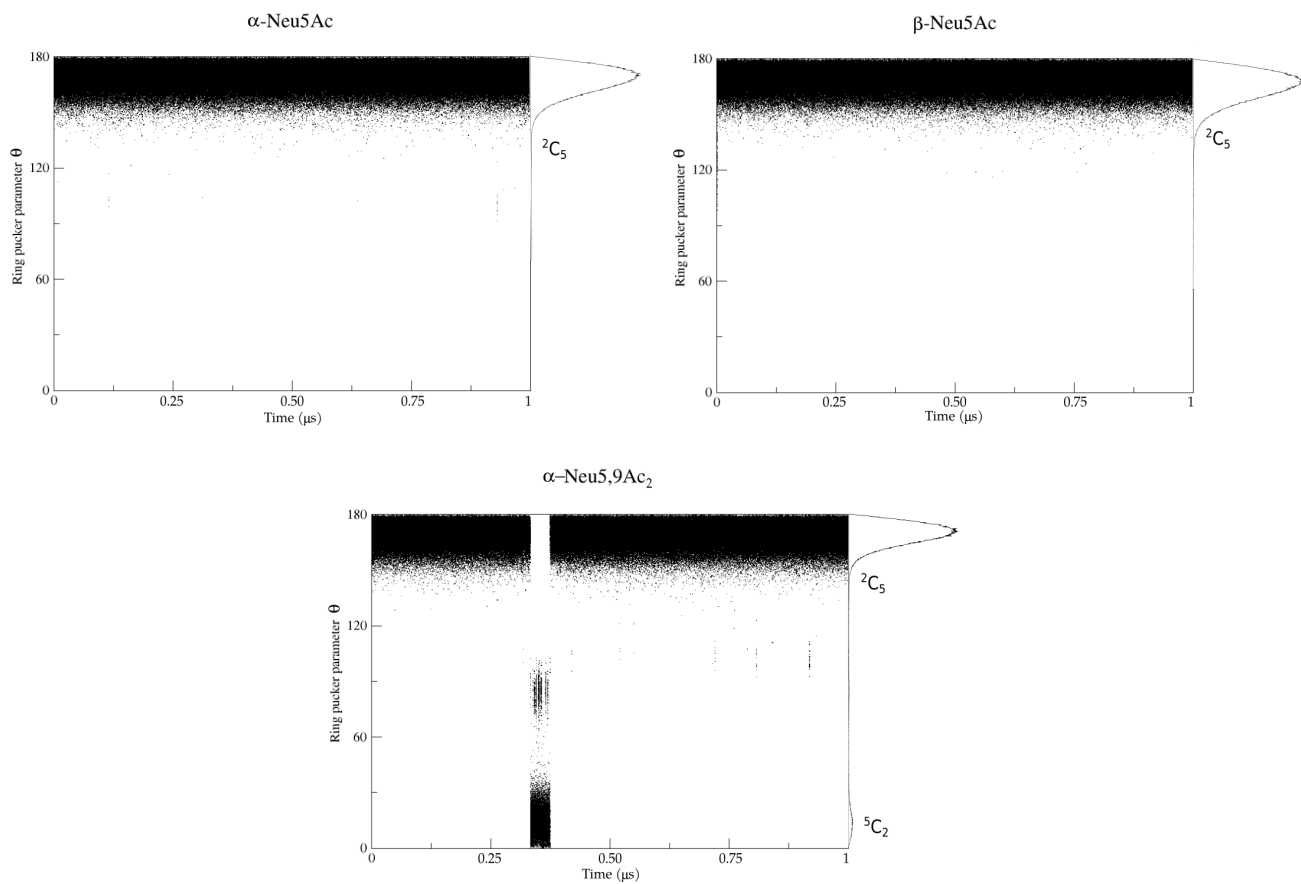


Figure 1: Analysis of the ring pucker parameter  $\theta$  for different sialic acids pyranose rings.

Table 1: Experimental and calculated  ${}^3J_{H,H}$  values for Neu5Ac  $\alpha$  and  $\beta$  anomers.

Res	${}^3J_{3,4}$		${}^3J_{4,5}$		${}^3J_{5,6}$		${}^3J_{6,7}$	
	exp	calc	exp	calc	exp	calc	exp	calc
$\alpha$ -D-Neu5Ac	11.5/4.5	$8.36/5.23 \pm 4.55/4.56$	-	$10 \pm 0.35$	10.5	$10 \pm 0.13$	1.5	$2.5 \pm 3.2$
$\beta$ -D-Neu5Ac	11.8/5	$10.4/5 \pm 2.3/3$	10.4	$10 \pm 0.16$	10.7	$10 \pm 0.31$	1.2	$1.7 \pm 0.79$

The values with the lowest standard deviation and more close to the experimental values were  ${}^3J_{4,5}$  and  ${}^3J_{5,6}$  in the  $\alpha$ -D-Neu5Ac, and  ${}^3J_{4,5}$ ,  ${}^3J_{5,6}$  and  ${}^3J_{6,7}$  in the  $\beta$ -D-Neu5Ac. The analyzed torsional which was the closest to the carboxyl group ring were  ${}^3J_{4,5}$  and related to the higher standard deviation values observed. The results suggest that the molecular dynamics was able to describe most of the conformations of the pyranose dihedrals, but also that the proximity to the exocyclic carboxyl acid, could interfere in the flexibility of the torsional angles, reinforcing this characteristic.

## Free-energy landscapes of disaccharides

Metadynamics simulations were applied in order to reproduce the conformations and to describe the behaviour of the unusual glycosidic linkages observed in the glycans of the sialic acids family, including the linkages between two sialic acids or a sialic acid and a galactose.

In the glycosidic linkage Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 3)Gal (Figure 3A), it was observed a higher energy barrier when in comparison with the other energy maps, what can be directly associated to the proximity of the carboxyl acid group of the C1 and to the glycosidic linkage atoms. The linkage Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 4)Gal (Figure 3B), as expected for a dihedral angle more distant do the carboxyl exocyclic group, showed more free energy minima, when compared to  $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 3).

The glycosidic linkage Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 6)Gal showed only two main energy minima in the analysis of the  $\phi$ - $\psi$  linkage, and the double of energy minima in the analysis of its  $\phi$ - $\omega$  linkage. That change in the energetic behavior observed in the same glycosidic linkage leads not only to the fact that this type of torsional angle is generally flexible, but it also reflects a tendency of the hydroxyl group linked to the C6 of the galactose, which is usually one of the most reactive hydroxyls of pyranoses.<sup>25</sup>

In the Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac linkage, we obtained the maps with the lower energy barriers, as a reflection of the more distal position of this glycosidic linkage in relation of the pyranose ring and, consequently, of the carboxyl group. Due to its location at the lateral carbon exocyclic chain, the torsional angles are characterized by a more flexible conformational

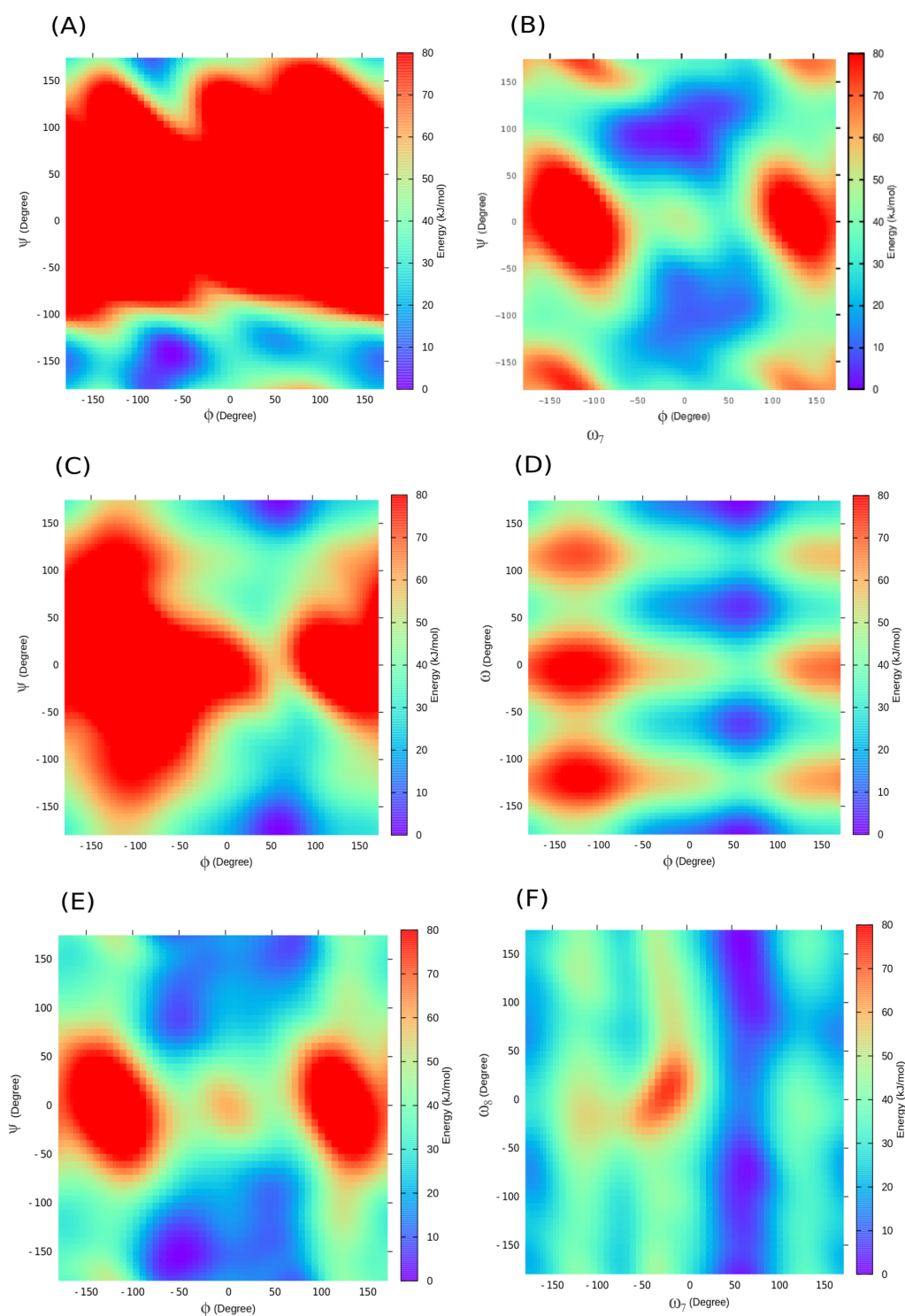


Figure 2: Energy landscapes obtained by well-tempered metadynamics simulations.

behavior, in comparison with the other dihedral angles analyzed in the unusual glycosidic linkages parametrized in this work. The calculated errors of the collective variables of each system remained in only 2% of the value of the barriers.

## Polysialic acid analysis

Aiming to observe the main conformations adopted by the polysialic acid, analysis of its glycosidic linkages  $\phi$ ,  $\psi$ ,  $\omega_7$  and  $\omega_8$  were performed with ConfID.<sup>12</sup> For analysis purposes, due to its high flexibility, the molecule was divided in 6 different disaccharides, and the analysis was made for each glycosidic linkage between these fragments, resulting in the study of 24 torsional angles.

The first two disaccharides analyzed by ConfID (Figure 3), showed preferential conformations at the torsional angle Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac  $\omega_7$ , representing 50% at the first network (Figure 3A) and 66% at the second network (Figure 3B). The second, of the four preferential conformations adopted by these fragments of the heptasialic acid, is related to the Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac glycosidic  $\phi$  angle, being 38% and 27% of the preferential conformations of the first and second fragments analyzed, respectively.

The networks of the two fragments farthest from the most external portions of the polysaccharide showed a higher number of possible conformations. Even with a more flexible conformational behavior, these two glycosidic linkages showed as preferential conformations the same angles as the two fragments analyzed at first, with Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac  $\omega_7$  and Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac  $\phi$  representing, respectively, 69% and 60% in the network (Figure 3C) and 17% and 15% at the network (Figure 3D).

In the last two fragments analyzed, a more rigid behavior was observed. This is in agreement with the low number of conformational states demonstrated in the first two analyzed disaccharides, which are also found in the outermost portions of the molecule. These linkages repeated the preferential torsional angles of the another analysis, where  $\omega_7$  corresponds to 74% (Figure 3E) and 58% (Figure 3F), and  $\phi$  to 22% (Figure 3E) and 38% (Figure 3F). The

distribution of the average angles of each dihedral analyzed is represented in the Figure 4.

## Experimental

### Obtaining the tree-dimensional structures of glycans

The construction of the 3D structures was made using as a model structure, a  $\alpha$ -D-Neu5Ac complexed with a Sia binding protein from *Pasturella Multocida*.<sup>26</sup> The heptasialic acid structure was obtained from a PDB file,<sup>27</sup> complexed with an anti-polysialic acid antibody.  $\alpha$ -D-Neu5Ac and heptasialic acids structures were removed from its protein-ligand complexes with PyMOL 2.5.1 (Schrödinger Release 2020-4, 2020). The structural modifications that are incumbent to the other Sias analyzed in this work, were carried out with Avogadro 1.93.0<sup>28</sup> and PyMOL 2.5.1 tools. At first, the exocyclic groups were added by using Avogadro, and then, the non-polar hydrogens were removed with PyMOL.

### Topologies building

The topologies were built with the GROMOS53A6<sub>GLYC</sub><sup>9</sup> force field parameters set for carbohydrates, combined to the topology constructed by Ligabue-Braun et al.<sup>16</sup> for the  $\alpha$ -Neu5Ac. Parameters for sulfates and fosfates were used as the topologies proposed by Arantes et al.<sup>17</sup>.

### Molecular dynamics protocol

In order to obtain the trajectory of the molecular behavior as a function of time, the sialic acids systems were submitted to MD simulations with the GROMACS 5.1.4<sup>29</sup> suite for 1  $\mu$ s each. In this study, the ensemble of physicochemical parameters applied to the description of the molecules was given by the GROMOS53A6<sub>GLYC</sub><sup>9,30</sup> force field, that was previously developed by our group.

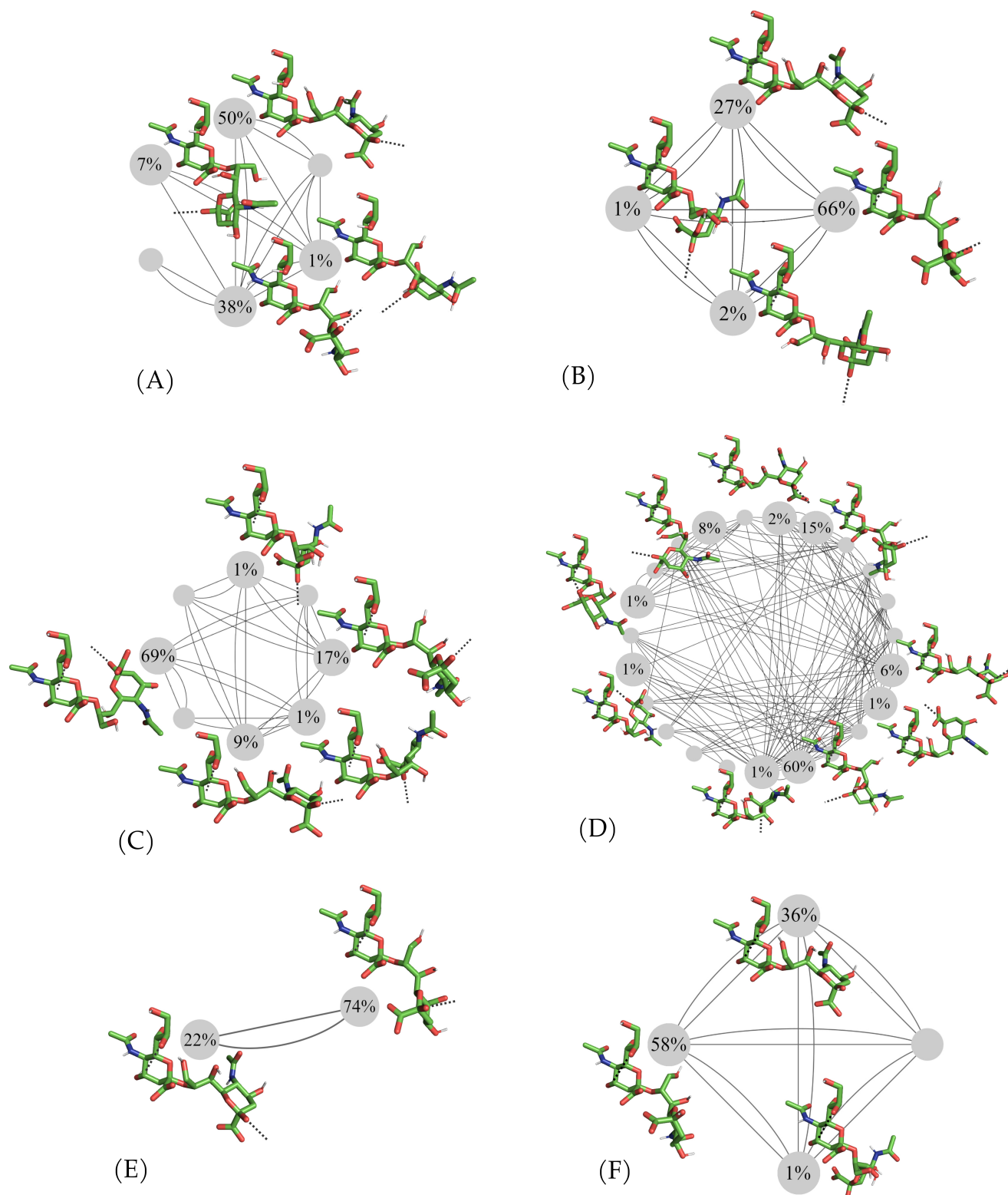


Figure 3: Networks representing the most representative preferential conformations adopted by the different torsional angles that compound the heptasialic acid glycosidic bonds.

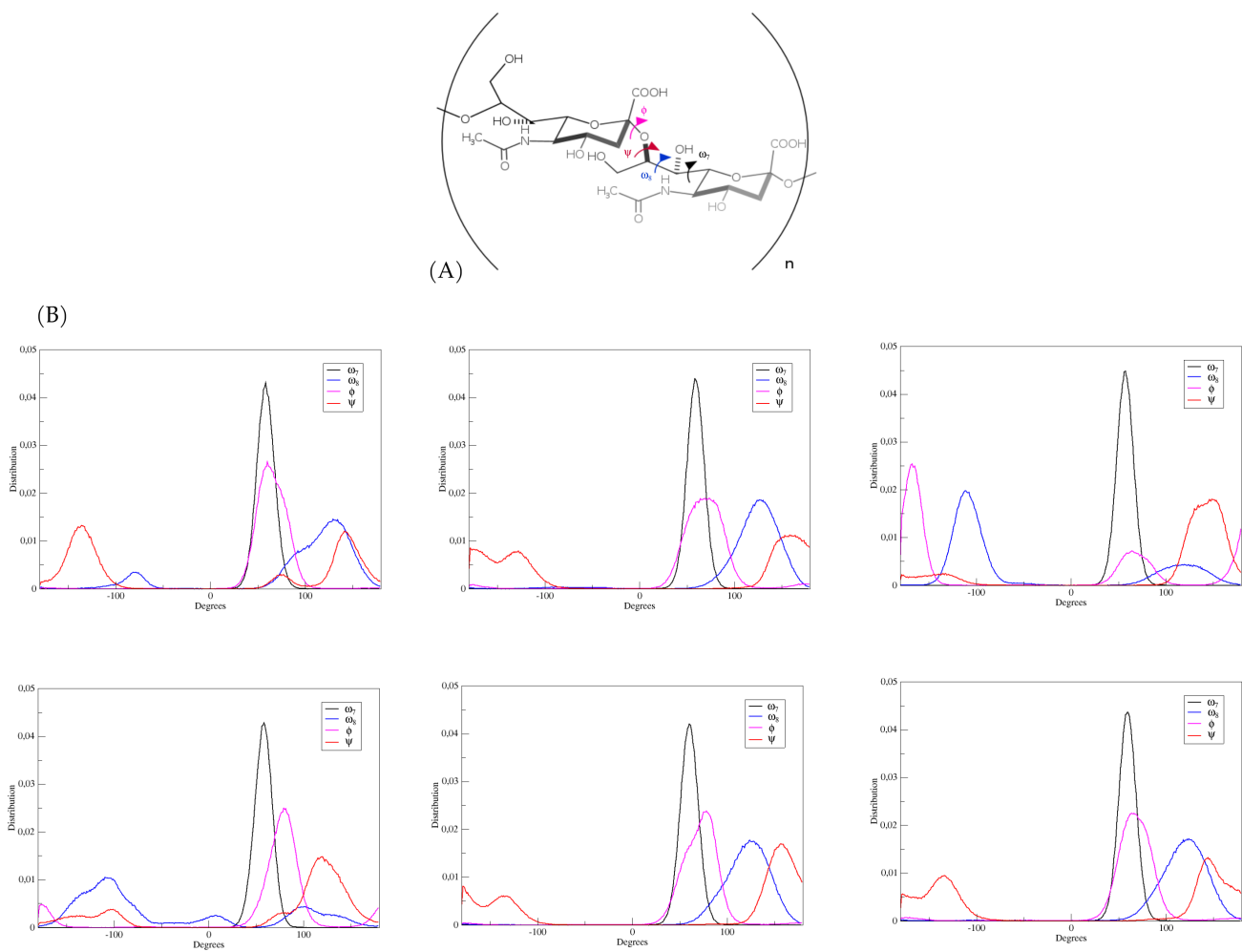


Figure 4: Dihedral distribution of each analyzed fragment of heptasialic acid. (A) 2D representation of the disaccharide fragments analyzed, with the torsional angles  $\phi$ ,  $\psi$ ,  $\omega_7$  and  $\omega_8$  indicated, with  $n = 7$ ; (B) Graphical representation of the dihedral distribution, displayed in the order of the network analysis.

The solvation of the systems was performed in cubic boxes using periodic boundary conditions and the water model used was SPC/E. Covalent bond lengths were constrained with the PME electrostatic treatment through LINCS algorithm, and the initial energy minimization was done until the difference between two steps was negligible, using Steepest Descent algorithm with an integration step of 2 fs.

The systems temperature and pressure were kept constant, with 1 bar of pressure using Parrinello-Rahman barostat<sup>31</sup> and the temperature of 298 K, using V-rescale thermostat.<sup>32</sup> Due to the low molecular mass and volume of structures such as monosaccharides and disaccharides, it was not necessary to apply equilibration steps to adjust the temperature, density and pressure of these systems. For the heptasialic acid equilibration, at first, a 1 ns simulation with a canonical ensemble (NVT) was performed to adjust the system temperature and 4 steps with an isobaric-isothermal ensemble (NPT), each step also at 1 ns, to promote the adjustment of density and pressure of the system, whose restraining forces were applied ranging from  $5 \times 10^3$  to 0 kJ/mol.

The validation of the method was performed through the calculation of the vicinal coupling constant  $^3J_{H,H}$ , by the application of the Haasnoot et al.<sup>21</sup> equation, of the two main components of the Sias, which were the only two residues we found NMR experimental data available in the literature. The accuracy of the calculations was measured by the standard deviation between calculated and experimental J vicinal values.

## Metadynamics settings

Well-tempered metadynamics simulations were performed using the GROMACS 5.1.4 suite and the force field GROMOS53A6<sub>GLYC</sub> with the PLUMED 2.5.1<sup>33</sup> library. Cubic simulation boxes were solvated using the SPC/E water model<sup>34</sup> in the presence of periodic boundary conditions. The energy minimization was performed by the Steepest Descent algorithm and the covalent bond lengths were constrained by the LINCS method,<sup>35</sup> allowing a 2 fs integration step.



The collective variables (CVs) applied as the metadynamics bias for the disaccharides calculations were the dihedral angles  $\phi$  and  $\psi$  for  $\alpha(2\rightarrow3)$ ,  $\alpha(2\rightarrow4)$ . In the linkages  $\alpha(2\rightarrow6)$  and  $\alpha(2\rightarrow8)$ , the CVs were the angles  $\phi$ ,  $\psi$ ,  $\omega$  and  $\phi$ ,  $\psi$ ,  $\omega7$  and  $\omega8$ , respectively (Table 1). The definition of the torsional atoms of  $\alpha(2\rightarrow3)$ ,  $\alpha(2\rightarrow4)$  and  $\alpha(2\rightarrow6)$  was made according to the postulated by IUPAC.<sup>36</sup> For the glycosidic linkage  $\alpha(2\rightarrow8)$ , the torsional parameters were applied as the proposed by Turupcu et al.<sup>37</sup>. For each system, the parameters of Gaussian height of 0.5 kJ/mol and width of 0.1 rad were applied.

Table 2: Atoms used in the definition of each dihedral angle analyzed.

Glycosidic linkages	$\phi$	$\psi$	$\omega$
$\alpha$ -2 $\rightarrow$ 3	O6-C2-O2-C2'	C2-O2-C2'-C1'	-
$\alpha$ -2 $\rightarrow$ 4	O6-C2-O2-C4'	C2-O2-C4'-C3'	-
$\alpha$ -2 $\rightarrow$ 6	O6-C2-O2-C6'	C2-O2-C6'-C5'	O6-C6-C5-C4
$\alpha$ -2 $\rightarrow$ 8	O6-C2-O8'-C8'	C2-O8'-C8'-C7'	$\omega7 = \text{O7-C7-C6-O6}$ ; $\omega8 = \text{O8-C8-C7-O7}$

The errors related to the CVs of each system were calculated by the block-averaging analysis. The temperature coupling of 298 K and pressure of 1 bar were kept constant by employing the V-rescale algorithm and ParrinelloRamhan algorithm,<sup>31</sup> respectively. The ratio between the temperature of the CVs and the systems temperature was established as the bias factor 10.

