

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

RAQUEL DA SILVA LEVISKI

**ESTUDO COMPUTACIONAL DA INTERAÇÃO ENTRE BICAMADA LIPÍDICA  
ANIÔNICA E MORICINA**

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

Prof. Dr. Hubert K. Stassen

Orientador

Prof. Dr. Paulo F. B. Gonçalves

Co-orientador

Porto Alegre, junho de 2006.

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre setembro de 2003 e junho de 2006, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação do Professor Doutor Hubert Karl Stassen e Co-orientação do Professor Doutor Paulo Fernando Bruno Gonçalves. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

**Comissão Examinadora:**

Prof. Dr. Laurent Emmanuel Dardenne

Prof. Dr. Paolo Roberto Livotto

Profa. Dra. Nádyá Pesce da Silveira

Prof. Dr. Paulo Fernando Bruno Gonçalves  
Co-orientador

Prof. Dr. Hubert Karl Stassen

Orientador

Raquel da Silva Leviski

## Agradecimentos:

São muitas as pessoas que participaram deste trabalho, de várias formas diferentes que contribuíram para sua conclusão. Por isso, começo agradecendo aos meus orientadores, Paulo e Hubert, pela paciência acima de tudo. Aos colegas de laboratório do GQT, em especial Lucas Bourscheidt; Jones de Andrade; Leandro Greff da Silveira e Emanuele Campelo; por terem me ajudado a vencer muitas etapas.

Agradeço ao meu noivo Alexandre Bender que sempre compreendeu minha ausência e aos meus (velhos) amigos, da mesma forma. Aos meus pais; irmãos e cunhados, pela força e incentivo para prosseguir.

## **Artigo**

1. Leviski, R.S.; Stassen, H.K.; Gonçalves, P.F.B., *Molecular Dynamics Simulation of Calcium Binding Effects to an Anionic Lipid Bilayer*; em preparação.

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisão Bibliográfica</b>	<b>5</b>
<b>3. Metodologia</b>	<b>18</b>
<b>3.1. Campo de Força – <i>CHARMM27</i></b>	<b>19</b>
<b>3.2. Mecânica Clássica</b>	<b>21</b>
<b>3.3. Algoritmo Integrador – <i>Velocity Verlet</i></b>	<b>22</b>
<b>3.4. Mecânica Estatística</b>	<b>24</b>
<b>3.5. Ensemble Estatístico</b>	<b>28</b>
<b>3.6. Termostato e Barostato</b>	<b>30</b>
<b>3.7. Condições Periódicas de Contorno</b>	<b>33</b>
<b>3.8. Constraints e Restraints</b>	<b>34</b>
<b>3.9. Tratamento das Interações Eletrostáticas - <i>PME</i></b>	<b>39</b>
<b>3.10. Múltiplos Passos de Integração</b>	<b>42</b>

3.11.	<b>Raio de Corte</b>	<b>43</b>
3.12.	<b>Função <i>Switch</i></b>	<b>44</b>
3.13.	<b>Lista de Vizinhos</b>	<b>45</b>
4.	<b>Parte Experimental</b>	<b>47</b>
4.1.	<b>Moricina (MRI)</b>	<b>50</b>
4.2.	<b>Moricina + Água (WMRI)</b>	<b>51</b>
4.3.	<b>Membrana (MEM)</b>	<b>53</b>
4.4.	<b>Membrana + 1 Moricina (MMRI)</b>	<b>55</b>
4.5.	<b>Membrana + 6 Moricinas (CANAL)</b>	<b>57</b>
5.	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>59</b>
a.	<b>Área</b>	<b>59</b>
b.	<b>Função de Distribuição Radial</b>	<b>60</b>
c.	<b>Perfil de Densidade de Massa</b>	<b>61</b>

<b>d. Parâmetro de Ordem</b>	<b>62</b>
<b>e. Estrutura Secundária</b>	<b>63</b>
<b>f. Raio Interno do Poro</b>	<b>63</b>
<b>g. Ramachandran</b>	<b>64</b>
<b>5.1 Moricina (MRI)</b>	<b>65</b>
<b>5.2 Moricina + Água (WMRI)</b>	<b>69</b>
<b>5.3 Membrana (MEM)</b>	<b>73</b>
<b>5.4 Membrana + 1 Moricina (MMRI)</b>	<b>80</b>
<b>5.5 Membrana + 6 Moricinas (CANAL)</b>	<b>90</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>98</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	<b>100</b>

## Lista de Figuras

- Figura 2.1.** Composição dos Fosfolipídios: (a) fosfato; (b) Etanolamina; (c) glicerol; (d) Fosfatidil-Glicerol; (e) Fosfatidil-Etanolamina; (f) Ácido Palmítico; (g) Ácido Oléico. **(6)**
- Figura 2.2.** Estrutura dos Fosfolipídios: (a) POPE; (b) POPG. **(6)**
- Figura 2.3.** Estrutura de um Aminoácido. **(11)**
- Figura 2.4.** Estrutura genérica de um polipeptídeo. **(11)**
- Figura 2.5.** Aminoácidos classificados quanto à carga em pH 7. **(12)**
- Figura 2.6.** Aminoácidos classificados quanto à carga em pH 7. **(13)**
- Figura 2.7.** Estrutura  $\alpha$ -Helice. **(14)**
- Figura 2.8.** Estrutura Folha- $\beta$ . **(14)**
- Figura 2.9.** Modelos de Estruturas Secundárias. **(16)**
- Figura 2.10.** Definição de  $\psi$  e  $\phi$ . **(17)**
- Figura 3.1.** Eliminação do efeito do sistema finito. **(33)**
- Figura 4.1.** Estrutura da Moricina: (a) alguns resíduos identificados; (b) resíduos coloridos conforme tipo. **(48)**
- Figura 4.2.** *Helical Wheel* dos resíduos da Moricina. **(49)**
- Figura 5.1.** Definição do raio e do elemento de volume para FDR. **(60)**
- Figura 5.2.** Definição do eixo molecular  $i$  e da Normal da Membrana. **(62)**
- Figura 5.3.** Diagrama de Ramachandran. **(64)**
- Figura 5.1.1.** Estrutura da Moricina após 2 ns de simulação no vácuo. **(65)**
- Figura 5.1.2.** Evolução temporal (1 ns) da DESP da Moricina no vácuo (MRI). **(67)**
- Figura 5.1.3.** Diagrama de Ramachandran das configurações acumuladas da Moricina em vácuo (1 ns). **(68)**
- Figura 5.2.1.** Estrutura da Moricina após 1,4 ns de simulação em água com contra-íons. **(69)**
- Figura 5.2.2.** Evolução temporal (1 ns) DESP da Moricina em água (WMRI). **(71)**
- Figura 5.2.3.** Diagrama de Ramachandran da Moricina em água (WMRI), com as configurações de 1 ns acumuladas. **(72)**
- Figura 5.3.1.** Evolução temporal da área por fosfolipídio para o sistema MEM. **(74)**
- Figura 5.3.2.** FDR P-P para o sistema MEM (a partir de 20 ns). **(75)**
- Figura 5.3.3.** FDR P-OH para o sistema MEM (a partir de 20 ns). **(75)**
- Figura 5.3.4.** PDM do sistema MEM (intervalo 1). **(76)**
- Figura 5.3.5.** Parâmetro de Ordem do Palmitoil, sistema MEM. **(78)**



**Figura 5.3.6.** Parâmetro de Ordem do Palmitoil, sistema MEM. **(78)**

**Figura 5.3.7.** Sistema MEM após 55 ns de simulação. **(79)**

**Figura 5.4.1.** Evolução temporal da área por fosfolipídio para o sistema MMRI. **(80)**

**Figura 5.4.2.** FDR P-P para o sistema MMRI (a partir de 40 ns). **(82)**

**Figura 5.4.3.** FDR P-OH para o sistema MMRI (a partir de 40 ns). **(83)**

**Figura 5.4.4.** PDM do intervalo MMRI 6 (60 – 62 ns). **(83)**

**Figura 5.4.5.** PDM da água, sistema MMRI (todos os intervalos). **(84)**

**Figura 5.4.6.** Parâmetro de Ordem do Palmitoil, sistema MMRI (todos os intervalos). **(85)**

**Figura 5.4.7.** Parâmetro de Ordem do Oleil, sistema MMRI (todos os intervalos). **(85)**

**Figura 5.4.8.** DESP do sistema MMRI, entre 70 e 72 ns. **(87)**

**Figura 5.4.9.** Diagrama de Ramachandran do sistema MMRI (configurações acumuladas entre 70 e 72 ns). **(88)**

**Figura 5.4.10.** Sistema MMRI após 75 ns de simulação. **(89)**

**Figura 5.5.1.** Evolução temporal da área por fosfolipídio para o CANAL. **(90)**

**Figura 5.5.2.** FDR P – P e P – OH do CANAL, calculada entre 120 e 130 ns. **(91)**

**Figura 5.5.3.** Presença de água e íons no interior do poro formado por 6 moricinas. **(92)**

**Figura 5.5.4.** PDM do CANAL (entre 120 e 130 ns). **(92)**

**Figura 5.5.5.** Parâmetros de Ordem para Palmitoil e Oleil, no sistema CANAL. **(93)**

**Figura 5.5.6.** Perfil do Raio do Poro do CANAL em  $\text{Å}^2$ , avaliado entre 120 ns e 130 ns. **(94)**

**Figura 5.5.7.** Preenchimento volumétrico do poro formado por 6 moricinas (CANAL). **(94)**

**Figura 5.5.8.** DESP do sistema CANAL, entre 120 e 130 ns. **(95)**

**Figura 5.5.9.** Diagrama de Ramachandran do CANAL, configurações acumuladas entre 120 e 130 ns. **(96)**

**Figura 5.5.10.** Vista superior do sistema CANAL. **(97)**

## **Lista de Tabelas:**

**Tabela 1.** Parâmetros de DM aplicados a todas as simulações. **(46)**

**Tabela 4.1.** Parâmetros da Simulação e Composição do Sistema MRI (Moricina no vácuo).  
**(50)**

**Tabela 4.2.** Parâmetros da Simulação e Composição do Sistema WMRI (Moricina em água).  
**(52)**

**Tabela 4.3.** Parâmetros da Simulação e Composição do Sistema MEM (Membrana em água).  
**(54)**

**Tabela 4.4.** Parâmetros da Simulação e Composição do Sistema MMRI (1 Moricina, Membrana). **(56)**

**Tabela 4.5.** Parâmetros da Simulação e Composição do Sistema CANAL (6 Moricinas, Membrana). **(58)**

**Tabela 5.3.** Propriedades do sistema MEM analisadas em 4 intervalos de tempo. **(73)**

**Tabela 5.4.** Propriedades do sistema MMRI analisadas em 4 intervalos de tempo. **(81)**

## Glossário

<b>POPE</b>	Palmitoil – oleil – fosfatidil – etanolamina
<b>POPG</b>	Palmitoil – oleil – fosfatidil – glicerol
<b>ts</b>	“ <i>time step</i> ”; passo de integração
<b>ns</b>	nano segundo ( $10^{-9}$ segundos)
<b>ps</b>	pico segundo ( $10^{-12}$ segundos)
<b>fs</b>	femto segundo ( $10^{-15}$ segundos)
<b>MRI</b>	Sistema composto por 1 moricina no vácuo
<b>WMRI</b>	Sistema composto por 1 moricina em água
<b>MEM</b>	Sistema composto por membrana, água e íons
<b>MMRI</b>	Sistema composto por membrana, 1 moricina, água e íons
<b>CANAL</b>	Sistema composto por membrana, 6 moricinas, água e íons
<b>FDR, g(r)</b>	Função de Distribuição Radial
<b>PDM</b>	Perfil de Densidade de Massa
<b>DESP</b>	Definição de Estrutura Secundária da Proteína
<b>P</b>	Átomo de fósforo da cabeça polar dos lipídios POPE e POPG
<b>Na, SOD</b>	íon sódio
<b>Cl, CLA</b>	íon cloreto
<b>OH</b>	Átomo de oxigênio da água
<b>(FDR) P – P</b>	entre 2 átomos de fósforo de fosfolipídio
<b>(FDR) P – OH</b>	entre um átomo de fósforo do lipídio e o oxigênio da água
<b>D<sub>P</sub></b>	Distância P – P (primeiro máximo da FDR, distância mais provável)
<b>D<sub>SP</sub></b>	Fim da primeira camada de solvatação P – P (primeiro mínimo da FDR)
<b>n<sub>P</sub></b>	Numero de lipídios vizinhos na primeira camada de solvatação
<b>D<sub>OH</sub></b>	Distância P – OH (primeiro máximo da FDR, distância mais provável)
<b>D<sub>SW</sub></b>	Primeira camada de solvatação P – OH, primeiro mínimo da FDR
<b>n<sub>w</sub></b>	Número de águas coordenadas
<b>d</b>	Distância de Repetição da Bicamada (altura da membrana)
<b>IW</b>	Dimensão da interface água – membrana
<b>P.O.</b>	Parâmetro de Ordem

## RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidas cinco simulações: Moricina no vácuo; moricina em meio fisiológico (água e íons); membrana em meio fisiológico; 1 moricina e 6 moricinas no interior da membrana. O objetivo é avaliar as interações antibiótico – membrana. Para esse estudo foi escolhido um peptídeo catiônico com atividade bactericida já constatada. A membrana adotada é baseada na composição da membrana celular da bactéria *E. Coli*.

A metodologia utilizada foi a Dinâmica Molecular. Os sistemas foram construídos com o software VMD e os cálculos foram desenvolvidos com o software NAMD2. O Campo de Força para os lipídios, os íons e a moricina foi o CHARMM27 e o modelo para água foi TIP3P. O ensemble adotado foi o NpT, com uma pressão de 1 atm e temperatura de 310 K, por ser o mais coerente com o sistema fisiológico.

A moricina é um peptídeo  $\alpha$ -hélice e por isso o modelo de atuação aplicado foi *barrel stave*. Em presença do peptídeo se observou a perturbação da estrutura da membrana, o que valida a metodologia. No sistema contendo 6 moricinas o poro formado possibilitou o escoamento de água e íons através da bicamada lipídica, desfazendo o gradiente de concentrações essencial à manutenção da célula bacteriana.

## ABSTRACT

In the present dissertation, five systems have been treated by molecular dynamics computer simulations: isolated moricine, moricine in physiological solution, membrane in physiological solution, a single moricine molecule inserted into the membrane, and an ion channel consisted of six moricine molecules inserted into the membrane. The moricine molecule represents a cationic peptide with known antibiotic activity. The membrane model was chosen to mimic the composition of the cellular membrane of E.Coli.

Our studies were directed towards the interaction between the antibiotic moricine and the membrane. All the systems were constructed using the VMD software. The simulations have been performed with the NAMD2 package adopting the CHARMM27 force field to the lipides, ions, and the moricine molecule. Water was described by the TIP3P model. The simulations were carried out within the NpT ensemble corresponding to physiological conditions (pressure of 1 atm and a temperature of 310 K).

Moricine is a peptide with alpha-helix treated as a barrel stave. The adopted methodology demonstrated a perturbation of the membrane's structure in the presence of the peptide. The system containing six moricine molecules forming a pore within the membrane exhibited a flux of water molecules and ions passing the membrane indicating the antibiotic activity of moricine.

# 1. INTRODUÇÃO

O estudo de membranas biológicas é muito importante para o planejamento e desenvolvimento de fármacos. Os principais componentes de uma membrana são lipídios, colesterol e proteínas de membrana.<sup>[1]-[3]</sup> A biodisponibilidade dos princípios ativos de muitos medicamentos depende da sua solubilidade em membranas. O mecanismo de ação de várias anestésias, apesar de não estar bem caracterizado, envolve sua distribuição na membrana.<sup>[4]</sup> Estima-se que mais de 70% dos fármacos disponíveis atuem através de proteínas de membrana.<sup>[5]</sup>

A toxicidade de um antibiótico para um organismo animal diminui à medida que o fármaco se torna capaz de um ataque seletivo, direcionado às células procariontes. Ou seja, ele deve ter a menor afinidade possível por células eucariontes e a máxima afinidade com células procariontes.

As células procariontes (bactérias) e eucariontes (animais e vegetais) apresentam uma membrana plasmática de composição fosfolipídica. Células bacterianas são mais simples e menores que as eucarióticas, pois não apresentam núcleo e o conteúdo genético é bem menos complexo. Essas células também se diferenciam quanto à composição da membrana.<sup>[1]</sup> O estudo das interações entre fármaco e membrana é de grande relevância no desenvolvimento dos medicamentos e na elucidação do mecanismo de ação destes.

Bactérias são seres unicelulares com uma membrana composta por fosfolipídios e proteínas associadas, envoltas por uma parede celular composta por polissacarídeos e peptídeos. Como a parede celular é facilmente transposta, o isolamento efetivo da célula com relação ao meio se deve à membrana.

As paredes celulares rígidas conferem as formas características das bactérias, e lhes permitem viver em ambientes hipotônicos. Nesses meios a concentração de sais é menor que a intracelular, isso causaria um inchasso osmótico até que suas membranas plasmáticas se rompessem. As paredes celulares bacterianas são de considerável relevância médica, pois são responsáveis pela virulência das bactérias. Os sintomas de muitas doenças bacterianas podem ser obtidos pela injeção da parede celular em animais, pois os antígenos característicos de bactérias são componentes de suas paredes celulares. A injeção de preparações da parede celular bacteriana em animais pode desenvolver imunidade contra infecções desse agente.<sup>[2]</sup>

As bactérias são classificadas como Gram-positivas (por exemplo, a *Staphylococcus Aureus*) ou Gram-negativas (por exemplo, a *Escherichia Coli*) dependendo de serem coradas ou não pelo corante de Gram. Esse procedimento foi desenvolvido em 1884 por Crystian Gram, e consiste em tratar sucessivamente com corante cristal de violeta e iodo células fixadas pelo calor e, em seguida, descorá-las com etanol e acetona.<sup>[2]</sup>

As bactérias Gram-positivas possuem uma parede celular com aproximadamente 250Å de espessura envolvendo sua membrana plasmática. As bactérias Gram-negativas possuem uma parede celular fina, de aproximadamente 30Å de espessura, coberta por uma membrana externa complexa. Essa membrana externa entre outras funções, atua como uma barreira efetiva à permeabilidade e na exclusão de substâncias tóxicas à bactéria, como o corante de Gram. Devido a essa estrutura, as bactérias Gram-negativas são mais resistentes a antibióticos que as Gram-positivas.<sup>[2]</sup>

Para um antibiótico atingir índices de seletividade satisfatórios, suas interações com as membranas celulares devem ser observadas. Um dos fatores que impulsiona a pesquisa e o desenvolvimento destes fármacos é a capacidade de adaptação dos microorganismos. Após algum tempo de exposição da bactéria, a eficácia do antibiótico é gradativamente reduzida.

A primeira família de antibióticos surgiu com a penicilina, descoberta acidentalmente em 1928, por Alexander Fleming. Foi utilizada na 2ª Guerra Mundial, embora na época não fosse conhecido em detalhes o seu mecanismo de ação. Hoje, em decorrência das modificações sofridas pelos microorganismos, seu potencial bactericida é muito inferior.

Uma classe de antibióticos que vem sendo estudada é dos PCAs (peptídeos catiônicos antibióticos)<sup>[6]</sup>, e embora haja informações experimentais abundantes acerca destes, os mecanismos de ação ainda não estão completamente elucidados.<sup>[7]</sup> Independente do mecanismo específico de atuação, a interação desses peptídeos com membranas é crucial para a atividade antimicrobial.<sup>[8]</sup> O presente trabalho é voltado a estes peptídeos, que interagem com a membrana celular perturbando o equilíbrio vital para a bactéria.