## Polysialic acid analysis

Preferential conformations of the heptasialic acid were analyzed by submitting the XTC trajectory files related to each dihedral angle to ConfID.<sup>12</sup> Obtained networks were plotted with Cytoscape 3.9.0.<sup>13</sup>

## Conclusions

The results obtained by molecular dynamics calculations confirmed the ring pucker conformation of  ${}^2C_5$  for the monomers analyzed. The simulations were able also to reproduce the

characteristic rigidity of pyranose rings, showing that the diversity of exocyclic groups could not affect the puckering conformation. Metadynamics results could describe the glycosidic linkages, demonstrating in the obtained energy maps, the effect of higher energy barriers in reflexion of a proximity to the ring carboxyl acid. We could also observe the preferential conformations of the glycosidic linkages of a heptasialic acid, which was at the torsional angles  $\omega_7$  and  $\phi$  in all of the glycosidic linkages analyzed.

In the present work, molecular mechanics simulations were able to, combined to the GROMOS 53A6<sub>GLYC</sub> parameters set, describe the unusual conformational behavior of sialic acids at different levels of structural complexity.

## References

- (1) Angata, T.; Varki, A. Chemical diversity in the sialic acids and related  $\alpha$ -keto acids: an evolutionary perspective. *Chemical reviews* **2002**, *102*, 439–470.
- (2) Schnaar, R. L.; Gerardy-Schahn, R.; Hildebrandt, H. Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiological reviews* **2014**,
- (3) Varki, A.; Schnaar, R. L.; Schauer, R. Sialic acids and other nonulosonic acids. *Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition* **2017**,
- (4) Varki, A. Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature* **2007**, *446*, 1023–1029.
- (5) Varki, A. Sialic acids in human health and disease. *Trends in molecular medicine* **2008**, *14*, 351–360.
- (6) Frank, M.; Schloissnig, S. Bioinformatics and molecular modeling in glycobiology. *Cellular and molecular life sciences* **2010**, *67*, 2749–2772.

- (7) Hospital, A.; Goñi, J. R.; Orozco, M.; Gelpí, J. L. Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Advances and applications in bioinformatics and chemistry: AABC* **2015**, *8*, 37.
- (8) Laio, A.; Parrinello, M. Escaping free-energy minima. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 12562–12566.
- (9) Pol-Fachin, L.; Rusu, V. H.; Verli, H.; Lins, R. D. GROMOS 53A6GLYC, an improved GROMOS force field for hexopyranose-based carbohydrates. *Journal of chemical theory and computation* **2012**, *8*, 4681–4690.
- (10) Bonomi, M.; Branduardi, D.; Bussi, G.; Camilloni, C.; Provasi, D.; Raiteri, P.; Donadio, D.; Marinelli, F.; Pietrucci, F.; Broglia, R. A., et al. PLUMED: A portable plugin for free-energy calculations with molecular dynamics. *Computer Physics Communications* **2009**, *180*, 1961–1972.
- (11) Karplus, M. Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments. *The Journal of chemical physics* **1959**, *30*, 11–15.
- (12) Polêto, M. D.; Grisci, B. I.; Dorn, M.; Verli, H. ConfID: an analytical method for conformational characterization of small molecules using molecular dynamics trajectories. *Bioinformatics* **2020**, *36*, 3576–3577.
- (13) Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research* **2003**, *13*, 2498–2504.
- (14) Marszalek, P. E.; Oberhauser, A. F.; Pang, Y.-P.; Fernandez, J. M. Polysaccharide elasticity governed by chair–boat transitions of the glucopyranose ring. *Nature* **1998**, *396*, 661–664.

- (15) Sattelle, B. M.; Bose-Basu, B.; Tessier, M.; Woods, R. J.; Serianni, A. S.; Almond, A. Dependence of pyranose ring puckering on anomeric configuration: methyl idopyranosides. *The Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116*, 6380–6386.
- (16) Ligabue-Braun, R.; Sachett, L. G.; Pol-Fachin, L.; Verli, H. The calcium goes meow: Effects of ions and glycosylation on Fel d 1, the major cat allergen. *PloS one* **2015**, *10*, e0132311.
- (17) Arantes, P. R.; Pedebos, C.; Polêto, M. D.; Pol-Fachin, L.; Verli, H. The Lazy Life of Lipid-Linked Oligosaccharides in All Life Domains. *Journal of chemical information and modeling* **2019**, *60*, 631–643.
- (18) de Meirelles, J. L.; Nepomuceno, F. C.; Peña-García, J.; Schmidt, R. R.; Pérez-Sánchez, H.; Verli, H. Current status of carbohydrates information in the protein data bank. *Journal of chemical information and modeling* **2020**, *60*, 684–699.
- (19) Kövér, K. E.; Szilágyi, L.; Batta, G.; Uhrin, D.; Jiménez-Barbero, J. Biomolecular recognition by oligosaccharides and glycopeptides: The NMR point of view. **2010**,
- (20) Marathe, D. D.; Buffone Jr, A.; Chandrasekaran, E.; Xue, J.; Locke, R. D.; Nasirikenari, M.; Lau, J. T.; Matta, K. L.; Neelamegham, S. Fluorinated per-acetylated GalNAc metabolically alters glycan structures on leukocyte PSGL-1 and reduces cell binding to selectins. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* **2010**, *115*, 1303–1312.
- (21) Haasnoot, C.; de Leeuw, F. A.; Altona, C. The relationship between proton-proton NMR coupling constants and substituent electronegativities—I: An empirical generalization of the karplus equation. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 2783–2792.
- (22) Huggins, L. *Journal of the American Chemical Society* **1953**, *782*, 3–6.

- (23) Coxon, B. Developments in the Karplus equation as they relate to the NMR coupling constants of carbohydrates. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* **2009**, *62*, 17–82.
- (24) Vliegthart, J.; Beau, J.-M.; Schauer, R.; Haverkamp, J.; Dorland, L.; Sinaÿ, P. Synthesis of a sialic acid ketoside by an intramolecular oxymercuration-demercuration reaction. *Carbohydrate research* **1980**, *82*, 125–129.
- (25) Marchiori, M. F. Síntese de glicopeptídeo de mucina, contendo análogo de antígeno tumoral, com possíveis aplicações terapêuticas em câncer. Ph.D. thesis, Universidade de São Paulo, 2018.
- (26) Gangi Setty, T.; Cho, C.; Govindappa, S.; Apicella, M. A.; Ramaswamy, S. Bacterial periplasmic sialic acid-binding proteins exhibit a conserved binding site. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **2014**, *70*, 1801–1811.
- (27) Nagae, M.; Ikeda, A.; Hane, M.; Hanashima, S.; Kitajima, K.; Sato, C.; Yamaguchi, Y. Crystal structure of anti-polysialic acid antibody single chain Fv fragment complexed with octasialic acid: insight into the binding preference for polysialic acid. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288*, 33784–33796.
- (28) Hanwell, M. D.; Curtis, D. E.; Lonie, D. C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G. R. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of cheminformatics* **2012**, *4*, 1–17.
- (29) Abraham, M. J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindahl, E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **2015**, *1*, 19–25.
- (30) Pol-Fachin, L.; Verli, H.; Lins, R. D. Extension and validation of the GROMOS 53A6glyc parameter set for glycoproteins. *Journal of computational chemistry* **2014**, *35*, 2087–2095.

- (31) Parrinello, M.; Rahman, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied physics* **1981**, *52*, 7182–7190.
- (32) Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. Canonical sampling through velocity rescaling. *The Journal of chemical physics* **2007**, *126*, 014101.
- (33) Tribello, G. A.; Bonomi, M.; Branduardi, D.; Camilloni, C.; Bussi, G. PLUMED 2: New feathers for an old bird. *Computer Physics Communications* **2014**, *185*, 604–613.
- (34) Berendsen, H.; Grigera, J.; Straatsma, T. The missing term in effective pair potentials. *Journal of Physical Chemistry* **1987**, *91*, 6269–6271.
- (35) BPLINCS, H. A parallel linear constraint solver for molecular simulation. *J. Chem. Theory Comput* **2008**, *4*, 116–122.
- (36) IUPAC-IUB, Conformational nomenclature for five and six-membered ring forms of monosaccharides and their derivatives, Recommendations 1980. *Arch. Biochem. Biophys.* **1981**, *207*, 469–472.
- (37) Turupcu, A.; Blaukopf, M.; Kosma, P.; Oostenbrink, C. Molecular Conformations of Di-, Tri-, and Tetra- $\alpha$ -(2 $\rightarrow$  8)-Linked Sialic Acid from NMR Spectroscopy and MD Simulations. *International journal of molecular sciences* **2020**, *21*, 30.

# Molecular modeling of novel sialic acids

## Supplementary Material

Brisa Raíssa Barteltt Godoy, João Luiz de Meirelles, Laís Barth Arend, Hugo Verli

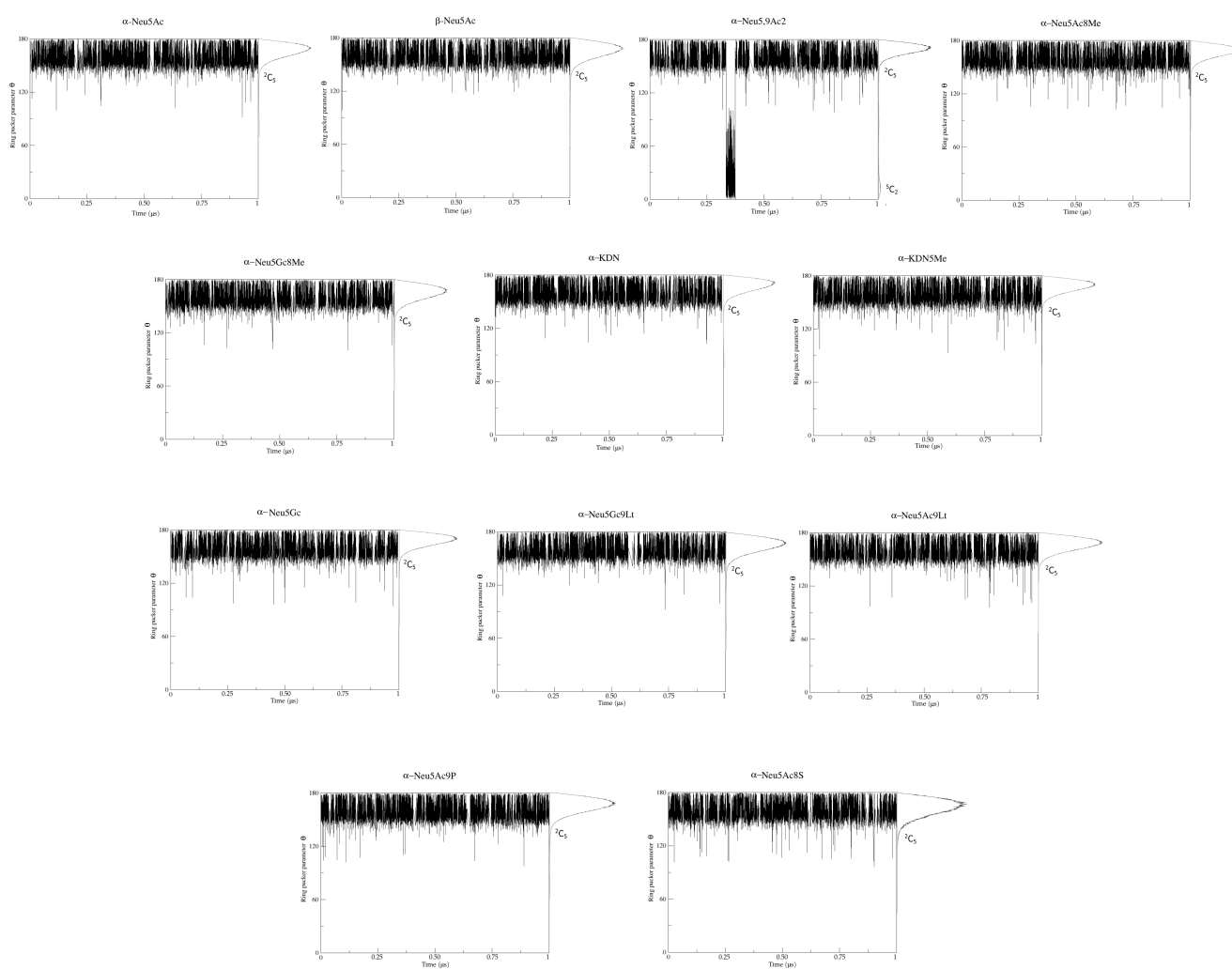


Figure S1: Puckering analysis of monosaccharides of the sialic acids family of molecules.

## 5 Discussão geral

A determinação e parametrização de estruturas de carboidratos pode ser desafiadora no que tange à elevada flexibilidade apresentada por essas estruturas, resultando em uma gama de possibilidades no que diz respeito às possíveis conformações adotadas em solução, assim como às diversas ligações glicosídicas que unem os monômeros de açúcares na formação de moléculas ainda mais complexas [Rao 1998]. Em função dessas características, as quais constituem em fatores que limitam a obtenção de dados de RMN que identifiquem e descrevam essas estruturas, há atualmente menos dados experimentais disponíveis elucidando esse grupo molecular, quando em comparação a outras macromoléculas biológicas. Por estarem dentre os monossacarídeos mais encontrados na natureza e pela disponibilidade de dados de J vicinal provenientes de experimentos de RMN, fez-se a escolha dos anômeros  $\alpha$  e  $\beta$  de D-Glicose e D-Talose como os principais objetos de estudo na validação da ferramenta de cálculo de J de acoplamento vicinal, *JCalc*.

Os anômeros de D-Glicose apresentam elevada flexibilidade e, além disso, os anômeros de glicose são diastereômeros, dessa forma apresentando diferentes rotações específicas e, portanto, diferentes propriedades físico-químicas [Ouellette e Rawn 2018]. Apesar das diferentes características observadas entre esses dois isômeros, pôde-se através dos cálculos de J vicinal realizados a partir da implementação da equação de Karplus, reproduzir dados com valores próximos aos experimentais. Nos anômeros de D-Talose foram observados, no geral, valores que apresentaram maiores desvios-padrão, quando em comparação às glicoses. Muito se deve ao fato de que a D-Talose é a única hexose que apresenta a capacidade de perturbar a estrutura da água de solvatação [Abraham, Cooper e Reid 2021], o que pode conferir maior instabilidade e flexibilidade aos torcionais que compõem esse monômero. A ferramenta desenvolvida mostrou-se capaz de descrever valores próximos aos obtidos por experimentos de RMN, no entanto, pode-se considerar que um aumento no tempo das simulações de dinâmica molecular, as quais foram desenvolvidas em 1  $\mu$ s constitua em uma mudança que resulte na obtenção de uma acurácia ainda maior nos resultados.

Os Sias estão presentes na natureza, principalmente, em sua forma monomérica. Dessa forma, fez-se o estudo acerca da conformação dos anéis dessas piranoses pois, a partir do entendimento das conformações de monossacarídeos em solução, se pode ter informações relevantes sobre a estereoquímica de reações e propriedades químicas e, principalmente, acerca da pletera de processos biológicos desempenhados por essas macromoléculas, visto que são essas conformações, assim como a variedade de grupos exocíclicos associados a essas estruturas, a principal razão pela qual essa família molecular desempenha tantos papéis e diferentes



funções [Marszalek et al. 1998, Sattelle et al. 2012, Panczyk e Plazinski 2018]. Os resultados obtidos a partir da aplicação de parâmetros do campo de força GROMOS 53A6<sub>GLYC</sub> a cálculos de dinâmica molecular reproduziram com fidelidade a rigidez característica de anéis de piranose, os quais adotaram, em maioria, a conformação preferencial  ${}^2C_5$ . Observou-se uma exceção na molécula de Neu5,9Ac<sub>2</sub>, sendo a única, dentre as analisadas no presente estudo, a demonstrar uma transição entre as conformações  ${}^2C_5$  e  ${}^5C_2$ . Acetilações em carboidratos são conhecidas por aumentar a hidrofobicidade molecular [Marathe et al. 2010]. Devido às acetilações nos carbonos C5 e C9, a presença de mais um grupo acetil pode levar a um aumento das interações hidrofóbicas entre esses grupos e o solvente, o que pode contribuir para uma instabilidade conformacional do anel de hexose, resultando na transição entre dois estados conformacionais observada. Outra possibilidade a ser considerada consiste na necessidade de reparametrização das cargas e torcionais relacionados ao acetil ligado ao C9 da Neu5,9Ac<sub>2</sub>, sendo necessária também a parametrização de mais Sias que contenham mais de uma acetilação, a fim de se estabelecer um maior entendimento da transição conformacional observada no Neu5,9Ac<sub>2</sub>.

A validação dos cálculos de dinâmica molecular, assim como dos parâmetros utilizados na modelagem molecular dos monossacarídeos pôde ser realizada através dos cálculos de J vicinal dos dois principais monômeros que constituem a base estrutural de formação dos ácidos siálicos. Observou-se que os resultados obtidos para os cálculos do  $\beta$ -Neu5Ac, em comparação ao  $\alpha$ -Neu5Ac demonstraram valores mais próximos aos experimentais, o que sugere que essa estrutura se torna mais estável em solução quando o carboxilato exocíclico se encontra em posição equatorial.

Ao passo em que a parametrização de monossacarídeos deve ser direcionada à análise da conformação do anel, no estudo de dissacarídeos, ou polissacarídeos, deve ser feita a observação do comportamento das ligações glicosídicas que unem os monômeros de glicanos. Sendo a metadinâmica uma técnica que, através da introdução de um viés, permite a amostragem do espaço conformacional de modo a permitir que o sistema deixe mínimos locais e explore diferentes estados amostrais [Barducci, Bonomi e Parrinello 2011], pôde-se obter um delineamento do comportamento de diferentes torcionais de ligações glicosídicas.

Os resultados obtidos por metadinâmica dos dissacarídeos, na qual o viés introduzido foram os ângulos dos torcionais das glicosídicas, descreveram a relação proporcional entre proximidade da glicosídica ao ácido carboxílico do  $\alpha$ -Neu5Ac e presença de maiores barreiras energéticas. Na ligação glicosídica Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 3)Gal foi observada uma barreira energética maior quando comparada aos demais mapas de superfície de energia livre, o que pode estar diretamente associado à proximidade do ácido carboxílico grupo de C1, conferindo maior rigidez aos torcionais da ligação glicosídica, constituindo ao sistema uma barreira impeditiva à exploração de diferentes estados conformacionais. A ligação Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 4)Gal, constituída de

torcionais mais distantes do carboxilato exocíclico, apresentou mais mínimos de energia livre, quando comparada a  $\alpha(2\rightarrow3)$ .

Observaram-se nos resultados da metadinâmica da ligação glicosídica Neu5Ac $\alpha(2\rightarrow6)$ Gal apenas dois mínimos de energia principais na análise dos ângulos  $\phi$ - $\psi$ , e o dobro de mínimos energéticos na análise dos torcionais  $\phi$ - $\omega$ . Essa mudança no comportamento energético observada em uma mesma ligação glicosídica leva não só ao fato de que esse tipo de ângulo de torção é geralmente flexível, mas também reflete uma tendência do grupo hidroxila ligado ao C6 da galactose, que geralmente é uma das hidroxilas mais reativas em piranoses [Marchiori 2018]. Dentre as glicosídicas analisadas, a  $\alpha$ -2,8 foi a que demonstrou menores barreiras energéticas, em reflexo da maior flexibilidade característica da cadeia lateral exocíclica que contém os carbonos C7, C8 e C9 dos ácidos siálicos.

Em contraste com o proposto na literatura para ligações glicosídicas como  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,4 ou  $\alpha$ -1,6, as quais populam majoritariamente geometrias positivas [Pol-Fachin et al. 2012], não se observou esse efeito exo-anomérico em relação às glicosídicas  $\alpha$ -2,3,  $\alpha$ -2,4,  $\alpha$ -2,6 e  $\alpha$ -2,8, estando todos os ângulos torcionais analisados distribuídos em geometrias cujos ângulos variam entre geometrias positivas e negativas.

Para a análise do ácido polissialílico, devido à sua elevada flexibilidade [Nagae et al. 2013], fez-se a divisão da molécula em 6 dissacarídeos, e foi realizada a análise de cada ligação glicosídica entre esses fragmentos, resultando no estudo de 24 ângulos torcionais. Os dois primeiros dissacarídeos analisados no ConflID, mostraram em suas redes conformações preferenciais no ângulo de torção  $\omega_7$ , representando 50% na primeira rede e 66% na segunda rede obtida. A segunda, das quatro conformações preferenciais adotadas por esses dois fragmentos do ácido heptasiálico, está relacionada ao ângulo  $\phi$ , sendo 38% e 27% das conformações preferenciais do primeiro e segundo fragmentos analisados, respectivamente.

As redes dos dois fragmentos mais distantes das porções mais externas do polissacarídeo apresentaram um maior número de conformações adotadas. Mesmo com um comportamento conformacional mais flexível, essas duas ligações glicosídicas mostraram como conformações preferenciais os mesmos ângulos que os dois fragmentos analisados inicialmente, com  $\omega_7$  representando 69% e 60% e  $\phi$  representando 17% e 15%. Nos dois últimos fragmentos analisados observou-se um comportamento mais rígido. Estando de acordo com o número mais baixo de estados conformacionais demonstrados nos dois primeiros dissacarídeos analisados, que também são encontrados nas porções mais externas da molécula. Essas ligações repetiram os ângulos de torção preferenciais das outras análises, onde  $\omega_7$  corresponde a 74% e 58%, e  $\phi$  a 22% e 38%.

## 6 Conclusões

A partir dos objetivos preestabelecidos, o presente trabalho permitiu:

- A parametrização do equilíbrio pseudo-rotacional de ácidos siálicos através da aplicação de metodologias de mecânica molecular;
- A validação dos parâmetros aplicados aos monossacarídeos através dos cálculos de J de acoplamento vicinal para os monômeros que constituem a base estrutural dos ácidos siálicos, os quais demonstraram valores similares aos J de acoplamento vicinal obtidos por experimentos de RMN;
- O delineamento da variação conformacional das ligações glicosídicas entre dissacarídeos, a partir de simulações de metadinâmica;
- A caracterização das conformações preferenciais adotadas pelos torcionais que compõem as glicosídicas de um ácido polissialílico pôde ser realizada através da análise de trajetórias de dinâmica molecular.

Dessa forma, a partir dos resultados obtidos, pôde-se estabelecer parâmetros que possibilitem o estudo e a modelagem de carboidratos de diferentes níveis de complexidade estrutural da família dos ácidos siálicos através do GROMOS, juntamente aos parâmetros do campo de força GROMOS 53A6<sub>GLYC</sub>.

## 7 Perspectivas

Através do trabalho realizado, as seguintes perspectivas podem ser traçadas:

- Ampliação do *ensemble* conformacional, obtendo-se parâmetros para novos ácidos siálicos;
- Simulações de metadinâmica aplicando-se como viés as coordenadas cartesianas que caracterizam as conformações de piranoses;
- Estudo das conformações preferenciais adotadas pelos torcionais das ligações glicosídicas de diferentes ácidos polissíálicos através de cálculos de metadinâmica;
- Parametrização e estudo de ácidos siálicos complexados a selectinas.

## Referências

- ABRAHAM, R. J.; COOPER, M. A.; REID, M. The use of mm/qm calculations of <sup>13</sup>C chemical shifts in the conformational analysis of some monosaccharides and sucrose. *New Journal of Chemistry*, Royal Society of Chemistry, v. 45, n. 4, p. 2001–2009, 2021. Citado na página 59,
- ALTMAN, M. O.; GAGNEUX, P. Absence of neu5gc and presence of anti-neu5gc antibodies in humans—an evolutionary perspective. *Frontiers in immunology*, Frontiers, v. 10, p. 789, 2019. Citado na página 13,
- ANGATA, T.; VARKI, A. Chemical diversity in the sialic acids and related  $\alpha$ -keto acids: an evolutionary perspective. *Chemical reviews*, ACS Publications, v. 102, n. 2, p. 439–470, 2002. Citado 3 vezes nas páginas 11, 12 e 29,
- ARANTES, P. R. et al. The lazy life of lipid-linked oligosaccharides in all life domains. *Journal of chemical information and modeling*, ACS Publications, v. 60, n. 2, p. 631–643, 2019. Citado na página 29,
- BARDUCCI, A.; BONOMI, M.; PARRINELLO, M. Metadynamics. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, Wiley Online Library, v. 1, n. 5, p. 826–843, 2011. Citado 3 vezes nas páginas 20, 24 e 60,
- BARRY, G. T. Detection of sialic acid in various escherichia coli strains and in other species of bacteria. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 183, n. 4654, p. 117–118, 1959. Citado na página 16,
- BEKKER, H. et al. Gromacs—a parallel computer for molecular-dynamics simulations. In: WORLD SCIENTIFIC PUBLISHING. *4th International Conference on Computational Physics (PC 92)*. [S.I.], 1993. p. 252–256. Citado na página 28,
- BERMAN, H.; HENRICK, K.; NAKAMURA, H. Announcing the worldwide protein data bank. *Nature Structural & Molecular Biology*, Nature Publishing Group, v. 10, n. 12, p. 980–980, 2003. Citado na página 18,
- BIANCHI, T.; BAUER, J. 5.03—particulate organic carbon cycling and transformation. *Treatise on estuarine and coastal science*, v. 5, p. 69–117, 2011. Citado na página 19,
- BONOMI, M. et al. Plumed: A portable plugin for free-energy calculations with molecular dynamics. *Computer Physics Communications*, Elsevier, v. 180, n. 10, p. 1961–1972, 2009. Citado na página 28,
- BORSIG, L. Selectins in cancer immunity. *Glycobiology*, Oxford University Press, v. 28, n. 9, p. 648–655, 2018. Citado na página 15,
- BUSH, C. A.; MARTIN-PASTOR, M.; IMBERY, A. Structure and conformation of complex carbohydrates of glycoproteins, glycolipids, and bacterial polysaccharides. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, v. 28, n. 1, p. 269–293, 1999. Citado na página 17,

- BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. *The Journal of chemical physics*, American Institute of Physics, v. 126, n. 1, p. 014101, 2007. Citado na página 29,
- CANNON, J. T. et al. Xenacoelomorpha is the sister group to nephrozoa. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 530, n. 7588, p. 89–93, 2016. Citado na página 11,
- CHARLAND, N. et al. Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of streptococcus suis capsular type 2. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK, v. 14, n. 4, p. 195–203, 1996. Citado na página 16,
- COHEN, M. et al. Influenza a penetrates host mucus by cleaving sialic acids with neuraminidase. *Virology journal*, BioMed Central, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2013. Citado na página 16,
- COLE, D. J. et al. Biomolecular force field parameterization via atoms-in-molecule electron density partitioning. *Journal of chemical theory and computation*, ACS Publications, v. 12, n. 5, p. 2312–2323, 2016. Citado na página 23,
- COXON, B. Developments in the karplus equation as they relate to the nmr coupling constants of carbohydrates. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, Elsevier, v. 62, p. 17–82, 2009. Citado na página 19,
- CREMER, D.; POPLE, J. General definition of ring puckering coordinates. *Journal of the American Chemical Society*, ACS Publications, v. 97, n. 6, p. 1354–1358, 1975. Citado na página 25,
- CROCKER, P. R.; PAULSON, J. C.; VARKI, A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, Nature Publishing Group, v. 7, n. 4, p. 255–266, 2007. Citado na página 14,
- DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh ewald: An  $n \log(n)$  method for ewald sums in large systems. *The Journal of chemical physics*, American Institute of Physics, v. 98, n. 12, p. 10089–10092, 1993. Citado na página 30,
- DEGASPERIS, A.; RUIJSENAARS, S. Newton-equivalent hamiltonians for the harmonic oscillator. *Annals of Physics*, Elsevier, v. 293, n. 1, p. 92–109, 2001. Citado na página 20,
- DHAR, C.; SASMAL, A.; VARKI, A. From “serum sickness” to “xenosialitis”: Past, present, and future significance of the non-human sialic acid neu5gc. *Frontiers in immunology*, Frontiers, v. 10, p. 807, 2019. Citado 2 vezes nas páginas 13 e 14,
- DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC biology*, BioMed Central, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2011. Citado na página 23,
- FERNANDES, H. P.; CESAR, C. L.; BARJAS-CASTRO, M. d. L. Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, SciELO Brasil, v. 33, p. 297–301, 2011. Citado na página 14,
- GOEL, S. et al. A theoretical assessment of surface defect machining and hot machining of nanocrystalline silicon carbide. *Journal of Manufacturing Science and Engineering*, American Society of Mechanical Engineers Digital Collection, v. 136, n. 2, 2014. Citado na página 21,

- GONZÁLEZ, M. Force fields and molecular dynamics simulations. *École thématique de la Société Française de la Neutronique*, EDP Sciences, v. 12, p. 169–200, 2011. Citado na página 22,
- GUNSTEREN, W. F. van; BERENDSEN, H. J. Groningen molecular simulation (gromos) library manual. *Biomos, Groningen*, v. 24, n. 682704, p. 13, 1987. Citado 2 vezes nas páginas 20 e 29,
- HAASNOOT, C.; LEEUW, F. A. de; ALTONA, C. The relationship between proton-proton nmr coupling constants and substituent electronegativities—i: An empirical generalization of the karplus equation. *Tetrahedron*, Elsevier, v. 36, n. 19, p. 2783–2792, 1980. Citado na página 32,
- HALL, L. Nuclear magnetic resonance. *Advances in carbohydrate chemistry*, Elsevier, v. 19, p. 51–93, 1964. Citado na página 19,
- HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of cheminformatics*, BioMed Central, v. 4, n. 1, p. 1–17, 2012. Citado na página 28,
- HESS, B. et al. Lincs: a linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of computational chemistry*, Wiley Online Library, v. 18, n. 12, p. 1463–1472, 1997. Citado na página 30,
- HIRMO, S. et al. Inhibition of helicobacter pylori sialic acid-specific haemagglutination by human gastrointestinal mucins and milk glycoproteins. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK, v. 20, n. 4, p. 275–281, 1998. Citado na página 16,
- HOLLAND, L. Z. Evolution of basal deuterostome nervous systems. *Journal of Experimental Biology*, Company of Biologists, v. 218, n. 4, p. 637–645, 2015. Citado na página 11,
- HOOVER, F. Mathtype 3.6. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 283, n. 5409, p. 1871–1872, 1999. Citado na página 28,
- HUGGINS, M. L. Bond energies and polarities. *Journal of the American Chemical Society*, ACS Publications, v. 75, n. 17, p. 4123–4126, 1953. Citado na página 19,
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. Vmd: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*, Elsevier, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996. Citado na página 28,
- HUXFORD, T. X-ray crystallography. In: . [S.l.: s.n.], 2013. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 18,
- IUPAC-IUB. Conformational nomenclature for five and six-membered ring forms of monosaccharides and their derivatives, recommendations 1980. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 207, p. 469–472, 1981. Citado na página 25,
- KARPLUS, M. Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments. *The Journal of chemical physics*, American Institute of Physics, v. 30, n. 1, p. 11–15, 1959. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 32,
- KIRSANOV, D. The book of inkscape: The definitive guide to the free graphics editor, 2009. *No Starch Press, Inc, San Francisco, Chapters*, v. 2, p. 4–14, 2009. Citado na página 28,

- LÄUBLI, H.; VARKI, A. Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins (siglecs) detect self-associated molecular patterns to regulate immune responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Springer, v. 77, n. 4, p. 593–605, 2020. Citado na página 15,
- LI, W. et al. Identification of sialic acid-binding function for the middle east respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 114, n. 40, p. E8508–E8517, 2017. Citado na página 16,
- LIAO, Q. Enhanced sampling and free energy calculations for protein simulations. *Progress in molecular biology and translational science*, Elsevier, v. 170, p. 177–213, 2020. Citado 2 vezes nas páginas 24 e 25,
- LIGABUE-BRAUN, R. et al. The calcium goes meow: effects of ions and glycosylation on fel d 1, the major cat allergen. *PLoS ONE. San Francisco. Vol. 10, no. 7 (July 2015), e0132311, p. 1-19*, 2015. Citado na página 29,
- MALPEDE, B. M.; LIN, D. H.; TOLIA, N. H. Molecular basis for sialic acid-dependent receptor recognition by the plasmodium falciparum invasion protein erythrocyte-binding antigen-140/baeb1. *Journal of Biological Chemistry*, ASBMB, v. 288, n. 17, p. 12406–12415, 2013. Citado na página 16,
- MARATHE, D. D. et al. Fluorinated per-acetylated galnac metabolically alters glycan structures on leukocyte psgl-1 and reduces cell binding to selectins. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, American Society of Hematology Washington, DC, v. 115, n. 6, p. 1303–1312, 2010. Citado na página 60,
- MARCHIORI, M. F. *Síntese de glicopeptídeo de mucina, contendo análogo de antígeno tumoral, com possíveis aplicações terapêuticas em câncer*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2018. Citado na página 61,
- MARSZALEK, P. E. et al. Polysaccharide elasticity governed by chair-boat transitions of the glucopyranose ring. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 396, n. 6712, p. 661–664, 1998. Citado na página 60,
- MARTIN, M. J. et al. Evolution of human-chimpanzee differences in malaria susceptibility: relationship to human genetic loss of n-glycolylneuraminic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 102, n. 36, p. 12819–12824, 2005. Citado na página 13,
- MAVERAKIS, E. et al. Glycans in the immune system and the altered glycan theory of autoimmunity: a critical review. *Journal of autoimmunity*, Elsevier, v. 57, p. 1–13, 2015. Citado na página 14,
- MAYES, H. B.; BROADBELT, L. J.; BECKHAM, G. T. How sugars pucker: electronic structure calculations map the kinetic landscape of five biologically paramount monosaccharides and their implications for enzymatic catalysis. *Journal of the American Chemical Society*, ACS Publications, v. 136, n. 3, p. 1008–1022, 2014. Citado 2 vezes nas páginas 25 e 26,
- MCNAUGHT, A. D. et al. Nomenclature of carbohydrates:(recommendations 1996). *Carbohydrate Research*, Elsevier BV, v. 297, n. 1, p. 1–92, 1997. Citado na página 30,



- MEIRELLES, J. L. de et al. Current status of carbohydrates information in the protein data bank. *Journal of chemical information and modeling*, ACS Publications, v. 60, n. 2, p. 684–699, 2020. Citado 3 vezes nas páginas 17, 18 e 31,
- NAGAE, M. et al. Crystal structure of anti-polysialic acid antibody single chain fv fragment complexed with octasialic acid: insight into the binding preference for polysialic acid. *Journal of Biological Chemistry*, ASBMB, v. 288, n. 47, p. 33784–33796, 2013. Citado 2 vezes nas páginas 29 e 61,
- NAMBA, A. M.; SILVA, V. B. da; SILVA, C. D. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Eclética Química*, SciELO Brasil, v. 33, p. 13–24, 2008. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 22,
- O'BOYLE, N. M. et al. Open babel: An open chemical toolbox. *Journal of cheminformatics*, BioMed Central, v. 3, n. 1, p. 1–14, 2011. Citado na página 28,
- OKERBLUM, J. J. et al. Loss of cmah during human evolution primed the monocyte–macrophage lineage toward a more inflammatory and phagocytic state. *The Journal of Immunology*, Am Assoc Immunol, v. 198, n. 6, p. 2366–2373, 2017. Citado na página 13,
- ORD, R. L. et al. Targeting sialic acid dependent and independent pathways of invasion in plasmodium falciparum. *PloS one*, Public Library of Science San Francisco, USA, v. 7, n. 1, p. e30251, 2012. Citado na página 16,
- OUELLETTE, R. J.; RAWN, J. D. *Organic chemistry: structure, mechanism, synthesis*. [S.l.]: Academic Press, 2018. Citado na página 59,
- PANCZYK, K.; PLAZINSKI, W. Pyranose ring puckering in aldopentoses, ketohexoses and deoxyaldohexoses. a molecular dynamics study. *Carbohydrate research*, Elsevier, v. 455, p. 62–70, 2018. Citado 2 vezes nas páginas 26 e 60,
- PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied physics*, American Institute of Physics, v. 52, n. 12, p. 7182–7190, 1981. Citado na página 29,
- PEREZ, S. *Molecular modelling in glycoscience*. [S.l.]: Elsevier, 2007. Citado na página 21,
- PEREZ, S. X-ray diffraction and crystallography of oligosaccharides and polysaccharides. *Encyclopedia of Biophysics; Roberts, GCK, Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany*, p. 2767–2777, 2013. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 18,
- POL-FACHIN, L. et al. Gromos 53a6glyc, an improved gromos force field for hexopyranose-based carbohydrates. *Journal of chemical theory and computation*, ACS Publications, v. 8, n. 11, p. 4681–4690, 2012. Citado 3 vezes nas páginas 24, 29 e 61,
- POLÊTO, M. D. et al. Confid: an analytical method for conformational characterization of small molecules using molecular dynamics trajectories. *Bioinformatics*, Oxford University Press, v. 36, n. 11, p. 3576–3577, 2020. Citado na página 28,
- POLTEV, V. Molecular mechanics: Method and applications. In: *Handbook of Computational Chemistry*. [S.l.: s.n.], 2012. p. 259–292. Citado na página 20,
- QING, E. et al. Distinct roles for sialoside and protein receptors in coronavirus infection. *MBio*, Am Soc Microbiol, v. 11, n. 1, p. e02764–19, 2020. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 17,

- RAMACHANDRAN, K.; DEEPA, G.; NAMBOORI, K. *Computational chemistry and molecular modeling: principles and applications*. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2008. Citado na página 20,
- RAO, V. Conformation of carbohydrates. Harwood Academic Publishers, 1998. Citado 4 vezes nas páginas 16, 25, 26 e 59,
- REYNOLDS, W. Natural product structure elucidation by nmr spectroscopy. In: *Pharmacognosy*. [S.l.]: Elsevier, 2017. p. 567–596. Citado na página 20,
- ROSSUM, G. V.; DRAKE, F. L. *Python 3 Reference Manual*. Scotts Valley, CA: CreateSpace, 2009. ISBN 1441412697. Citado na página 28,
- RUSTMEIER, N. H.; STREBL, M.; STEHLE, T. The symmetry of viral sialic acid binding sites—implications for antiviral strategies. *Viruses*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 11, n. 10, p. 947, 2019. Citado na página 11,
- SATTELLE, B. M. et al. Dependence of pyranose ring puckering on anomeric configuration: methyl idopyranosides. *The Journal of Physical Chemistry B*, ACS Publications, v. 116, n. 22, p. 6380–6386, 2012. Citado na página 60,
- SÄWÉN, E. *NMR spectroscopy and MD simulations of carbohydrates*. Tese (Doutorado) — Department of Organic Chemistry, Stockholm University, 2011. Citado na página 19,
- SCHAUER, R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Current opinion in structural biology*, Elsevier, v. 19, n. 5, p. 507–514, 2009. Citado na página 16,
- SCHAUER, R.; KAMERLING, J. P. Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids. *New comprehensive biochemistry*, Elsevier, v. 29, p. 243, 1997. Citado na página 12,
- SETTY, T. G. et al. Bacterial periplasmic sialic acid-binding proteins exhibit a conserved binding site. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, International Union of Crystallography, v. 70, n. 7, p. 1801–1811, 2014. Citado na página 29,
- SHANNON, P. et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, Cold Spring Harbor Lab, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, 2003. Citado na página 28,
- STAMBULCHIK, E. *Grace*. 2000. Disponível em: <<https://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>>. Citado na página 28,
- SUN, X.-L. The role of cell surface sialic acids for sars-cov-2 infection. *Glycobiology*, 2021. Citado na página 16,
- TAKAHASHI, T. et al. Production and purification of secretory simian cytidine monophosphate-n-acetylneuraminic acid hydroxylase using baculovirus-protein expression system. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, The Pharmaceutical Society of Japan, v. 38, n. 8, p. 1220–1226, 2015. Citado na página 13,
- TRAVING, C.; SCHAUER, R. Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, Springer, v. 54, n. 12, p. 1330–1349, 1998. Citado na página 14,

- TURUPCU, A. et al. Molecular conformations of di-, tri-, and tetra- $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 8)-linked sialic acid from nmr spectroscopy and md simulations. *International journal of molecular sciences*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 21, n. 1, p. 30, 2020. Citado na página 31,
- UNEMO, M. et al. The sialic acid binding saba adhesin of helicobacter pylori is essential for nonopsonic activation of human neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, ASBMB, v. 280, n. 15, p. 15390–15397, 2005. Citado na página 16,
- VARKI, A. Sialic acids in human health and disease. *Trends in molecular medicine*, Elsevier, v. 14, n. 8, p. 351–360, 2008. Citado na página 14,
- VARKI, A. Uniquely human evolution of sialic acid genetics and biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 107, n. Supplement 2, p. 8939–8946, 2010. Citado na página 13,
- VARKI, A.; SCHAUER, R. Sialic acids. *Essentials of Glycobiology. 2nd edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. Citado na página 12,
- VARKI, A.; SCHNAAR, R. L.; SCHAUER, R. Sialic acids and other nonulosonic acids. *Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017. Citado na página 13,
- VERLI, H. Interação heparina-antitrombina: reconhecimento molecular caracterizado por ferramentas de modelagem molecular. 2005. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 22,
- VERLI, H. Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular. Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 23,
- VIMR, E. R.; TROY, F. A. Regulation of sialic acid metabolism in escherichia coli: role of n-acylneuraminate pyruvate-lyase. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 164, n. 2, p. 854–860, 1985. Citado na página 16,
- WEIMAN, S. et al. O-acetylation of sialic acid on group b streptococcus inhibits neutrophil suppression and virulence. *Biochemical Journal*, Portland Press Ltd., v. 428, n. 2, p. 163–168, 2010. Citado na página 16,
- WIDAGDO, W. et al. Host determinants of mers-cov transmission and pathogenesis. *Viruses*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 11, n. 3, p. 280, 2019. Citado na página 16,
- ZHONG, Y. et al. Avian influenza virus infection risk in humans with chronic diseases. *Scientific reports*, Nature Publishing Group, v. 5, n. 1, p. 1–7, 2015. Citado na página 16,

# Anexos

# ANEXO A – Topologias

A seguir encontram-se os arquivos contendo os parâmetros de ligações, ângulos entre ligações, diedros próprios e impróprios aplicados à parametrização das estruturas moleculares dos monossacarídeos, dissacarídeos e do polissacarídeo em estudo. Os arquivos descritos apresentam originalmente extensão RTP e consistem em parâmetros do campo de força GROMOS 53A6<sub>GLYC</sub>, cuja utilização combinada ao pacote GROMACS, possibilitaram a construção das topologias que descreveram o comportamento conformacional do conjunto molecular parametrizado no presente trabalho.

# β-Neu5Ac

```
[ BEUN ]
[ atoms ]
  C5  CH1  0.00000  0
  N5  N    -0.28000  0
  HN5 H     0.28000  0
  C5A  C    0.38000  0
  O5A  O   -0.38000  0
  C5B  CH3  0.00000  0
  C4   CH1  0.23200  1
  O4   OA  -0.64200  1
  HO4  H    0.41000  1
  C7   CH1  0.23200  2
  O7   OA  -0.64200  2
  HO7  H    0.41000  2
  C8   CH1  0.23200  3
  O8   OA  -0.64200  3
  HO8  H    0.41000  3
  C9   CH2  0.23200  4
  O9   OA  -0.64200  4
  HO9  H    0.41000  4
  C6   CH1  0.37600  5
  O6   OA  -0.48000  5
  C2   CH1  0.23200  5
  O2   OA  -0.53800  5
  C3   CH2  0.00000  5
  C1   C    0.36000  6
  O1A  O   -0.68000  6
  O1B  OA  -0.68000  6
  HO1  H    0.41000  6

[ bonds ]
  C5  N5  gb_21
  N5  HN5 gb_2
  N5  C5A gb_10
  C5A O5A gb_5
  C5A C5B gb_16
  C5  C4  gb_26
  C5  C6  gb_26
  C4  O4  gb_20
  C4  C3  gb_26
  O4  HO4 gb_1
  C3  C2  gb_26
  C7  C6  gb_26
  C7  O7  gb_20
  O7  HO7 gb_1
  C7  C8  gb_26
  C8  O8  gb_20
  O8  HO8 gb_1
  C9  C8  gb_26
  C9  O9  gb_20
  O9  HO9 gb_1
  C6  O6  gb_20
  O6  C2  gb_20
  C2  O2  gb_20
  C1  O1A gb_6
  O1A HO1  gb_1
  C1  O1B gb_6
  C1  C2  gb_26

[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
  C6  C5  N5  ga_15
  N5  C5  C4  ga_15
  C5  N5  HN5  ga_18
  C5  N5  C5A  ga_31
  HN5  N5  C5A  ga_32
  N5  C5A  O5A  ga_33
  N5  C5A  C5B  ga_19
```

```
O5A  C5A  C5B  ga_30
  C4  C5  C6  ga_8
  C5  C4  O4  ga_9
  C5  C4  C3  ga_8
  O4  C4  C3  ga_9
  C4  O4  HO4  ga_12
  C4  C3  C2  ga_8
  C5  C6  C7  ga_8
  C5  C6  O6  ga_9
  C7  C6  O6  ga_9
  HO7  O7  C7  ga_12
  O7  C7  C6  ga_9
  O7  C7  C8  ga_9
  C6  C7  C8  ga_8
  HO8  O8  C8  ga_12
  O8  C8  C7  ga_9
  O8  C8  C9  ga_9
  C7  C8  C9  ga_8
  O9  C9  C8  ga_9
  HO9  O9  C9  ga_12
  C6  O6  C2  ga_10
  C3  C2  O6  ga_9
  C3  C2  O2  ga_9
  O6  C2  O2  ga_9
  O6  C2  C1  ga_9
  O2  C2  C1  ga_9
  C2  O2  HO2  ga_12
  O1A  C1  O1B  ga_38
  O1A  C1  C2  ga_22
  O1B  C1  C2  ga_22
  C3  C2  C1  ga_8

[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  N5  C5A  C5B  HN5  gi_1
  C5A  C5B  N5  O5A  gi_1
  C5  O6  C7  C6  gi_2
  C5  O4  C3  C4  gi_2
  C5  N5  C4  C6  gi_2
  C2  O6  O2  C3  gi_2
  C3  O6  C1  C2  gi_2
  C1  O1A  O1B  C2  gi_1

[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C3  C4  C5  N5  gd_16
  C7  C6  C5  N5  gd_16
  O4  C4  C5  N5  gd_17
  O6  C6  C5  N5  gd_18
  C4  C5  N5  C5A  gd_39
  C5  N5  C5A  C5B  gd_14
  C6  C5  C4  O4  gd_43
  C6  C5  C4  O4  gd_44
  C6  C5  C4  C3  gd_34
  C4  C5  C6  C7  gd_34
  C4  C5  C6  O6  gd_43
  C4  C5  C6  O6  gd_44
  C3  C4  O4  HO4  gd_30
  C5  C4  C3  C2  gd_34
  O4  C4  C3  C2  gd_43
  O4  C4  C3  C2  gd_44
  C4  C3  C2  O6  gd_43
  C4  C3  C2  O6  gd_44
  C4  C3  C2  O2  gd_43
  C4  C3  C2  O2  gd_44
  C6  C7  O7  HO7  gd_30
  O7  C7  C6  O6  gd_5
  O7  C7  C6  O6  gd_37
  C6  C7  C8  O8  gd_43
  C6  C7  C8  O8  gd_44
  O7  C7  C8  O8  gd_18
  C7  C8  O8  HO8  gd_30
  C7  C8  C9  O9  gd_43
  C7  C8  C9  O9  gd_44
  O8  C8  C9  O9  gd_18
  C8  C9  O9  HO9  gd_30
  O1A  C1  C2  C3  gd_40
  C5  C6  O6  C2  gd_29
  C6  O6  C2  C3  gd_29
  C2  C1  O1A  HO1  gd_30
```

# $\alpha$ -Neu5Ac8Me

```
[ NEME ]
[ atoms ]
  C5  CH1  0.00000  0
  N5  N    -0.28000  0
  HN5 H     0.28000  0
  C5A  C    0.38000  0
  O5A  O   -0.38000  0
  C5B  CH3  0.00000  0
  C4   CH1  0.23200  1
  O4   OA  -0.64200  1
  HO4  H    0.41000  1
  C7   CH1  0.23200  2
  O7   OA  -0.64200  2
  HO7  H    0.41000  2
  C8   CH1  0.23200  3
  O8   OA  -0.36000  3
  C8A  CH3  0.23200  3
  C9   CH2  0.23200  4
  O9   OA  -0.64200  4
  HO9  H    0.41000  4
  C6   CH1  0.37600  5
  O6   OA  -0.48000  5
  C2   CH1  0.23200  5
  O2   OA  -0.53800  5
  HO2  H    0.41000  5
  C3   CH2  0.00000  5
  C1   C    0.36000  6
  O1A  O   -0.68000  6
  O1B  OA  -0.68000  6

[ bonds ]
  C5  N5  gb_21
  N5  HN5 gb_2
  N5  C5A gb_10
  C5A O5A gb_5
  C5A C5B gb_16
  C5  C4  gb_26
  C5  C6  gb_26
  C4  O4  gb_20
  C4  C3  gb_26
  O4  HO4 gb_1
  C3  C2  gb_26
  C7  C6  gb_26
  C7  O7  gb_20
  O7  HO7 gb_1
  C7  C8  gb_26
  C8  O8  gb_20
  O8  C8A gb_20
  C9  C8  gb_26
  C9  O9  gb_20
  O9  HO9 gb_1
  C6  O6  gb_20
  O6  C2  gb_20
  C2  O2  gb_20
  O2  HO2 gb_1
  C1  O1A gb_6
  C1  O1B gb_6
  C1  C2  gb_26

[ angles ]
; ai aj ak gromos type
  C6  C5  N5  ga_15
  N5  C5  C4  ga_15
  C5  N5  HN5  ga_18
  C5  N5  C5A  ga_31
  HN5  N5  C5A  ga_32
  N5  C5A  O5A  ga_33
  N5  C5A  C5B  ga_19
  O5A  C5A  C5B  ga_30
  C4  C5  C6  ga_8
  C5  C4  O4  ga_9
  C5  C4  C3  ga_8
  O4  C4  C3  ga_9
  C4  O4  HO4  ga_12
  C4  C3  C2  ga_8
  C5  C6  C7  ga_8
  C5  C6  O6  ga_9
  C7  C6  O6  ga_9

HO7  O7  C7  ga_12
O7  C7  C6  ga_9
O7  C7  C8  ga_9
C6  C7  C8  ga_8
C8A  O8  C8  ga_10
O8  C8  C7  ga_9
O8  C8  C9  ga_9
C7  C8  C9  ga_8
O9  C9  C8  ga_9
HO9  O9  C9  ga_12
C6  O6  C2  ga_10
C3  C2  O6  ga_9
C3  C2  O2  ga_9
O6  C2  O2  ga_9
O6  C2  C1  ga_9
O2  C2  C1  ga_9
C2  O2  HO2  ga_12
O1A  C1  O1B  ga_38
O1A  C1  C2  ga_22
O1B  C1  C2  ga_22
C3  C2  C1  ga_8

[ impropers ]
; ai aj ak al gromos type
  N5  C5A  C5B  HN5  gi_1
  C5A  C5B  N5  O5A  gi_1
  C5  O6  C7  C6  gi_2
  C5  O4  C3  C4  gi_2
  C5  N5  C4  C6  gi_2
  C2  O6  O2  C3  gi_2
  C3  O6  C1  C2  gi_2
  C1  O1A  O1B  C2  gi_1

[ dihedrals ]
; ai aj ak al gromos type
  C3  C4  C5  N5  gd_16
  C7  C6  C5  N5  gd_16
  O4  C4  C5  N5  gd_17
  O6  C6  C5  N5  gd_18
  C4  C5  N5  C5A  gd_39
  C5  N5  C5A  C5B  gd_14
  C6  C5  C4  O4  gd_43
  C6  C5  C4  O4  gd_44
  C6  C5  C4  C3  gd_34
  C4  C5  C6  C7  gd_34
  C4  C5  C6  O6  gd_43
  C4  C5  C6  O6  gd_44
  C3  C4  O4  HO4  gd_30
  C5  C4  C3  C2  gd_34
  O4  C4  C3  C2  gd_43
  O4  C4  C3  C2  gd_44
  C4  C3  C2  O6  gd_43
  C4  C3  C2  O6  gd_44
  C4  C3  C2  O2  gd_43
  C4  C3  C2  O2  gd_44
  C6  C7  O7  HO7  gd_30
  O7  C7  C6  O6  gd_5
  O7  C7  C6  O6  gd_37
  C6  C7  C8  O8  gd_43
  C6  C7  C8  O8  gd_44
  O7  C7  C8  O8  gd_18
  C7  C8  O8  C8A  gd_29
  C7  C8  C9  O9  gd_43
  C7  C8  C9  O9  gd_44
  O8  C8  C9  O9  gd_18
  C8  C9  O9  HO9  gd_30
  O1A  C1  C2  C3  gd_40
  C5  C6  O6  C2  gd_29
  C6  O6  C2  C3  gd_29
  O6  C2  O2  HO2  gd_2
  O6  C2  O2  HO2  gd_32

[ exclusions ]
HO2  O6
```