O uso de PCAs pode ser vantajoso por vários aspectos, alguns dos quais seguem relacionados abaixo: São eficazes contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e, em alguns casos, penetram a membrana externa bacteriana para sensibilizar a célula ao ataque de outros antibióticos. Muitos apresentam toxicidade seletiva contra células eucarióticas e procarióticas devido à afinidade eletrostática com membranas bacterianas. Por interagirem e desestabilizarem a membrana, sua ação é mais rápida que a dos antibióticos que apenas inibem a divisão celular e o crescimento da colônia. Não induzem a formação de organismos resistentes, pois as bactérias teriam que modificar a estrutura de suas membranas para se

tornarem resistentes a eles, o que teria conseqüências na permeabilidade e as tornaria vulneráveis ao ataque de outros tipos de antibiótico.<sup>[9]</sup>

Neste estudo temos por objetivo entender as interações de um peptídeo antibiótico com uma membrana bacteriana. Adotamos a composição da membrana da *Escherichia Coli* (*E. Coli*) como modelo, esta bactéria é bastante utilizada por pesquisadores e sua estrutura é bem conhecida.<sup>[1]-[3]</sup> A membrana pode ser satisfatoriamente representada por uma bicamada lipídica, neste caso formada 75% POPE (palmitoil-oleil-fosfatidil-etanolamina) e 25% POPG (palmitoil-oleil-fosfatidil-glicerol).<sup>[10]-[12]</sup>

Os insetos não possuem um sistema imune baseado em relações antígeno-anticorpo como os vertebrados, mas têm defesas eficazes contra infecções bacterianas. A moricina é um peptídeo de 42 resíduos, com atividade bactericida constatada.<sup>[13]-[15]</sup> É um antibiótico da classe PCA sintetizada pelo bicho-da-seda em resposta ao contato com bactérias como a *E. Coli* ou componentes da parede celular destas.<sup>[13]</sup> Outros peptídeos com estrutura primária semelhante foram descobertos e integram a família da moricina.<sup>[6]</sup> Esse tipo de antibiótico atua na membrana bacteriana e em decorrência da estrutura secundária  $\alpha$ -hélice deve se posicionar no interior da membrana.

O estudo computacional das interações da moricina com a membrana bacteriana pode ajudar a entender as causas da atividade bactericida. Dados experimentais continuam sendo usados para validar resultados computacionais, mas muitas informações obtidas nas simulações, como as que dizem respeito ao comportamento do sistema a nível microscópico, são inatingíveis pelos métodos empíricos convencionais e vice-versa.

Os testes empíricos são essenciais na pesquisa de novos fármacos principalmente nas etapas finais do planejamento, a tendência atual é combinar métodos computacionais e experimentais para investigar as propriedades do composto em questão. Com os modelos adequados é possível antecipar o comportamento de uma molécula como resultado de suas interações com diferentes meios.

Das metodologias computacionais que podem ser utilizadas no estudo e desenvolvimento de novos fármacos, optamos por simulações de Dinâmica Molecular (DM). Sistemas biológicos envolvem um grande número de átomos (da ordem de  $10^4$ ), e um tratamento quântico até o momento é inviável. Uma alternativa é a utilização de métodos híbridos.

Uma das limitações das simulações de DM é o intervalo de tempo que pode ser observado, atualmente na ordem de  $10^{-7}$  segundos. Muitos processos, como a penetração de uma proteína na membrana, ainda não podem ser estudados por DM “pura”. Nesse caso pode-



se optar por dinâmica forçada (*SMD – Steered Molecular Dynamics*), “empurrando” a proteína para o interior da membrana e monitorando as energias a cada passo.<sup>[16],[17]</sup>

O objetivo desse estudo é observar os efeitos do peptídeo quando inserido na membrana bacteriana. Para isso são comparados os sistemas com a moricina dentro e fora da bicamada, bem como a membrana com e sem peptídeo. Com essas análises serão avaliadas as alterações provocadas na bicamada e as interações fármaco – membrana, esses dados podem ser úteis na elucidação de mecanismos da ação bactericida de antibióticos da família da moricina. Nos sistemas em que há peptídeo e membrana, a configuração inicial das simulações aqui desenvolvidas contém a moricina inserida na membrana.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

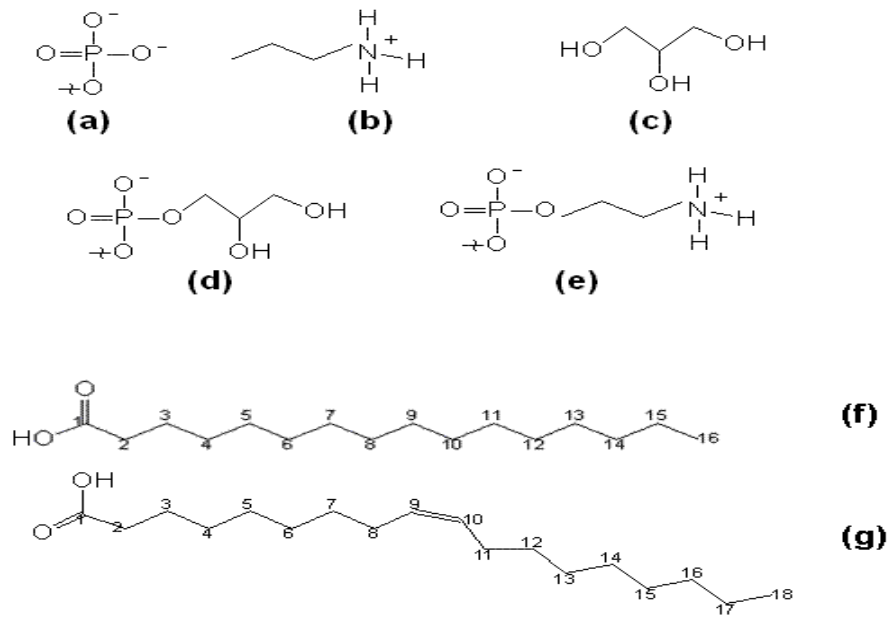
A partir da década de 90, com a significativa evolução na capacidade de processamento dos computadores abriu-se um novo campo nas simulações de Dinâmica Molecular. Tornou-se viável a realização de estudos de membranas biológicas e suas interações com diferentes moléculas, tais como proteínas.

Na maioria dos casos, uma membrana sintetizada para fins experimentais é formada apenas por lipídios, na forma de uma bicamada lipídica. Um lipídio é composto de duas cadeias alifáticas, que podem ser saturadas ou insaturadas, e uma “cabeça polar” ligadas a um glicerol.<sup>[1]-[3]</sup> Cada cadeia se liga a um carbono do glicerol, a cabeça polar consiste num grupo polar conectado ao terceiro carbono do glicerol através de um fosfato, constituindo assim um glicero-fosfolipídio.

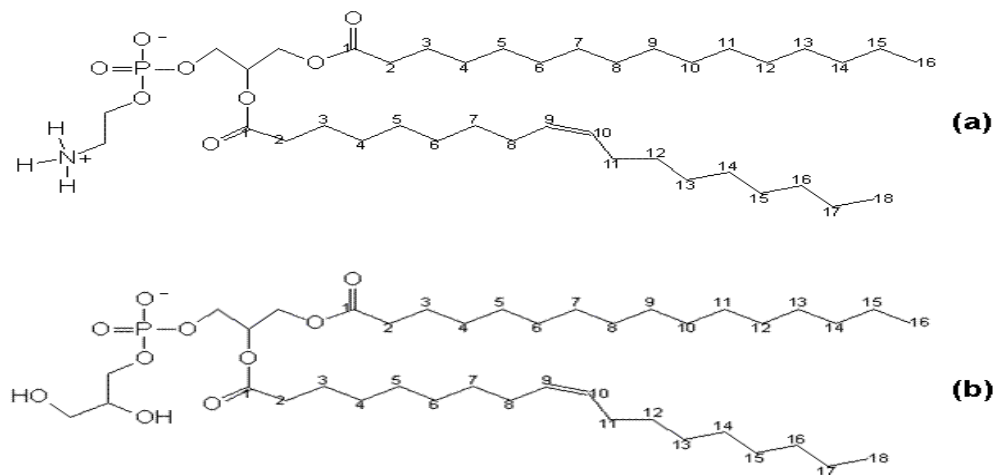
As cadeias alifáticas se ligam ao glicerol por uma reação de esterificação – entre ácido graxo e álcool. Fosfolipídios são anfifílicos, com um segmento solúvel em água ou hidrofílico, e outro hidrofóbico. Essa característica é fundamental para a formação de membranas. A parte hidrofóbica fica orientada para o interior da bicamada e consiste de cadeias alifáticas.

A parte hidrofílica consiste de uma *cabeça polar*. Na Figura 2.1. são exibidos os componentes das cabeças polares de POPE e POPG, com a distribuição de cargas que torna o primeiro zwitteriônico, e o segundo aniônico. Também nesta figura aparecem os ácidos carboxílicos Palmítico (C16) e Oléico (C18), que se ligam ao glicerol (reação de esterificação) na composição das cadeias hidrofóbicas. A Figura 2.2. mostra as estruturas completas de POPE e POPG. O único fosfolipídio que não tem as cadeias alifáticas conectadas por um glicerol é a esfingomiélna, todos os demais são glicero-fosfolipídios.

Os fosfolipídios são classificados conforme a carga da cabeça polar: são aniônicos se os grupos polares apresentam carga resultante negativa, ou zwitteriônicos se a carga resultante é nula. As membranas procarióticas são compostas por fosfolipídios aniônicos e zwitteriônicos, o que confere a ela carga final negativa e caráter aniônico. As membranas eucarióticas são compostas por fosfolipídios zwitteriônicos, com carga resultante nula que lhe confere caráter neutro. Estas informações podem e devem ser aplicadas no desenvolvimento de agentes bactericidas mais seletivos.



**Figura 2.1.** Composição dos Fosfolípidios: (a) fosfato; (b) Etanolamina; (c) glicerol; (d) Fosfatidil-Glicerol; (e) Fosfatidil-Etanolamina; (f) Ácido Palmítico; (g) Ácido Oléico.



**Figura 2.2.** Estrutura dos Fosfolípidios: (a) POPE; (b) POPG.

A formação de membranas é regida pelas interações favoráveis entre lipídios e desfavoráveis dos lipídios com o meio aquoso. Interações hidrofóbicas permitem aglomeração de lipídios, que orientam as cabeças polares na direção das moléculas de água e as caudas hidrofóbicas para o interior da membrana.

Segundo o modelo do Mosaico Fluido,<sup>[2]</sup> os fosfolipídios na membrana apresentam difusão lateral e *flip-flop*. No primeiro caso, os lipídios se movem ao longo de uma lâmina da bicamada, sem que a cabeça polar penetre na parte hidrofóbica. No segundo, a cabeça polar atravessa a porção hidrofóbica, e o fosfolipídio passa de uma lâmina para a outra, um processo muito mais raro e mais lento que a difusão lateral. Este último processo é mediado pela *Flipase* (enzima).

Os movimentos lentos dos átomos das cabeças polares dos lipídios fazem com que sua contribuição para o potencial de dipolo varie lentamente. No entanto, a reorganização rápida das moléculas de água em torno dos grupos polares compensa tais oscilações do potencial, mantendo-o praticamente constante.<sup>[16],[18],[19]</sup>

Com relação à fluidez da membrana, abaixo da temperatura de transição de fase ( $T_m$ ) a membrana está numa fase gel ( $L_\beta$ ), mais compactada e com mobilidade restrita. As interações hidrofóbicas são enfraquecidas com o aquecimento do sistema, e a mobilidade aumenta. A partir da temperatura de transição de fase a membrana passa à fase líquido-cristalina ( $L_\alpha$ ).<sup>[20]</sup> Para membranas compostas somente por POPE ou POPG, as temperaturas de transição de fase são 299.1 K e 269 K, respectivamente.<sup>[10],[21]-[23]</sup>

As cadeias hidrofóbicas também têm influência na fluidez: cadeias curtas têm maior mobilidade e a presença de insaturações – quase todas as duplas têm configuração *cis* – provoca dobras na cadeia que impedem um empacotamento dos fosfolipídios e aumentam a fluidez.<sup>[3]</sup> As terminações das caudas hidrofóbicas se encontram na região central da bicamada, por estarem livres têm maior mobilidade e conferem maior fluidez a esse ponto da membrana.

A extremidade da cadeia hidrofóbica que se liga à cabeça polar tem menor mobilidade. A rigidez da membrana na região das cabeças polares pode ser atribuída às interações cabeça-cabeça e cabeça-íon, uma vez que podem se coordenar aos cátions presentes na interface.<sup>[24]</sup>

A interação de cátions, principalmente os divalentes, com membranas biológicas é relevante para a estrutura, dinâmica, estabilidade e fusão da membrana, do transporte de pequenas moléculas através dela e da inserção de proteínas. Além disso, os íons cálcio estão relacionados à transmissão de impulsos neurais. A interação dos íons sódio com a membrana é mais lenta, mas também é efetiva.<sup>[25]</sup> As interações dos cátions com os lipídios também são

presumidas como o principal elemento diretor da agregação e fusão de lipídios em vesículas. Embora se verifique a desidratação parcial dos cátions que blindam a bicamada lipídica, as interações dos grupos polares com as moléculas de água não são afetadas.<sup>[26]</sup>

A interação dos íons sódio com as cabeças polares da membrana neutra DPPC é mais forte que dos íons cloreto. Em função dessa interação o número de moléculas de água que solvatam o cátion é reduzido, ocorre uma desidratação parcial dos íons sódio coordenados às cabeças polares dos lipídios.<sup>[26]</sup> A penetração dos íons sódio na membrana pode ser acompanhada a medida que diminui o número de moléculas de água coordenadas ao cátion e aumenta o número de átomos oxigênio do éster dos lipídios coordenados ao sódio. A membrana hidratada, em presença de NaCl 0,15M não apresentou alteração na área por lipídio, mas houve um discreto acréscimo no parâmetro de ordem dos primeiros carbonos da cadeia alifática, como resultado da coordenação dos íons sódio, próximos a essa região.<sup>[27]</sup>

A idéia de como as membranas se organizam está mudando atualmente, as bicamadas lipídicas não estão mais sendo entendidas como um fluido homogêneo. Em membranas mistas pode haver a formação de aglomerados lipídicos duradouros ou não, que segregam componentes das membranas e as compartimentalizam.<sup>[28]</sup> Esses aglomerados são chamados domínios, e sua existência daria origem a regiões com características distintas.<sup>[29]</sup>

A grande diversidade de lipídios existentes é justificada pela quantidade de funções que estes desempenham: como base molecular de vários processos catalíticos; pela barreira seletiva que impõem à permeabilidade de moléculas em células e organelas; como doadores na síntese de macromoléculas; por influenciarem várias funções e processos relacionados às membranas,...<sup>[30]</sup>

A hipótese da formação de domínios é baseada no comportamento de misturas lipídicas em lipossomas ou membranas-modelo. A relevância dos domínios está nas interações intermoleculares diferenciadas, como resultado das diferentes concentrações locais dos componentes da membrana.<sup>[31]</sup> As alterações nas concentrações locais podem controlar a permeabilidade e a estabilidade da membrana.<sup>[32]</sup>

As interações Coulombicas entre as cabeças polares de lipídios carregados podem acarretar redução da área por lipídio se comparada a membranas não carregadas. Em função disso podem ocorrer alterações no parâmetro de ordem, na distribuição dos átomos ao redor do fosfolipídio e no coeficiente de difusão. A penetração de moléculas de água verificada na interface com a membrana carregada foi menor. As interações cabeça-cabeça são mais fortes e as interações das cabeças polares com as moléculas de água podem ser mais fracas.<sup>[33]</sup>

A partir de simulações de uma bicamada lipídica POPE 3:1 POPG constatou-se que a interação mais forte se dá entre as cabeças polares PE-PG, com formação de ligações de hidrogênio onde o principal doador é PE. Ocorrem ainda ligações entre PE-PE, e mais raramente entre PG-PG.<sup>[10],[34]</sup> As propriedades das bicamadas formadas apenas por POPE ou POPG são diferentes. A área superficial de POPG é maior e a altura da bicamada menor, além disso, as cadeias alifáticas têm maior ordenamento. Provavelmente em função da interação mais fraca entre as cabeças polares e da área superficial maior, o empacotamento para POPG é menor.<sup>[10]</sup>

Com relação aos parâmetros aplicados nas simulações de membranas, há algumas divergências quanto ao uso de área constante e tensão superficial. Em 1996, Tieleman e Berendsen entenderam que não havia diferença significativa quanto ao uso ou não de tensão superficial constante em simulações de membranas.<sup>[35]</sup> Em sua tese de doutorado, defendida em 1998, Tieleman reconsiderou argumentando que aquela conclusão estava em desacordo com resultados experimentais.<sup>[36]</sup> Feller e Pastor, em 1999, apresentaram simulações de DM de uma bicamada de DPPC e mostraram que as áreas por lipídio e a compressibilidade da membrana são sensíveis ao uso de tensão superficial ( $\gamma$ ) constante. Os resultados mostraram maior dependência com os valores aplicados para área por lipídio ou  $\gamma$  do que com o tipo de ensemble (NpAT ou Np $\gamma$ T).<sup>[37]</sup>

O uso de dados experimentais para área por lipídio ou tensão superficial depende da aplicação de condições semelhantes às da determinação. No caso de membranas mistas, compostas por mais de um tipo de lipídio ou com inserção de peptídeos ou proteínas, dados experimentais obtidos para membranas puras não são confiáveis. A adição de peptídeo na bicamada lipídica inviabiliza o uso de área constante na simulação por falta de dados experimentais apropriados e se faz necessário rodar a simulação sob pressão constante.<sup>[38]</sup>

Segundo Forrest e Sansom, uma bicamada lipídica de DPPC em fase gel  $L_{\beta I}$  simulada no ensemble Np $\gamma$ T não é sensível aos valores de  $\gamma$ . Já para a fase líquido-cristalina  $L_{\alpha}$ , a área por lipídio e o parâmetro de ordem apresentaram forte dependência com os valores de  $\gamma$  aplicados.<sup>[18]</sup> Quanto maior o número de lipídios numa membrana simulada com área constante, menor o valor correspondente calculado para  $\gamma$ .<sup>[39]</sup>

Em 2005, Edholm e Nagle apresentaram um método para cálculo da área por lipídio em membranas mistas compostas por um tipo de lipídio e colesterol.<sup>[40]</sup> A determinação das áreas por lipídio pelo método *Voronoi Tessellation* em membranas mistas formadas por mais de um tipo de lipídio tem precisão reduzida.<sup>[10],[11]</sup>

Os tempos de cálculo requeridos aumentaram ao longo dessa década, e é provável que a complexidade dos sistemas e o tamanho das simulações continuem aumentando.<sup>[18]</sup> Há 20 anos os tempos das simulações ficavam entre centenas de ps e algumas dezenas de ns e atualmente, os cálculos estão próximos de  $\mu$ s e os modelos usados são mais detalhados.<sup>[7],[19],[41]-[43]</sup>

Em 1996 um sistema contendo uma membrana na fase  $L_{\alpha}$ , formada por 32 DPPC por lâmina e hidratada por 434 moléculas de água foi simulado em NpT durante 2ns para avaliação estrutural.<sup>[43]</sup> A Tese de Doutorado de D.P. Tieleman, defendida em 1998, pode ser considerada um dos marcos iniciais dessa área. Ele desenvolveu simulações de DM de bicamadas lipídicas hidratadas, estudou as interações da membrana com peptídeos  $\alpha$ -hélice e com proteínas-canal. Um dos sistemas, contendo 65898 átomos, foi simulado por pouco mais de 1 ns.<sup>[36]</sup>