# $\alpha$ -Neu5,9Ac<sub>2</sub>

```
[ NEAC ]
[ atoms ]
  C5  CH1  0.00000  0
  N5  N    -0.28000  0
  HN5 H     0.28000  0
  C5A  C    0.38000  0
  O5A  O   -0.38000  0
  C5B  CH3  0.00000  0
  C4  CH1  0.23200  1
  O4  OA   -0.64200  1
  HO4  H    0.41000  1
  C7  CH1  0.23200  2
  O7  OA   -0.64200  2
  HO7  H    0.41000  2
  C8  CH1  0.23200  3
  O8  OA   -0.64200  3
  HO8  H    0.41000  3
  C9  CH2  0.37600  4
  O9  OA   -0.48000  4
  C10 C     0.38000  5
  O10 O    -0.38000  5
  C11 CH3  0.00000  6
  C6  CH1  0.37600  7
  O6  OA   -0.48000  7
  C2  CH1  0.23200  7
  O2  OA   -0.53800  7
  HO2  H    0.41000  7
  C3  CH2  0.00000  7
  C1  C     0.36000  8
  O1A O    -0.68000  8
  O1B OA   -0.68000  8
[ bonds ]
  C5  N5  gb_21
  N5  HN5 gb_2
  N5  C5A gb_10
  C5A O5A gb_5
  C5A C5B gb_16
  C5  C4  gb_26
  C5  C6  gb_26
  C4  O4  gb_20
  C4  C3  gb_26
  O4  HO4 gb_1
  C3  C2  gb_26
  C7  C6  gb_26
  C7  O7  gb_20
  O7  HO7 gb_1
  C7  C8  gb_26
  C8  O8  gb_20
  O8  HO8 gb_1
  C9  C8  gb_26
  C9  O9  gb_20
  O9  C10 gb_20
  O10 C10 gb_5
  C10 C11 gb_16
  C6  O6  gb_20
  O6  C2  gb_20
  C2  O2  gb_20
  O2  HO2 gb_1
  C1  O1A gb_6
  C1  O1B gb_6
  C1  C2  gb_26
[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
  C6  C5  N5  ga_15
  N5  C5  C4  ga_15
  C5  N5  HN5 ga_18
  C5  N5  C5A ga_31
  HN5 N5  C5A ga_32
  N5  C5A O5A ga_33
  N5  C5A C5B ga_19
  O5A C5A C5B ga_30
  C4  C5  C6  ga_8
  C5  C4  O4  ga_9
  C5  C4  C3  ga_8
  O4  C4  C3  ga_9
  C4  O4  HO4 ga_12
  C4  C3  C2  ga_8
  C5  C6  C7  ga_8
  C5  C6  O6  ga_9
  C7  C6  O6  ga_9
  HO7  O7  C7  ga_12
  O7  C7  C6  ga_9
  O7  C7  C8  ga_9
  C6  C7  C8  ga_8
  HO8  O8  C8  ga_12
  O8  C8  C7  ga_9
  O8  C8  C9  ga_9
  C7  C8  C9  ga_8
  O9  C9  C8  ga_9
  O9  C10 O10 ga_38
  O9  C10 C11 ga_9
  O10 C10 C11 ga_30
  C6  O6  C2  ga_10
  C3  C2  O6  ga_9
  C3  C2  O2  ga_9
  O6  C2  O2  ga_9
  O2  C2  HO2 ga_12
  O1A C1  O1B ga_38
  O1A C1  C2  ga_22
  O1B C1  C2  ga_22
  C3  C2  C1  ga_8
[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  N5  C5A C5B HN5  gi_1
  C5A C5B N5  O5A  gi_1
  C5  O6  C7  C6  gi_2
  C5  O4  C3  C4  gi_2
  C5  N5  C4  C6  gi_2
  C2  O6  O2  C3  gi_2
  C3  O6  C1  C2  gi_2
  C1  O1A O1B  C2  gi_1
  C10 C11 O9  O10 gi_2
[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C3  C4  C5  N5  gd_16
  C7  C6  C5  N5  gd_16
  O4  C4  C5  N5  gd_17
  O6  C6  C5  N5  gd_18
  C4  C5  N5  C5A  gd_39
  C5  N5  C5A  C5B  gd_14
  C6  C5  C4  O4  gd_43
  C6  C5  C4  O4  gd_44
  C6  C5  C4  C3  gd_34
  C4  C5  C6  C7  gd_34
  C4  C5  C6  O6  gd_43
  C4  C5  C6  O6  gd_44
  C3  C4  O4  HO4  gd_30
  C5  C4  C3  C2  gd_34
  O4  C4  C3  C2  gd_43
  O4  C4  C3  C2  gd_44
  C4  C3  C2  O6  gd_43
  C4  C3  C2  O2  gd_43
  C4  C3  C2  O2  gd_44
  C6  C7  O7  HO7  gd_30
  O7  C7  C6  O6  gd_5
  O7  C7  C6  O6  gd_37
  C6  C7  C8  O8  gd_43
  C6  C7  C8  O8  gd_44
  O7  C7  C8  O8  gd_18
  C7  C8  O8  HO8  gd_30
  C7  C8  C9  O9  gd_43
  C7  C8  C9  O9  gd_44
  O8  C8  C9  O9  gd_18
  C8  C9  O9  C10  gd_29
  C9  O9  C10 O11  gd_29
  C9  O9  C10 O10  gd_28
  O9  C10 C11 O11  gd_5
  O9  C10 C11 O11  gd_37
  O1A C1  C2  C3  gd_40
  C5  C6  O6  C2  gd_29
  C6  O6  C2  C3  gd_29
  O6  C2  O2  HO2  gd_2
  O6  C2  O2  HO2  gd_32
[ exclusions ]
HO2  O6
```



# α-Neu5Ac9Lt

```

[ NEUL ]
[ atoms ]
  C5  CH1  0.00000  0
  N5  N    -0.28000  0
  HN5 H     0.28000  0
  C5A C     0.38000  0
  O5A O    -0.38000  0
  C5B CH3   0.00000  0
  C4  CH1  0.23200  1
  O4  OA   -0.64200  1
  HO4 H     0.41000  1
  C7  CH1  0.23200  2
  O7  OA   -0.64200  2
  HO7 H     0.41000  2
  C8  CH1  0.23200  3
  O8  OA   -0.64200  3
  HO8 H     0.41000  3
  C9  CH2  0.37600  4
  O9  OA   -0.48000  4
  C10 CH2  0.37600  5
  O10 OA   -0.48000  5
  C11 CH1  0.23200  6
  O11 OA   -0.64200  6
  HO11 H    0.41000  6
  C12 CH3  0.23200  7
  C6  CH1  0.37600  8
  O6  OA   -0.48000  8
  C2  CH1  0.23200  8
  O2  OA   -0.53800  8
  HO2 H     0.41000  8
  C3  CH2  0.00000  8
  C1  C     0.36000  9
  O1A O    -0.68000  9
  O1B OA   -0.68000  9

[ bonds ]
  C5  N5      gbj_21
  N5  HN5     gbj_2
  N5  C5A     gbj_10
  C5A O5A     gbj_5
  C5A C5B     gbj_16
  C5  C4      gbj_26
  C5  C6      gbj_26
  C4  O4      gbj_20
  C4  C3      gbj_26
  O4  HO4     gbj_1
  C3  C2      gbj_26
  C7  C6      gbj_26
  C7  O7      gbj_20
  O7  HO7     gbj_1
  C7  C8      gbj_26
  C8  O8      gbj_20
  O8  HO8     gbj_1
  C9  C8      gbj_26
  C9  O9      gbj_20
  O9  C10     gbj_20
  O10 C10     gbj_20
  C10 C11     gbj_26
  C11 O11     gbj_20
  O11 HO11    gbj_1
  C11 C12     gbj_26
  C6  O6      gbj_20
  O6  C2      gbj_20
  C2  O2      gbj_20
  O2  HO2     gbj_1
  C1  O1A     gbj_6
  C1  O1B     gbj_6
  C1  C2      gbj_26

[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
  C6  C5  N5  ga_15
  N5  C5  C4  ga_15
  C5  N5  HN5  ga_18
  C5  N5  C5A  ga_31
  HN5 N5  C5A  ga_32
  N5  C5A  O5A  ga_33
  N5  C5A  C5B  ga_19
  O5A C5A  C5B  ga_30

  C4  C5  C6  ga_8
  C5  C4  O4  ga_9
  C5  C4  C3  ga_8
  O4  C4  C3  ga_9
  C4  O4  HO4  ga_12
  C4  C3  C2  ga_8
  C5  C6  C7  ga_8
  C5  C6  O6  ga_9
  C7  C6  O6  ga_9
  HO7  O7  C7  ga_12
  O7  C7  C6  ga_9
  O7  C7  C8  ga_9
  C6  C7  C8  ga_8
  HO8  O8  C8  ga_12
  O8  C8  C7  ga_9
  O8  C8  C9  ga_9
  C7  C8  C9  ga_8
  O9  C9  C8  ga_9
  O9  C10  O10  ga_38
  O9  C10  C11  ga_9
  O10 C10  C11  ga_9
  HO11 O11  C11  ga_12
  O11 C11  C12  ga_9
  C10 C11  C12  ga_8
  C6  O6  C2  ga_10
  C3  C2  O6  ga_9
  C3  C2  O2  ga_9
  O6  C2  O2  ga_9
  O6  C2  C1  ga_9
  O2  C2  C1  ga_9
  C2  O2  HO2  ga_12
  O1A C1  O1B  ga_38
  O1A C1  C2  ga_22
  O1B C1  C2  ga_22
  C3  C2  C1  ga_8

[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  N5  C5A  C5B  HN5  gi_1
  C5A C5B  N5  O5A  gi_1
  C5  O6  C7  C6  gi_2
  C5  O4  C3  C4  gi_2
  C5  N5  C4  C6  gi_2
  C2  O6  O2  C3  gi_2
  C3  O6  C1  C2  gi_2
  C1  O1A  O1B  C2  gi_1
  C10 C11  C12  O11  gi_2

[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C3  C4  C5  N5  gd_16
  C7  C6  C5  N5  gd_16
  O4  C4  C5  N5  gd_17
  O6  C6  C5  N5  gd_18
  C4  C5  N5  C5A  gd_39
  C5  N5  C5A  C5B  gd_14
  C6  C5  C4  O4  gd_43
  C6  C5  C4  O4  gd_44
  C6  C5  C4  C3  gd_34
  C4  C5  C6  C7  gd_34
  C4  C5  C6  O6  gd_43
  C4  C5  C6  O6  gd_44
  C3  C4  O4  HO4  gd_30
  C5  C4  C3  C2  gd_34
  O4  C4  C3  C2  gd_43
  O4  C4  C3  C2  gd_44
  C4  C3  C2  O6  gd_43
  C4  C3  C2  O6  gd_44
  C4  C3  C2  O2  gd_43
  C4  C3  C2  O2  gd_44
  C6  C7  O7  HO7  gd_30
  O7  C7  C6  O6  gd_5
  O7  C7  C6  O6  gd_37
  C6  C7  C8  O8  gd_43
  C6  C7  C8  O8  gd_44
  O7  C7  C8  O8  gd_18
  C7  C8  O8  HO8  gd_30
  C7  C8  C9  O9  gd_43
  C7  C8  C9  O9  gd_44
  O8  C8  C9  O9  gd_18
  C8  C9  O9  C10  gd_29
  C9  O9  C10  C11  gd_29
  O9  C10  C11  C12  gd_40
  O9  C10  C11  O11  gd_5
  O9  C10  C11  O11  gd_37
  C10 C11  O11  HO11  gd_30
  O1A C1  C2  C3  gd_40
  C5  C6  O6  C2  gd_29
  C6  O6  C2  C3  gd_29
  O6  C2  O2  HO2  gd_2
  O6  C2  O2  HO2  gd_32

[ exclusions ]
  HO2  O6

```

# $\alpha$ -Neu5Gc

```
[ NEGC ]
[ atoms ]
  C5  CH1  0.00000  0
  N5  N    -0.28000  0
  HN5 H     0.28000  0
  C5A  C    0.38000  0
  O5A  O   -0.38000  0
  C5B  CH1  0.23200  0
  O5B  OA  -0.53800  0
  HO5  H    0.41000  0
  C4  CH1  0.23200  1
  O4  OA  -0.64200  1
  HO4  H    0.41000  1
  C7  CH1  0.23200  2
  O7  OA  -0.64200  2
  HO7  H    0.41000  2
  C8  CH1  0.23200  3
  O8  OA  -0.64200  3
  HO8  H    0.41000  3
  C9  CH1  0.23200  4
  O9  OA  -0.64200  4
  HO9  H    0.41000  4
  C6  CH1  0.37600  5
  O6  OA  -0.48000  5
  C2  CH1  0.23200  5
  O2  OA  -0.53800  5
  HO2  H    0.41000  5
  C3  CH2  0.00000  5
  C1  C    0.36000  6
  O1A  O   -0.68000  6
  O1B  OA  -0.68000  6

[ bonds ]
  C5  N5  gb_21
  N5  HN5 gb_2
  N5  C5A gb_10
  C5A O5A gb_5
  C5A C5B gb_16
  C5B O5B gb_20
  O5B HO5 gb_1
  C5  C4  gb_26
  C5  C6  gb_26
  C4  O4  gb_20
  C4  C3  gb_26
  O4  HO4 gb_1
  C3  C2  gb_26
  C7  C6  gb_26
  C7  O7  gb_20
  O7  HO7 gb_1
  C7  C8  gb_26
  C8  O8  gb_20
  O8  HO8 gb_1
  C9  C8  gb_26
  C9  O9  gb_20
  O9  HO9 gb_1
  C6  O6  gb_20
  O6  C2  gb_20
  C2  O2  gb_20
  O2  HO2 gb_1
  C1  O1A gb_6
  C1  O1B gb_6
  C1  C2  gb_26

[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
  C6  C5  N5  ga_15
  N5  C5  C4  ga_15
  C5  N5  HN5  ga_18
  C5  N5  C5A  ga_31
  HN5  N5  C5A  ga_32
  N5  C5A  O5A  ga_33
  N5  C5A  C5B  ga_19
  O5A  C5A  C5B  ga_30
  O5B  C5B  C5A  ga_9
  HO5  O5B  C5B  ga_12
  C4  C5  C6  ga_8
  C5  C4  O4  ga_9
  C5  C4  C3  ga_8
  O4  C4  C3  ga_9
  C4  O4  HO4  ga_12
  C4  C3  C2  ga_8
  C5  C6  C7  ga_8
  C5  C6  O6  ga_9
  C7  C6  O6  ga_9

  HO7  O7  C7  ga_12
  O7  C7  C6  ga_9
  O7  C7  C8  ga_9
  C6  C7  C8  ga_8
  HO8  O8  C8  ga_12
  O8  C8  C7  ga_9
  O8  C8  C9  ga_9
  C7  C8  C9  ga_8
  O9  C9  C8  ga_9
  HO9  O9  C9  ga_12
  C6  O6  C2  ga_10
  C3  C2  O6  ga_9
  C3  C2  O2  ga_9
  O6  C2  O2  ga_9
  O2  C2  C1  ga_9
  C2  O2  HO2  ga_12
  O1A  C1  O1B  ga_38
  O1A  C1  C2  ga_22
  O1B  C1  C2  ga_22
  C3  C2  C1  ga_8

[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  N5  C5A  C5B  HN5  gi_1
  C5A  C5B  N5  O5A  gi_1
  C5  O6  C7  C6  gi_2
  C5  O4  C3  C4  gi_2
  C5  N5  C4  C6  gi_2
  C2  O6  O2  C3  gi_2
  C3  O6  C1  C2  gi_2
  C1  O1A  O1B  C2  gi_1

[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C3  C4  C5  N5  gd_16
  C7  C6  C5  N5  gd_16
  O4  C4  C5  N5  gd_17
  O6  C6  C5  N5  gd_18
  C4  C5  N5  C5A  gd_39
  C5  N5  C5A  C5B  gd_14
  O5A  C5A  C5B  O5B  gd_18
  C5A  C5B  O5B  HO5  gd_30
  C6  C5  C4  O4  gd_43
  C6  C5  C4  O4  gd_44
  C6  C5  C4  C3  gd_34
  C4  C5  C6  C7  gd_34
  C4  C5  C6  O6  gd_43
  C4  C5  C6  O6  gd_44
  C3  C4  O4  HO4  gd_30
  C5  C4  C3  C2  gd_34
  O4  C4  C3  C2  gd_43
  O4  C4  C3  C2  gd_44
  C4  C3  C2  O6  gd_43
  C4  C3  C2  O6  gd_44
  C4  C3  C2  O2  gd_43
  C4  C3  C2  O2  gd_44
  C6  C7  O7  HO7  gd_30
  O7  C7  C6  O6  gd_5
  O7  C7  C6  O6  gd_37
  C6  C7  C8  O8  gd_43
  C6  C7  C8  O8  gd_44
  O7  C7  C8  O8  gd_18
  C7  C8  O8  HO8  gd_30
  C7  C8  C9  O9  gd_43
  O8  C8  C9  O9  gd_18
  C8  C9  O9  HO9  gd_30
  O1A  C1  C2  C3  gd_40
  C5  C6  O6  C2  gd_29
  C6  O6  C2  C3  gd_29
  O6  C2  O2  HO2  gd_2
  O6  C2  O2  HO2  gd_32

[ exclusions ]
  HO2  O6
```

# α-Neu5Gc9Lt

```

[ NEGL ]
[ atoms ]
C5 CH1 0.00000 0
N5 N -0.28000 0
HN5 H 0.28000 0
C5A C 0.38000 0
O5A O -0.38000 0
C5B CH1 0.23200 0
O5B OA -0.53800 0
HO5 H 0.41000 0
C4 CH1 0.23200 1
O4 OA -0.64200 1
HO4 H 0.41000 1
C7 CH1 0.23200 2
O7 OA -0.64200 2
HO7 H 0.41000 2
C8 CH1 0.23200 3
O8 OA -0.64200 3
HO8 H 0.41000 3
C9 CH2 0.37600 4
O9 OA -0.48000 4
C10 CH2 0.37600 5
O10 OA -0.48000 5
C11 CH1 0.23200 6
O11 OA -0.64200 6
HO11 H 0.41000 6
C12 CH3 0.23200 7
C6 CH1 0.37600 8
O6 OA -0.48000 8
C2 CH1 0.23200 8
O2 OA -0.53800 8
HO2 H 0.41000 8
C3 CH2 0.00000 8
C1 C 0.36000 9
O1A O -0.68000 9
O1B OA -0.68000 9

[ bonds ]
C5 N5 gb_21
N5 HN5 gb_2
N5 C5A gb_10
C5A O5A gb_5
C5A C5B gb_16
C5B O5B gb_20
O5B HO5 gb_1
C5 C4 gb_26
C5 C6 gb_26
C4 O4 gb_20
C4 C3 gb_26
O4 HO4 gb_1
C3 C2 gb_26
C7 C6 gb_26
C7 O7 gb_20
O7 HO7 gb_1
C7 C8 gb_26
O8 O8 gb_20
O8 HO8 gb_1
C9 C8 gb_26
C9 O9 gb_20
O9 C10 gb_20
O10 C10 gb_20
C10 C11 gb_26
C11 O11 gb_20
O11 HO11 gb_1
C11 C12 gb_26
C6 O6 gb_20
O6 C2 gb_20
C2 O2 gb_20
O2 HO2 gb_1
C1 O1A gb_6
C1 O1B gb_6
C1 C2 gb_26

[ angles ]
; ai aj ak gromos type
C6 C5 N5 ga_15
N5 C5 C4 ga_15
C5 N5 HN5 ga_18
C5 N5 C5A ga_31
HN5 N5 C5A ga_32
N5 C5A O5A ga_33
N5 C5A C5B ga_19
O5A C5A C5B ga_30
O5B C5B C5A ga_9
O5B C5B C5A ga_9
HO5 O5B C5B ga_12
C4 C5 C6 ga_8
C5 C4 O4 ga_9
C5 C4 C3 ga_8
O4 C4 C3 ga_9
C4 O4 HO4 ga_12
C4 C3 C2 ga_8
C5 C6 C7 ga_8
C5 C6 O6 ga_9
C7 C6 O6 ga_9
HO7 O7 C7 ga_12
O7 C7 C6 ga_9
O7 C7 C8 ga_9
C6 C7 C8 ga_8
HO8 O8 C8 ga_12

O8 C8 C7 ga_9
O8 C8 C9 ga_9
C7 C8 C9 ga_8
O9 C9 C8 ga_9
O9 C10 O10 ga_38
O9 C10 C11 ga_9
O10 C10 C11 ga_9
HO11 O11 C11 ga_12
O11 C11 C12 ga_9
C10 C11 C12 ga_8
C6 O6 C2 ga_10
C3 C2 O6 ga_9
C3 C2 O2 ga_9
O6 C2 O2 ga_9
O6 C2 C1 ga_9
O2 C2 C1 ga_9
C2 O2 HO2 ga_12
O1A C1 O1B ga_38
O1A C1 C2 ga_22
O1B C1 C2 ga_22
C3 C2 C1 ga_8

[ impropers ]
; ai aj ak al gromos type
N5 C5A C5B HN5 gi_1
C5A C5B N5 O5A gi_1
C5 O6 C7 C6 gi_2
C5 O4 C3 C4 gi_2
C5 N5 C4 C6 gi_2
C2 O6 O2 C3 gi_2
C3 O6 C1 C2 gi_2
C1 O1A O1B C2 gi_1
C10 C11 C12 O11 gi_2

[ dihedrals ]
; ai aj ak al gromos type
C3 C4 C5 N5 gd_16
C7 C6 C5 N5 gd_16
O4 C4 C5 N5 gd_17
O6 C6 C5 N5 gd_18
C4 C5 N5 C5A gd_39
C5 N5 C5A C5B gd_14
O5A C5A C5B O5B gd_18
C5A C5B O5B HO5 gd_30
C6 C5 C4 O4 gd_43
C6 C5 C4 O4 gd_44
C6 C5 C4 C3 gd_34
C4 C5 C6 C7 gd_34
C4 C5 C6 O6 gd_43
C4 C5 C6 O6 gd_44
C3 C4 O4 HO4 gd_30
C5 C4 C3 C2 gd_34
O4 C4 C3 C2 gd_43
O4 C4 C3 C2 gd_44
C4 C3 C2 O6 gd_43
C4 C3 C2 O2 gd_43
C4 C3 C2 O2 gd_44
C6 C7 O7 HO7 gd_30
O7 C7 C6 O6 gd_5
O7 C7 C6 O6 gd_37
C6 C7 C8 O8 gd_43
C6 C7 C8 O8 gd_44
O7 C7 C8 O8 gd_18
C7 C8 O8 HO8 gd_30
C7 C8 C9 O9 gd_43
C7 C8 C9 O9 gd_44
O8 C8 C9 O9 gd_18
C8 C9 O9 C10 gd_29
C9 O9 C10 C11 gd_29
O9 C10 C11 C12 gd_40
O9 C10 C11 O11 gd_5
O9 C10 C11 O11 gd_37
C10 C11 O11 HO11 gd_30
O1A C1 C2 C3 gd_40
C5 C6 O6 C2 gd_29
C6 O6 C2 C3 gd_29
O6 C2 O2 HO2 gd_2
O6 C2 O2 HO2 gd_32

[ exclusions ]
HO2 O6