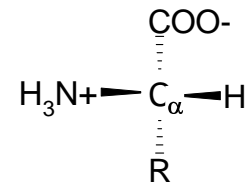
Em 1999 foi apresentado um estudo de estabilidade da membrana a tempos longos, com uma simulação de 10ns.<sup>[16]</sup> Um canal formado por 6 alameticinas no interior de uma bicamada lipídica hidratada foi simulado por 12 ns.<sup>[7]</sup> Em 2002, para estudo da blindagem da bicamada lipídica DPPS por íons sódio a simulação teve duração de 4ns.<sup>[44]</sup> Ainda para estudos da blindagem da membrana, em 2004 uma bicamada lipídica POPS neutralizada com íons sódio e cloreto foi simulada por 40ns.<sup>[27]</sup> Em outro artigo, uma bicamada DPPC com íons cálcio foi simulada durante 200ns.<sup>[25]</sup>

Em 2005 foram comparadas simulações de DM para uma bicamada lipídica hidratada, e as propriedades se mostraram mais rapidamente convergentes para ensemble NVT que NpT. A bicamada formada por 36 fosfolipídios em cada lâmina apresentou convergência das propriedades como perfil de densidade eletrônica, parâmetro de ordem e tensão superficial entre 3ns e 4ns de cálculo.<sup>[39]</sup> Uma bicamada lipídica mista POPE/POPG, simulada durante 25ns para estudos estruturais, indicou que a interação PE-PG é preferencial se comparada a PE-PE ou PG-PG.<sup>[10]</sup>

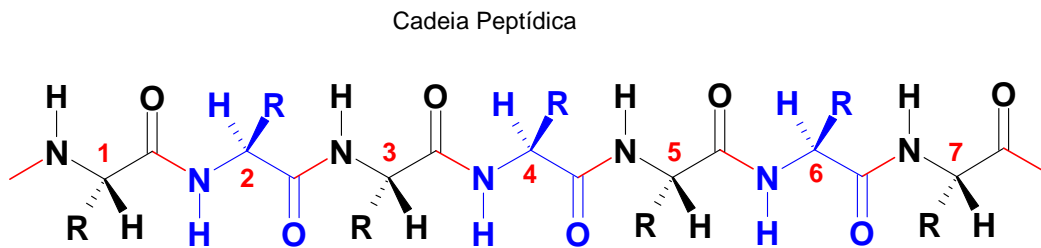
As interações entre membranas aniônicas e peptídeos catiônicos são governadas por interações eletrostáticas, fator que aumenta a seletividade dos antibióticos da classe PCA.<sup>[27],[44]</sup> O potencial transmembrana pode ser determinante na reorientação e passagem dos peptídeos  $\alpha$ -hélices da superfície para o interior da membrana, devido às interações com os momentos de dipolo dos peptídeos. Outro fator que influencia essa transição é a concentração de peptídeos sobre a membrana, cujo acréscimo permite a inserção na bicamada

lipídica. Para razões maiores peptídeo/lipídio, pode haver a formação de canal através do qual se estabelece o fluxo de água, que pode romper a membrana e causar a morte da célula.<sup>[7],[45]</sup>

Polipeptídeo é um polímero de aminoácidos<sup>[1],[2]</sup> (Figuras 2.3. e 2.4.). Embora não haja uma regulamentação, costuma-se usar o termo *proteína* para um polipeptídeo de mais de 50 aminoácidos. Abaixo disso, o mesmo é considerado um *peptídeo*. As proteínas são variações na combinação de 20 aminoácidos específicos, que se diferenciam por suas cadeias laterais (grupo *R*) ligadas ao carbono  $\alpha$  ( $C_\alpha$ ). Os 4 substituintes desse carbono são dispostos num arranjo tetraédrico.



**Figura 2.3.** Estrutura de um aminoácido.



**Figura 2.4.** Estrutura genérica de um polipeptídeo.

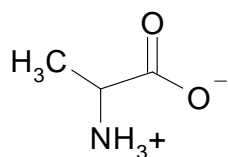
Com exceção do aminoácido glicina (cujo *R* é um hidrogênio) todos os demais têm  $C_\alpha$  assimétrico e apresentam atividade óptica. Em proteínas de mamíferos todos os aminoácidos encontrados são *Levogiros*, conhecidos como L-aminoácidos, pois desviam o plano da luz polarizada para a esquerda. Usando a projeção de Fisher, o grupo  $\alpha$ -COO<sup>-</sup> é direcionado para dentro do plano da folha e para cima, o  $\alpha$ -R para dentro e para baixo, restando o  $\alpha$ -H e o  $\alpha$ -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>. Por convenção, se o último estiver posicionado à esquerda, o aminoácido é L, caso contrário será D (*Destrogiro*). Os aminoácidos são classificados ainda em função da carga que apresentam em pH fisiológico (pH 7) como ácidos, básicos, polares e não-polares (Figuras 2.5. e 2.6.).

Os aminoácidos básicos apresentam carga resultante positiva em pH neutro, são eles Lisina (Lys); Arginina (Arg) e Histidina (His). Os aminoácidos ácidos apresentam carga resultante negativa em pH neutro, são o Ácido Aspártico (Asp) e o Ácido Glutâmico (Glu). Há ainda dois tipos de aminoácidos, cujas cadeias laterais têm carga resultante neutra: os polares e os não-polares. Serina (Ser); Treonina (Thr); Asparagina (Asn); Glutamina (Gln); Tirosina (Tyr) e Cisteína (Cys) fazem parte dos aminoácidos polares. Alanina (Ala); Valina

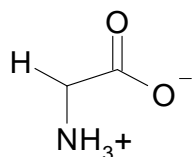


(Val); Leucina (Leu); Isoleucina (Ile); Metionina (Met); Prolina (Pro); Fenilalanina (Phe); Triptofano (Trp) e Glicina (Gly) são aminoácidos não-polares. Este último, Gly, tem apenas um átomo de hidrogênio na cadeia lateral e também pode ser considerado polar.

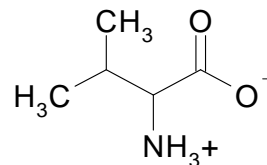
### Não-Polares



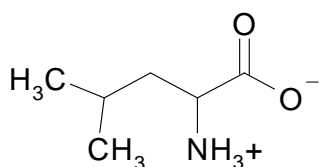
[Ala]



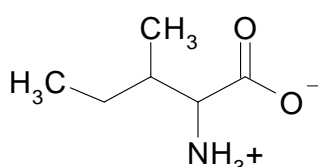
[Gly]



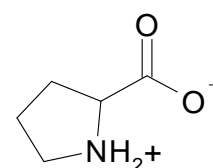
[Val]



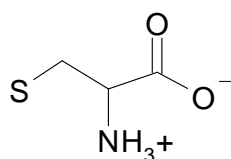
[Leu]



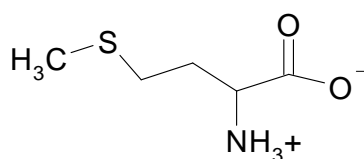
[Ile]



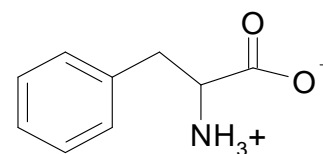
[Pro]



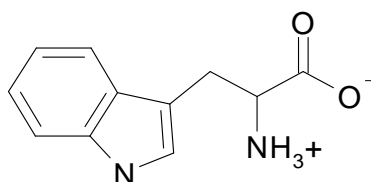
[Cys]



[Met]

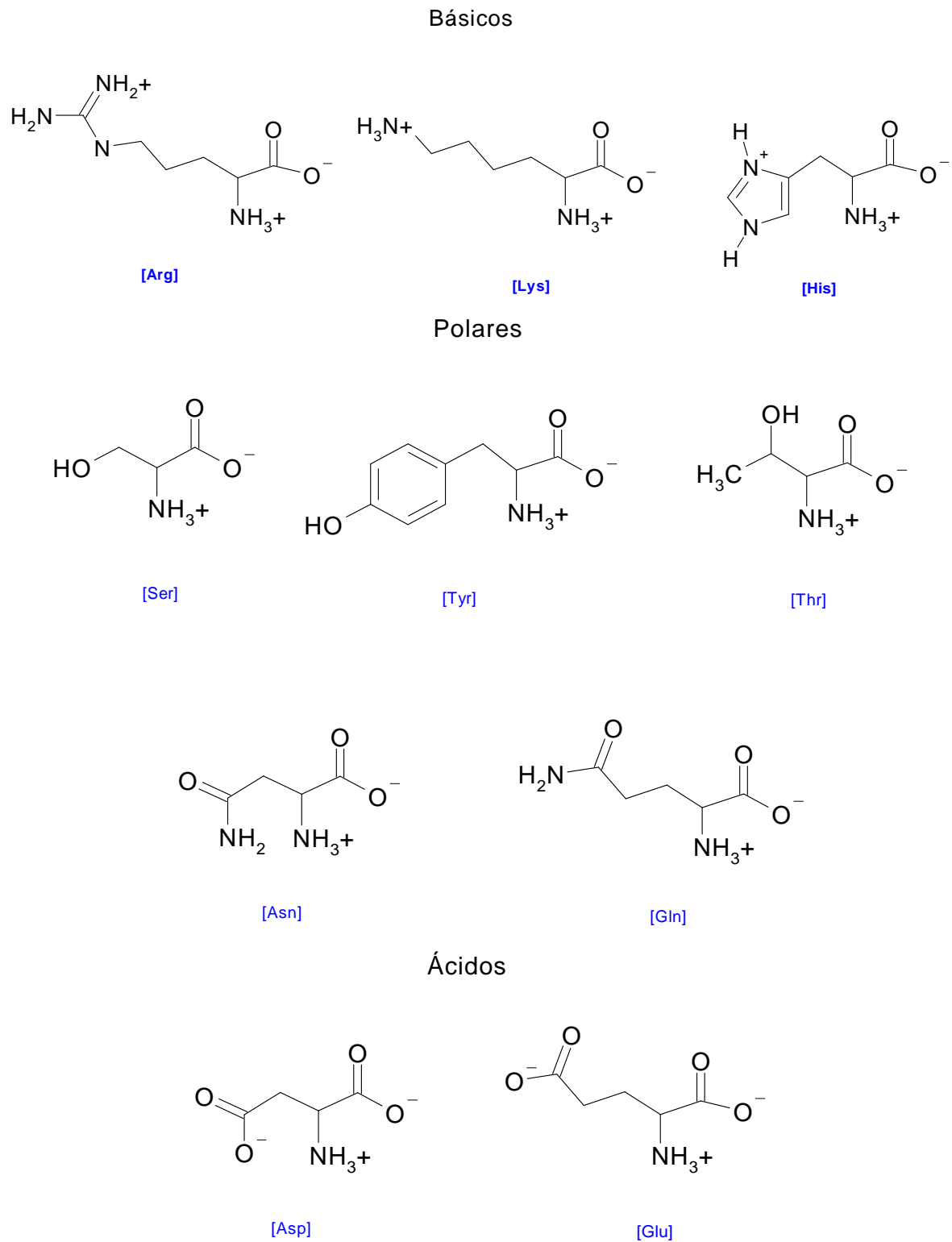


[Phe]



[Trp]

**Figura 2.5.** Estrutura dos aminoácidos não-polares, classificados quanto à carga em pH 7.



**Figura 2.6.** Estrutura dos aminoácidos básicos, polares e ácidos, classificados quanto à carga em pH 7.

As proteínas têm estruturas definidas,<sup>[2]</sup> qualificadas como Primária; Secundária; Terciária e Quaternária. A estrutura Primária consiste na seqüência de aminoácidos que a compõe, e é fundamental que seja conhecida, pois dela depende o arranjo tridimensional da proteína.

Polipeptídios de até 25 resíduos podem ser seqüenciados por Espectroscopia de Massas. Os seqüenciadores automáticos fragmentam a proteína em subunidades para fazer a determinação. Pelo procedimento de Sanger,<sup>[46]</sup> a proteína é quebrada em fragmentos pequenos o suficiente para serem seqüenciados de modo individual e a estrutura da proteína intacta é reconstituída a partir da sobreposição das seqüências dos fragmentos.

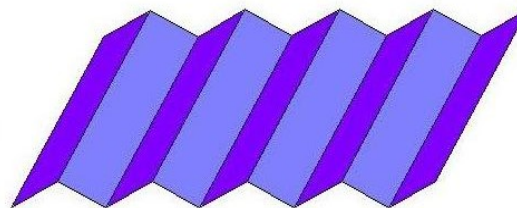
A Estrutura Secundária é referente à disposição espacial de domínios do polipeptídio. Linus Pauling e Robert Corey fizeram vários estudos por Raio-X das estruturas de aminoácidos e dipeptídios nas décadas de 30 e 40, constatando que a ligação peptídica possui 40% de caráter de ligação dupla, o que confere ao esqueleto do peptídeo uma conformação planar rígida. A ligação C–N do peptídeo é 0,13 Å mais curta que a C<sub>α</sub>–N normal; bem como a ligação C=O é 0,02Å maior que a C=O de aldeídos e cetonas.

Com poucas exceções, os peptídeos adotam conformações trans, na qual C<sub>α</sub> sucessivos ficam em lados opostos da cadeia; a conformação cis para C<sub>α</sub> sucessivos é aproximadamente 8kJ.mol<sup>-1</sup> mais instável devido a efeitos estéricos de cadeias laterais vizinhas.

As torções na cadeia principal da proteína determinam suas conformações espaciais, tal como α-hélice e folha-β (ou fita-β) (Figuras 2.7. e 2.8.). A definição da estrutura secundária de uma seqüência de peptídeos segue uma hierarquia.<sup>[47]</sup> Primeiramente são definidas as ligações de hidrogênio entre O do C=O, e H do N–H.



**Figura 2.7.** Estrutura α-Helice.



**Figura 2.8.** Estrutura Folha-β.

Com base na separação dos resíduos e no dobramento da sequência envolvidos (Figura 2.9.) determinam-se *turns* (voltas) ou *bridges* (pontes). Nos *n-turns*, o *n* indica o número de resíduos entre as ligações de hidrogênio. Por exemplo, *3-turn*, indica que a ponte é formada entre o  $O_{C=O}$  de um aminoácido (*i*) com o  $H_{N-H}$  do aminoácido (*i*+2). As  $\alpha$ -hélices são formadas por repetições de *3-turns* (4 *3-turns* consecutivos), enquanto folhas- $\beta$  são formadas por repetições de *bridges*; fragmentos de curva que unem diferentes domínios são *coils* (alças).

As hélices se “enrolam” em sentido anti-horário e as pontes, conforme o sentido que se dispõem, podem ser paralelas ou antiparalelas. Hélices longas podem apresentar desvios na estrutura que impedem a formação de ligações de hidrogênio, gerando imperfeições. O tamanho máximo sugerido para uma estrutura secundária é de 30 Å (hélice mais provável: 13 a 18 resíduos).<sup>[47]</sup>

A Figura 2.10. tem as definições dos ângulos  $\psi$  e  $\phi$ . São traçados dois planos que contêm os grupos amida dos resíduos ligados ao  $C_{\alpha}$ . Para o plano que contêm os átomos N- $C_{\alpha}$ - $C_{lat}$  (cadeia lateral) tomado como referência,  $\phi$  é o ângulo entre este e o plano que contém a ligação N(grupo amida)- $C_{\alpha}$ . Para o plano que tem a ligação entre  $C_{\alpha}$  e  $C=O$ , o ângulo que este plano faz com o plano referência  $C_{lat}$ - $C_{\alpha}$ - $C_{C=O}$  é  $\psi$ .

A estrutura Terciária diz respeito à conformação da proteína como um todo, onde o dobramento dos domínios determina a posição de todos os átomos no espaço, é obtida por Cristalografia de Raio-X ou por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A estrutura Quaternária é atribuída apenas a agregados de proteínas.

Geralmente os peptídeos são compostos por no máximo 50 resíduos de aminoácidos,<sup>[2]</sup> por isso só apresentam estrutura primária e secundária. As proteínas, que são cadeias maiores de aminoácidos, apresentam também estruturas terciária e quaternária que são relativas ao dobramento da estrutura secundária e à disposição espacial das subunidades. De acordo com a estrutura terciária em  $\alpha$ -hélice ou folha- $\beta$ , acredita-se que a proteína atue sobre a membrana ou no interior desta respectivamente.<sup>[48]</sup>

Quando a estrutura predominante é folha- $\beta$  o modelo de atuação é referido como *carpet*, segundo o qual várias unidades da proteína “revestem” a parte externa da membrana formando um tapete.<sup>[45],[48]</sup> Nesta distribuição, os resíduos polares são direcionados para as cabeças polares da membrana, enquanto os apolares são direcionados para o meio externo à célula. As interações desfavoráveis entre os resíduos apolares e o meio provocam um “dobramento” na membrana, resultando na ruptura da célula.

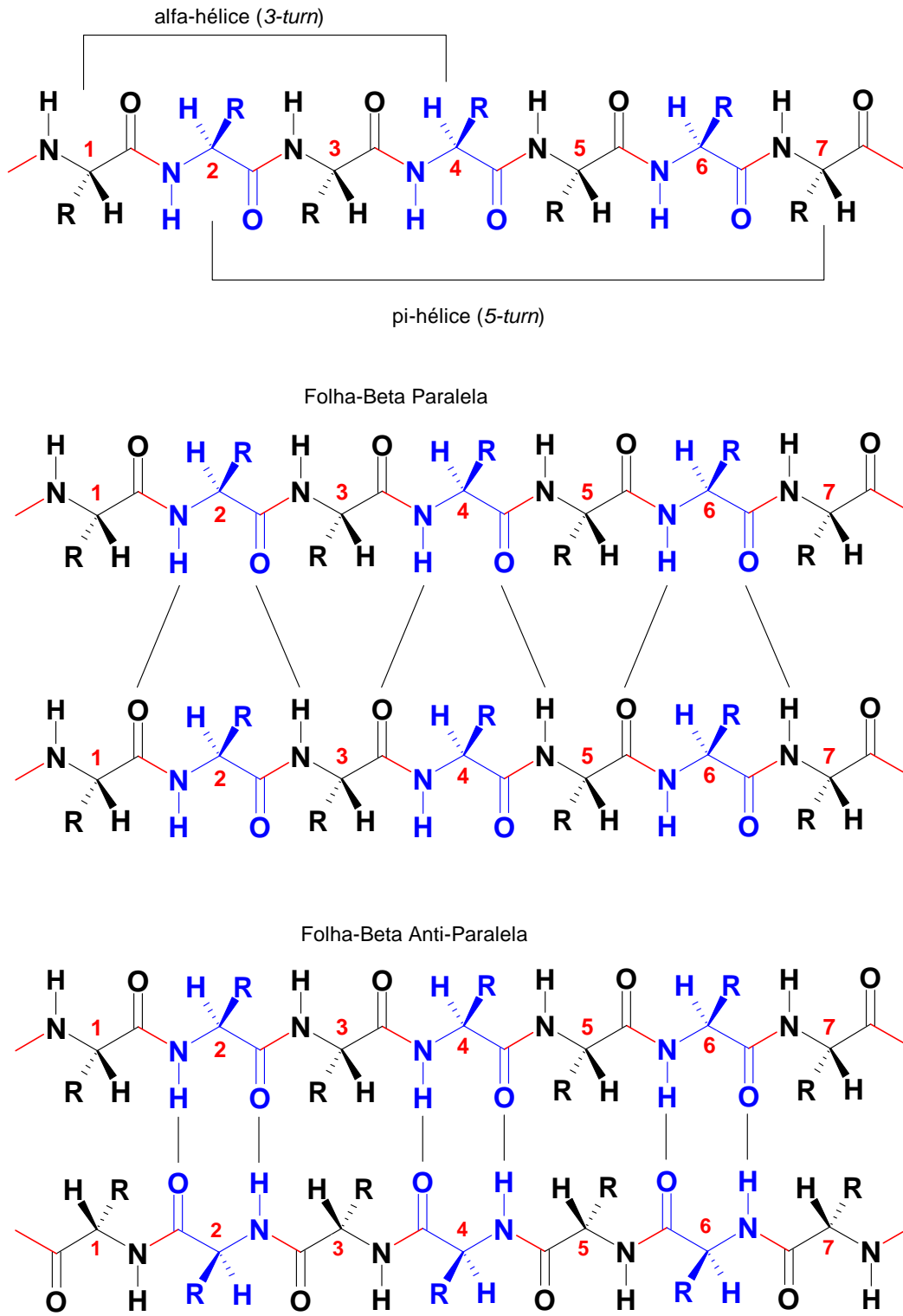
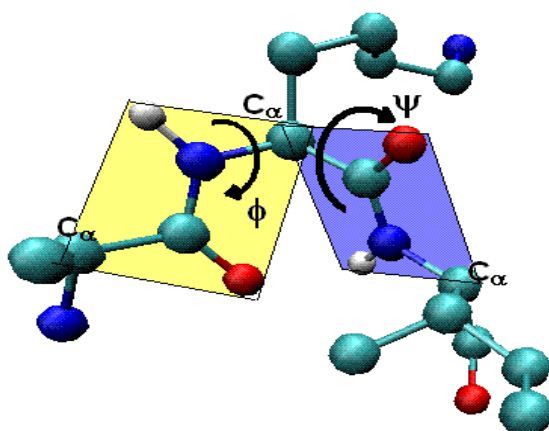


Figura 2.9. Modelos de Estruturas Secundárias.



**Figura 2.10.** Definição de  $\psi$  e  $\phi$ .

Se a estrutura predominante é  $\alpha$ -hélice as unidades desta proteína penetram na membrana formando um feixe como as tábuas de um barril, e o modelo é referido como *Barrel Stave*. Essa configuração da origem a um poro na membrana, alterando sua permeabilidade e desfazendo o gradiente de concentração mantido por ela, também causando a lise da célula.<sup>[45],[48]-[50]</sup>

### 3. METODOLOGIA

Os sistemas foram estudados por simulações computacionais de Dinâmica Molecular<sup>[51]</sup> (DM), aplicando o software NAMD2<sup>[52]</sup>. A escolha do NAMD se deu, principalmente, em função da performance do software quando rodado em paralelo. Como sistemas biológicos são extensos a obtenção de resultados é demorada, foi a possibilidade de rodar os cálculos num cluster com 14 nodos que viabilizou um estudo desse porte como trabalho de mestrado. No final de 2003, quando esse projeto começou, testamos os principais softwares – o NAMD e o GROMACS<sup>[53]</sup> – no cluster do nosso laboratório, e a melhor resposta foi do NAMD.

A DM parte da Mecânica Clássica, resolvendo as equações do movimento de Newton por meio de algoritmos integradores que geram as trajetórias de cada átomo do sistema. As condições iniciais requeridas são as coordenadas de cada partícula dentro do volume (V) acessível e suas respectivas velocidades, que seguem uma distribuição Maxwelliana de acordo com a temperatura (T). A DM representa uma ferramenta da Mecânica Estatística (ME) conectando propriedades microscópicas e macroscópicas do sistema.

A evolução temporal do sistema simulado por DM é controlada através das médias termodinâmicas. Tendo obtido médias estáveis que não apresentem dependência com qualquer configuração inicial considera-se o sistema equilibrado. A partir desse ponto serão feitas as análises que, sempre que possível, devem ser comparadas a resultados obtidos experimentalmente a fim de validar os dados da simulação.

A seguir são apresentados alguns parâmetros de uma Simulação por Dinâmica Molecular, incluindo o tratamento por Mecânica Clássica e Mecânica Estatística.

### 3.1. CAMPO DE FORÇA – CHARMM27

Os Campos de Força empíricos fornecem informações detalhadas sobre os átomos e suas interações em uma molécula, levando em consideração átomos que se ligam diretamente e os não ligados (separados por duas ou mais ligações). A qualidade dos parâmetros de um Campo de Força é determinante para obtenção de bons resultados. O Campo de Força escolhido para desenvolver esse estudo foi o CHARMM27<sup>[54]-[59]</sup>, cujos parâmetros foram otimizados para a descrição de biomoléculas tal como proteínas e lipídios.<sup>[60],[61]</sup> Além disso, o CHARMM é compatível com o software NAMD, aplicado aqui.

Os parâmetros de Campo de Força usados pelo NAMD podem ser usados nos programas CHARMM<sup>[60]</sup> e X-PLOR<sup>[62]</sup>. A forma funcional da energia potencial é definida pela Equação 1:

$$\begin{aligned}
 V(\vec{r}) = & \sum_{bonds} k_b (b - b_o)^2 + \sum_{UB} k_{UB} (S - S_o)^2 + \sum_{ang} k_\theta (\theta - \theta_o)^2 + \\
 & \sum_{dihed} k_\chi (1 + \cos(n\chi - \delta))^2 + \sum_{impr} k_{impr} (\varphi - \varphi_o)^2 + \\
 & \sum_{nbond} \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}}
 \end{aligned} \tag{1}$$

Na equação acima, as duas primeiras linhas são referentes às interações ligantes; a última linha, às não-ligantes:

***b*** o comprimento de ligação

***k<sub>b</sub>*** a constante de força da ligação

***b<sub>o</sub>*** a distância de equilíbrio

***S*** a distância 1-3 (entre dois átomos separados por duas ligações covalentes)

***k<sub>UB</sub>*** força Urey-Bradley

***S<sub>o</sub>*** a distância de equilíbrio

***θ*** o ângulo

***k<sub>θ</sub>*** a constante de força do ângulo

***θ<sub>o</sub>*** o ângulo de equilíbrio

***χ*** diedro ou ângulo de torção

***k<sub>χ</sub>*** constante de força do diedro

***nχ*** a multiplicidade



$\delta$  o ângulo fase

$\varphi$  diedro impróprio

$k_\varphi$  constante de força do diedro impróprio

$\varphi_0$  diedro de equilíbrio

$r_{ij}$  distância entre os átomos  $i$  e  $j$

$\sigma_{ij}$  distância de equilíbrio entre os átomos  $i$  e  $j$

$\varepsilon_{ij}$  energia de LJ no ponto de equilíbrio entre os átomos  $i$  e  $j$

$q_i$  carga individual para o átomo  $i$

$e$  constante dielétrica; em todos os cálculos é igual a 1, que corresponde à permissividade no vácuo.

Na equação 1, a primeira expressão da última linha é referente ao Potencial de Lennard-Jones (LJ), que não envolve interações eletrostáticas. Entre colchetes o primeiro termo, elevado à potência 12, refere-se às interações repulsivas entre os átomos  $i$  e  $j$ ; o segundo, elevado à potência 6, é relativo às interações atrativas de Van der Waals. Pela regra de Lorentz-Berthelot<sup>[63]</sup>, os parâmetros  $\sigma_{ij}$  e  $\varepsilon_{ij}$  são obtidos para cada átomo e depois combinados, como mostra a Equação 2.

$$\varepsilon_{ij} = \sqrt{\varepsilon_i \cdot \varepsilon_j} \quad (2)$$

$$\sigma_{ij} = \left( \frac{\sigma_i + \sigma_j}{2} \right) \quad (3)$$

A segunda expressão na última linha da equação 1 é referente ao Potencial de Coulomb, que trabalha as interações eletrostáticas, que decorrem das cargas individuais dos átomos que compõe a molécula.

O modelo TIP3P<sup>[64],[65]</sup> define a molécula de água por 3 cargas puntuais, 2 comprimentos de ligação O–H, e 1 ângulo H–O–H. Pode-se usar TIP4P<sup>[46]</sup> ou TIP5P<sup>[66]</sup>; mas por enquanto existem recomendações para que se utilize TIP3P com o CHARMM.<sup>[67]</sup>

*“Não existe o melhor Campo de Força. A melhor opção de Modelo e Campo de Força depende do tipo de sistema molecular e o tipo de propriedade na qual se tem interesse”.*

van Gunsteren.<sup>[51]</sup>

### 3.2. MECÂNICA CLÁSSICA

Em simulações de DM, os átomos são tratados como pontos de massa que se movem no espaço, descritos através de equações clássicas do movimento. No formalismo Newtoniano, o movimento do  $i$ -ésimo átomo com massa  $m_i$  é descrito pela seguinte equação:<sup>[68]</sup>

$$\vec{F}_i = \frac{d}{dt} \vec{p}_i = m_i \frac{d}{dt} \vec{v}_i = m_i \frac{d^2}{dt^2} \vec{r}_i \quad (4)$$

A força  $\vec{F}_i$  exercida sobre o átomo  $i$  é a consequência de todas as interações com os demais átomos do sistema. Para um sistema contendo  $N$  átomos:

$$\vec{F}_i = \sum_{j \neq i}^N \vec{F}_{ij} \quad (5)$$

Sendo a força  $\vec{F}_{ij}$  exercida pelo átomo  $j$  no átomo  $i$ , definida pela derivada do Campo de Força (Equação 1) em relação a separação  $\vec{r}_{ij}$  (Equação 6).

$$\vec{F}_{ij} = -\frac{\partial}{\partial \vec{r}_{ij}} V(\vec{r}_{ij}) \quad (6)$$

As Equações do Movimento de Newton representam um sistema de  $N$  equações diferenciais acopladas:

$$\vec{F}_i = \frac{d}{dt} \vec{p}_i = \frac{d}{dt} (m_i \vec{v}_i) \quad (7)$$

Sendo  $\vec{p}_i$  o momentum do átomo  $i$ , de massa  $m_i$  com velocidade  $\vec{v}_i$ . As soluções podem ser obtidas através da escolha adequada de coordenadas e velocidades iniciais para os  $N$  átomos. Em simulações por DM, essas soluções são obtidas numericamente pelo algoritmo Integrador.

### 3.3. ALGORITMO INTEGRADOR – VELOCITY VERLET

Este tipo de algoritmo é responsável pela integração computacional das equações do movimento de Newton, a cada passo de integração  $\Delta t$ .<sup>[51],[63]</sup> A Equação 4 é uma equação diferencial de 2ª ordem, que pode ser reescrita como duas equações diferenciais de 1ª ordem, para coordenada e velocidade:

$$\frac{d}{dt} \vec{v}_i(t) = m_i^{-1} \vec{F}_i(\vec{r}_i(t)) \quad (8)$$

$$\frac{d}{dt} \vec{r}_i(t) = \vec{v}_i(t) \quad (9)$$

As forças  $\vec{F}_i$  são derivadas da Energia Potencial (Equação 6), e dependem da configuração do sistema. Pela soma das expansões em série de Taylor para  $\vec{v}_i(t)$ , num instante  $t=t_n$ , pode-se construir um algoritmo para integração das funções acima em pequenos intervalos de tempo (passos de integração):

$$\begin{aligned} \vec{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) &= \vec{v}_i(t_n) + \left. \frac{d}{dt} \vec{v}_i(t) \right|_{t_n} \frac{\Delta t}{2} + \left. \frac{d^2}{dt^2} \vec{v}_i(t) \right|_{t_n} \frac{\left(\frac{\Delta t}{2}\right)^2}{2!} + O(\Delta t^3) \\ \vec{v}_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) &= \vec{v}_i(t_n) - \left. \frac{d}{dt} \vec{v}_i(t) \right|_{t_n} \frac{\Delta t}{2} + \left. \frac{d^2}{dt^2} \vec{v}_i(t) \right|_{t_n} \frac{\left(\frac{\Delta t}{2}\right)^2}{2!} + O(\Delta t^3) \\ \hline \vec{v}_i\left(t_n + \frac{\Delta t}{2}\right) &= \vec{v}_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + m_i^{-1} \vec{F}_i(\vec{r}_i(t_n)) \Delta t + O(\Delta t^3) \end{aligned} \quad (10)$$

Aplicando a expansão em série de Taylor para  $\vec{F}_i(t)$  no instante  $t=(t_n - \Delta t/2)$ , teremos:

$$\vec{r}_i(t_n + \Delta t) = \vec{r}_i(t_n) + \vec{v}_i\left(t_n + \frac{\Delta t}{2}\right) \Delta t + O(\Delta t^3) \quad (11)$$

O algoritmo mais utilizado é o Verlet, e pode ser obtido suprimindo as velocidades  $\vec{v}_i\left(t_n + \frac{\Delta t}{2}\right)$  e  $\vec{v}_i\left(t_n - \frac{\Delta t}{2}\right)$  das equações anteriores, e substituindo  $t_n$  por  $(t_n - \Delta t)$ :

$$\vec{r}_i(t_n + \Delta t) = 2\vec{r}_i(t_n) - \vec{r}_i(t_n - \Delta t) + m_i^{-1} \vec{F}_i(\vec{r}_i(t_n)) \Delta t^2 + O(\Delta t^4) \quad (12)$$

As velocidades atômicas não são necessárias para calcular as trajetórias, mas são necessárias nos cálculos de Energia Cinética (e assim também para o cálculo da Energia Total). Como a velocidade atômica não aparece explicitamente no algoritmo *Verlet*, o acoplamento do sistema ao banho térmico (controle de temperatura) através do escalonamento das velocidades se torna impossível. Uma das soluções propostas para essa “deficiência” é o algoritmo *Velocity Verlet*, utilizado pelo NAMD; é equivalente ao *Verlet* (Equação 12) mas retorna  $\vec{r}_i(t_n); \vec{v}_i(t_n); \vec{a}_i(t_n)$ :

$$\vec{r}_i(t_n + \Delta t) = \vec{r}_i(t_n) + \vec{v}_i(t_n) \Delta t + \frac{1}{2} \vec{a}_i(t_n) \Delta t^2 \quad (13)$$

$$\vec{v}_i(t_n + \Delta t) = \vec{v}_i(t_n) + \frac{1}{2} [\vec{a}_i(t_n) + \vec{a}_i(t_n + \Delta t)] \Delta t \quad (14)$$

### 3.4. MECÂNICA ESTATÍSTICA

Simulações computacionais são usadas para estudar propriedades de sistemas de muitas partículas, mas nem todas essas propriedades podem ser medidas diretamente na simulação. As médias da simulação são equivalentes a medidas experimentais, quando obtidas por métodos mecânico-estatísticos ou medidas ao longo da trajetória.

Para calcular essas médias a partir de dados microscópicos utilizamos conceitos da Mecânica Estatística<sup>[63],[69]</sup>. Para medir um observável ou propriedade macroscópica estimada na DM precisamos expressar este como função das coordenadas e dos momenta das partículas do sistema.

Pelo Princípio da Equipartição da Energia<sup>[70]</sup>, a energia cinética média associada a cada grau de liberdade  $N$  é de  $k_B T/2$ . Tendo  $\left( m_i v_x^2/2, m_i v_y^2/2, m_i v_z^2/2 \right)$ , a contribuição para a energia cinética passa a ser  $3N(k_B T)/2$ . Considerando um sistema composto de  $N$  partículas de massa  $m_i$ , cada uma com coordenada  $\vec{r}_i = (r_x, r_y, r_z)$ . Para qualquer temperatura  $T > 0K$ , essas partículas terão velocidade não nula  $\vec{v}_i = (v_x, v_y, v_z)$ , e um momentum linear associado  $\vec{p}_i = m_i \vec{v}_i$ .

$$\left\langle \sum_{i=1}^N \frac{|\vec{p}_i|^2}{m_i} \right\rangle = \langle 2K \rangle = 3Nk_B T \quad (15)$$

Essa é a definição da temperatura no sistema. Na prática, é medida a energia cinética total do sistema  $K$ , que posteriormente é dividida pelo número de graus de liberdade. Considerando as flutuações da energia cinética, é adotada a temperatura instantânea:

$$T(t) = \frac{2K}{3Nk_B} = \frac{1}{3Nk_B} \sum_{i=1}^N \frac{|\vec{p}_i|^2}{m_i} = \frac{1}{3Nk_B} \sum_{i=1}^N m_i v_i^2 \quad (16)$$

### a. Teorema Virial

O Teorema Virial<sup>[68]</sup> tem origem estatística e se aplica a sistemas moleculares de  $N$  partículas. Cada partícula possui um vetor posição  $\vec{r}_i$  e momentum  $\vec{p}_i$  relacionado. Sendo uma quantidade  $X$  definida como função de  $\vec{r}_i$  e  $\vec{p}_i$ :

$$X \equiv \sum_i \vec{p}_i \cdot \vec{r}_i \quad (17)$$

A derivada temporal de  $X$  é:

$$\frac{dX}{dt} = \dot{X} = \sum_i \left( \vec{p}_i \cdot \dot{\vec{r}}_i + \dot{\vec{p}}_i \cdot \vec{r}_i \right) \quad (18)$$

Calculando-se a média de  $\langle \dot{X} \rangle$  sobre um intervalo de tempo  $\tau$ , teremos:

$$\left\langle \frac{dX}{dt} \right\rangle = \frac{1}{\tau} \int_0^\tau \frac{dX}{dt} dt = \frac{X(\tau) - X(0)}{\tau} \quad (19)$$

Se o movimento do sistema for periódico, e se  $\tau$  for um múltiplo integrador do sistema no período, então  $X(\tau) = X(0)$ , e  $\langle \dot{X} \rangle$  será igual a zero. No entanto, se o sistema não apresenta nenhuma periodicidade, sendo  $X$  uma função finita para qualquer valor de  $t$ , podemos tornar  $\langle \dot{X} \rangle$  um valor tão pequeno quanto desejado, através de  $\tau$  suficientemente longo:

$$\left\langle \sum_i \vec{p}_i \cdot \dot{\vec{r}}_i \right\rangle = - \left\langle \sum_i \dot{\vec{p}}_i \cdot \vec{r}_i \right\rangle \quad (20)$$

No lado esquerdo da equação (20),  $\vec{p}_i \cdot \dot{\vec{r}}_i$  corresponde ao dobro da Energia Cinética, no direito,  $\dot{\vec{p}}_i$  é a força  $\vec{F}_i$  sobre a  $i$ -ésima partícula.

Logo:

$$\left\langle 2 \sum_i K_i \right\rangle = - \left\langle \sum_i \vec{F}_i \cdot \vec{r}_i \right\rangle \quad (21)$$

A soma sobre  $K_i$  é a energia cinética total do sistema  $K$ , portanto:

$$\langle K \rangle = - \left\langle \frac{1}{2} \sum_i \vec{F}_i \cdot \vec{r}_i \right\rangle \quad (22)$$

O lado direito da equação (22) foi o que Clausius chamou de *virial* do sistema, e o *Teorema Virial* consiste no fato de que “a energia cinética média de um sistema de partículas é igual ao *virial*”.