```

# $\alpha$ -Neu5Gc8Me

```
[ NEGM ]
[ atoms ]
  C5  CH1    0.00000    0
  N5   N     -0.28000    0
  HN5  H      0.28000    0
  C5A  C      0.38000    0
  O5A  O     -0.38000    0
  C5B  CH1    0.23200    0
  O5B  OA    -0.53800    0
  HO5  H      0.41000    0
  C4   CH1    0.23200    1
  O4   OA    -0.64200    1
  HO4  H      0.41000    1
  C7   CH1    0.23200    2
  O7   OA    -0.64200    2
  HO7  H      0.41000    2
  C8   CH1    0.23200    3
  O8   OA    -0.36000    3
  C8A  CH3    0.23200    3
  C9   CH1    0.23200    4
  O9   OA    -0.64200    4
  HO9  H      0.41000    4
  C6   CH1    0.37600    5
  O6   OA    -0.48000    5
  C2   CH1    0.23200    5
  O2   OA    -0.53800    5
  HO2  H      0.41000    5
  C3   CH2    0.00000    5
  C1   C      0.36000    6
  O1A  O     -0.68000    6
  O1B  OA    -0.68000    6
[ bonds ]
  C5  N5      gb_21
  N5  HN5     gb_2
  N5  C5A     gb_10
  C5A O5A     gb_5
  C5A C5B     gb_16
  C5B O5B     gb_20
  O5B HO5     gb_1
  C5  C4      gb_26
  C5  C6      gb_26
  C4  O4      gb_20
  C4  C3      gb_26
  O4  HO4     gb_1
  C3  C2      gb_26
  C7  C6      gb_26
  C7  O7      gb_20
  O7  HO7     gb_1
  C7  C8      gb_26
  C8  O8      gb_20
  O8  C8A     gb_20
  C9  C8      gb_26
  C9  O9      gb_20
  O9  HO9     gb_1
  C6  O6      gb_20
  O6  C2      gb_20
  C2  O2      gb_20
  O2  HO2     gb_1
  C1  O1A     gb_6
  C1  O1B     gb_6
  C1  C2      gb_26
[ angles ]
; ai aj ak gromos type
  C6  C5  N5  ga_15
  N5  C5  C4  ga_15
  C5  N5  HN5 ga_18
  C5  N5  C5A ga_31
  HN5 N5  C5A ga_32
  N5  C5A O5A ga_33
  N5  C5A C5B ga_19
  O5A C5A C5B ga_30
  O5B C5B C5A ga_9
  HO5 O5B C5B ga_12
  C4  C5  C6  ga_8
  C5  C4  O4  ga_9
  C5  C4  C3  ga_8
  O4  C4  C3  ga_9
  C4  O4  HO4 ga_12
  C4  C3  C2  ga_8
  C5  C6  C7  ga_8
  C5  C6  O6  ga_9
  C7  C6  O6  ga_9
  HO7 O7  C7  ga_12
  O7  C7  C6  ga_9
  O7  C7  C8  ga_9
  C6  C7  C8  ga_8
  C8A O8  C8  ga_10
  O8  C8  C7  ga_9
  O8  C8  C9  ga_9
  C7  C8  C9  ga_8
  O9  C9  C8  ga_9
  HO9 O9  C9  ga_12
  C6  O6  C2  ga_10
  C3  C2  O6  ga_9
  C3  C2  O2  ga_9
  O6  C2  O2  ga_9
  O2  C2  C1  ga_9
  C2  O2  HO2 ga_12
  O1A C1  O1B ga_38
  O1A C1  C2  ga_22
  O1B C1  C2  ga_22
  C3  C2  C1  ga_8
[ impropers ]
; ai aj ak al gromos type
  N5  C5A  C5B  HN5  gi_1
  C5A C5B  N5  O5A  gi_1
  C5  O6  C7  C6  gi_2
  C5  O4  C3  C4  gi_2
  C5  N5  C4  C6  gi_2
  C2  O6  O2  C3  gi_2
  C3  O6  C1  C2  gi_2
  C1  O1A O1B C2  gi_1
[ dihedrals ]
; ai aj ak al gromos type
  C3  C4  C5  N5  gd_16
  C7  C6  C5  N5  gd_16
  O4  C4  C5  N5  gd_17
  O6  C6  C5  N5  gd_18
  C4  C5  N5  C5A  gd_39
  C5  N5  C5A  C5B  gd_14
  O5A C5A  C5B  O5B  gd_18
  C5A C5B  O5B  HO5  gd_30
  C6  C5  C4  O4  gd_43
  C6  C5  C4  O4  gd_44
  C6  C5  C4  C3  gd_34
  C4  C5  C6  C7  gd_34
  C4  C5  C6  O6  gd_43
  C4  C5  C6  O6  gd_44
  C3  C4  O4  HO4  gd_30
  C5  C4  C3  C2  gd_34
  O4  C4  C3  C2  gd_43
  O4  C4  C3  C2  gd_44
  C4  C3  C2  O6  gd_44
  C4  C3  C2  O2  gd_43
  C4  C3  C2  O2  gd_44
  C6  C7  O7  HO7  gd_30
  O7  C7  C6  O6  gd_5
  O7  C7  C6  O6  gd_37
  C6  C7  C8  O8  gd_43
  C6  C7  C8  O8  gd_44
  O7  C7  C8  O8  gd_18
  C7  C8  O8  C8A  gd_29
  C7  C8  C9  O9  gd_43
  C7  C8  C9  O9  gd_44
  O8  C8  C9  O9  gd_18
  C8  C9  O9  HO9  gd_30
  O1A C1  C2  C3  gd_40
  C5  C6  O6  C2  gd_29
  C6  O6  C2  C3  gd_29
  O6  C2  O2  HO2  gd_2
  O6  C2  O2  HO2  gd_32
[ exclusions ]
HO2 O6
```

# $\alpha$ -KDN

```
[ KDN ]
[ atoms ]
  C5 CH1  0.23200  0
  O5 OA  -0.64200  0
HO5 H  0.41000  0
  C4 CH1  0.23200  1
  O4 OA  -0.64200  1
HO4 H  0.41000  1
  C7 CH1  0.23200  2
  O7 OA  -0.64200  2
HO7 H  0.41000  2
  C8 CH1  0.23200  3
  O8 OA  -0.64200  3
HO8 H  0.41000  3
  C9 CH2  0.23200  4
  O9 OA  -0.64200  4
HO9 H  0.41000  4
  C6 CH1  0.37600  5
  O6 OA  -0.48000  5
  C2 CH1  0.23200  5
  O2 OA  -0.53800  5
HO2 H  0.41000  5
  C3 CH2  0.00000  5
  C1 C  0.36000  6
O1A O  -0.68000  6
O1B OA  -0.68000  6
[ bonds ]
  C5 O5 gb_20
  O5 HO5 gb_1
  C5 C4 gb_26
  C5 C6 gb_26
  C4 O4 gb_20
  C4 C3 gb_26
  O4 HO4 gb_1
  C3 C2 gb_26
  C7 C6 gb_26
  C7 O7 gb_20
  O7 HO7 gb_1
  C7 C8 gb_26
  C8 O8 gb_20
  O8 HO8 gb_1
  C9 C8 gb_26
  C9 O9 gb_20
  O9 HO9 gb_1
  C6 O6 gb_20
  O6 C2 gb_20
  C2 O2 gb_20
  O2 HO2 gb_1
  C1 O1A gb_6
  C1 O1B gb_6
  C1 C2 gb_26
[ angles ]
; ai aj ak gromos type
  C4 C5 O5 ga_9
  C5 C6 O5 ga_9
HO5 O5 C5 ga_12
  C4 C5 C6 ga_8
  C5 C4 O4 ga_9
  C5 C4 C3 ga_8
  O4 C4 C3 ga_9
  C4 O4 HO4 ga_12
  C4 C3 C2 ga_8
  C5 C6 C7 ga_8
  C5 C6 O6 ga_9
  C7 C6 O6 ga_9
HO7 O7 C7 ga_12
  O7 C7 C6 ga_9
  O7 C7 C8 ga_9
  C6 C7 C8 ga_8
HO8 O8 C8 ga_12
  O8 C8 C7 ga_9
  O8 C8 C9 ga_9
  C7 C8 C9 ga_8
  O9 C9 C8 ga_9
HO9 O9 C9 ga_12
  C6 O6 C2 ga_10
  C3 C2 O6 ga_9
  C3 C2 O2 ga_9
  O6 C2 O2 ga_9
  O6 C2 C1 ga_9
  O2 C2 C1 ga_9
  C2 O2 HO2 ga_12
  O1A C1 O1B ga_38
  O1A C1 C2 ga_22
  O1B C1 C2 ga_22
  C3 C2 C1 ga_8
[ impropers ]
; ai aj ak al gromos type
  C5 O6 C7 C6 gi_2
  C5 O4 C3 C4 gi_2
  C2 O6 O2 C3 gi_2
  C3 O6 C1 C2 gi_2
  C1 O1A O1B C2 gi_1
[ dihedrals ]
; ai aj ak al gromos type
  C6 C5 C4 O5 gd_43
  C6 C5 C4 O5 gd_44
  C3 C4 C5 O5 gd_43
  C3 C4 C5 O5 gd_44
  C4 C5 O5 HO5 gd_30
  C6 C5 C4 O4 gd_43
  C6 C5 C4 O4 gd_44
  C6 C5 C4 C3 gd_34
  C4 C5 C6 C7 gd_34
  C4 C5 C6 O6 gd_43
  C4 C5 C6 O6 gd_44
  C3 C4 O4 HO4 gd_30
  C5 C4 C3 C2 gd_34
  O4 C4 C3 C2 gd_43
  O4 C4 C3 C2 gd_44
  C4 C3 C2 O6 gd_43
  C4 C3 C2 O6 gd_44
  C4 C3 C2 O2 gd_43
  C4 C3 C2 O2 gd_44
  C6 C7 O7 HO7 gd_30
  O7 C7 C6 O6 gd_5
  O7 C7 C6 O6 gd_37
  C6 C7 C8 O8 gd_43
  C6 C7 C8 O8 gd_44
  O7 C7 C8 O8 gd_18
  C7 C8 O8 HO8 gd_30
  C7 C8 C9 O9 gd_43
  C7 C8 C9 O9 gd_44
  O8 C8 C9 O9 gd_18
  C8 C9 O9 HO9 gd_30
  O1A C1 C2 C3 gd_40
  C5 C6 O6 C2 gd_29
  C6 O6 C2 C3 gd_29
  O6 C2 O2 HO2 gd_2
  O6 C2 O2 HO2 gd_32
[ exclusions ]
HO2 O6
```

# $\alpha$ -KDN5Me

```
[ KDNM ]
[ atoms ]
  C5  CH1  0.23200  0
  O5  OA  -0.36000  0
  C5A CH3  0.23200  0
  C4  CH1  0.23200  1
  O4  OA  -0.64200  1
  HO4  H   0.41000  1
  C7  CH1  0.23200  2
  O7  OA  -0.64200  2
  HO7  H   0.41000  2
  C8  CH1  0.23200  3
  O8  OA  -0.64200  3
  HO8  H   0.41000  3
  C9  CH2  0.23200  4
  O9  OA  -0.64200  4
  HO9  H   0.41000  4
  C6  CH1  0.37600  5
  O6  OA  -0.48000  5
  C2  CH1  0.23200  5
  O2  OA  -0.53800  5
  HO2  H   0.41000  5
  C3  CH2  0.00000  5
  C1  C    0.36000  6
  O1A  O   -0.68000  6
  O1B  OA  -0.68000  6
[ bonds ]
  C5  O5      gb_20
  O5  C5A     gb_20
  C5  C4      gb_26
  C5  C6      gb_26
  C4  O4      gb_20
  C4  C3      gb_26
  O4  HO4     gb_1
  C3  C2      gb_26
  C7  C6      gb_26
  C7  O7      gb_20
  O7  HO7     gb_1
  C7  C8      gb_26
  C8  O8      gb_20
  O8  HO8     gb_1
  C9  C8      gb_26
  C9  O9      gb_20
  O9  HO9     gb_1
  C6  O6      gb_20
  O6  C2      gb_20
  C2  O2      gb_20
  O2  HO2     gb_1
  C1  O1A     gb_6
  C1  O1B     gb_6
  C1  C2      gb_26
[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
  C4  C5  O5  ga_9
  C5  C6  O5  ga_9
  C5A O5  C5  ga_10
  C4  C5  C6  ga_8
  C5  C4  O4  ga_9
  C5  C4  C3  ga_8
  O4  C4  C3  ga_9
  C4  O4  HO4 ga_12
  C4  C3  C2  ga_8
  C5  C6  C7  ga_8
  C5  C6  O6  ga_9
  C7  C6  O6  ga_9
  HO7 O7  C7  ga_12
  O7  C7  C6  ga_9
  O7  C7  C8  ga_9
  C6  C7  C8  ga_8
  HO8  O8  C8  ga_12
  O8  C8  C7  ga_9
  O8  C8  C9  ga_9
  C7  C8  C9  ga_8
  O9  C9  C8  ga_9
  HO9 O9  C9  ga_12
  C6  O6  C2  ga_10
  C3  C2  O6  ga_9
  C3  C2  O2  ga_9
  O6  C2  O2  ga_9
  O2  C2  C1  ga_9
  C2  O2  HO2 ga_12
  O1A C1  O1B ga_38
  O1A C1  C2  ga_22
  O1B C1  C2  ga_22
  C3  C2  C1  ga_8
[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C5  O6  C7  C6  gi_2
  C5  O4  C3  C4  gi_2
  C2  O6  O2  C3  gi_2
  C3  O6  C1  C2  gi_2
  C1  O1A O1B C2  gi_1
[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C6  C5  C4  O5  gd_43
  C6  C5  C4  O5  gd_44
  C3  C4  C5  O5  gd_43
  C3  C4  C5  O5  gd_44
  C4  C5  O5  C5A gd_29
  C6  C5  C4  O4  gd_43
  C6  C5  C4  O4  gd_44
  C6  C5  C4  C3  gd_34
  C4  C5  C6  C7  gd_34
  C4  C5  C6  O6  gd_43
  C4  C5  C6  O6  gd_44
  C3  C4  O4  HO4 gd_30
  C5  C4  C3  C2  gd_34
  O4  C4  C3  C2  gd_43
  O4  C4  C3  C2  gd_44
  C4  C3  C2  O6  gd_43
  C4  C3  C2  O2  gd_43
  C4  C3  C2  O2  gd_44
  C6  C7  O7  HO7 gd_30
  O7  C7  C6  O6  gd_5
  O7  C7  C6  O6  gd_37
  C6  C7  C8  O8  gd_43
  C6  C7  C8  O8  gd_44
  O7  C7  C8  O8  gd_18
  C7  C8  O8  HO8 gd_30
  C7  C8  C9  O9  gd_43
  C7  C8  C9  O9  gd_44
  O8  C8  C9  O9  gd_18
  C8  C9  O9  HO9 gd_30
  O1A C1  C2  C3  gd_40
  C5  C6  O6  C2  gd_29
  C6  O6  C2  C3  gd_29
  O6  C2  O2  HO2 gd_2
  O6  C2  O2  HO2 gd_32
[ exclusions ]
  HO2  O6
```

# $\alpha$ -Neu5Ac9P

```
[ NEUP ]
[ atoms ]
  C5  CH1  0.00000  0
  N5  N    -0.28000  0
  HN5 H     0.28000  0
  C5A  C    0.38000  0
  O5A  O   -0.38000  0
  C5B  CH3  0.00000  0
  C4  CH1  0.23200  1
  O4  OA   -0.64200  1
  HO4  H    0.41000  1
  C7  CH1  0.23200  2
  O7  OA   -0.64200  2
  HO7  H    0.41000  2
  C8  CH1  0.23200  3
  O8  OA   -0.64200  3
  HO8  H    0.41000  3
  C9  CH2  0.17600  4
  O9  OA   -0.36000  4
  P9  P     0.70000  4
  OP9A OA  -0.36000  4
  OP9B OM  -0.63600  4
  OP9C OM  -0.63600  4
  C6  CH1  0.37600  5
  O6  OA   -0.48000  5
  C2  CH1  0.23200  5
  O2  OA   -0.53800  5
  HO2  H    0.41000  5
  C3  CH2  0.00000  5
  C1  C     0.36000  6
  O1A  O   -0.68000  6
  O1B  OA  -0.68000  6
[ bonds ]
  C5  N5  gb_21
  N5  HN5 gb_2
  N5  C5A gb_10
  C5A O5A gb_5
  C5A C5B gb_16
  C5  C4  gb_26
  C5  C6  gb_26
  C4  O4  gb_20
  C4  C3  gb_26
  O4  HO4 gb_1
  C3  C2  gb_26
  C7  C6  gb_26
  C7  O7  gb_20
  O7  HO7 gb_1
  C7  C8  gb_26
  C8  O8  gb_20
  O8  HO8 gb_1
  C9  C8  gb_26
  C9  O9  gb_20
  O9  P9  gb_28
  P9  OP9A gb_28
  P9  OP9B gb_24
  P9  OP9C gb_24
  C6  O6  gb_20
  O6  C2  gb_20
  C2  O2  gb_20
  O2  HO2 gb_1
  C1  O1A gb_6
  C1  O1B gb_6
  C1  C2  gb_26
[ angles ]
; ai aj ak gromos type
  C6  C5  N5  ga_15
  N5  C5  C4  ga_15
  C5  N5  HN5 ga_18
  C5  N5  C5A ga_31
  HN5 N5  C5A ga_32
  N5  C5A O5A ga_33
  N5  C5A C5B ga_19
  O5A C5A C5B ga_30
  C4  C5  C6  ga_8
  C5  C4  O4  ga_9
  C5  C4  C3  ga_8
  O4  C4  C3  ga_9
  C4  O4  HO4 ga_12
  C4  C3  C2  ga_8
  C5  C6  C7  ga_8
  C5  C6  O6  ga_9
  C7  C6  O6  ga_9
  HO7 O7  C7  ga_12
  O7  C7  C6  ga_9
  O7  C7  C8  ga_9
  C6  C7  C8  ga_8
  HO8 O8  C8  ga_12
  O8  C8  C7  ga_9
  O8  C8  C9  ga_9
  C7  C8  C9  ga_8
  O9  C9  C8  ga_9
  C9  O9  P9  ga_26
  O9  P9  OP9A ga_5
  O9  P9  OP9B ga_14
  O9  P9  OP9C ga_14
  OP9A P9  OP9B ga_14
  OP9A P9  OP9C ga_14
  OP9B P9  OP9C ga_29
  C6  O6  C2  ga_10
  C3  C2  O6  ga_9
  C3  C2  O2  ga_9
  O6  C2  O2  ga_9
  O6  C2  C1  ga_9
  O2  C2  C1  ga_9
  C2  O2  HO2 ga_12
  O1A C1  O1B ga_38
  O1A C1  C2  ga_22
  O1B C1  C2  ga_22
  C3  C2  C1  ga_8
[ impropers ]
; ai aj ak al gromos type
  N5  C5A C5B HN5 gi_1
  C5A C5B N5 O5A gi_1
  C5  O6  C7  C6  gi_2
  C5  O4  C3  C4  gi_2
  C5  N5  C4  C6  gi_2
  C2  O6  O2  C3  gi_2
  C3  O6  C1  C2  gi_2
  C1  O1A O1B C2  gi_1
[ dihedrals ]
; ai aj ak al gromos type
  C3  C4  C5  N5  gd_16
  C7  C6  C5  N5  gd_16
  O4  C4  C5  N5  gd_17
  O6  C6  C5  N5  gd_18
  C4  C5  N5  C5A gd_39
  C5  N5  C5A  C5B gd_14
  C6  C5  C4  O4  gd_43
  C6  C5  C4  O4  gd_44
  C6  C5  C4  C3  gd_34
  C4  C5  C6  C7  gd_34
  C4  C5  C6  O6  gd_43
  C4  C5  C6  O6  gd_44
  C3  C4  O4  HO4 gd_30
  C5  C4  C3  C2  gd_34
  O4  C4  C3  C2  gd_43
  O4  C4  C3  C2  gd_43
  C4  C3  C2  O6  gd_44
  C4  C3  C2  O6  gd_44
  C4  C3  C2  O2  gd_43
  C4  C3  C2  O2  gd_43
  C4  C3  C2  O2  gd_44
  C6  C7  O7  HO7 gd_30
  O7  C7  C6  O6  gd_5
  O7  C7  C6  O6  gd_37
  C6  C7  C8  O8  gd_43
  C6  C7  C8  O8  gd_44
  O7  C7  C8  O8  gd_18
  C7  C8  O8  HO8 gd_30
  C7  C8  C9  O9  gd_43
  C7  C8  C9  O9  gd_44
  O8  C8  C9  O9  gd_18
  C8  C9  O9  P9  gd_29
  C9  O9  P9  OP9A gd_19
  C9  O9  P9  OP9A gd_22
  O1A C1  C2  C3  gd_40
  C5  C6  O6  C2  gd_29
  C6  O6  C2  C3  gd_29
  O6  C2  O2  HO2 gd_2
  O6  C2  O2  HO2 gd_32
[ exclusions ]
  HO2  O6
```

# $\alpha$ -Neu5Ac8S

```
[ NEUS ]
[ atoms ]
  C5  CH1  0.00000  0
  N5  N    -0.28000  0
  HN5 H     0.28000  0
  C5A C     0.38000  0
  O5A O    -0.38000  0
  C5B CH3   0.00000  0
  C4  CH1   0.23200  1
  O4  OA   -0.64200  1
  HO4 H     0.41000  1
  C7  CH1   0.23200  2
  O7  OA   -0.64200  2
  HO7 H     0.41000  2
  C8  CH1   0.23200  3
  O8  OA   -0.36000  3
  S8  S     1.03300  3
  OS8A OM   -0.63500  3
  OS8B OM   -0.63500  3
  OS8C OM   -0.63500  3
  C9  CH1   0.23200  4
  O9  OA   -0.64200  4
  HO9 H     0.41000  4
  C6  CH1   0.37600  5
  O6  OA   -0.48000  5
  C2  CH1   0.23200  5
  O2  OA   -0.53800  5
  HO2 H     0.41000  5
  C3  CH2   0.00000  5
  C1  C     0.36000  6
  O1A O    -0.68000  6
  O1B OA   -0.68000  6
[ bonds ]
  C5  N5  gb_21
  N5  HN5 gb_2
  N5  C5A gb_10
  C5A O5A gb_5
  C5A C5B gb_16
  C5  C4  gb_26
  C5  C6  gb_26
  C4  O4  gb_20
  C4  C3  gb_26
  O4  HO4 gb_1
  C3  C2  gb_26
  C7  C6  gb_26
  C7  O7  gb_20
  O7  HO7 gb_1
  C7  C8  gb_26
  C8  O8  gb_20
  O8  S8  gb_28
  S8  OS8A gb_25
  S8  OS8B gb_25
  S8  OS8C gb_25
  C9  C8  gb_26
  C9  O9  gb_20
  O9  HO9 gb_1
  C6  O6  gb_20
  O6  C2  gb_20
  C2  O2  gb_20
  O2  HO2 gb_1
  C1  O1A gb_6
  C1  O1B gb_6
  C1  C2  gb_26
[ angles ]
; ai aj ak gromos type
  C6  C5  N5  ga_15
  N5  C5  C4  ga_15
  C5  N5  HN5  ga_18
  C5  N5  C5A  ga_31
  HN5 N5  C5A  ga_32
  N5  C5A  O5A  ga_33
  N5  C5A  C5B  ga_19
  O5A C5A  C5B  ga_30
  C4  C5  C6  ga_8
  C5  C4  O4  ga_9
  C5  C4  C3  ga_8
  O4  C4  C3  ga_9
  C4  O4  HO4  ga_12
  C4  C3  C2  ga_8
  C5  C6  C7  ga_8
  C5  C6  O6  ga_9
  C7  C6  O6  ga_9
  O7  C7  C6  ga_9
  C6  C7  C8  ga_8
  C8  O8  S8  ga_21
  O8  S8  OS8A  ga_14
  O8  S8  OS8B  ga_14
  O8  S8  OS8C  ga_14
  OS8A S8  OS8B  ga_29
  OS8A S8  OS8C  ga_29
  OS8B S8  OS8C  ga_29
  O8  C8  C7  ga_9
  O8  C8  C9  ga_9
  C7  C8  C9  ga_8
  O9  C9  C8  ga_9
  HO9 O9  C9  ga_12
  C6  O6  C2  ga_10
  C3  C2  O6  ga_9
  C3  C2  O2  ga_9
  O6  C2  O2  ga_9
  O6  C2  C1  ga_9
  O2  C2  C1  ga_9
  C2  O2  HO2  ga_12
  O1A C1  O1B  ga_38
  O1A C1  C2  ga_22
  O1B C1  C2  ga_22
  C3  C2  C1  ga_8
[ impropers ]
; ai aj ak al gromos type
  N5  C5A  C5B  HN5  O5A  gi_1
  C5A  C5B  N5  O5A  gi_1
  C5  O6  C7  C6  gi_2
  C5  O4  C3  C4  gi_2
  C5  N5  C4  C6  gi_2
  C2  O6  O2  C3  gi_2
  C3  O6  C1  C2  gi_2
  C1  O1A  O1B  C2  ai_1
[ dihedrals ]
; ai aj ak al gromos type
  C3  C4  C5  N5  gd_16
  C7  C6  C5  N5  gd_16
  O4  C4  C5  N5  gd_17
  O6  C6  C5  N5  gd_18
  C4  C5  N5  C5A  gd_39
  C5  N5  C5A  C5B  gd_14
  C6  C5  C4  O4  gd_43
  C6  C5  C4  O4  gd_44
  C6  C5  C4  C3  gd_34
  C4  C5  C6  C7  gd_34
  C4  C5  C6  O6  gd_43
  C4  C5  C6  O6  gd_44
  C3  C4  O4  HO4  gd_30
  C5  C4  C3  C2  gd_34
  O4  C4  C3  C2  gd_43
  O4  C4  C3  C2  gd_44
  C4  C3  C2  O6  gd_43
  C4  C3  C2  O6  gd_44
  C4  C3  C2  O2  gd_43
  C4  C3  C2  O2  gd_44
  C6  C7  O7  HO7  gd_30
  O7  C7  C6  O6  gd_5
  O7  C7  C6  O6  gd_37
  C6  C7  C8  O8  gd_43
  C6  C7  C8  O8  gd_44
  O7  C7  C8  O8  gd_18
  C8  O8  S8  OS8A  gd_19
  C8  O8  S8  OS8A  gd_22
  C7  C8  O8  S8  gd_24
  C7  C8  C9  O9  gd_43
  C7  C8  C9  O9  gd_44
  O8  C8  C9  O9  gd_18
  C8  C9  O9  HO9  gd_30
  O1A C1  C2  C3  gd_40
  C5  C6  O6  C2  gd_29
  C6  O6  C2  C3  gd_29
  O6  C2  O2  HO2  gd_2
  O6  C2  O2  HO2  gd_32
[ exclusions ]
  HO2  O6
```



# Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 3)Gal

```

[ NEUN ]
[ atoms ]
C5  CH1  0.00000  0
N5  N    -0.28000  0
HN5 H     0.28000  0
C5A C     0.38000  0
O5A O    -0.38000  0
C5B CH3   0.00000  0
C4  CH1  0.23200  1
O4  OA   -0.64200  1
HO4 H     0.41000  1
C7  CH1  0.23200  2
O7  OA   -0.64200  2
HO7 H     0.41000  2
C8  CH1  0.23200  3
O8  OA   -0.64200  3
HO8 H     0.41000  3
C9  CH2  0.23200  4
O9  OA   -0.64200  4
HO9 H     0.41000  4
C6  CH1  0.37600  5
O6  OA   -0.48000  5
C2  CH1  0.23200  5
C3  CH2  0.00000  5
C1  C     0.33000  6
O1A O    -0.45000  6
O1B OA   -0.28800  6
HO1 H     0.40800  6

[ bonds ]
C5  N5      gb_21
N5  HN5     gb_2
N5  C5A     gb_10
C5A O5A     gb_5
C5A C5B     gb_16
C5  C4      gb_26
C5  C6      gb_26
C4  O4      gb_20
C4  C3      gb_26
O4  HO4     gb_1
C3  C2      gb_26
C7  C6      gb_26
C7  O7      gb_20
O7  HO7     gb_1
C7  C8      gb_26
C8  O8      gb_20
O8  HO8     gb_1
C9  C8      gb_26
C9  O9      gb_20
O9  HO9     gb_1
C6  O6      gb_20
O6  C2      gb_20
O1A HO1     gb_1
C1  O1A     gb_6
C1  O1B     gb_6
C1  C2      gb_26
C2  +O3     gb_20

[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
C6  C5  N5  ga_15
N5  C5  C4  ga_15
C5  N5  HN5 ga_18
C5  N5  C5A ga_31
HN5 N5  C5A ga_32
N5  C5A O5A ga_33
N5  C5A C5B ga_19
O5A C5A C5B ga_30
C4  C5  C6  ga_8
C5  C4  O4  ga_9
C5  C4  C3  ga_8
O4  C4  C3  ga_9
C4  O4  HO4 ga_12
C4  C3  C2  ga_8
C5  C6  C7  ga_8
C5  C6  O6  ga_9
C7  C6  O6  ga_9
HO7  O7  C7  ga_12
O7  C7  C6  ga_9
O7  C7  C8  ga_9
C6  C7  C8  ga_8
HO8  O8  C8  ga_12

O8  C8  C7  ga_9
O8  C8  C9  ga_9
C7  C8  C9  ga_8
O9  C9  C8  ga_9
HO9 O9  C9  ga_12
C6  O6  C2  ga_10
C3  C2  O6  ga_10
C3  C2  +O3 ga_10
C2  +O3  +C3 ga_10
O6  C2  +O3 ga_10
O6  C2  C1  ga_9
HO1 O1A C1  ga_12
O1A C1  O1B ga_38
O1A C1  C2  ga_22
O1B C1  C2  ga_22
C3  C2  C1  ga_8

[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
N5  C5A  C5B  HN5  gi_1
C5A  C5B  N5  O5A  gi_1
C5  O6  C7  C6  gi_2
C5  O4  C3  C4  gi_2
C5  N5  C4  C6  gi_2
C3  O6  C1  C2  gi_2
C1  O1A O1B  C2  gi_1

[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
C3  C4  C5  N5  gd_16
C7  C6  C5  N5  gd_16
O4  C4  C5  N5  gd_17
O6  C6  C5  N5  gd_18
C4  C5  N5  C5A gd_39
C5  N5  C5A  C5B gd_14
C6  C5  C4  O4  gd_43
C6  C5  C4  O4  gd_44
C6  C5  C4  C3  gd_34
C3  C4  O4  HO4 gd_30
C3  C2  +O3  +C3 gd_29
C5  C4  C3  C2  gd_34
O4  C4  C3  C2  gd_43
O4  C4  C3  C2  gd_44
C4  C3  C2  O6  gd_43
C4  C3  C2  O6  gd_44
C6  C7  O7  HO7 gd_30
O7  C7  C6  O6  gd_5
O7  C7  C6  O6  gd_37
C6  C7  C8  O8  gd_43
C6  C7  C8  O8  gd_44
O7  C7  C8  O8  gd_18
C7  C8  O8  HO8 gd_30
C7  C8  C9  O9  gd_43
C7  C8  C9  O9  gd_44
O8  C8  C9  O9  gd_18
C2  C1  O1A  HO1  gd_30
C1  C2  +O3  +C3  gd_29
O1A C1  C2  C3  gd_40
C8  C9  O9  HO9  gd_30
C5  C6  O6  C2  gd_29
C6  O6  C2  C3  gd_29

```

# Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 3)Gal

```

[ HBLD ]
[ atoms ]
  C4  CH1    0.23200    0
  O4  OA    -0.64200    0
  HO4  H     0.41000    0
  C3  CH1    0.23200    1
  O3  OA    -0.36000    1
  C2  CH1    0.23200    2
  O2  OA    -0.64200    2
  HO2  H     0.41000    2
  C6  CH2    0.23200    3
  O6  OA    -0.64200    3
  HO6  H     0.41000    3
  C5  CH1    0.37600    4
  O5  OA    -0.48000    4
  C1  CH1    0.23200    4
  O1  OA    -0.53800    4
  HO1  H     0.41000    4
[ bonds ]
  C4  O4      gb_20
  O4  HO4     gb_1
  C4  C3      gb_26
  C4  C5      gb_26
  C3  O3      gb_20
  C3  C2      gb_26
  O3  HO3     gb_1
  C2  O2      gb_20
  C2  C1      gb_26
  O2  HO2     gb_1
  C6  O6      gb_20
  C6  C5      gb_26
  O6  HO6     gb_1
  C5  O5      gb_20
  O5  C1      gb_20
  C1  O1      gb_20
  O1  HO1     gb_1
[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
HO4  O4  C4  ga_12
  O4  C4  C3  ga_9
  O4  C4  C5  ga_9
  C3  C4  C5  ga_8
  C4  C3  O3  ga_9
  C4  C3  C2  ga_8
  O3  C3  C2  ga_9
  C3  C2  O2  ga_9
  C3  C2  C1  ga_8
  C3  O3  C2  ga_10
  O2  C2  C1  ga_9
  C2  O2  HO2  ga_12
  O6  C6  C5  ga_9
  C6  O6  HO6  ga_12
  C4  C5  C6  ga_8
  C4  C5  O5  ga_9
  C6  C5  O5  ga_9
  C5  O5  C1  ga_10
  C2  C1  O5  ga_9
  C2  C1  O1  ga_9
  O5  C1  O1  ga_9
  C1  O1  HO1  ga_12

[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C4  C6  O5  C5  gi_2
  C3  O3  C2  C4  gi_2
  C4  O4  C3  C5  gi_2
  C1  C3  O2  C2  gi_2
  C2  O5  O1  C1  gi_2
[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  HO4  O4  C4  C3  gd_30
  O4  C4  C3  O3  gd_18
  O4  C4  C3  C2  gd_47
  O4  C4  C3  C2  gd_48
  C5  C4  C3  O3  gd_47
  C5  C4  C3  O3  gd_48
  C5  C4  C3  C2  gd_34
  O4  C4  C5  C6  gd_47
  O4  C4  C5  C6  gd_48
  C3  C4  C5  C6  gd_34
  C3  C4  C5  O5  gd_47
  C3  C4  C5  O5  gd_48
  C4  C3  C2  O2  gd_47
  C4  C3  C2  O2  gd_48
  C4  C3  C2  C1  gd_34
  O3  C3  C2  O2  gd_18
  O3  C3  C2  C1  gd_47
  O3  C3  C2  C1  gd_48
  C1  C2  O2  HO2  gd_30
  C3  C2  C1  O5  gd_47
  C3  C2  C1  O5  gd_48
  C3  C2  C1  O1  gd_47
  C3  C2  C1  O1  gd_48
  O2  C2  C1  O1  gd_18
  C2  C3  O3  C2  gd_29
  O2  C2  C3  O3  gd_35
  C5  C6  O6  HO6  gd_30
  O6  C6  C5  C4  gd_1
  O6  C6  C5  O5  gd_46
  O6  C6  C5  O5  gd_35
  C4  C5  O5  C1  gd_29
  C5  O5  C1  C2  gd_29
  O5  C1  O1  HO1  gd_2
  O5  C1  O1  HO1  gd_32
[ exclusions ]
  HO1  O5

```

# Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 4)Gal

```

[ NEUN ]
[ atoms ]
  C5  CH1  0.40800  0
  N5   N   -0.28000  0
  HN5  H    0.28000  0
  C5A  C    0.38000  0
  O5A  O   -0.38000  0
  C5B  CH3  0.00000  0
  C4   CH1  0.23200  1
  O4   OA  -0.64200  1
  HO4  H    0.41000  1
  C7   CH1  0.23200  2
  O7   OA  -0.64200  2
  HO7  H    0.41000  2
  C8   CH1  0.23200  3
  O8   OA  -0.64200  3
  HO8  H    0.41000  3
  C9   CH2  0.23200  4
  O9   OA  -0.64200  4
  HO9  H    0.41000  4
  C6   CH1  0.37600  5
  O6   OA  -0.48000  5
  C2   CH1  0.23200  6
  O2   OA  -0.53800  6
  C3   CH2  0.00000  7
  C1   C    0.33000  8
  O1A  O   -0.45000  8
  O1B  OA  -0.28800  8
[ bonds ]
  C5  N5  gb_21
  N5  HN5 gb_2
  N5  C5A gb_10
  C5A O5A gb_5
  C5A C5B gb_16
  C5  C4  gb_26
  C5  C6  gb_26
  C4  O4  gb_20
  C4  C3  gb_26
  O4  HO4 gb_1
  C3  C2  gb_26
  C7  C6  gb_26
  C7  O7  gb_20
  O7  HO7 gb_1
  C7  C8  gb_26
  C8  O8  gb_20
  O8  HO8 gb_1
  C9  C8  gb_26
  C9  O9  gb_20
  O9  HO9 gb_1
  C6  O6  gb_20
  O6  C2  gb_20
  C2  O2  gb_20
  O2  +C4 gb_20
  C1  O1A gb_6
  C1  O1B gb_6
  C1  C2  gb_26
[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
  C6  C5  N5  ga_15
  N5  C5  C4  ga_15
  C5  N5  HN5  ga_18
  C5  N5  C5A  ga_31
  HN5  N5  C5A  ga_32
  N5  C5A  O5A  ga_33
  N5  C5A  C5B  ga_19
  O5A  C5A  C5B  ga_30
  C4  C5  C6  ga_8
  C5  C4  O4  ga_9
  C5  C4  C3  ga_8
  O4  C4  C3  ga_9
  C4  O4  HO4  ga_12
  C4  C3  C2  ga_8
  C5  C6  C7  ga_8
  C5  C6  O6  ga_9
  C7  C6  O6  ga_9
  HO7  O7  C7  ga_12
  O7  C7  C6  ga_9
  O7  C7  C8  ga_9
  C6  C7  C8  ga_8
  HO8  O8  C8  ga_12
  O8  C8  C7  ga_9
  O8  C8  C9  ga_9
  C7  C8  C9  ga_8
  HO9  O9  C9  ga_12
  C6  O6  C2  ga_10
  C3  C2  O6  ga_9
  O6  C2  C1  ga_9
  O6  C2  O2  ga_38
  O2  C2  C1  ga_9
  O2  C2  C3  ga_9
  C2  O2  +C4  ga_9
  O2  +C4  +C5  ga_9
  O2  +C4  +C3  ga_9
  O1A  C1  O1B  ga_38
  O1A  C1  C2  ga_22
  O1B  C1  C2  ga_22
  C3  C2  C1  ga_8
[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  N5  C5A  C5B  HN5  gi_1
  C5A  C5B  N5  O5A  gi_1
  C5  O6  C7  C6  gi_2
  C5  O4  C3  C4  gi_2
  C5  N5  C4  C6  gi_2
  C2  O6  O2  C3  gi_2
  C3  O6  C1  C2  gi_2
  C1  O1A  O1B  C2  gi_1
[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C3  C4  C5  N5  gd_16
  C7  C6  C5  N5  gd_16
  O4  C4  C5  N5  gd_17
  O6  C6  C5  N5  gd_18
  C4  C5  N5  C5A  gd_39
  C5  N5  C5A  C5B  gd_14
  C6  C5  C4  O4  gd_43
  C6  C5  C4  O4  gd_44
  C6  C5  C4  C3  gd_34
  C3  C4  O4  HO4  gd_30
  C5  C4  C3  C2  gd_34
  O4  C4  C3  C2  gd_43
  O4  C4  C3  C2  gd_44
  C4  C3  C2  O6  gd_43
  C4  C3  C2  O6  gd_44
  C4  C3  C2  O2  gd_43
  C4  C3  C2  O2  gd_44
  C6  C7  O7  HO7  gd_30
  O7  C7  C6  O6  gd_5
  O7  C7  C6  O6  gd_37
  C6  C7  C8  O8  gd_43
  C6  C7  C8  O8  gd_44
  O7  C7  C8  O8  gd_18
  C7  C8  O8  HO8  gd_30
  C7  C8  C9  O9  gd_43
  C7  C8  C9  O9  gd_44
  O8  C8  C9  O9  gd_18
  C1  C2  O2  +C4  gd_29
  C2  O2  +C4  +C5  gd_29
  C2  O2  +C4  +C3  gd_29
  O1A  C1  C2  C3  gd_40
  C8  C9  O9  HO9  gd_30
  C5  C6  O6  C2  gd_29
  C6  O6  C2  C3  gd_29

```

# Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 4)Gal

```

[ HBLD ]
[ atoms ]
  C4  CH1  0.23200  0
  C3  CH1  0.23200  1
  O3  OA   -0.36000  1
  HO3 H     0.41000  1
  C2  CH1  0.23200  2
  O2  OA   -0.64200  2
  HO2 H     0.41000  2
  C6  CH2  0.23200  3
  O6  OA   -0.64200  3
  HO6 H     0.41000  3
  C5  CH1  0.37600  4
  O5  OA   -0.48000  4
  C1  CH1  0.23200  5
  O1  OA   -0.53800  5
  HO1 H     0.41000  5
[ bonds ]
  C4  C3  gb_26
  C4  C5  gb_26
  C3  O3  gb_20
  C3  C2  gb_26
  O3  HO3 gb_1
  C2  O2  gb_20
  C2  C1  gb_26
  O2  HO2 gb_1
  C6  O6  gb_20
  C6  C5  gb_26
  C4  +O2 gb_20
  O6  HO6 gb_1
  C5  O5  gb_20
  O5  C1  gb_20
  C1  O1  gb_20
  O1  HO1 gb_1
[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
  C3  C4  C5  ga_8
  C4  C3  O3  ga_9
  C5  C4  +O2 ga_9
  C3  C4  +O2 ga_9
  C4  C3  C2  ga_8
  O3  C3  C2  ga_9
  C3  O3  HO3 ga_12
  C3  C2  O2  ga_9
  C3  C2  C1  ga_8
  O2  C2  C1  ga_9
  C2  O2  HO2 ga_12
  O6  C6  C5  ga_9
  C6  O6  HO6 ga_12
  C4  C5  C6  ga_8
  C4  C5  O5  ga_9
  C6  C5  O5  ga_9
  C5  O5  C1  ga_10
  C2  C1  O5  ga_9
  C2  C1  O1  ga_9
  O5  C1  O1  ga_9
  C1  O1  HO1 ga_12

[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C4  C6  O5  C5  gi_2
  C3  O3  C2  C4  gi_2
  C1  C3  O2  C2  gi_2
  C2  O5  O1  C1  gi_2
[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C5  C4  C3  O3  gd_47
  C5  C4  C3  O3  gd_48
  C5  C4  C3  C2  gd_34
  C3  C4  C5  C6  gd_34
  C3  C4  C5  O5  gd_47
  C3  C4  C5  O5  gd_48
  C2  C3  O3  HO3  gd_30
  C4  C3  C2  O2  gd_47
  C4  C3  C2  O2  gd_48
  C4  C3  C2  C1  gd_34
  O3  C3  C2  O2  gd_18
  O3  C3  C2  C1  gd_47
  O3  C3  C2  C1  gd_48
  C1  C2  O2  HO2  gd_30
  C3  C2  C1  O5  gd_47
  C3  C2  C1  O5  gd_48
  C3  C2  C1  O1  gd_47
  C3  C2  C1  O1  gd_48
  O2  C2  C1  O1  gd_18
  C2  C3  O3  C2  gd_29
  O2  C2  C3  O3  gd_35
  C5  C4  +O2  +C2  gd_48
  C3  C4  +O2  +C2  gd_48
  O5  C5  C4  +O2  gd_48
  C5  C6  O6  HO6  gd_30
  O6  C6  C5  C4  gd_1
  O6  C6  C5  O5  gd_46
  O6  C6  C5  O5  gd_35
  C4  C5  O5  C1  gd_29
  C5  O5  C1  C2  gd_29
  O5  C1  O1  HO1  gd_2
  O5  C1  O1  HO1  gd_32
[ exclusions ]
  HO1  O5

```

# Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 6)Gal

```

[ NEUN ]
[ atoms ]
  C5  CH1  0.00000  0
  N5  N    -0.28000  0
  HN5 H     0.28000  0
  C5A  C    0.38000  0
  O5A  O   -0.38000  0
  C5B  CH3  0.00000  0
  C4   CH1  0.23200  1
  O4   OA  -0.64200  1
  HO4  H    0.41000  1
  C7   CH1  0.23200  2
  O7   OA  -0.64200  2
  HO7  H    0.41000  2
  C8   CH1  0.23200  3
  O8   OA  -0.64200  3
  HO8  H    0.41000  3
  C9   CH2  0.23200  4
  O9   OA  -0.64200  4
  HO9  H    0.41000  4
  C6   CH1  0.37600  5
  O6   OA  -0.48000  5
  C2   CH1  0.46800  6
  O2   OA  -0.53800  6
  C3   CH2  0.68000  7
  C1   C    0.68000  8
  O1A  O   -0.68000  8
  O1B  OA  -0.68000  8
[ bonds ]
  C5  N5      gb_21
  N5  HN5     gb_2
  N5  C5A     gb_10
  C5A O5A     gb_5
  C5A C5B     gb_16
  C5  C4      gb_26
  C5  C6      gb_26
  C4  O4      gb_20
  C4  C3      gb_26
  O4  HO4     gb_1
  C3  C2      gb_26
  C7  C6      gb_26
  C7  O7      gb_20
  O7  HO7     gb_1
  C7  C8      gb_26
  C8  O8      gb_20
  O8  HO8     gb_1
  C9  C8      gb_26
  C9  O9      gb_20
  O9  HO9     gb_1
  C6  O6      gb_20
  O6  C2      gb_20
  C2  O2      gb_20
  O2  +C6     gd_20
  C1  O1A     gb_6
  C1  O1B     gb_6
  C1  C2      gb_26
[ angles ]
; ai aj ak gromos type
  C6  C5  N5  ga_15
  N5  C5  C4  ga_15
  C5  N5  HN5 ga_18
  C5  N5  C5A ga_31
  HN5 N5  C5A ga_32
  N5  C5A O5A ga_33
  N5  C5A C5B ga_19
  O5A C5A C5B ga_30
  C4  C5  C6  ga_8
  C5  C4  O4  ga_9
  C5  C4  C3  ga_8
  O4  C4  C3  ga_9
  C4  O4  HO4 ga_12
  C4  C3  C2  ga_8
  C5  C6  C7  ga_8
  C5  C6  O6  ga_9
  C7  C6  O6  ga_9
  HO7 O7  C7  ga_12
  O7  C7  C6  ga_9
  O7  C7  C8  ga_9
  C6  C7  C8  ga_8
  HO8 O8  C8  ga_12
  O8  C8  C7  ga_9
  O8  C8  C9  ga_9
  C7  C8  C9  ga_8
  HO9 O9  C9  ga_12
  C6  O6  C2  ga_10
  C3  C2  O6  ga_9
  O6  C2  C1  ga_9
  O6  C2  O2  ga_38
  O2  C2  C3  ga_9
  O2  C2  C1  ga_9
  +C6 O2  C2  ga_9
  +C6 O2  C2  ga_22
  O2  +C6  +C5 ga_9
  O1A C1  O1B ga_38
  O1A C1  C2  ga_22
  O1B C1  C2  ga_22
  C3  C2  C1  ga_8
[ impropers ]
; ai aj ak al gromos type
  N5  C5A  C5B  HN5  gi_1
  C5A C5B  N5  O5A  gi_1
  C5  O6  C7  C6  gi_2
  C5  O4  C3  C4  gi_2
  C5  N5  C4  C6  gi_2
  C2  O6  O2  C3  gi_2
  C3  O6  C1  C2  gi_2
  C1  O1A O1B  C2  gi_1
[ dihedrals ]
; ai aj ak al gromos type
  C3  C4  C5  N5  gd_16
  C7  C6  C5  N5  gd_16
  O4  C4  C5  N5  gd_17
  O6  C6  C5  N5  gd_18
  C4  C5  N5  C5A gd_39
  C5  N5  C5A  C5B gd_14
  C6  C5  C4  O4  gd_43
  C6  C5  C4  O4  gd_44
  C6  C5  C4  C3  gd_34
  C3  C4  O4  HO4 gd_30
  C5  C4  C3  C2  gd_34
  O4  C4  C3  C2  gd_43
  O4  C4  C3  C2  gd_44
  C4  C3  C2  O6  gd_43
  C4  C3  C2  O6  gd_44
  C4  C3  C2  O2  gd_43
  C4  C3  C2  O2  gd_44
  C6  C7  O7  HO7 gd_30
  O7  C7  C6  O6  gd_5
  O7  C7  C6  O6  gd_37
  C6  C7  C8  O8  gd_43
  C6  C7  C8  O8  gd_44
  O7  C7  C8  O8  gd_18
  C7  C8  O8  HO8 gd_30
  C7  C8  C9  O9  gd_43
  C7  C8  C9  O9  gd_44
  O8  C8  C9  O9  gd_18
  C1  C2  O2  +C6 gd_29
  O6  C2  O2  +C6 gd_44
  C2  O2  +C6  +C5 gd_29
  O1A C1  C2  C3  gd_40
  C8  C9  O9  HO9 gd_30
  C5  C6  O6  C2  gd_29
  C6  O6  C2  C3  gd_29

```

# Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 6)Gal

```

[ HBLD ]
[ atoms ]
  C4  CH1  0.23200  0
  O4  OA   -0.64200  0
HO4   H    0.41000  0
  C3  CH1  0.23200  1
  O3  OA   -0.36000  1
HO3   H    0.41000  1
  C2  CH1  0.23200  2
  O2  OA   -0.64200  2
HO2   H    0.41000  2
  C6  CH2  0.23200  3
  C5  CH1  0.37600  4
  O5  OA   -0.48000  4
  C1  CH1  0.23200  4
  O1  OA   -0.53800  4
HO1   H    0.41000  4
[ bonds ]
  C4  O4      gb_20
  O4  HO4     gb_1
   4   C3     gb_26
  C4   C5     gb_26
  C3   O3     gb_20
  C3   C2     gb_26
   3   HO3    gb_1
  C2   O2     gb_20
  C2   C1     gb_26
  O2   HO2    gb_1
  C6   C5     gb_26
  C6   +O2    gb_20
  C5   O5     gb_20
  O5   C1     gb_20
  C1   O1     gb_20
  O1   HO1    gb_1
[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
HO4  O4  C4  ga_12
  O4  C4  C3  ga_9
  O4  C4  C5  ga_9
  C3  C4  C5  ga_8
  C4  C3  O3  ga_9
  C5  C6  +O2  ga_9
  C6  +O2  +C2  ga_10
  C4  C3  C2  ga_8
  O3  C3  C2  ga_9
  C3  C3  HO3  ga_12
  C3  C2  O2  ga_9
  C3  C2  C1  ga_8
  O2  C2  C1  ga_9
  C2  O2  HO2  ga_12

  C4  C5  C6  ga_8
  C4  C5  O5  ga_9
  C6  C5  O5  ga_9
  C5  O5  C1  ga_10
  C2  C1  O5  ga_9
  C2  C1  O1  ga_9
  O5  C1  O1  ga_9
  C1  O1  HO1  ga_12
[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C4  C6  O5  C5  gi_2
  C3  O3  C2  C4  gi_2
  C4  O4  C3  C5  gi_2
  C1  C3  O2  C2  gi_2
  C2  O5  O1  C1  gi_2
[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
HO4  O4  C4  C3  gd_30
  O4  C4  C3  O3  gd_18
  O4  C4  C3  C2  gd_47
  O4  C4  C3  C2  gd_48
  C5  C4  C3  O3  gd_47
  C5  C4  C3  O3  gd_48
  C5  C4  C3  C2  gd_34
  O4  C4  C5  C6  gd_47
  O4  C4  C5  C6  gd_48
  C3  C4  C5  C6  gd_34
  C3  C4  C5  O5  gd_47
  C3  C4  C5  O5  gd_48
  C2  C3  O3  HO3  gd_30
  C4  C3  C2  O2  gd_47
  C4  C3  C2  O2  gd_48
  C4  C3  C2  C1  gd_34
  O3  C3  C2  O2  gd_18
  O3  C3  C2  C1  gd_47
  O3  C3  C2  C1  gd_48
  C1  C2  O2  HO2  gd_30
  C3  C2  C1  O5  gd_47
  C3  C2  C1  O5  gd_48
  C3  C2  C1  O1  gd_47
  C3  C2  C1  O1  gd_48
  O2  C2  C1  O1  gd_18
  C2  C3  O3  C2  gd_29
  O2  C2  C3  O3  gd_35
  C5  C6  +O2  +C2  gd_48
  O5  C5  C6  +O2  gd_48
  C4  C5  C6  +O2  gd_48
+O6  +C2  +O2  C6  gd_18
  C4  C5  O5  C1  gd_29
  C5  O5  C1  C2  gd_29
  O5  C1  O1  HO1  gd_2
  O5  C1  O1  HO1  gd_32
[ exclusions ]
HO1  O5