Como  $\vec{r} = (\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N)$  e  $\vec{p} = (\vec{p}_1, \vec{p}_2, \dots, \vec{p}_N)$  as energias interna total, potencial e cinética serão expressas por:

$$E(\vec{p}, \vec{r}) = K(\vec{p}) + V(\vec{r}) \quad (23)$$

$$K(\vec{p}) = \sum_{i=1}^N p_i^2 / 2m_i \quad (24)$$

Podemos escrever

$$\langle E \rangle = \langle K \rangle + \langle V \rangle \quad (25)$$

Temperatura e pressão podem ser calculadas pelo teorema virial que, para uma coordenada e um momentum qualquer, escrevendo na forma de uma equi-partição generalizada:

$$\left\langle p \frac{\partial E}{\partial p} \right\rangle = k_B T \quad (26)$$

$$\left\langle q \frac{\partial E}{\partial q} \right\rangle = k_B T \quad (27)$$

## b. Hipótese Ergódica

Segundo esta hipótese, as médias temporal e de ensemble devem ser iguais.<sup>[69]</sup> A média do observável  $A$  (função do momentum  $\vec{p}$  e das coordenadas  $\vec{r}$ ) pode ser computada como média temporal,  $\bar{A}$ , ou estimada sobre todas as configurações de um ensemble,  $\langle A \rangle$ .

Na DM são especificadas as condições iniciais  $(\vec{p}, \vec{q})$  que seguem uma evolução temporal conforme a mecânica Newtoniana, com as médias calculadas referentes ao tempo. Assim:

$$\bar{A} = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{t} \int_0^t A(t) dt \quad (28)$$

Para um tempo de simulação suficientemente longo, a média temporal não deve depender da condição inicial, isto é, partindo de diferentes configurações deve-se chegar à mesma média. Dessa forma as médias serão equivalentes:  $\bar{A} = \langle A \rangle$ .



### 3.5. ENSEMBLE ESTATÍSTICO

Um Ensemble pode ser definido como o conjunto de configurações e as propriedades mantidas constantes durante a integração das equações de Newton, que representam o estado do sistema.<sup>[63]</sup> Uma das primeiras opções de ensemble é o microcanônico ou  $NVE$  (número de partículas; volume e energia total constantes durante a simulação). Foram desenvolvidas alternativas para esse ensemble, em que se controla separadamente  $T$  e  $P$  ao invés da energia total, derivada destas.<sup>[63]</sup>

Outros ensembles definidos são o grand-canônico ou  $\mu VT$  (potencial químico; volume e temperatura constantes); o canônico ou  $NVT$  (com número de partículas; volume e temperatura constantes); o isobárico-isoentalpico ou  $NpH$  (com número de partículas; pressão e entalpia constantes) e o isotérmico-isobárico ou  $NpT$  (com número de partículas; pressão e temperatura constantes).<sup>[63]</sup>

Quando se trabalha com DM de não-equilíbrio, como no estudo de processos irreversíveis; eventos catalíticos ou propriedades de transporte, é necessário impor ao sistema constraints ou restraints externos. Nesses casos, pode-se controlar  $T$  com o objetivo de absorver o calor dissipado nesses processos. Para simulações de DM no equilíbrio também é conveniente que se controle  $T$  e  $P$ . Isso evita erros no cálculo das forças, e torna mais fácil a transição para determinadas condições de  $T$  e  $P$ .

No caso de sistemas biológicos contendo membranas homogêneas, é recomendável aplicar tensão superficial ( $\gamma$ ) constante no plano  $xy$  da bicamada. No ensemble  $NpT$ , a pressão que atua no sistema é a mesma em todas as direções ( $x$ ,  $y$ ,  $z$ ), o sistema pode ser considerado isotrópico – a variação do volume em qualquer direção enfrenta a mesma “resistência”. Para um sistema no qual se aplica tensão superficial ( $\gamma_{xy}$ ), a pressão definida atua somente no eixo  $z$  ( $p_z$ ), e a “resistência” não é mais a mesma em todas as direções. Assim pode ser caracterizado o ensemble  $N p_z \gamma_{xy} T$  ou  $Np\gamma T$ .

O valor de  $\gamma_{xy}$  pode ser determinado de duas maneiras: Tomando o valor experimental de tensão superficial que tenha sido determinado para uma membrana de mesma composição da simulada, ou aplicando ao sistema uma área constante no plano  $xy$ . Neste caso é utilizado um valor experimental pré-definido para uma membrana de mesma composição, com base na área superficial do fosfolipídio (depende, principalmente, das cabeças polares). Esse seria um ensemble  $N p_z A_{xy} T$  ou  $NPAT$ , é utilizado em alguns casos para “agilizar” a equilibração do sistema – como a área por fosfolipídio é um critério de equilibração, deve convergir para determinado valor durante a simulação.

A partir da simulação  $NpAT$ , depois do sistema equilibrado, é possível calcular a tensão superficial a ser aplicada. Valores experimentais de  $A$  e  $\gamma$  são determinados para bicamadas lipídicas homogêneas (composta apenas por um tipo de lipídio). Para membranas heterogêneas, a mistura de dois lipídios diferentes modifica as interações cabeça-cabeça, podendo aproximar ou afastar os lipídios uns dos outros.

Qualquer alteração nas condições usadas para obtenção dos valores experimentais pode afetar as interações entre as cabeças polares. Se o solvente for modificado ou houver a inserção de uma proteína, por exemplo, as interações cabeça-cabeça serão alteradas. Neste caso, o uso de valores experimentais – de área por lipídio ou tensão superficial – pode incutir erro nos resultados, ainda que a membrana seja homogênea.

Em decorrência das alterações de intensidade nas forças intermoleculares, a utilização de uma média ainda que ponderada conforme a composição da membrana não fornece um valor confiável. Assim, os valores de referência iniciais para área e tensão superficial não são aplicáveis quando se trabalha em condições diversas das usadas para determinação dos parâmetros experimentais.

Fizemos o teste com os ensembles  $NpAT$  e  $Np\gamma T$ , essa experiência está brevemente relatada no capítulo 4 – Parte Experimental, e em decorrência dos maus resultados obtidos, os cálculos foram refeitos no ensemble  $NpT$ .

### 3.6. TERMOSTATO E BAROSTATO

O controle de temperatura do NAMD usa Dinâmica de Langevin simples e o controle de Pressão é feito pelo *Nosé-Hoover Langevin Piston Method*<sup>[59]</sup> (dinâmica de Langevin implementada no barostato Nosé-Hoover<sup>[72],[73]</sup>). Os termostatos e barostatos são bastante semelhantes. No controle da pressão as variáveis  $T$  são substituídas por  $p$ , e as velocidades atômicas pelas coordenadas.

#### a. Constraint

Através do uso de *constraint*, a temperatura instantânea  $T(t)$  é a mesma da pré-determinada  $T_0$ . Isso pode ser feito re-escalando as velocidades a cada passo de integração por um fator  $[T_0/T(t)]^2$ , sendo que a temperatura é definida em termos da Energia Cinética ( $K(t)$ ), segundo a equiipartição:

$$K(t) = \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} m_i \overline{v_i(t)}^2 = \frac{3}{2} N k_B T(t) \quad (29)$$

Este método apresenta desvantagens como a imprecisão numérica do algoritmo que pode levar à perda do controle da temperatura instantânea, uma vez que  $T_0$  não aparece nas equações integráveis. Além disso, esse método é modelado pelo Hamiltoniano, que não representa um sistema físico no qual flutuações de  $K(t)$  são características. Embora seja possível obter expressões matematicamente consistentes, o Hamiltoniano não tem significado físico.

#### b. Extended System

Quando é aplicado o *Extended System*, são adicionados graus de liberdade extras aos graus de liberdade atômicos do sistema, reproduzindo o efeito do banho térmico. Os termos de energia cinética e potencial referentes aos graus de liberdade extras são inseridos no Hamiltoniano e a simulação é controlada com esses  $N+1$  graus de liberdade do sistema expandido. A energia flui entre o sistema e o banho térmico de acordo com o termo cinético  $1/2 m_s (dS/dt)^2$  do Hamiltoniano, sendo a velocidade controlada pelo parâmetro de inércia  $m_s$ .

Uma desvantagem desse tipo de acoplamento de 2ª ordem com o banho é a ocorrência de oscilações na energia.

### c. Acoplamento Fraco

Utilizando-se *acoplamento fraco* as equações do movimento são modificadas de tal forma que a relaxação da temperatura instantânea do sistema para a temperatura de referência seja de 1ª ordem:

$$\frac{d}{dt}T(t) = \tau_T^{-1} [T_0 - T(t)] \quad (30)$$

A energia cinética pode variar ( $\Delta K$ ) no intervalo  $\Delta t$ , com o escalonamento de todas as velocidades  $\vec{v}_i$  por um fator  $\lambda$ :

$$\Delta K = (\lambda^2 - 1) \frac{3}{2} N k_B T(t) \quad (31)$$

Se a capacidade calorífica do sistema por grau de liberdade for  $C_v^f$ , a variação da energia leva a:

$$\Delta T = [N^f C_v^f] \Delta K \quad (32)$$

$$\lambda = \left[ 1 + \frac{2}{k_B} C_v^f \Delta t \tau_T^{-1} \left( \frac{T_0}{T(t)} - 1 \right) \right]^{\frac{1}{2}} \quad (33)$$

A capacidade calorífica  $C_v^f$  não pode ser determinada com precisão, mas  $\tau_T$  (período de relaxação da temperatura) é um parâmetro ajustável, não havendo prejuízos para a DM.

Esse acoplamento ajustável de 1ª ordem pode ser fraco ( $\tau_T$  suficientemente grande) para evitar distúrbios no sistema; ou forte ( $\tau_T$  suficientemente pequeno) para se obter o resultado desejado.

#### d. Métodos Estocásticos

As velocidades atômicas são alteradas segundo a *Dinâmica de Langevin* (ou estocástica), e as novas velocidades seguem uma distribuição Maxwelliana. O tempo médio entre as colisões é um parâmetro ajustável e determina a força do acoplamento com o banho térmico. Outra opção é usar o coeficiente atômico de fricção  $\gamma_i$  como parâmetro ajustável no acoplamento com o banho térmico. A Equação de Langevin para uma partícula simples é:<sup>[74]</sup>

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} = \vec{F}_i(\vec{r}_i(t)) - \gamma_i m_i \frac{d \vec{r}_i}{dt} + \vec{R}_i(t) \quad (34)$$

O segundo termo, do lado direito da Equação 34, representa o *damping* ou amortecimento da fricção aplicada à partícula. O último termo é referente às forças aleatórias que podem ser aplicadas à partícula, como o efeito do solvente, por exemplo. Essa expressão mantém a energia cinética constante e, como consequência, a temperatura. Também pode ser aplicada, com algumas modificações, para controle da pressão.

Para um sistema isotrópico, no qual a pressão aplicada ao sistema é a mesma em todas as direções, a pressão é um escalar determinado por:

$$P = \frac{2}{3V} [K - \Xi] \quad (35)$$

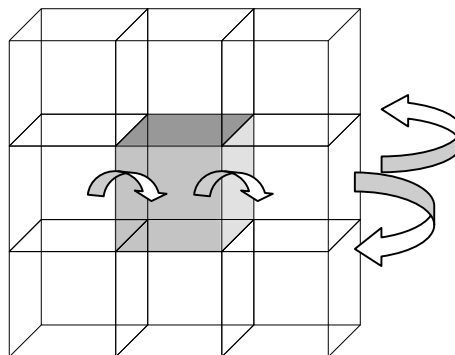
Onde  $K$  é a energia cinética; o  $V$  volume da caixa, e  $\Xi$  é o virial (equação 22). Para sistemas moleculares, as forças dos átomos de uma mesma molécula podem ser desconsideradas. Isso porque as contribuições para  $K$  são computadas a partir dos graus de liberdade moleculares. Variações de pressão podem ser obtidas alterando o volume da caixa e o virial através do escalonamento das distâncias interatômicas.

### 3.7. CONDIÇÕES PERIÓDICAS DE CONTORNO

Simulações com Condições Periódicas de Contorno<sup>[51]</sup> costumam ser aplicadas com a finalidade de minimizar os efeitos da parede (efeito do sistema finito). Caso o sistema não seja compatível com a periodicidade, é possível restringir artificialmente os movimentos dos átomos na região da parede.

A condição periódica mais simples é o vácuo, onde o sistema não é delimitado por paredes. O vácuo corresponde a uma fase gasosa, com pressão nula. As propriedades dos átomos mais externos da molécula são distorcidas, normalmente, para minimizar a área superficial.

Nas demais condições periódicas, o sistema é posto numa célula que funciona como unidade de repetição, a ser replicada indefinidamente em todas as direções. Para manter  $N$  constante assume-se que quando a partícula chega ao limite da caixa ela passa para a caixa ao lado, na mesma direção e velocidade com que se movia. Ao mesmo tempo, outra partícula idêntica entra na caixa em questão pela face oposta (Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Eliminação do efeito do sistema finito, replicação da imagem para cima e para baixo do plano da folha (conforme as setas à direita, fora da caixa) elimina completamente o contato de uma partícula com a parede da caixa central (sombreada). As setas dentro da caixa indicam o deslocamento de uma partícula da caixa central para a da direita, e ao mesmo tempo de uma partícula da esquerda para a central.

### 3.8. CONSTRAINTS E RESTRAINTS

Para simulações de DM, a evolução temporal do sistema deve considerar movimentos de estiramento das ligações interatômicas, além dos movimentos angulares e de torções (diedros). Os valores das frequências de estiramento são consideravelmente maiores que das demais, e se puderem ser “subtraídos” do cálculo das interações, o passo de integração pode ser aumentado; isso representa uma redução considerável no custo computacional. Neste trabalho está sendo aplicado *Constraint* apenas em ligações intramoleculares.

Ao “congelar” os comprimentos de ligação, torna-se possível desconsiderar as frequências de estiramento. Isso é feito incorporando *forças de constraint* ao integrador por meio de um *algoritmo de constraint*.<sup>[64],[69],[75]</sup> A cada passo de integração as coordenadas são resetadas para satisfazerem as distâncias de ligação desejadas.

A equação do movimento para o átomo  $i$  de uma molécula é:

$$m_i \frac{d^2}{dt^2} \vec{r}_i = \vec{F}_i + \vec{g}_i \quad (36)$$

Onde  $\vec{F}_i$  são as forças resultantes das interações inter e intramoleculares e  $\vec{g}_i$  representa as forças de constraint aplicadas para manter o comprimento de ligação constante. Conforme a função:

$$\delta_{ij} = r_{ij}^2 - d_{ref}^2 = 0 \quad (37)$$

Onde  $d_{ref}$  é o comprimento de ligação entre os átomos  $i$  e  $j$ ; e  $r_{ij} = |\vec{r}_i - \vec{r}_j|$  a distância entre esses átomos a ser satisfeita a cada passo de integração. As forças de constraint podem ser escritas como:

$$\vec{g}_a = \frac{1}{2} \lambda_{ij} \nabla_{\vec{r}_a} \delta_{ij} + \frac{1}{2} \lambda_{jk} \nabla_{\vec{r}_a} \delta_{jk} + \dots \quad (38)$$

Aqui,  $\vec{g}_a$  representa a força de constraint que atua sobre o átomo  $a$ , de uma molécula específica;  $ij; jk; \dots$  são pares de átomos desta molécula ligados diretamente, cujas distâncias

devem ser fixadas.  $\lambda_{ij}$  e  $\lambda_{jk}$  são multiplicadores de Lagrange não-determinados e os fatores  $\frac{1}{2}$  foram introduzidos para que essas equações sejam consistentes com as próximas.

Para assegurar que os constraints sejam satisfeitos a cada passo de integração, será usada uma aproximação para corrigir as forças de constraint com o mesmo grau de precisão do algoritmo integrador:<sup>[76]</sup>

$$m_a \frac{d^2 \overline{r}_a}{dt^2} = \overline{F}_a + \overline{g}_a \cong \overline{F}_a + \overline{g}_a^{(r)} \quad (39)$$

Onde  $\overline{g}_a^{(r)}$  é uma aproximação da força real de constraint. Inserindo-se a força de constraint ao algoritmo Verlet, teremos:

$$\overline{r}_a(t_n + \Delta t) = \overline{r}_a^{\sim}(t_n + \Delta t) + \frac{\Delta t^2}{m_a} \overline{g}_a^{(r)}(t_n) \quad (40)$$

Onde  $\overline{r}_a^{\sim}(t_n + \Delta t)$  é a posição calculada sem constraint que deve ser corrigida. Considerando uma molécula triatômica, com o átomo  $j$  ligado a  $i$  e  $k$ , as forças aplicadas a cada um deles serão:

$$\begin{aligned} \overline{g}_i^{(r)} &= \lambda_{ij} \overline{r}_{ij} \\ \overline{g}_j^{(r)} &= \lambda_{jk} \overline{r}_{jk} - \lambda_{ij} \overline{r}_{ij} \\ \overline{g}_k^{(r)} &= -\lambda_{jk} \overline{r}_{jk} \end{aligned} \quad (41)$$

Reescrevendo para o algoritmo de Verlet:

$$\begin{aligned} \overline{r}_{ij}(t_n + \Delta t) &= \overline{r}_{ij}^{\sim}(t_n + \Delta t) + \Delta t^2 \left( \frac{1}{m_i} + \frac{1}{m_j} \right) \lambda_{ij} \overline{r}_{ij}^{\sim}(t_n) - \frac{\Delta t^2}{m_j} \lambda_{jk} \overline{r}_{jk}^{\sim}(t_n) \\ \overline{r}_{jk}(t_n + \Delta t) &= \overline{r}_{jk}^{\sim}(t_n + \Delta t) + \Delta t^2 \left( \frac{1}{m_j} + \frac{1}{m_k} \right) \lambda_{jk} \overline{r}_{jk}^{\sim}(t_n) - \frac{\Delta t^2}{m_j} \lambda_{ij} \overline{r}_{ij}^{\sim}(t_n) \end{aligned} \quad (42)$$



Fazendo o módulo quadrático da equação acima:

$$\left| \vec{r}_{ij}(t_n + \Delta t) \right|^2 = \left| \vec{r}_{ij}(t_n) \right|^2 = d_{ref}^2 \quad (43)$$

Para um sistema poliatômico com  $n_c$  constraints, a solução dessas equações requer a inversão de uma matriz  $n_c \times n_c$ , a cada passo de integração. Outra possibilidade é percorrer a lista de constraints, satisfazendo-os um a um com certa tolerância. Este é o processo empregado pelo SHAKE<sup>[76]</sup>, o algoritmo mais usado em simulações de moléculas grandes.

O SHAKE pode ser implementado facilmente ao algoritmo de Verlet e outros de ordem maior. Para o Velocity Verlet, foi desenvolvido o RATTLE<sup>[77]</sup>, que corrige as coordenadas  $\vec{r}_a(t_n + \Delta t)$  e velocidades  $\vec{v}_a\left(t_n + \frac{\Delta t}{2}\right)$  calculadas pelo algoritmo original (equações 13 e 14), calculadas sem constraint, para valores  $(\vec{r}_a(t_n + \Delta t) \text{ e } \vec{v}_a\left(t_n + \frac{\Delta t}{2}\right))$  que satisfaçam os comprimentos de ligação desejados:

$$\vec{r}_a(t_n + \Delta t) = \vec{r}_a(t_n + \Delta t) + \frac{1}{2} \frac{\Delta t^2}{m_a} \vec{g}_a^{(r)}(t_n) \quad (44)$$

$$\vec{v}_a\left(t_n + \frac{\Delta t}{2}\right) = \vec{v}_a\left(t_n + \frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{1}{2} \frac{\Delta t^2}{m_a} \vec{g}_a^{(r)}(t_n) \quad (45)$$

Para fazer a restrição do ângulo entre as ligações  $i-j$  e  $j-k$ , é definida uma terceira ligação  $i-k$ , que será fixada como as demais. Para o caso específico de moléculas de água, que representam cerca de 80% do sistema simulado, foi desenvolvido o SETTLE (uma solução analítica do SHAKE). Neste, o comprimento das ligações O-H é fixado e o ângulo H-O-H é definido como uma ligação H-H, também fixada. Assim são tratadas as águas rígidas nos modelos TIP3P e TIP4P, ao invés de 2 ligações O-H e 1 ângulo. No primeiro modelo a molécula de água é definida por 3 cargas pontuais e no segundo, por 4 cargas pontuais sendo a última de um átomo fictício, que não precisa ser fixado.