```

# Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac

```

[ NEUN ]
[ atoms ]
  C5  CH1  0.61400  0
  N5   N   -0.28000  0
  HN5  H    0.28000  0
  C5A  C    0.38000  0
  O5A  O   -0.38000  0
  C5B  CH3  0.00000  0
  C4   CH1  0.23200  1
  O4   OA  -0.64200  1
  HO4  H    0.41000  1
  C7   CH1  0.23200  2
  O7   OA  -0.64200  2
  HO7  H    0.41000  2
  C8   CH1  0.23200  3
  O8   OA  -0.64200  3
  HO8  H    0.41000  3
  C9   CH2  0.23200  4
  O9   OA  -0.64200  4
  HO9  H    0.41000  4
  C6   CH1  0.30200  5
  O6   OA  -0.68000  5
  C2   CH1  0.23200  6
  C3   CH2  0.00000  7
  C1   C    0.60000  8
  O1A  O   -0.53000  8
  O1B  OA  -0.53800  8
[ bonds ]
  C5  N5  gb_21
  N5  HN5 gb_2
  N5  C5A gb_10
  C5A O5A gb_5
  C5A C5B gb_16
  C5  C4  gb_26
  C5  C6  gb_26
  C4  O4  gb_20
  C4  C3  gb_26
  O4  HO4 gb_1
  C3  C2  gb_26
  C7  C6  gb_26
  C7  O7  gb_20
  O7  HO7 gb_1
  C7  C8  gb_26
  C8  O8  gb_20
  O8  HO8 gb_1
  C9  C8  gb_26
  C9  O9  gb_20
  O9  HO9 gb_1
  C6  O6  gb_20
  O6  C2  gb_20
  C2  O2  gb_20
  C2  +O8 gb_20
  C1  O1A gb_6
  C1  O1B gb_6
  C1  C2  gb_26
[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
  C6  C5  N5  ga_15
  N5  C5  C4  ga_15
  C5  N5  HN5  ga_18
  C5  N5  C5A  ga_31
  HN5 N5  C5A  ga_32
  N5  C5A  O5A  ga_33
  N5  C5A  C5B  ga_19
  O5A C5A  C5B  ga_30
  C4  C5  C6  ga_8
  C5  C4  O4  ga_9
  C5  C4  C3  ga_8
  O4  C4  C3  ga_9
  C4  O4  HO4  ga_12
  C4  C3  C2  ga_8
  C5  C6  C7  ga_8
  C5  C6  O6  ga_9
  C7  C6  O6  ga_9
  HO7 O7  C7  ga_12
  O7  C7  C6  ga_9
  O7  C7  C8  ga_9
  C6  C7  C8  ga_8
  HO8 O8  C8  ga_12
  O8  C8  C7  ga_9
  O8  C8  C9  ga_9
  C7  C8  C9  ga_8
  O9  C9  C8  ga_9
HO9  O9  C9  ga_12
  C6  O6  C2  ga_10
  C3  C2  O6  ga_9
  O6  C2  C1  ga_9
  O6  C2  +O8  ga_38
+O8  C2  C1  ga_9
  C2  +O8  +C8  ga_10
  O1A C1  O1B  ga_38
  O1A C1  C2  ga_22
  O1B C1  C2  ga_22
  C3  C2  C1  ga_8
  C3  C2  +O8  ga_22
[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  N5  C5A  C5B  HN5  O5A  gi_1
  C5A  C5B  N5  O5A  gi_1
  C5  O6  C7  C6  gi_2
  C5  O4  C3  C4  gi_2
  C5  N5  C4  C6  gi_2
  C3  O6  C1  C2  gi_2
  C1  O1A  O1B  C2  gi_1
[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C3  C4  C5  N5  gd_16
  C7  C6  C5  N5  gd_16
  O4  C4  C5  N5  gd_17
  O6  C6  C5  N5  gd_18
  C4  C5  N5  C5A  gd_39
  C5  N5  C5A  C5B  gd_14
  C6  C5  C4  O4  gd_43
  C6  C5  C4  O4  gd_44
  C6  C5  C4  C3  gd_34
  C3  C4  O4  HO4  gd_30
  C3  C2  +O8  +C8  gd_29
  C1  C2  +O8  +C8  gd_29
  C2  +O8  +C8  +C9  gd_43
  C2  +O8  +C8  +C7  gd_43
  C5  C4  C3  C2  gd_34
  O4  C4  C3  C2  gd_43
  O4  C4  C3  C2  gd_44
  C4  C3  C2  O6  gd_43
  C4  C3  C2  O6  gd_44
  C4  C3  C2  +O8  gd_43
  C4  C3  C2  +O8  gd_44
  C6  C7  O7  HO7  gd_30
  O7  C7  C6  O6  gd_5
  O7  C7  C6  O6  gd_37
  C6  C7  C8  O8  gd_43
  C6  C7  C8  O8  gd_44
  O7  C7  C8  O8  gd_18
  C7  C8  O8  HO8  gd_30
  C7  C8  C9  O9  gd_43
  C7  C8  C9  O9  gd_44
  O8  C8  C9  O9  gd_18
  O1A C1  C2  C3  gd_40
  C8  C9  O9  HO9  gd_30
  C5  C6  O6  C2  gd_29
  C6  O6  C2  C3  gd_29

```

# Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac

```

[ NEU1 ]
[ atoms ]
  C5 CH1 0.31000 0
  N5 N -0.28000 0
  HN5 H 0.28000 0
  C5A C 0.38000 0
  O5A O -0.38000 0
  C5B CH3 0.00000 0
  C4 CH1 0.23200 1
  O4 OA -0.64200 1
  HO4 H 0.41000 1
  C7 CH1 0.23200 2
  O7 OA -0.64200 2
  HO7 H 0.41000 2
  C8 CH1 0.23200 3
  O8 OA -0.31000 3
  C9 CH2 0.23200 4
  O9 OA -0.64200 4
  HO9 H 0.41000 4
  C6 CH1 0.37600 5
  O6 OA -0.48000 5
  C2 CH1 0.23200 6
  O2 OA -0.53800 6
  HO2 H 0.41000 6
  C3 CH2 0.00000 7
  C1 C 0.52800 8
  O1A O -0.45000 8
  O1B OA -0.31000 8
[ bonds ]
  C5 N5 gb_21
  N5 HN5 gb_2
  N5 C5A gb_10
  C5A O5A gb_5
  C5A C5B gb_16
  C5 C4 gb_26
  C5 C6 gb_26
  C4 O4 gb_20
  C4 C3 gb_26
  O4 HO4 gb_1
  C3 C2 gb_26
  C7 C6 gb_26
  C7 O7 gb_20
  O7 HO7 gb_1
  C7 C8 gb_26
  C8 O8 gb_20
  C9 C8 gb_26
  C9 O9 gb_20
  O9 HO9 gb_1
  +C2 O8 gb_20
  C6 O6 gb_20
  O6 C2 gb_20
  C2 O2 gb_20
  O2 HO2 gb_1
  C1 O1A gb_6
  C1 O1B gb_6
  C1 C2 gb_26
[ angles ]
; ai aj ak gromos type
  C6 C5 N5 ga_15
  N5 C5 C4 ga_15
  C5 N5 HN5 ga_18
  C5 N5 C5A ga_31
  HN5 N5 C5A ga_32
  N5 C5A O5A ga_33
  N5 C5A C5B ga_19
  O5A C5A C5B ga_30
  C4 C5 C6 ga_8
  C5 C4 O4 ga_9
  C5 C4 C3 ga_8
  O4 C4 C3 ga_9
  C4 O4 HO4 ga_12
  C4 C3 C2 ga_8
  C5 C6 C7 ga_8
  C5 C6 O6 ga_9
  C7 C6 O6 ga_9
  HO7 O7 C7 ga_12
  O7 C7 C6 ga_9
  O7 C7 C8 ga_9
  C6 C7 C8 ga_8
  C7 C8 O8 ga_9
  C9 C8 O8 ga_9
  C8 O8 +C2 ga_9
  O8 +C2 +C1 ga_9
  O8 +C2 +C3 ga_9
  O8 +C2 +O6 ga_38
  C7 C8 C9 ga_8
  O9 C9 C8 ga_9
  HO9 O9 C9 ga_12
  C6 O6 C2 ga_10
  C3 C2 O6 ga_9
  O6 C2 C1 ga_9
  O2 C2 C1 ga_22
  O2 C2 C3 ga_22
  C2 O2 HO2 ga_12
  O1A C1 O1B ga_38
  O1A C1 C2 ga_22
  O1B C1 C2 ga_22
  C3 C2 C1 ga_8
[ impropers ]
; ai aj ak al gromos type
  N5 C5A C5B HN5 gi_1
  C5A C5B N5 O5A gi_1
  C5 O6 C7 C6 gi_2
  C5 O4 C3 C4 gi_2
  C5 N5 C4 C6 gi_2
  C2 O6 O2 C3 gi_2
  C3 O6 C1 C2 gi_2
  C1 O1A O1B C2 gi_1
[ dihedrals ]
; ai aj ak al gromos type
  C3 C4 C5 N5 gd_16
  C7 C6 C5 N5 gd_16
  O4 C4 C5 N5 gd_17
  O6 C6 C5 N5 gd_18
  C4 C5 N5 C5A gd_39
  C5 N5 C5A C5B gd_14
  C6 C5 C4 O4 gd_43
  C6 C5 C4 O4 gd_44
  C6 C5 C4 C3 gd_34
  C3 C4 O4 HO4 gd_30
  C5 C4 C3 C2 gd_34
  O4 C4 C3 C2 gd_43
  O4 C4 C3 C2 gd_44
  C4 C3 C2 O6 gd_43
  C4 C3 C2 O6 gd_44
  C4 C3 C2 O2 gd_43
  C4 C3 C2 O2 gd_44
  C6 C7 O7 HO7 gd_30
  C8 C7 O7 HO7 gd_30
  O7 C7 C6 O6 gd_5
  O7 C7 C6 O6 gd_37
  C6 C7 C8 O8 gd_43
  C6 C7 C8 O8 gd_44
  O7 C7 C8 O8 gd_18
  C7 C8 O8 +C2 gd_18
  C9 C8 O8 +C2 gd_18
  C7 C8 C9 O9 gd_43
  C7 C8 C9 O9 gd_44
  O1A C1 C2 C3 gd_40
  C8 C9 O9 HO9 gd_30
  C5 C6 O6 C2 gd_29
  C6 O6 C2 C3 gd_29
  O6 C2 O2 HO2 gd_2
  O6 C2 O2 HO2 gd_32
[ exclusions ]
  HO2 O6

```



Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac

```

[ NEU1 ]
[ atoms ]
  C51  CH1  0.00000  0
  N51   N   -0.28000  0
  HN51  H    0.28000  0
  C51A  C    0.38000  0
  O51A  O   -0.38000  0
  C51B  CH3  0.00000  0
  C41   CH1  0.23200  1
  O41   OA  -0.64200  1
  HO41  H    0.41000  1
  C71   CH1  0.23200  2
  O71   OA  -0.64200  2
  HO71  H    0.41000  2
  C81   CH1  0.37600  3
  O81   OA  -0.48000  3
  C91   CH2  0.23200  4
  O91   OA  -0.64200  4
  HO91  H    0.41000  4
  C61   CH1  0.37600  5
  O61   OA  -0.48000  5
  C21   CH1  0.23200  5
  O21   OA  -0.53800  5
  HO21  H    0.41000  5
  C31   CH2  0.00000  5
  C11   C    0.36000  6
  O11A  O   -0.68000  6
  O11B  OA  -0.68000  6
[ bonds ]
  C51  N51      gb_21
  N51  HN51     gb_2
  N51  C51A     gb_10
  C51A O51A     gb_5
  C51A C51B     gb_16
  C51  C41     gb_26
  C51  C61     gb_26
  C41  O41     gb_20
  C41  C31     gb_26
  O41  HO41    gb_1
  C31  C21     gb_26
  C71  C61     gb_26
  C71  O71     gb_20
  O71  HO71    gb_1
  C71  C81     gb_26
  C81  O81     gb_20
  O81  +C22    gb_20
  C91  C81     gb_26
  C91  O91     gb_20
  O91  HO91    gb_1
  C61  O61     gb_20
  O61  C21     gb_20
  C21  O21     gb_20
  O21  HO21    gb_1
  C11  O11A    gb_6
  C11  O11B    gb_6
  C11  C21     gb_26
[ angles ]
; ai aj ak gromos type
  C61  C51  N51  ga_15
  N51  C51  C41  ga_15
  C51  N51  HN51  ga_18
  C51  N51  C51A  ga_31
  HN51 N51  C51A  ga_32
  N51  C51A O51A  ga_33
  N51  C51A C51B  ga_19
  O51A C51A C51B  ga_30
  C41  C51  C61  ga_8
  C51  C41  O41  ga_9
  C51  C41  C31  ga_8
  O41  C41  C31  ga_9
  C41  O41  HO41  ga_12
  C41  C31  C21  ga_8
  C51  C61  C71  ga_8
  C51  C61  O61  ga_9
  C71  C61  O61  ga_9
  HO71 O71  C71  ga_12
  O71  C71  C61  ga_9
  O71  C71  C81  ga_9
  C61  C71  C81  ga_8
  +C22 O81  C81  ga_12
  O81  C81  C71  ga_9
  O81  C81  C91  ga_9
  O81  +C22 +O62  ga_9
  O81  +C22 +C32  ga_9
  O81  +C22 +C12  ga_9
  C71  C81  C91  ga_8
  O91  C91  C81  ga_9
  HO91 O91  C91  ga_12
  C61  O61  C21  ga_10
  C31  C21  O61  ga_9
  C31  C21  O21  ga_9
  O61  C21  O21  ga_9
  O61  C21  C11  ga_9
  O21  C21  C11  ga_9
  C21  O21  HO21  ga_12
  O11A C11  O11B  ga_38
  O11A C11  C21  ga_22
  O11B C11  C21  ga_22
  C31  C21  C11  ga_8
[ impropers ]
; ai aj ak al gromos type
  N51  C51A  C51B  HN51  gi_1
  C51A C51B  N51  O51A  gi_1
  C51  O61  C71  C61  gi_2
  C51  O41  C31  C41  gi_2
  C51  N51  C41  C61  gi_2
  C21  O61  O21  C31  gi_2
  C31  O61  C11  C21  gi_2
  C11  O11A O11B  C21  gi_1
[ dihedrals ]
; ai aj ak al gromos type
  C31  C41  C51  N51  gd_16
  C71  C61  C51  N51  gd_16
  O41  C41  C51  N51  gd_17
  O61  C61  C51  N51  gd_18
  C41  C51  N51  C51A  gd_39
  C51  N51  C51A  C51B  gd_14
  C61  C51  C41  O41  gd_43
  C61  C51  C41  O41  gd_44
  C61  C51  C41  C31  gd_34
  C41  C51  C61  C71  gd_34
  C41  C51  C61  O61  gd_43
  C41  C51  C61  O61  gd_44
  C31  C41  O41  HO41  gd_30
  C51  C41  C31  C21  gd_34
  O41  C41  C31  C21  gd_43
  O41  C41  C31  C21  gd_44
  C41  C31  C21  O61  gd_43
  C41  C31  C21  O61  gd_44
  C41  C31  C21  O21  gd_43
  C41  C31  C21  O21  gd_44
  C61  C71  O71  HO71  gd_30
  O71  C71  C61  O61  gd_5
  O71  C71  C61  O61  gd_37
  C61  C71  C81  O81  gd_43
  C61  C71  C81  O81  gd_44
  O71  C71  C81  O81  gd_18
  C71  C81  C91  O91  gd_43
  C71  C81  C91  O91  gd_44
  C71  C81  O81  +C22  gd_29
  O81  C81  C91  O91  gd_18
  C81  C91  +C22  +O62  gd_43
  C81  O81  +C22  +O62  gd_28
  C81  C91  O91  HO91  gd_30
  O11A C11  C21  C31  gd_40
  C51  C61  O61  C21  gd_29
  C61  O61  C21  C31  gd_29
  O61  C21  O21  HO21  gd_2
  O61  C21  O21  HO21  gd_32

```

Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac

```
[ NEU2 ]
[ atoms ]
C52 CH1 0.00000 0
N52 N -0.28000 0
HN52 H 0.28000 0
C52A C 0.38000 0
O52A O -0.38000 0
C52B CH3 0.00000 0
C42 CH1 0.23200 1
O42 OA -0.64200 1
HO42 H 0.41000 1
C72 CH1 0.23200 2
O72 OA -0.64200 2
HO72 H 0.41000 2
C82 CH1 0.37600 3
O82 OA -0.48000 3
C92 CH2 0.23200 4
O92 OA -0.64200 4
HO92 H 0.41000 4
C62 CH1 0.37600 5
O62 OA -0.48000 5
C22 CH1 0.23200 5
C32 CH2 0.00000 5
C12 C 0.36000 6
O12A O -0.68000 6
O12B OA -0.68000 6

[ bonds ]
C52 N52 gb_21
N52 HN52 gb_2
N52 C52A gb_10
C52A O52A gb_5
C52A C52B gb_16
C52 C42 gb_26
C52 C62 gb_26
C42 O42 gb_20
C42 C32 gb_26
O42 HO42 gb_1
C32 C22 gb_26
C72 C62 gb_26
C72 O72 gb_20
O72 HO72 gb_1
C72 C82 gb_26
C82 O82 gb_20
O82 +C23 gb_20
C92 C82 gb_26
C92 O92 gb_20
O92 HO92 gb_1
C62 O62 gb_20
O62 C22 gb_20
C12 O12A gb_6
C12 O12B gb_6
C12 C22 gb_26

[ angles ]
; ai aj ak gromos type
C62 C52 N52 ga_15
N52 C52 C42 ga_15
C52 N52 HN52 ga_18
C52 N52 C52A ga_31
HN52 N52 C52A ga_32
N52 C52A O52A ga_33
N52 C52A C52B ga_19
O52A C52A C52B ga_30
C42 C52 C62 ga_8
C52 C42 O42 ga_9
C52 C42 C32 ga_8
O42 C42 C32 ga_9
C42 O42 HO42 ga_12
C42 C32 C22 ga_8
C52 C62 C72 ga_8
C52 C62 O62 ga_9
C72 C62 O62 ga_9
HO72 O72 C72 ga_12
O72 C72 C62 ga_9
O72 C72 C82 ga_9
C62 C72 C82 ga_8
+C23 O82 C82 ga_10
O82 C82 C72 ga_9
O82 C82 C92 ga_9
O82 +C23 +O63 ga_9
O82 +C23 +C33 ga_9
O82 +C23 +C13 ga_9
```

```
C72 C82 C92 ga_8
O92 C92 C82 ga_9
HO92 O92 C92 ga_12
C62 O62 C22 ga_10
C32 C22 O62 ga_9
O62 C22 C12 ga_9
O12A C12 O12B ga_38
O12A C12 C22 ga_22
O12B C12 C22 ga_22
C32 C22 C12 ga_8

[ impropers ]
; ai aj ak al gromos type
N52 C52A C52B HN52 gi_1
C52A C52B N52 O52A gi_1
C52 O62 C72 C62 gi_2
C52 O42 C32 C42 gi_2
C52 N52 C42 C62 gi_2
C32 O62 C12 C22 gi_2
C12 O12A O12B C22 gi_1

[ dihedrals ]
; ai aj ak al gromos type
C32 C42 C52 N52 gd_16
C72 C62 C52 N52 gd_16
O42 C42 C52 N52 gd_17
O62 C62 C52 N52 gd_18
C42 C52 N52 C52A gd_39
C52 N52 C52A C52B gd_14
C62 C52 C42 O42 gd_43
C62 C52 C42 O42 gd_44
C62 C52 C42 C32 gd_34
C42 C52 C62 C72 gd_34
C42 C52 C62 O62 gd_43
C42 C52 C62 O62 gd_44
C32 C42 O42 HO42 gd_30
C52 C42 C32 C22 gd_34
O42 C42 C32 C22 gd_43
O42 C42 C32 C22 gd_44
C42 C32 C22 O62 gd_43
C42 C32 C22 O62 gd_44
C32 C42 O42 HO42 gd_30
C52 C42 C32 C22 gd_34
O42 C42 C32 C22 gd_44
C42 C32 C22 O62 gd_43
C42 C32 C22 O62 gd_44
C62 C72 O72 HO72 gd_30
O72 C72 C62 O62 gd_5
O72 C72 C62 O62 gd_37
C62 C72 C82 O82 gd_43
C62 C72 C82 O82 gd_44
O72 C72 C82 O82 gd_18
C72 C82 O82 +C23 gd_29
C72 C82 C92 O92 gd_43
C72 C82 C92 O92 gd_44
O82 C82 C92 O92 gd_18
C82 C92 O92 HO92 gd_30
C82 O82 +C23 +O63 gd_28
O12A C12 C22 C32 gd_40
C52 C62 O62 C22 gd_29
C62 O62 C22 C32 gd_29
```

Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac

```

[ NEU3 ]
[ atoms ]
C53  CH1    0.00000    0
N53   N     -0.28000    0
HN53  H      0.28000    0
C53A  C      0.38000    0
O53A  O     -0.38000    0
C53B  CH3    0.00000    0
C43   CH1    0.23200    1
O43   OA    -0.64200    1
HO43  H      0.41000    1
C73   CH1    0.23200    2
O73   OA    -0.64200    2
HO73  H      0.41000    2
C83   CH1    0.37600    3
O83   OA    -0.48000    3
C93   CH2    0.23200    4
O93   OA    -0.64200    4
HO93  H      0.41000    4
C63   CH1    0.37600    5
O63   OA    -0.48000    5
C23   CH1    0.23200    5
C33   CH2    0.00000    5
C13   C      0.36000    6
O13A  O     -0.68000    6
O13B  OA    -0.68000    6
[ bonds ]
C53  N53    gb_21
N53  HN53   gb_2
N53  C53A   gb_10
C53A O53A   gb_5
C53A C53B   gb_16
C53  C43    gb_26
C53  C63    gb_26
C43  O43    gb_20
C43  C33    gb_26
O43  HO43   gb_1
C33  C23    gb_26
C73  C63    gb_26
C73  O73    gb_20
O73  HO73   gb_1
C73  C83    gb_26
C83  O83    gb_20
O83  +C24   gb_20
C93  C83    gb_26
C93  O93    gb_20
O93  HO93   gb_1
C63  O63    gb_20
O63  C23    gb_20
C13  O13A   gb_6
C13  O13B   gb_6
C13  C23    gb_26
[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
C63  C53  N53  ga_15
N53  C53  C43  ga_15
C53  N53  HN53  ga_18
C53  N53  C53A  ga_31
HN53  N53  C53A  ga_32
N53  C53A  O53A  ga_33
N53  C53A  C53B  ga_19
O53A  C53A  C53B  ga_30
C43  C53  C63  ga_8
C53  C43  O43  ga_9
C53  C43  C33  ga_8
O43  C43  C33  ga_9
C43  O43  HO43  ga_12
C43  C33  C23  ga_8
C53  C63  C73  ga_8
C53  C63  O63  ga_9
C73  C63  O63  ga_9
HO73  O73  C73  ga_12
O73  C73  C63  ga_9
O73  C73  C83  ga_9
C63  C73  C83  ga_8
+C24  O83  C83  ga_10
O83  C83  C73  ga_9
O83  C83  C93  ga_9
O83  +C24  +O64  ga_9
O83  +C24  +C34  ga_9
O83  +C24  +C14  ga_9

C73  C83  C93  ga_8
O93  C93  C83  ga_9
HO93  O93  C93  ga_12
C63  O63  C23  ga_10
C33  C23  O63  ga_9
O63  C23  C13  ga_9
O13A  C13  O13B  ga_38
O13A  C13  C23  ga_22
O13B  C13  C23  ga_22
C33  C23  C13  ga_8
[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
N53  C53A  C53B  HN53  gi_1
C53A  C53B  N53  O53A  gi_1
C53  O63  C73  C63  gi_2
C53  O43  C33  C43  gi_2
C53  N53  C43  C63  gi_2
C33  O63  C13  C23  gi_2
C13  O13A  O13B  C23  gi_1
[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
C33  C43  C53  N53  gd_16
C73  C63  C53  N53  gd_16
O43  C43  C53  N53  gd_17
O63  C63  C53  N53  gd_18
C43  C53  N53  C53A  gd_39
C53  N53  C53A  C53B  gd_14
C63  C53  C43  O43  gd_43
C63  C53  C43  O43  gd_44
C63  C53  C43  C33  gd_34
C43  C53  C63  C73  gd_34
C43  C53  C63  O63  gd_43
C43  C53  C63  O63  gd_44
C33  C43  O43  HO43  gd_30
C53  C43  C33  C23  gd_34
O43  C43  C33  C23  gd_43
O43  C43  C33  C23  gd_44
C43  C33  C23  O63  gd_43
C43  C33  C23  O63  gd_44
C63  C73  O73  HO73  gd_30
O73  C73  C63  O63  gd_5
O73  C73  C63  O63  gd_37
C63  C73  C83  O83  gd_43
C63  C73  C83  O83  gd_44
O73  C73  C83  O83  gd_18
C73  C83  O83  +C24  gd_29
C73  C83  C93  O93  gd_43
C73  C83  C93  O93  gd_44
O83  C83  C93  O93  gd_18
C83  C93  O93  HO93  gd_30
C83  O83  +C24  +O64  gd_28
O13A  C13  C23  C33  gd_40
C53  C63  O63  C23  gd_29
C63  O63  C23  C33  gd_29

```

Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac

```

[ NEU4 ]
[ atoms ]
C54 CH1 0.00000 0
N54 N -0.28000 0
HN54 H 0.28000 0
C54A C 0.38000 0
O54A O -0.38000 0
C54B CH3 0.00000 0
C44 CH1 0.23200 1
O44 OA -0.64200 1
HO44 H 0.41000 1
C74 CH1 0.23200 2
O74 OA -0.64200 2
HO74 H 0.41000 2
C84 CH1 0.37600 3
O84 OA -0.48000 3
C94 CH2 0.23200 4
O94 OA -0.64200 4
HO94 H 0.41000 4
C64 CH1 0.37600 5
O64 OA -0.48000 5
C24 CH1 0.23200 5
C34 CH2 0.00000 5
C14 C 0.36000 6
O14A O -0.68000 6
O14B OA -0.68000 6
[ bonds ]
C54 N54 gb_21
N54 HN54 gb_2
N54 C54A gb_10
C54A O54A gb_5
C54A C54B gb_16
C54 C44 gb_26
C54 C64 gb_26
C44 O44 gb_20
C44 C34 gb_26
O44 HO44 gb_1
C34 C24 gb_26
C74 C64 gb_26
C74 O74 gb_20
O74 HO74 gb_1
C74 C84 gb_26
C84 O84 gb_20
O84 +C25 gb_20
C94 C84 gb_26
C94 O94 gb_20
O94 HO94 gb_1
C64 O64 gb_20
O64 C24 gb_20
C24 O24 gb_20
O24 HO24 gb_1
C14 O14A gb_6
C14 O14B gb_6
C14 C24 gb_26
[ angles ]
; ai aj ak gromos type
C64 C54 N54 ga_15
N54 C54 C44 ga_15
C54 N54 HN54 ga_18
C54 N54 C54A ga_31
HN54 N54 C54A ga_32
N54 C54A O54A ga_33
N54 C54A C54B ga_19
O54A C54A C54B ga_30
C44 C54 C64 ga_8
C54 C44 O44 ga_9
C54 C44 C34 ga_8
O44 C44 C34 ga_9
C44 O44 HO44 ga_12
C44 C34 C24 ga_8
C54 C64 C74 ga_8
C54 C64 O64 ga_9
C74 C64 O64 ga_9
HO74 O74 C74 ga_12
O74 C74 C64 ga_9
O74 C74 C84 ga_9
C64 C74 C84 ga_8
+C25 O84 C84 ga_10
O84 C84 C74 ga_9
O84 C84 C94 ga_9
O84 +C25 +O65 ga_9
O84 +C25 +C35 ga_9
O84 +C25 +C15 ga_9
C74 C84 C94 ga_8
O94 C94 C84 ga_9
HO94 O94 C94 ga_12
C64 O64 C24 ga_10
C34 C24 O64 ga_9
O64 C24 C14 ga_9
O14A C14 O14B ga_38
O14A C14 C24 ga_22
O14B C14 C24 ga_22
C34 C24 C14 ga_8
[ impropers ]
; ai aj ak al gromos type
N54 C54A C54B HN54 gi_1
C54A C54B N54 O54A gi_1
C54 O64 C74 C64 gi_2
C54 O44 C34 C44 gi_2
C54 N54 C44 C64 gi_2
C34 O64 C14 C24 gi_2
C14 O14A O14B C24 gi_1
[ dihedrals ]
; ai aj ak al gromos type
C34 C44 C54 N54 gd_16
C74 C64 C54 N54 gd_16
O44 C44 C54 N54 gd_17
O64 C64 C54 N54 gd_18
C44 C54 N54 C54A gd_39
C54 N54 C54A C54B gd_14
C64 C54 C44 O44 gd_43
C64 C54 C44 O44 gd_44
C64 C54 C44 C34 gd_34
C44 C54 C64 C74 gd_34
C44 C54 C64 O64 gd_43
C44 C54 C64 O64 gd_44
C34 C44 O44 HO44 gd_30
C54 C44 C34 C24 gd_34
O44 C44 C34 C24 gd_43
O44 C44 C34 C24 gd_44
C44 C34 C24 O64 gd_43
C44 C34 C24 O64 gd_44
C64 C74 O74 HO74 gd_30
O74 C74 C64 O64 gd_5
O74 C74 C64 O64 gd_37
C64 C74 C84 O84 gd_43
C64 C74 C84 O84 gd_44
O74 C74 C84 O84 gd_18
C74 C84 O84 +C25 gd_29
C74 C84 C94 O94 gd_43
C74 C84 C94 O94 gd_44
O84 C84 C94 O94 gd_18
C84 C94 O94 HO94 gd_30
C84 O84 +C25 +O65 gd_28
O14A C14 C24 C34 gd_40
C54 C64 O64 C24 gd_29
C64 O64 C24 C34 gd_29

```

Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac

```

[ NEU5 ]
[ atoms ]
  C55  CH1    0.00000    0
  N55   N     -0.28000    0
  HN55  H      0.28000    0
  C55A  C      0.38000    0
  O55A  O     -0.38000    0
  C55B  CH3    0.00000    0
  C45   CH1    0.23200    1
  O45   OA     -0.64200    1
  HO45  H      0.41000    1
  C75   CH1    0.23200    2
  O75   OA     -0.64200    2
  HO75  H      0.41000    2
  C85   CH1    0.37600    3
  O85   OA     -0.48000    3
  C95   CH2    0.23200    4
  O95   OA     -0.64200    4
  HO95  H      0.41000    4
  C65   CH1    0.37600    5
  O65   OA     -0.48000    5
  C25   CH1    0.23200    5
  C35   CH2    0.00000    5
  C15   C      0.36000    6
  O15A  O     -0.68000    6
  O15B  OA     -0.68000    6

[ bonds ]
  C55  N55    gb_21
  N55  HN55   gb_2
  N55  C55A   gb_10
  C55A O55A   gb_5
  C55A C55B   gb_16
  C55  C45    gb_26
  C55  C65    gb_26
  C45  O45    gb_20
  C45  C35    gb_26
  O45  HO45   gb_1
  C35  C25    gb_26
  C75  C65    gb_26
  C75  O75    gb_20
  O75  HO75   gb_1
  C75  C85    gb_26
  C85  O85    gb_20
  O85  +C26   gb_20
  C95  C85    gb_26
  C95  O95    gb_20
  O95  HO95   gb_1
  C65  O65    gb_20
  O65  C25    gb_20
  C15  O15A   gb_6
  C15  O15B   gb_6
  C15  C25    gb_26

[ angles ]
; ai aj ak gromos type
  C65  C55  N55    ga_15
  N55  C55  C45    ga_15
  C55  N55  HN55   ga_18
  C55  N55  C55A   ga_31
  HN55 N55  C55A   ga_32
  N55  C55A O55A   ga_33
  N55  C55A C55B   ga_19
  O55A C55A C55B   ga_30
  C45  C55  C65    ga_8
  C55  C45  O45    ga_9
  C55  C45  C35    ga_8
  O45  C45  C35    ga_9
  C45  O45  HO45   ga_12
  C45  C35  C25    ga_8
  C55  C65  C75    ga_8
  C55  C65  O65    ga_9
  C75  C65  O65    ga_9
  HO75 O75  C75    ga_12
  O75  C75  C65    ga_9
  O75  C75  C85    ga_9
  C65  C75  C85    ga_8
  +C26 O85  C85    ga_10

  O85  C85  C75    ga_9
  O85  C85  C95    ga_9
  O85  +C26 +O66   ga_9
  O85  +C26 +C36   ga_9
  O85  +C26 +C16   ga_9
  C75  C85  C95    ga_8
  O95  C95  C85    ga_9
  HO95 O95  C95    ga_12
  C65  O65  C25    ga_10
  C35  C25  O65    ga_9
  O65  C25  C15    ga_9
  O15A C15  O15B   ga_38
  O15A C15  C25    ga_22
  O15B C15  C25    ga_22
  C35  C25  C15    ga_8

[ impropers ]
; ai aj ak al gromos type
  N55  C55A C55B HN55 gi_1
  C55A C55B N55 O55A gi_1
  C55  O65  C75  C65 gi_2
  C55  O45  C35  C45 gi_2
  C55  N55  C45  C65 gi_2
  C35  O65  C15  C25 gi_2
  C15  O15A O15B C25 gi_1

[ dihedrals ]
; ai aj ak al gromos type
  C35  C45  C55  N55  gd_16
  C75  C65  C55  N55  gd_16
  O45  C45  C55  N55  gd_17
  O65  C65  C55  N55  gd_18
  C45  C55  N55  C55A gd_39
  C55  N55  C55A C55B gd_14
  C65  C55  C45  O45  gd_43
  C65  C55  C45  O45  gd_44
  C65  C55  C45  C35  gd_34
  C45  C55  C65  C75  gd_34
  C45  C55  C65  O65  gd_43
  C45  C55  C65  O65  gd_44
  C35  C45  O45  HO45 gd_30
  C55  C45  C35  C25  gd_34
  O45  C45  C35  C25  gd_43
  O45  C45  C35  C25  gd_44
  C45  C35  C25  O65  gd_43
  C65  C75  O75  HO75 gd_30
  O75  C75  C65  O65  gd_5
  O75  C75  C65  O65  gd_37
  C65  C75  C85  O85  gd_43
  C65  C75  C85  O85  gd_44
  O75  C75  C85  O85  gd_18
  C75  C85  O85  +C26 gd_29
  C75  C85  C95  O95  gd_43
  C75  C85  C95  O95  gd_44
  O85  C85  C95  O95  gd_18
  C85  C95  O95  HO95 gd_30
  C85  O85  +C26 +O66 gd_28
  O15A C15  C25  C35  gd_40
  C55  C65  O65  C25  gd_29
  C65  O65  C25  C35  gd_29

```

Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac

```

[ NEU6 ]
[ atoms ]
  C56  CH1  0.00000  0
  N56   N   -0.28000  0
  HN56  H    0.28000  0
  C56A  C    0.38000  0
  O56A  O   -0.38000  0
  C56B  CH3  0.00000  0
  C46   CH1  0.23200  1
  O46   OA  -0.64200  1
  HO46  H    0.41000  1
  C76   CH1  0.23200  2
  O76   OA  -0.64200  2
  HO76  H    0.41000  2
  C86   CH1  0.37600  3
  O86   OA  -0.48000  3
  C96   CH2  0.23200  4
  O96   OA  -0.64200  4
  HO96  H    0.41000  4
  C66   CH1  0.37600  5
  O66   OA  -0.48000  5
  C26   CH1  0.23200  5
  C36   CH2  0.00000  5
  C16   C    0.36000  6
  O16A  O   -0.68000  6
  O16B  OA  -0.68000  6
[ bonds ]
  C56  N56      gb_21
  N56  HN56     gb_2
  N56  C56A     gb_10
  C56A O56A     gb_5
  C56A C56B     gb_16
  C56  C46      gb_26
  C56  C66      gb_26
  C46  O46      gb_20
  C46  C36      gb_26
  O46  HO46     gb_1
  C36  C26      gb_26
  C76  C66      gb_26
  C76  O76      gb_20
  O76  HO76     gb_1
  C76  C86      gb_26
  C86  O86      gb_20
  O86  +C27     gb_20
  C96  C86      gb_26
  C96  O96      gb_20
  O96  HO96     gb_1
  C66  O66      gb_20
  O66  C26      gb_20
  C16  O16A     gb_6
  C16  O16B     gb_6
  C16  C26      gb_26
[ angles ]
; ai aj ak gromos type
  C66  C56  N56      ga_15
  N56  C56  C46      ga_15
  C56  N56  HN56     ga_18
  C56  N56  C56A     ga_31
  HN56 N56  C56A     ga_32
  N56  C56A O56A     ga_33
  N56  C56A C56B     ga_19
  O56A C56A C56B     ga_30
  C46  C56  C66      ga_8
  C56  C46  O46      ga_9
  C56  C46  C36      ga_8
  O46  C46  C36      ga_9
  C46  O46  HO46     ga_12
  C46  C36  C26      ga_8
  C56  C66  C76      ga_8
  C56  C66  O66      ga_9
  C76  C66  O66      ga_9
  HO76 O76  C76      ga_12
  O76  C76  C66      ga_9
  O76  C76  C86      ga_9
  C66  C76  C86      ga_8
  +C27 O86  C86      ga_10
  O86  C86  C76      ga_9
  O86  C86  C96      ga_9
  O86  +C27 +O67     ga_9
  O86  +C27 +C37     ga_9
  O86  +C27 +C17     ga_9
  C76  C86  C96      ga_8
  O96  C96  C86      ga_9
  HO96 O96  C96      ga_12
  C66  O66  C26      ga_10
  C36  C26  O66      ga_9
  O16A O16A C16      ga_38
  O16A C16  C26      ga_22
  O16B C16  C26      ga_22
  C36  C26  C16      ga_8
[ impropers ]
; ai aj ak al gromos type
  N56  C56A C56B HN56      gi_1
  C56A C56B N56 O56A     gi_1
  C56  O66  C76  C66      gi_2
  C56  O46  C36  C46      gi_2
  C56  N56  C46  C66      gi_2
  C36  O66  C16  C26      gi_2
  C16  O16A O16B C26      gi_1
[ dihedrals ]
; ai aj ak al gromos type
  C36  C46  C56  N56      gd_16
  C76  C66  C56  N56      gd_16
  O46  C46  C56  N56      gd_17
  O66  C66  C56  N56      gd_18
  C46  C56  N56  C56A     gd_39
  C56  N56  C56A C56B     gd_14
  C66  C56  C46  O46      gd_43
  C66  C56  C46  O46      gd_44
  C66  C56  C46  C36      gd_34
  C46  C56  C66  C76      gd_34
  C46  C56  C66  O66      gd_43
  C46  C56  C66  O66      gd_44
  C36  C46  O46  HO46     gd_30
  C56  C46  C36  C26      gd_34
  O46  C46  C36  C26      gd_43
  O46  C46  C36  C26      gd_44
  C46  C36  C26  O66      gd_44
  C66  C76  O76  HO76     gd_30
  O76  C76  C66  O66      gd_5
  O76  C76  C66  O66      gd_37
  C66  C76  C86  O86      gd_43
  C66  C76  C86  O86      gd_44
  O76  C76  C86  O86      gd_18
  C76  C86  O86  +C27     gd_29
  C76  C86  C96  O96      gd_43
  C76  C86  C96  O96      gd_44
  O86  C86  C96  O96      gd_18
  C86  C96  O96  HO96     gd_30
  C86  O86  +C27 +O67     gd_28
  O16A C16  C26  C36      gd_40
  C56  C66  O66  C26      gd_29
  C66  O66  C26  C36      gd_29

```

Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac

```

[ NEU7 ]
[ atoms ]
C57 CH1 0.00000 0
N57 N -0.28000 0
HN57 H 0.28000 0
C57A C 0.38000 0
O57A O -0.38000 0
C57B CH3 0.00000 0
C47 CH1 0.23200 1
O47 OA -0.64200 1
HO47 H 0.41000 1
C77 CH1 0.23200 2
O77 OA -0.64200 2
HO77 H 0.41000 2
C87 CH1 0.23200 3
O87 OA -0.64200 3
HO87 H 0.41000 3
C97 CH2 0.23200 4
O97 OA -0.64200 4
HO97 H 0.41000 4
C67 CH1 0.37600 5
O67 OA -0.48000 5
C27 CH1 0.23200 5
C37 CH2 0.00000 5
C17 C 0.36000 6
O17A O -0.68000 6
O17B OA -0.68000 6
[ bonds ]
C57 N57 gb_21
N57 HN57 gb_2
N57 C57A gb_10
C57A O57A gb_5
C57A C57B gb_16
C57 C47 gb_26
C57 C67 gb_26
C47 O47 gb_20
C47 C37 gb_26
O47 HO47 gb_1
C37 C27 gb_26
C77 C67 gb_26
C77 O77 gb_20
O77 HO77 gb_1
C77 C87 gb_26
C87 O87 gb_20
O87 HO87 gb_1
C97 C87 gb_26
C97 O97 gb_20
O97 HO97 gb_1
C67 O67 gb_20
O67 C27 gb_20
C17 O17A gb_6
C17 O17B gb_6
C17 C27 gb_26
[ angles ]
; ai aj ak gromos type
C67 C57 N57 ga_15
N57 C57 C47 ga_15
C57 N57 HN57 ga_18
C57 N57 C57A ga_31
HN57 N57 C57A ga_32
N57 C57A O57A ga_33
N57 C57A C57B ga_19
O57A C57A C57B ga_30
C47 C57 C67 ga_8
C57 C47 O47 ga_9
C57 C47 C37 ga_8
O47 C47 C37 ga_9
C47 O47 HO47 ga_12
C47 C37 C27 ga_8
C57 C67 C77 ga_8
C57 C67 O67 ga_9
C77 C67 O67 ga_9
HO77 O77 C77 ga_12
O77 C77 C67 ga_9
O77 C77 C87 ga_9
C67 C77 C87 ga_8
HO87 O87 C87 ga_12
O87 C87 C77 ga_9
O87 C87 C97 ga_9
C77 C87 C97 ga_8
O97 C97 C87 ga_9
HO97 O97 C97 ga_12
C67 O67 C27 ga_10
C37 C27 O67 ga_9
O67 C27 C17 ga_9
O17A C17 O17B ga_38
O17A C17 C27 ga_22
O17B C17 C27 ga_22
C37 C27 C17 ga_8
[ impropers ]
; ai aj ak al gromos type
N57 C57A C57B HN57 gi_1
C57A C57B N57 O57A gi_1
C57 O67 C77 C67 gi_2
C57 O47 C37 C47 gi_2
C57 N57 C47 C67 gi_2
C37 O67 C17 C27 gi_2
C17 O17A O17B C27 gi_1
[ dihedrals ]
; ai aj ak al gromos type
C37 C47 C57 N57 gd_16
C77 C67 C57 N57 gd_16
O47 C47 C57 N57 gd_17
O67 C67 C57 N57 gd_18
C47 C57 N57 C57A gd_39
C57 N57 C57A C57B gd_14
C67 C57 C47 O47 gd_43
C67 C57 C47 O47 gd_44
C67 C57 C47 C37 gd_34
C47 C57 C67 C77 gd_34
C47 C57 C67 O67 gd_43
C47 C57 C67 O67 gd_44
C37 C47 O47 HO47 gd_30
C57 C47 C37 C27 gd_34
O47 C47 C37 C27 gd_43
O47 C47 C37 C27 gd_44
C47 C37 C27 O67 gd_43
C47 C37 C27 O67 gd_44
C67 C77 O77 HO77 gd_30
O77 C77 C67 O67 gd_5
O77 C77 C67 O67 gd_37
C67 C77 C87 O87 gd_43
C67 C77 C87 O87 gd_44
O77 C77 C87 O87 gd_18
C77 C87 O87 HO87 gd_30
C77 C87 C97 O97 gd_43
C77 C87 C97 O97 gd_44
O87 C87 C97 O97 gd_18
C87 C97 O97 HO97 gd_30
O17A C17 C27 C37 gd_40
C57 C67 O67 C27 gd_29
C67 O67 C27 C37 gd_29

```

# BRISA RAÍSSA BARTELLT GODOY

## Biochemical Engineer BSc. | MSc. Student

+5551 98494 1560 @ brisabartellt@hotmail.com  
Novo Hamburgo - Rio Grande do Sul | Brazil

### EDUCATION

2019 - Current **Master in Cell and Molecular Biology**, UFRGS, Porto Alegre, BR.  
2019 **Bachelor in Biotechnology and Bioprocess Engineering**, UERGS, Novo Hamburgo, BR.

### LANGUAGES

Portuguese ●●●●●  
English ●●●●○

### + STRENGTHS

- > Team work or in an independent role;
- > Writing and communication skills;
- > Experience in multidisciplinary laboratories;
- > Experience in supervising undergraduate students.

### EXPERIENCE

- 2021 | **Volunteer, PROFISSÃO BIOTEC, BR.**  
Volunteer work involving the writing of scientific divulgation texts for the Profissão Biotec website.  
Scientific communication Biotechnology Writing Research
- 2019 | **Intern, FEEVALE UNIVERSITY, Novo Hamburgo, BR.**  
Internship at a Vegetal Biotechnology Laboratory, in the biomonitoring of the environmental quality, through the application of the Micronucleus Test and the evaluation of pollen viability in cells of *Tradescantia pallida* var. *purpurea*.  
Vegetal biotechnology Research Internship

### RESEARCH PROJECTS

**MOLECULAR MODELING OF SIALIC ACIDS AND THEIR  $\alpha$ -LINKED GLYCANS** 2019 - CURRENT

Parametrization of the pseudo-rotational equilibrium of carbohydrates of the sialic acids family through molecular modeling of these structures by applying molecular mechanics methods, such as molecular dynamics and metadynamics.

Molecular modeling Structure elucidation Structural bioinformatics Molecular mechanics GROMOS Molecular dynamics Metadynamics

**EVALUATION OF HYDRODYNAMIC INFLUENCE PARAMETERS IN BIOREACTOR OPTIMIZATION IN MICROORGANISMS CULTIVATION** 2019

Research in the field of Fermentative Microbiology, involving the investigation of hydrodynamic parameters in a bioreactor and the influence of these parameters in the cultivation of yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*).

Fermentation Bioreactor Bioprocess *Saccharomyces cerevisiae*

**EVALUATION OF MICRONUCLEI AND OTHER NUCLEAR CHANGES IN EXFOLIATED CELLS OF THE ORAL MUCOSA OF FARMERS AND VEGETABLE CONSUMERS** 2017 - 2018

Research in the field of Cell Biology in which, with the application of the Micronucleus Test, it was possible to prove that exposure to pesticides, whether through food or occupationally, increases the rate of cellular alterations.

Cell biology Micronuclei Test



## TEACHING AND MENTORING

---

- 2021 | **Bioinformatics for Biomedicine, UFRGS, Porto Alegre, BR.**  
Teaching assistant in the class of Bioinformatics for the Biomedicine undergraduate course, helping the students in classes involving the analysis of genomic, aminoacids and FASTA sequences, the use of tools such as BLAST and MEGA, and analysis of phylogenetic trees  
Genomics BLAST Phylogeny Biomedicine Molecular modeling PDB
- 2021 | **Introduction to Bioinformatics, UFRGS, Porto Alegre, BR.**  
Teaching assistant in the class of Introduction to Bioinformatics for the Biomedicine and Biology undergraduate courses, helping the students in classes involving the analysis of genomic, aminoacids and FASTA sequences.  
Genomics BLAST Biomedicine Biology Biotechnology
- 2016 | **Analytical Chemistry, UERGS, Novo Hamburgo, BR.**  
Teaching assistant in the class of Analytical Chemistry, in the development of laboratory practices involving potentiometric titrations and pH measurement of different electrolytes.  
Analytical chemistry Titration pH measurement

## PUBLICATIONS

---

- 2020 **Godoy, B. R. B.**, Conte, A. M., Govoni, B., Boeira, J. M. Avaliação de micronúcleos e outras alterações nucleares em células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos expostos direta e indiretamente aos agrotóxicos. Ciências Da Saúde : Conceitos e Perspectivas, Brazilian Journals Editora, p. 227–245.
- 2019 **Godoy, B. R. B.**, Conte, A. M., Govoni, B., Boeira, J. M. Avaliação de micronúcleos e outras alterações nucleares em células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos expostos direta e indiretamente aos agrotóxicos. Brazilian Journal of Development, 5(11), 23889-23906.
- 2019 Govoni, B., Conte, A. M., **Godoy, B. R. B.**, Boeira, J. M. Análise da exposição direta e indireta à compostos agroquímicos : biomonitoramento da saúde humana. Brazilian Journal of Development, 5(9), 15668-15674.

## SKILLS

---

<b>Programming Languages</b>	Python , R, C/C++.
<b>Bash programming</b>	Linux/UNIX Shell
<b>Molecular modeling</b>	Molecular dynamics, Metadynamics, force field parametrization and quantum mechanics calculations.
<b>Structural biology</b>	Knowledge in structural elucidation of carbohydrates structures, glycoproteins and oligosaccharides.
<b>Structural bioinformatics tools</b>	GROMACS, PLUMED, Avogadro, PyMOL, Chimera, VMD, DockThor.
<b>Multidisciplinary laboratory practices</b>	Strutural Bioinformatics, Cell Biology, Chemistry, Biotechnology and Microbiology.