Ângulos e diedros também podem ser restringidos, mas acarretam mudanças significativas na estrutura e na dinâmica do sistema. Além disso, esses movimentos têm frequência mais baixa que os estiramentos, e não é produtivo trabalhar com eles fixos.

Assim como os constraints, os restraints fixam as ligações e ângulos da molécula em torno de um comprimento de equilíbrio, e podem ser aplicados também a posições e diedros (torções).<sup>[64],[75]</sup> No caso dos constraints, ligações e ângulos congelados são mantidos reescalando as coordenadas dos átomos a cada passo de integração, para satisfazer valores determinados. Os restraints são restrições energéticas.

Quando as posições assumidas pelos átomos não satisfazem as condições estipuladas, ocorre um aumento significativo de energia; fazendo com que o sistema mantenha essas configurações. O potencial de restraint pode ser comparado ao do Oscilador Harmônico, e o poço do potencial corresponde aos valores determinados de posições, distâncias, ângulos e diedros.

A energia do restraint de posição (1 átomo) pode ser calculada por:

$$E = \frac{K_f}{2} \left( \overline{r}_i - \overline{r}_{ref} \right)^2 \quad (46)$$

Para distância (2 átomos), por:

$$E = \frac{K_f}{2} \left( \overline{r}_{ij} - \overline{d}_{ref} \right)^2 \quad (47)$$

Para ângulo (3 átomos), por:

$$E = \frac{K_f}{2} \left( \overline{\theta}_i - \overline{\theta}_{ref} \right)^2 \quad (48)$$

E, para diedro (4 átomos), por:

$$E = \frac{E_0}{2} \left\{ 1 - \cos \left( \overline{\chi}_i - \overline{\chi}_{ref} \right) \right\} \quad (49)$$

Sendo  $k_f$  uma constante de força;  $\overline{r}_{ref}$  a posição de referência;  $\overline{d}_{ref}$  a distância de referência;  $\overline{\theta}_{ref}$  o ângulo de referência;  $E_0$  uma barreira energética; e  $\overline{\chi}_{ref}$  o diedro de referência.

Os restraints podem ser fixos ou forçados, sendo o cálculo das energias praticamente o mesmo. No restraint forçado o valor de referência tem adição de um parâmetro  $\lambda$  ajustável,

para regular o acoplamento entre dois valores específicos. Esses novos valores podem ser expressos por:

$$\overline{r}_{ref} = \lambda \overline{r}_1 + (1 - \lambda) \overline{r}_0 \quad (50)$$

$$d_{ref} = \lambda d_1 + (1 - \lambda) d_0 \quad (51)$$

$$\theta_{ref} = \lambda \theta_1 + (1 - \lambda) \theta_0 \quad (52)$$

$$\chi_{ref} = \lambda \chi_1 + (1 - \lambda) \chi_0 \quad (53)$$

### 3.9. TRATAMENTO DAS INTERAÇÕES ELETROSTÁTICAS – PME

O custo computacional para calcular todas as interações eletrostáticas de um sistema de  $N$  partículas, pelo potencial de Coulomb, é proporcional a  $N^2$ . Foram desenvolvidos métodos alternativos, a fim de reduzir o custo computacional dessas interações.<sup>[51],[69]</sup>

Utilizando-se o potencial de Coulomb simples, é possível aplicar um Raio de Corte  $R_c$  que trunca as interações na distância  $r=R_c$  e as considera nulas para  $r>R_c$ . Isso aumenta a energia cinética dos átomos artificialmente e, como consequência, a temperatura do sistema, acarretando erros na simulação de DM. Uma forma de reduzir esse erro é multiplicar as interações não ligadas do potencial por uma função *switch*.

Outro método que também trabalha com o potencial de Coulomb é o *Twin Range*, que usa 2 raios de corte ( $R_1$  e  $R_2$ ). Até o primeiro corte ( $r \leq R_1$ ) as interações eletrostáticas são computadas passo a passo. Entre o primeiro e o segundo ( $R_1 < r \leq R_2$ ) estas forças são estimadas em intervalos que podem ir de 10 a 100 passos de integração. Para distâncias  $r > R_2$  as interações são consideradas nulas.

Para sistemas periódicos existem métodos baseados em *Somas de Ewald*, que calcula as interações de uma carga com todas as suas imagens periódicas. A distribuição de cargas no sistema  $\rho_i(r)$  é um conjunto infinito de cargas pontuais, matematicamente representadas por funções  $\delta$ :

$$\rho_i(\vec{r}) = q_i \delta(\vec{r} - \vec{r}_i) \quad (54)$$

Cada carga puntual  $q_i$  é envolvida por uma distribuição de cargas Gaussiana, com mesma magnitude e sinal contrário:

$$\rho_i^G(\vec{r}) = -q_i \left( \frac{\alpha}{\sqrt{\pi}} \right)^3 \exp\left(-\alpha \left| \vec{r} - \vec{r}_i \right|^2\right) \quad (55)$$

Esta distribuição cobre a interação entre as cargas pontuais. As forças calculadas usando a distribuição de cargas blindada  $\rho_i^S(\vec{r}) = \rho_i(\vec{r}) + \rho_i^G(\vec{r})$  tem menor alcance, devido à função erro complementar  $erfc(\alpha|r_{ij}+n|)$ , que pode ser definida como:

$$erfc(x) = 2\pi^{-1/2} \int_x^{\infty} \exp(-y^2) dy \quad (56)$$

Assim, a energia para a distribuição de cargas blindada  $E^S$  é:

$$E^S = (4\pi\epsilon_0)^{-1} \frac{1}{2} \sum_{n=0}^{\infty} \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \frac{q_i q_j}{(r_{ij} + n)} erfc(\alpha |r_{ij} + n|) \quad (57)$$

Uma distribuição de carga puramente Gaussiana de sinal contrário  $-\rho_i^G(r)$  deve ser acrescentada à  $\rho_i^S(r)$ , para contrabalançar a carga inserida pela primeira distribuição. Assim, a carga final do sistema continua sendo igual à soma das cargas puntuais.

A energia dessas distribuições Gaussianas é expressa por uma soma no espaço recíproco, subtraindo-se o próprio termo:

$$E^G = (4\pi\epsilon_0)^{-1} 2\pi L^3 \sum_{k \neq 0} k^{-2} \exp\left(-\frac{k^2}{4\alpha^2}\right) \left| \sum_{j=1}^N q_j \exp(-i\vec{k} \cdot \vec{r}_j) \right|^2 - (4\pi\epsilon_0)^{-1} \pi^{-1/2} \alpha \sum_{j=1}^N q_j^2 \quad (58)$$

onde  $k=2\pi L^{-1}$  e  $L$  é a dimensão da caixa nas direções  $x$ ,  $y$  e  $z$ ,  $L(l_x, l_y, l_z)$ . Devido à presença do fator exponencial, esta soma infinita converge para 1 (resultado finito). O parâmetro  $\alpha$  pode ser ajustado para otimizar as propriedades de convergência das 2 somas, que contribuem para a energia eletrostática final:

$$E = E^S + E^G \quad (59)$$

Embora a Soma de Ewald seja bastante usada para simulação de sistemas periódicos pequenos, o custo computacional a torna proibitiva para sistemas grandes de macromoléculas ( $N > 10^4$ ). Técnicas alternativas para calcular as forças eletrostáticas de longo alcance incluem a expansão do potencial de Ewald em polinômios cúbicos, além do uso de potenciais de Wigner, múltiplos passos de integração, particle-mesh, e expansões em séries de Taylor e/ou multipolos.

O método PME<sup>[78]</sup> (*Particle Mesh Ewald*), incorporado pelo NAMD, requer a escolha do valor de  $\alpha$  suficientemente grande para que os pares de átomos nas distâncias  $r_{ij} > r_c$  sejam desconsiderados na soma do espaço direto ( $E^S$ ), o que reduz este termo à ordem  $N$ .

A soma no espaço recíproco ( $E^G$ ) é aproximada por uma interpolação multidimensional baseada no método Particle Mesh<sup>[63]</sup>. As aproximações das forças e energias do espaço recíproco são expressas como convoluções, e podem ser calculadas rapidamente usando FFT (*Fast Fourier Transforms*). O algoritmo resultante, de ordem  $N \log N$ , é preciso e eficiente para sistemas macromoleculares.

A aplicação de PME modifica a função do raio de corte sobre o potencial eletrostático sem interferir no cálculo das interações de VdW. As forças eletrostáticas são computadas a cada passo de integração para distâncias  $r \leq R_c$ . Para  $r > R_c$ , as mesmas são computadas a cada 4 passos.

### 3.10. MÚLTIPLOS PASSOS DE INTEGRAÇÃO

Com o objetivo de reduzir o custo computacional foram desenvolvidos algoritmos que trabalham com múltiplos passos de integração (*MTS – Multiple Time Step*)<sup>[51]</sup>. O passo de integração depende do tempo de oscilação ou relaxação das forças, sendo que em sistemas moleculares podem-se identificar 3 frequências diferentes: forças de estiramento de alta frequência,  $F^{hf}$ , que têm tempos de relaxação da ordem de 10 fs; forças de Coulomb de longo alcance,  $F^{lf}$ , com frequência bem inferior, da ordem de 1000 fs; forças remanescentes de frequência intermediária,  $F^{if}$ , como as vibrações angulares e de diedros e forças de VdW e Coulomb de curto alcance, com frequências da ordem de 40 fs.

Essas contribuições podem ser estimadas em intervalos de tempo (passos de integração) diferentes. Dessa forma, as forças  $F^{hf}$  serão calculadas a cada  $(m+n\Delta t)$ , com  $n=0,1,2,\dots$  e  $(\Delta t=m\Delta t')$ . Quando  $n$  for múltiplo de  $m$ ,  $F^{lf}$  e  $F^{if}$  serão computadas e multiplicadas por  $m$ , para compensar os intervalos nos quais são omitidas. Esse tipo de algoritmo representa uma economia tão eficiente quanto o SHAKE, mas sem acarretar erros.

### 3.11. RAIIO DE CORTE

Uma partícula  $i$  interage com todas as demais na caixa central, bem como com as introduzidas através de condições periódicas. Para um par de partículas essas interações, tanto eletrostáticas como de VdW, diminuem à medida que a separação aumenta. Com base nisso, é aplicado às interações não-ligadas do sistema um *raio de corte*<sup>[51],[64]</sup> ( $R_c$ ).

Define-se uma distância  $R_c$  a partir da qual as interações são consideradas nulas. Ou seja, só serão consideradas no cálculo das forças as partículas que estiverem afastadas até um comprimento  $R_c$ . Na distância equivalente ao  $R_c$ , as interações eletrostáticas e de VdW são abruptamente truncadas, prejudicando a conservação de energia.

A aplicação de PME modifica a função do raio de corte sobre o potencial eletrostático sem interferir no cálculo das interações de VdW. Isso faz com que as forças eletrostáticas sejam computadas a cada passo para partículas distantes até o raio de corte. Para distâncias maiores, somente para alguns passos.

Pode-se determinar um raio de corte interno, pois as forças dos átomos de uma mesma molécula podem ser desconsideradas. As contribuições para a energia cinética são computadas partir dos graus de liberdade moleculares.



### 3.12. FUNÇÃO SWITCH

Uma alternativa para reduzir o erro decorrente do raio de corte é multiplicar as interações não-ligadas do potencial por uma função *Switch*<sup>[51]</sup>,  $S(r)$ , que suaviza as interações no intervalo  $(R_{sw}, R_c)$ . No caso do potencial de LJ, esta amortece as energias a partir de um ponto  $R_{sw}$  pré-determinado, até o zero na distância  $r=R_c$ .

As interações eletrostáticas não-ligadas são calculadas normalmente e em seguida a magnitude da energia no ponto  $r=R_c$  é subtraída de todo o potencial, zerando as interações em  $R_c$ . Cabe lembrar, no entanto, que o uso do PME modifica a função do raio de corte.

Esta função pode ser escrita como:

$$S(r) = \begin{cases} 1; & r < R_{sw} \\ (R_c - r)^2 \frac{(R_c + 2r - 3R_{sw})}{(R_c - R_{sw})^3}; & R_{sw} < r < R_c \\ 0; & r > R_{sw} \end{cases} \quad (60)$$

Com:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dr} S(R_{sw}) &= 0 \\ \frac{d}{dr} S(R_c) &= 0 \\ S(R_c) &= 0 \end{aligned} \quad (61)$$

### 3.13. LISTA DE VIZINHOS

A maior parte do tempo computacional numa simulação de DM é gasto para calcular interações não-ligadas. Ou seja, identificar o átomo vizinho mais próximo, e assim por diante, para calcular as interações de VdW e eletrostáticas de cada par. Para agilizar esse processo de busca foram desenvolvidos alguns métodos, como busca por grid e lista de vizinhos.<sup>[51]</sup>

Na busca por grid a caixa é dividida em subcélulas e são determinados quais os átomos presentes em cada uma. Este processo tem custo proporcional a  $N$ . Os vizinhos mais próximos são facilmente encontrados nas subcaixas que envolvem a central.

No outro método os vizinhos mais próximos são identificados, seja pelo escaneamento de todos os pares possíveis (ordem  $N^2$ ) ou pelo uso de técnicas de busca como grid (ordem  $N$ ). Feito isso, os pares serão disponibilizados numa lista de vizinhos que será atualizada apenas em alguns passos de integração; o novo intervalo fica entre 5 e 100 passos. A cada passo, a lista é utilizada para o cálculo das interações.

Com o uso do raio de corte, só serão computados os átomos que estiverem numa distância  $r \leq R_c$ . Em função da evolução temporal do sistema, alguns átomos saem desse raio de corte e são desconsiderados, enquanto outros entram. Se a lista relacionar apenas os vizinhos mais próximos no momento de sua atualização, essas trocas causarão erros no cálculo das energias.

No momento da criação da lista, pode-se determinar uma margem além do raio de corte.<sup>[64]</sup> Assim, os átomos que estejam numa faixa de transição e que possam entrar no  $R_c$  antes da próxima atualização constarão na lista.

**Tabela 1. Parâmetros de DM aplicados a todas as simulações.**

---

Campo de Força	CHARMM27
Modelo para Água	TIP3P
Integrador	Velocity Verlet
Ensemble	NPT
Temperatura	310 K
Termostato	Dinâmica de Langevin
Pressão	1 atm
Barostato	Nosé-Hoover Langevin Piston
Interações Eletrostáticas	PME
Constraint	SETTLE

---

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

Por se tratar da simulação de sistemas biológicos, este capítulo foi dividido em duas partes: a primeira contém informações sobre proteínas e lipídios; a segunda descreve os sistemas e a forma como foram construídos. Os programas utilizados foram VMD1.8.2<sup>[79]</sup> para construção e NAMD2<sup>[52]</sup> para simulação, ambos em sistema operacional LINUX. Os cálculos foram desenvolvidos em um cluster com 15 nodos, cada um com processador ATHLON 1.4 GHz e 512 MB RAM.

Para a moricina (Figura 4.1.), os fosfolipídios e os íons, os parâmetros usados foram do campo de força CHARMM27<sup>[54]-[59]</sup>; o campo de força utilizado para água foi o TIP3P<sup>[65]</sup>. A topologia para Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Glicerol (POPG) foi adaptada a partir das topologias do Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Etanolamina (POPE) e do glicerol, disponíveis no Campo de Força CHARMM27<sup>[54]-[59]</sup>.

Para o peptídeo, o arquivo de coordenadas (PDB) foi obtido do *Protein Data Bank* sob o código 1kv4.<sup>[80]</sup> São disponibilizadas 20 estruturas equivalentes com pequenas variações nas coordenadas dos átomos, determinadas por RMN.<sup>[14]</sup> Qualquer uma dessas estruturas pode ser tomada como ponto de partida para a DM, sem acarretar prejuízos ou divergência nos resultados. Neste estudo optamos pela estrutura 1. O arquivo de estrutura (*Protein Structure File*, PSF) foi gerado com o pacote *psfgen*, executado dentro do VMD1.8.2.

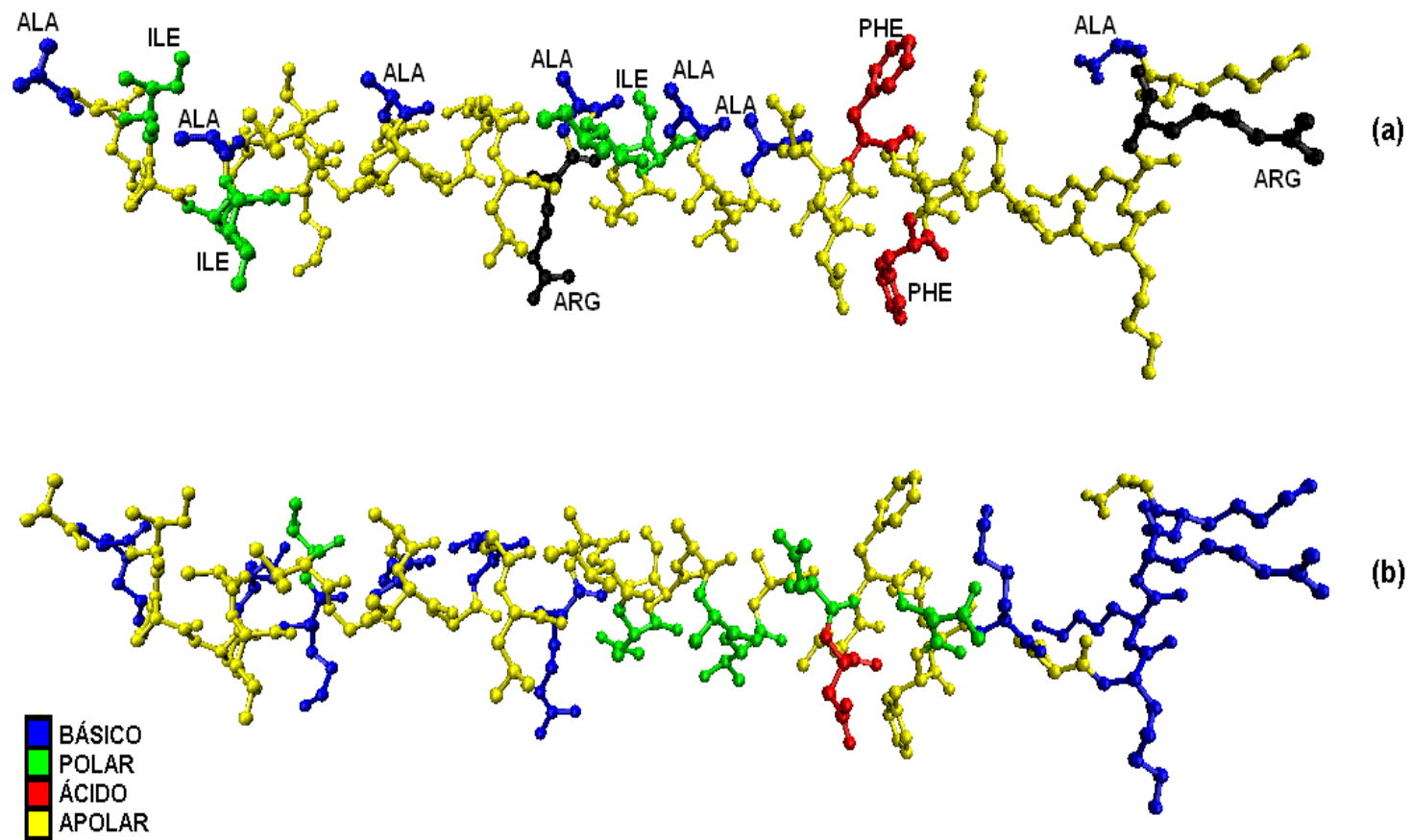
A moricina possui 682 átomos, distribuídos em 42 resíduos. Sua estrutura primária é:

**ALA<sub>1</sub>-LYS<sub>2</sub>-ILE<sub>3</sub>-PRO<sub>4</sub>-ILE<sub>5</sub>-LYS<sub>6</sub>-ALA<sub>7</sub>-ILE<sub>8</sub>-LYS<sub>9</sub>-THR<sub>10</sub>-VAL<sub>11</sub>-GLY<sub>12</sub>\* -  
LYS<sub>13</sub>-ALA<sub>14</sub>-VAL<sub>15</sub>-GLY<sub>16</sub>\*-LYS<sub>17</sub>-GLY<sub>18</sub>\*-LEU<sub>19</sub>-ARG<sub>20</sub>-ALA<sub>21</sub>-ILE<sub>22</sub>-ASN<sub>23</sub>-ILE<sub>24</sub>-  
ALA<sub>25</sub>-SER<sub>26</sub>-THR<sub>27</sub>-ALA<sub>28</sub>-ASN<sub>29</sub>-ASP<sub>30</sub>-VAL<sub>31</sub>-PHE<sub>32</sub>-ASN<sub>33</sub>-PHE<sub>34</sub>-LEU<sub>35</sub>-LYS<sub>36</sub>-  
PRO<sub>37</sub>-LYS<sub>38</sub>-LYS<sub>39</sub>-ARG<sub>40</sub>-LYS<sub>41</sub>-ALA<sub>42</sub>**

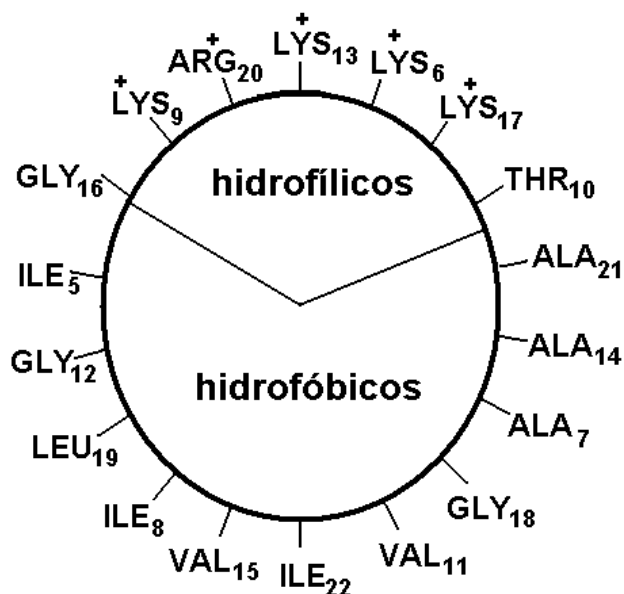
Destes resíduos, 24 são não-polares; 6 são polares; 11 são básicos e 1 é ácido (ASP). A moricina é um peptídeo catiônico com carga resultante (+10). Por ser pequeno, vamos nos ater à sua estrutura secundária, majoritariamente  $\alpha$ -hélice. A orientação dos resíduos na  $\alpha$ -hélice pode ser visualizada na Figura 4.2., que mostra a análise de *Helical Wheel*<sup>[81]</sup> da Moricina.

---

\* O R da GLY é um átomo de H, o aminoácido pode ser classificado como polar.



**Figura 4.1.** Estrutura da Moricina: (a) alguns resíduos identificados; (b) resíduos coloridos conforme tipo.



**Figura 4.2.** *Helical Wheel* dos resíduos da Moricina.

No começo deste trabalho fizemos tentativas para aplicar área e tensão superficial constantes. Como as bicamadas simuladas reproduzem a membrana celular da bactéria *E. Coli*, foram construídas com POPE e POPG, numa proporção 3:1. Foram 3 etapas de cálculos, variando os ensembles de NpT para NpAT e para NpγT, respectivamente. No primeiro momento os sistemas foram simulados sob 1 atm de pressão isotrópica, com  $p_x = p_y = p_z$ , e o tempo médio de cálculo foi de 45 ns. Após essa etapa, o sistema foi simulado com área constante no plano xy, com tempos de cálculo em torno de 15 ns. Ponderamos a área por lipídio conforme a composição da membrana, usando valores experimentais para POPE ( $A_{\text{POPE}}$ ) e POPG ( $A_{\text{POPG}}$ ).<sup>[10],[11],[37],[82]</sup>

$$A_{\text{média}} = 0,25 \times A_{\text{POPG}} + 0,75 \times A_{\text{POPE}}$$

Esta área média foi multiplicada pelo número de lipídios contidos em uma lâmina da bicamada, extraindo a raiz quadrada deste resultado obtivemos as dimensões x e y da “caixa”, que foram fixadas. Depois disso o sistema passou a ser simulado com tensão superficial constante, em NpγT. Nesse caso optamos pelo valor experimental de  $\gamma$  referente ao POPE, de 44 dyn/cm<sup>[82]</sup>, por ser este o componente majoritário das bicamadas. Os cálculos no ensemble NpγT tiveram duração média de 40 ns.

Os tempos de cálculo ficaram em torno de 100 ns no total e os sistemas não permaneceram estáveis. Como não obtivemos bons resultados com esse procedimento, os cálculos foram refeitos no ensemble NpT.

#### 4.1. MORICINA (MRI)

Este primeiro sistema é o mais simples, onde a estrutura 1 do 1kv4<sup>[80]</sup> é simulada em condições de vácuo, com temperatura de 310 K. O sistema é composto apenas por uma molécula de moricina com 682 átomos e massa total 4487.55 u.m.a., correspondendo a 2046 graus de liberdade. Na ausência de contra-íons o sistema não é neutralizado e tem carga resultante de +10  $e$ .

O passo de integração aplicado foi de 1 fs e o tempo total da simulação foi de 1,2 ns, sem aplicação de *constraint* ou *restraint*, sendo 200 ps de equilibrção e 1 ns de aquisição dos dados para análise com o sistema equilibrado. Na Tabela 4.1. são apresentados os parâmetros usados nesta simulação.

**Tabela 4.1. Parâmetros da Simulação e Composição do Sistema MRI (Moricina no vácuo).**

Passo de Integração (ts)	1 fs
Custo Computacional	0,265 dias / ns
Equilibrção	0,2 ns
Aquisição	1 ns
Simulação	1,2 ns
Passo Interações Eletrostáticas $r > R_c$	4 ts $\rightarrow$ 4 fs
Distância Switch	1 nm
Raio de Corte	1,2 nm
Distância da Lista de Vizinhos	1,4 nm
Ciclo da Lista de Vizinhos	10 ts $\rightarrow$ 10 fs
Átomos	682
Graus de Liberdade	2046
Moricinas	1
Carga Resultante	+10 $e$

## 4.2. MORICINA + ÁGUA (WMRI)

Este sistema também partiu da estrutura 1 de 1kv4. No VMD, a moricina foi solvatada por uma caixa de água pré-equilibrada contendo 3654 moléculas de água. A concentração fisiológica do cloreto no líquido intersticial é 0,114 mol/l,<sup>[83]</sup> o que neste sistema corresponderia a 7,5 cloretos. Este número é insuficiente para neutralizar a carga do peptídeo, por isso a adição de 10 ânions cloreto, resultando numa concentração superior. Assim, o sistema somou um total de 11654 átomos, com 34962 graus de liberdade, carga final nula e massa total 70670 u.m.a.

As dimensões iniciais da caixa foram 90Å x 40Å x 40Å. A pressão aplicada foi de 1 atm, controlada com o barostato *Nosé-Hoover Langevin Piston*. As moléculas de água não foram fixadas com *constraints* (sistema simulado sem utilização de SETTLE).

Quando se aplica minimização, as coordenadas dos átomos são ajustadas em busca da configuração de menor energia (mínimo do potencial), sem resolver as equações de movimento. O sistema foi minimizado durante 500 passos de integração e depois foi aquecido de 0 K a 310 K, em um intervalo de 11000 passos de integração – equivalente a 11 ps – e esta temperatura foi mantida constante com *Nosé-Hoover Langevin Piston*. O tempo total de simulação foi de 1,4 ns, sendo 200 ps para equilíbrio e 1,2 ns para aquisição. As análises foram feitas utilizando apenas o último nanosegundo. O passo de integração aplicado foi de 1 fs e foram utilizadas condições periódicas de contorno. Detalhes desta simulação são apresentados na Tabela 4.2.



**Tabela 4.2.** Parâmetros da Simulação e Composição do Sistema WMRI (Moricina em água).

---

Passo de Integração (ts)	1 fs
Custo Computacional	1,389 dias/ns
Minimização	500 ts
Aquecimento	11 ps
Equilibração	0,2 ns
Aquisição	1,2 ns
Simulação	1,4 ns
Passo Interações Eletrostáticas $r > R_c$	4 ts $\rightarrow$ 4 fs
Distância Switch	1 nm
Raio de Corte	1,2 nm
Distância da Lista de Vizinhos	1,4 nm
Ciclo da Lista de Vizinhos	10 ts $\rightarrow$ 10 fs
Átomos	11654
Graus de Liberdade	34962
Moricinas	1
Águas	3654
Íons Cloreto	10
Carga Resultante	0 $e$

---

### 4.3. MEMBRANA (MEM)

Este é o primeiro sistema que contém fosfolipídios, mas não possui proteína. Com o objetivo de simular uma membrana bacteriana, foi construída uma bicamada lipídica tendo por modelo a bactéria *Escherichia Coli*. Assim, 75% da membrana a ser simulada é composta por POPE (zwitteriônico) e 25% por POPG (aniônico). Durante a construção do sistema no VMD é gerada uma lâmina contendo 16 POPG e 48 POPE, a qual é duplicada, sendo que uma lâmina é girada em 180° no eixo y. As lâminas são sobrepostas de forma que as cabeças polares fiquem orientadas para fora e as caudas apolares sejam direcionadas para o interior da bicamada.

A membrana gerada é aniônica e contém 128 lipídios, são 96 POPE e 32 POPG. A carga resultante é -32 *e*, relativa aos POPG. Essa bicamada é solvatada com água acima e abaixo da membrana, no eixo z, e caso existam moléculas de água dentro da membrana essas são removidas. As concentrações fisiológicas dos íons sódio e cloreto são 0,147 mol/l e 0,114 mol/l, respectivamente.<sup>[83]</sup> Foram utilizados 8 cloretos e 40 sódios, sendo a concentração do ânion 0,092 mol/l e do cátion 0,46 mol/l. A concentração do cloreto ficou próxima da fisiológica e sendo a concentração fisiológica do sódio insuficiente para neutralizar o sistema, foi utilizada uma concentração superior para que a carga final do sistema fosse de 0 *e*. As 4843 moléculas de água foram fixadas com SETTLE. O sistema contém 30609 átomos com massa total 181318 u.m.a. e 67666 graus de liberdade. As dimensões da caixa inicial foram 60Å x 60Å x 80Å.

Para simulação de membranas, a área por lipídio deve ser observada como critério de equilíbrio, e o tempo necessário para estabilizá-la é muito superior ao das médias termodinâmicas. Como se trata de uma membrana heterogênea, o valor para o qual a área deve convergir não está determinado. Quando as interações da membrana estiverem estáveis, pode-se esperar que a área por lipídio apresente convergência (independente do valor). Nesse caso, apenas o tempo de convergência é tomado como parâmetro de equilíbrio.

Inicialmente foi aplicada ao sistema uma minimização de 1000 passos e em seguida a membrana foi comprimida sob 50 atm de pressão, com passo de integração de 2 fs, durante 100 ps. O aquecimento do sistema de 0 K a 310 K se deu num intervalo de 3 ns, e a simulação do sistema utilizou *Nosé-Hoover Langevin Piston* para manter constantes a temperatura de 310 K e a pressão de 1 atm. Foram simulados 55 ns, sendo os primeiros 20 ns de equilíbrio e os últimos 35 ns de aquisição. Detalhes desta simulação são apresentados na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3.** Parâmetros da Simulação e Composição do Sistema MEM (Membrana em água).

---

Passo de Integração (ts)	2 fs
Custo Computacional	0,668 dias /ns
Minimização	1000 ts
Pressão	50 atm
Aquecimento	3 ps
Compressão	100 ps
Pressão	1 atm
Equilibração	20 ns
Aquisição	35 ns
Simulação	55 ns
Passo Interações Eléctrostáticas $r > R_c$	4 ts $\rightarrow$ 8 fs
Distância Switch	1 nm
Raio de Corte	1,2 nm
Distância da Lista de Vizinhos	1,4 nm
Ciclo da Lista de Vizinhos	10 ts $\rightarrow$ 20 fs
Átomos	30609
Graus de Liberdade	67666
Águas	4843
POPE	96
POPG	32
Água:POPE	50,448
Água:POPG	151,344
Água:Lipídio (total)	37,836
Íons Sódio	40
Íons Cloreto	8
Carga Resultante	0 $e$

---

#### 4.4. MEMBRANA + 1 MORICINA (MMRI)

Os sistemas contendo peptídeo no interior da membrana tornam-se mais complexos desde a preparação. Com a bicamada construída como no sistema MEM, são removidos alguns lipídios para gerar uma cavidade onde será inserido o peptídeo. Depois da inserção o sistema é solvatado e ionizado como no sistema MEM.

Na retirada de lipídios para gerar a lacuna perde-se a proporção 3:1 de POPE para POPG e a membrana resultante passa a ter 43 POPE e 17 POPG, ou seja, as lâminas não são mais idênticas. O sistema final possui 4815 moléculas de água fixadas com SETTLE e 7 íons sódio, a carga resultante é nula. No total são 22651 átomos, o sistema possui 67497 graus de liberdade com massa igual a 134983 u.m.a..

Inicialmente todos os átomos da moricina foram fixados com *restraints* enquanto os demais átomos do sistema se ajustaram ao peptídeo num intervalo de 1000 passos de minimização. Na segunda minimização de 1000 passos, foram mantidos os *restraints* apenas dos  $C_\alpha$  para preservar o esqueleto ou *backbone* da moricina.

O sistema foi aquecido de 0 K a 310 K num intervalo de 6 ps usando um passo de integração de 2 fs. Esta temperatura de 310 K e a pressão de 1 atm foram controladas com *Nosé-Hoover Langevin Piston*. Foram realizadas ainda duas pré-equilibrações para ajuste do volume da caixa. Na primeira pré-equilibração que teve duração de 10 ps os  $C_\alpha$  foram mantidos fixos e na segunda, que não teve aplicação de *restraint*, a duração foi de 20 ps.

Com a temperatura constante a 310 K a membrana foi comprimida durante 500 ps, sob 50 atm de pressão. A simulação foi iniciada a 1 atm, 310 K e passo de integração de 2 fs, sendo o tempo total de 75 ns. O tempo de equilíbrio foi de 40 ns e foram simulados mais 35 ns com o sistema equilibrado para aquisição. Detalhes desta simulação são apresentados na Tabela 4.4.

**Tabela 4.4.** Parâmetros da Simulação e Composição do Sistema MMRI (1 Moricina, Membrana).

---

Passo de Integração (ts)	2 fs
Custo Computacional	0,868 dias/ns
Minimização (restraint proteína)	1000 ts
Minimização (restraint $C_\alpha$ )	1000 ts
Aquecimento	6 ps
Pré-Equilíbrio ( $C_\alpha$ fixo)	10 ps
Pré-Equilíbrio (sem restraint)	20 ps
Compressão (50 atm)	500 ps
Pressão	1 atm
Equilíbrio	40 ns
Aquisição	35 ns
Simulação	75 ns
Passo Interações Eléctrostáticas $r > R_c$	4 ts $\rightarrow$ 8 fs
Distância Switch	1 nm
Raio de Corte	1,2 nm
Distância da Lista de Vizinhos	1,4 nm
Ciclo da Lista de Vizinhos	10 ts $\rightarrow$ 20 fs
Átomos	22651
Graus de Liberdade	67497
Águas	4815
Moricinas	1
POPE	43
POPG	17
Água:POPE	111,977
Água:POPG	283,235
Água:Lipídio (total)	80,25
Íons Sódio	7
Carga Resultante	0 $e$

---

#### 4.5. MEMBRANA + 6 MORICINAS (CANAL)

A moricina é um peptídeo carregado que contém resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos orientados em sentidos opostos, originando um anfífilo facial. A análise por *Helical Wheel*<sup>[81]</sup> da moricina dá uma visão “axial” do peptídeo e é apresentada na Figura 4.2.. Nela observa-se que a maioria dos aminoácidos polares ocupa 120°, sendo que os não-polares ocupam os 240° restantes. Para minimizar o contato desfavorável entre a porção polar da moricina e o interior hidrofóbico da bicamada lipídica o melhor ajuste foi obtido com um feixe de 6 peptídeos, o que foi determinante na escolha do hexâmero. Os resíduos hidrofílicos ficam voltados para o interior do canal e os hidrofóbicos para a parte externa deste.

A construção e simulação deste sistema se assemelham ao item anterior (MMRI) e assim como no sistema anterior a proporção 3:1 entre POPE e POPG foi alterada com a retirada de lipídios para inserção de 6 moricinas. A membrana é composta por 122 POPE e 40 POPG, foram adicionadas 17165 moléculas de água para solvatar a membrana, além de 49 íons sódio e 69 cloretos. A concentração do ânion é equivalente a 0,159 mol/l, aproximadamente a concentração fisiológica de 0,147 mol/l<sup>[83]</sup>. A concentração do cátion é 0,223 mol/l, superior a concentração fisiológica de 0,114 mol/l<sup>[83]</sup>, pois esta não seria suficiente neutralizar o sistema. A massa total é de 457142 u.m.a., são 75995 átomos e 162060 graus de liberdade. As dimensões da caixa inicial foram 90Å x 90Å x 90Å.

Antes da simulação o sistema passou por uma minimização de 1000 passos com todos os átomos das proteínas fixados por *restraints*, e uma segunda minimização onde apenas os  $C_{\alpha}$  foram mantidos fixos, também com duração de 1000 passos. O aquecimento do sistema de 0 K a 310 K se deu num intervalo de 6 ps, com um passo de integração de 2 fs. Esta temperatura de 310 K e a pressão de 1 atm foram controladas com *Nosé-Hoover Langevin Piston*.

Nessas condições o sistema foi pré-equilibrado durante 10 ps mantendo os  $C_{\alpha}$  fixos. Em seguida foram liberados os *restraints* dos  $C_{\alpha}$  e todos os átomos do sistema passaram por uma segunda pré-equilibração de 20 ps. O sistema foi então comprimido sob uma pressão de 50 atm durante 1 ns. O tempo total da simulação foi de 110 ns, sendo 80 ns para equilibração e 30 ns para aquisição. Na Tabela 4.5. são apresentados detalhes desta simulação.

**Tabela 4.5.** Parâmetros da Simulação e Composição do Sistema CANAL (6 Moricinas, Membrana).

---

Passo de Integração (ts)	2 fs
Custo Computacional	1,972 dias/ns
Minimização (restraint proteínas)	1000 ts
Minimização (restraint $C_\alpha$ )	1000 ts
Aquecimento	6 ps
Pré-Equilíbrio ( $C_\alpha$ fixo)	10 ps
Pré-Equilíbrio (sem restraint)	20 ps
Compressão (50 atm)	1 ns
Pressão	1 atm
Equilíbrio	80 ns
Aquisição	30 ns
Simulação	110 ns
Passo Interações Eléctrostáticas $r > R_c$	4 ts $\rightarrow$ 8 fs
Distância Switch	1 nm
Raio de Corte	1,2 nm
Distância da Lista de Vizinhos	1,4 nm
Ciclo da Lista de Vizinhos	10 ts $\rightarrow$ 20 fs
Átomos	75995
Graus de Liberdade	162060
Águas	17165
Moricinas	6
POPE	122
POPG	40
Água:POPE	140,697
Água:POPG	429,125
Água:Lipídio (total)	105,957
Íons Sódio	49
Íons Cloreto	69
Carga Resultante	0 $e$

---

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados e discutidos individualmente para cada sistema. Inicialmente, são descritas as análises aplicadas aos sistemas, bem como o tipo de resultado esperado de cada uma.

### a. ÁREA

Como já foi mencionado os lipídios têm uma área superficial fixa, determinada principalmente pela cabeça polar. Em simulações de membranas quando o sistema está equilibrado a área da bicamada tende a ficar constante, e por isso é considerada parâmetro de equilíbrio. Também foi citado o fato de a membrana estudada não ser homogênea e, nesse caso, ainda não há um valor experimentalmente determinado para cada lipídio. Assim, a evolução desta área ao longo da simulação é usada para conhecer o tempo necessário para a convergência, independente do valor da área.

Com base no processo de construção, uma bicamada com  $2n$  lipídios é composta de duas lâminas, cada uma com  $n$  moléculas. Se o número de lipídios retirados para inserção de peptídeos no interior da membrana for  $2k$ , cada camada permanece com  $(n-k)$  moléculas, e a membrana com  $2(n-k)$ . Por isso, a área estimada por fosfolipídio é a área total da membrana no plano  $xy$  da caixa dividida pelo número de lipídios de uma lâmina.

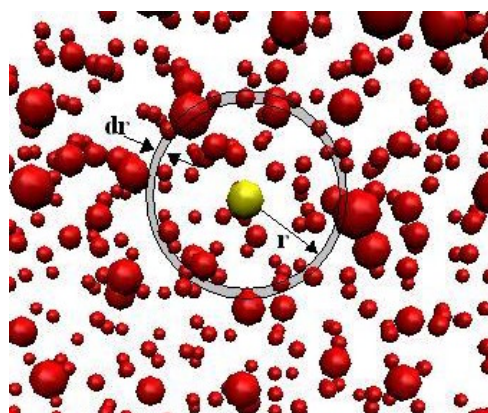


## b. FUNÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO RADIAL

Uma Função de Distribuição Radial<sup>[63]</sup> ( $g(r)$  ou  $FDR$ ) expressa a probabilidade de encontrar uma partícula  $j$ , a uma distância  $r$  da partícula  $i$ . Para um sistema no qual as partículas (átomos) apresentem uma distribuição completamente aleatória no ensemble NVT, mantendo a densidade  $\rho$  constante, a  $g(r)$  pode ser escrita como:

$$g(r) = \rho^{-2} \left\langle \sum_i \sum_{j \neq i} \delta(\vec{r}_i) \delta(\vec{r}_j - \vec{r}) \right\rangle = \frac{V}{N^2} \left\langle \sum_i \sum_{j \neq i} \delta(\vec{r} - \vec{r}_{ij}) \right\rangle \quad (62)$$

A FDR verifica, para cada distância  $r$ , as moléculas presentes numa casca esférica de espessura  $dr$  (Figura 5.1.). Quando as interações são truncadas no Raio de Corte ( $R_c$ ), a  $g(r)$  só deve ser considerada para distâncias  $r \leq R_c$ . Quando há uma regularidade na distribuição dos átomos, como na formação de camadas de solvatação, a FDR apresenta máximos e mínimos definidos, indicando as distâncias de maior e menor probabilidade de encontrar os átomos. Dessa forma pode ser usada para uma melhor compreensão da estruturação do sistema.



**Figura 5.1.** Definição do raio e do elemento de volume para RDF.

A integral de uma  $g(r)$ , por sua vez, dá o número de átomos encontrados até a distância  $r$  a partir do átomo de referência. Esta função pode ser escrita como:

$$G = 4\pi \int_{r_j=0}^{R_c} g(r) r^2 dr \quad (63)$$

Assim, é possível obter o número de átomos na primeira camada de solvatação, e, dependendo do grau de estruturação do sistema, da segunda. De qualquer modo, os dados da primeira camada são os mais relevantes. A partir desses é que se pode determinar o número de átomos coordenados ao átomo de referência, a distância e o número de átomos mais próximos. As FDRs foram calculadas com o software VMD.

### c. PERFIL DE DENSIDADE DE MASSA

Através de uma varredura ao longo do eixo  $z$  (Normal da membrana), é detectado o número de elétrons pertencentes a uma dada molécula. O mapeamento desses elétrons gera um Perfil de Densidade Eletrônica<sup>[84]</sup> (PDE). Outra alternativa é identificar a quantidade de massa dessas moléculas em cada ponto, cujo mapeamento gera um Perfil de Densidade de Massa (PDM). Ambas as análises fornecem as mesmas informações e por este trabalho tratar de simulações de Dinâmica Molecular, é mais coerente falar em PDM.

Qualquer um desses métodos pode ser usado na determinação da posição, com relação à Normal da membrana, das diversas moléculas que fazem parte do sistema. Dessa forma podemos determinar a região ocupada pelo solvente, a região ocupada pela membrana, a posição dos íons e a posição de cada resíduo da moricina no interior da membrana.

Com a sobreposição desses perfis pode-se observar, por exemplo, a interface entre a membrana e o solvente, bem como a altura da membrana e a posição de cada molécula do sistema em relação à bicamada. Também é possível localizar qualquer molécula no interior da bicamada, como os resíduos do peptídeo na região de maior fluidez ou na região das cabeças polares onde ocorre a ancoragem deste.

Para delimitar a interface água – membrana ( $IW$ ) é tomado o intervalo no qual a densidade da água varia entre 90% e 10% em relação à região ocupada pelo solvente. A distância de repetição ou altura da bicamada ( $d$ ) é a distância entre os pontos de intersecção dos PDMs da água e da membrana. Aproximadamente na metade deste comprimento fica a região de maior fluidez da bicamada, que apresenta a menor densidade do sistema. Os PDMs foram gerados usando programas próprios a partir da análise das trajetórias.

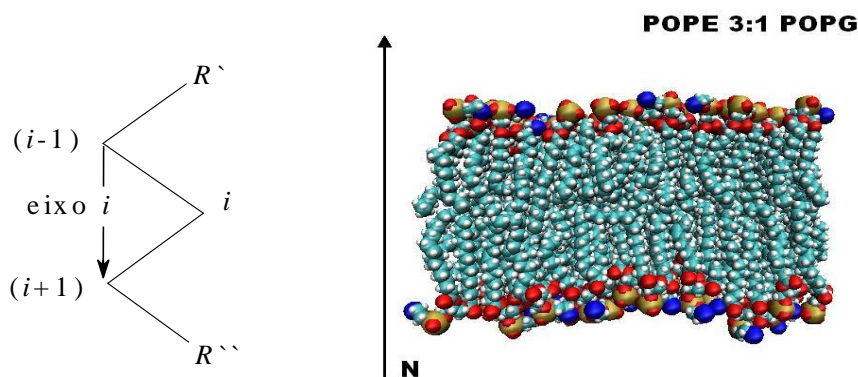
#### d. PARÂMETRO DE ORDEM

O Parâmetro de Ordem<sup>[49],[85]</sup> (O.P.) é um parâmetro normalizado que indica o grau de ordenamento do sistema. Quanto mais próximo de 0 (zero), menor o alinhamento das cadeias alifáticas. O valor para o estado ordenado absoluto é 1.<sup>[85]</sup> Neste trabalho o parâmetro é calculado para as cadeias hidrofóbicas dos fosfolipídios POPE e POPG, sem distinção. Essas cadeias são derivadas dos ácidos palmítico e oléico (Figuras 2.1. e 2.2.). A expressão usada para cálculo do Parâmetro de Ordem é dada pela equação (64):<sup>[11]</sup>

$$S_i = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \theta_i - 1 \rangle \quad (64)$$

Sendo  $\theta_i$  o ângulo entre o eixo molecular  $i$  e a Normal à bicamada. Os brackets denotam uma média de ensemble. O eixo molecular para a  $i$ -ésima unidade de  $\text{CH}_2$  é definido pelo vetor que une os carbonos  $(i-1)$  e  $(i+1)$ , conforme Figura 5.2.

Para calcular o valor médio do parâmetro de ordem de uma cadeia são considerados os carbonos, do 4º ao penúltimo.<sup>[10]</sup> O arquivo utilizado para calcular os parâmetros de ordem foi executado no software VMD.



**Figura 5.2.** Definição do eixo molecular  $i$  e da Normal da Membrana.

## e. ESTRUTURA SECUNDÁRIA

A Definição da Estrutura Secundária de uma Proteína (DESP ou *DSSP – Definition of secondary structure of proteins*) é baseada no dobramento da cadeia, conforme explicado no capítulo 2.<sup>[47]</sup> Com o *stride* (ferramenta do software VMD), pode-se ter acesso à estrutura assumida pela proteína de ponta a ponta da cadeia de aminoácidos, para cada passo do arquivo de trajetórias. Para um sistema equilibrado não deve haver mudanças significativas na estrutura.

A moricina é majoritariamente  $\alpha$ -hélice. Quando uma seqüência de aminoácidos não apresentar integridade de hélice, a ocorrência de *n-turns* será identificada pela cor verde. Quando formar uma  $\alpha$ -hélice (*3-turn*), será indicada pela cor púrpura. Se houver formação de  $\pi$ -hélice (*5-turn*), esta será indicada em vermelho. As “alças” (*coil*) que conectam duas estruturas são indicadas pela branca.

## f. RAIIO INTERNO DO PORO

Apenas para o sistema que contém o hexâmero será apresentada uma última análise, que corresponde a uma medida do raio interno do canal feita com o software HOLE<sup>[86],[87]</sup>. O algoritmo utiliza *Monte Carlo Simulated Annealing* para determinar o volume e a forma do poro através do preenchimento do interior deste com esferas de raios variados.

## g. RAMACHANDRAN

O Diagrama de Ramachandran<sup>[2]</sup> (Figura 5.3.) mostra as configurações permitidas para a “espinha dorsal” (*backbone*) da proteína. No Capítulo 2, a Figura 2.10. mostra as definições dos ângulos  $\psi$  e  $\phi$ . As regiões em azul do Diagrama de Ramachandran são os valores permitidos de  $\phi$  e  $\psi$  para qualquer resíduo. Os aminoácidos Gly e Pro são exceções, pois devido às particularidades de suas cadeias laterais (Figura 2.5.) podem ocupar outras regiões do diagrama.

No primeiro quadrante a região indicada por  $\alpha_L$ , em torno de  $(70^\circ, 70^\circ)$ , corresponde a uma  $\alpha$ -hélice para a esquerda, em sentido horário, de rara ocorrência. A região indicada por  $\alpha$ , em torno de  $(-70^\circ, -50^\circ)$ , corresponde a valores de  $\phi$  e  $\psi$  característicos de  $\alpha$ -hélice para a direita, em sentido anti-horário, mais comum.

No segundo quadrante em azul está a região correspondente às folhas- $\beta$ . A região em torno de  $(-150^\circ, 150^\circ)$ , indicada por  $\beta_{ap}$ , é relativa a folhas antiparalelas. Em torno de  $(-120^\circ, 90^\circ)$ , na região marcada com  $\beta_p$ , às folhas- $\beta$  paralelas.

Existe ainda uma região indicada por **C**, aproximadamente a  $(-70^\circ, 150^\circ)$ , referente a uma hélice de colágeno. Esta se deve a ligações de hidrogênio entre duas cadeias de aminoácidos (como por exemplo, o DNA). Sendo a moricina um peptídeo pequeno, a formação dessa estrutura é inviável.

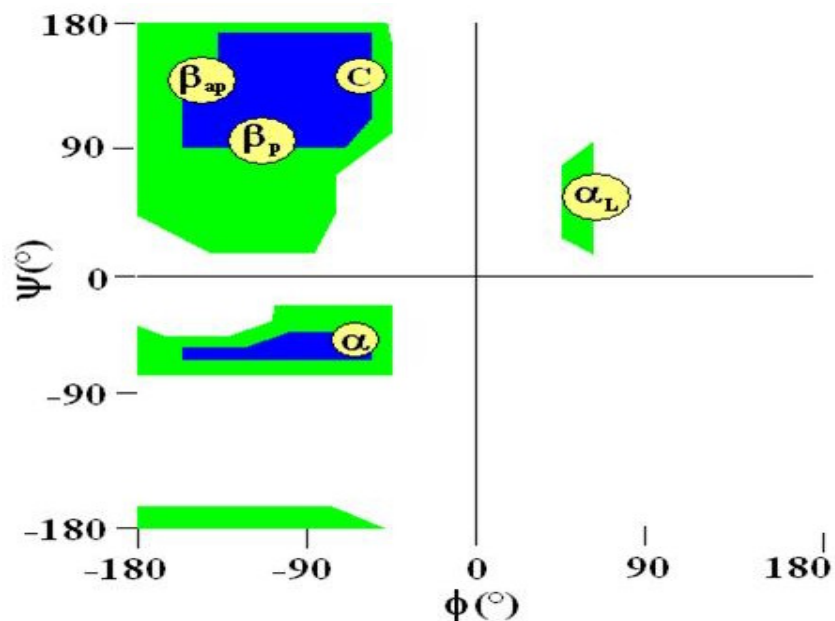


Figura 5.3. Diagrama de Ramachandran.

## 5.1 MORICINA (MRI)

Neste sistema, a moricina é simulada em vácuo por 2 nanosegundos (ns) e para as análises da estrutura secundária foi utilizado o último ns. A Figura 5.1.1. apresenta o peptídeo ao final da simulação. Pode-se observar que a integridade da  $\alpha$ -hélice não é conservada. Por se tratar de um peptídeo catiônico, os resíduos polares e carregados tendem a se aproximar para estabilizar suas cargas. Para obter uma configuração mais adequada, a cadeia peptídica se dobra e a  $\alpha$ -hélice é parcialmente desfeita. Nestes pontos o raio da hélice é alterado e aparecem *turns* (voltas) e *coils* (alças).

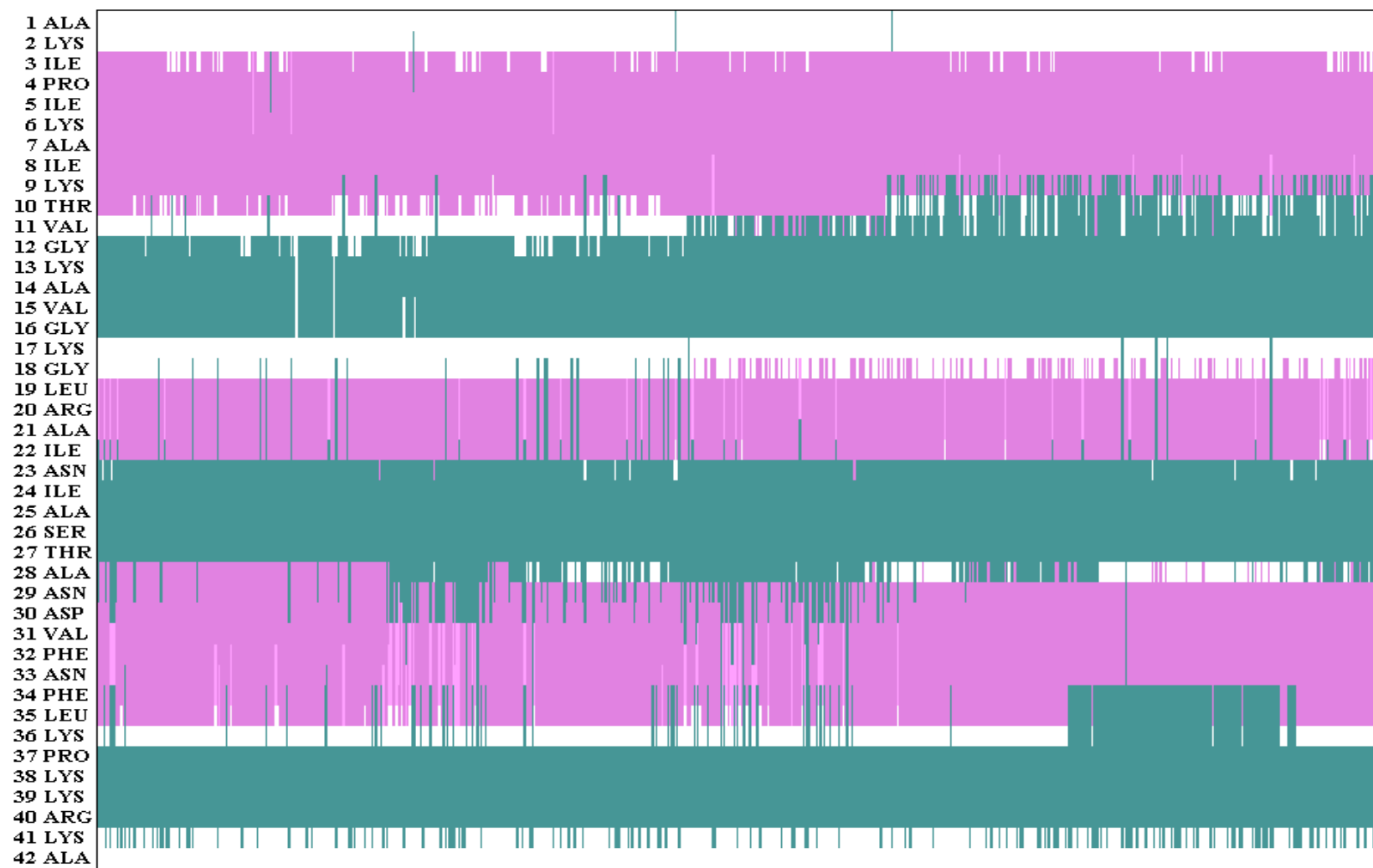


**Figura 5.1.1.** Estrutura da Moricina após 2 ns de simulação no vácuo.

A Figura 5.1.2. mostra a evolução temporal da estrutura secundária (DESP) deste sistema. Em geral, nas análises estruturais os 5 resíduos terminais de cada lado da cadeia peptídica são desconsiderados. Entretanto, como a moricina é um peptídeo pequeno todos os resíduos serão discutidos. Nesta figura pode-se ver que na maior parte do tempo os 2 resíduos terminais de cada extremidade não mantêm a estrutura  $\alpha$ -hélice e formam *coils*. Ao contrário dos *turns*, os *coils* são fragmentos de curvas que não têm uma estrutura regular, sendo detectados quando o espiral se “desenrola” e a seqüência de aminoácidos assume curvaturas irregulares. Os *turns* são as voltas com raios variados, que podem permanecer isolados. Quando alinhados, suas repetições podem constituir hélices ( $\alpha$ ;  $\pi$ ; 3-10).

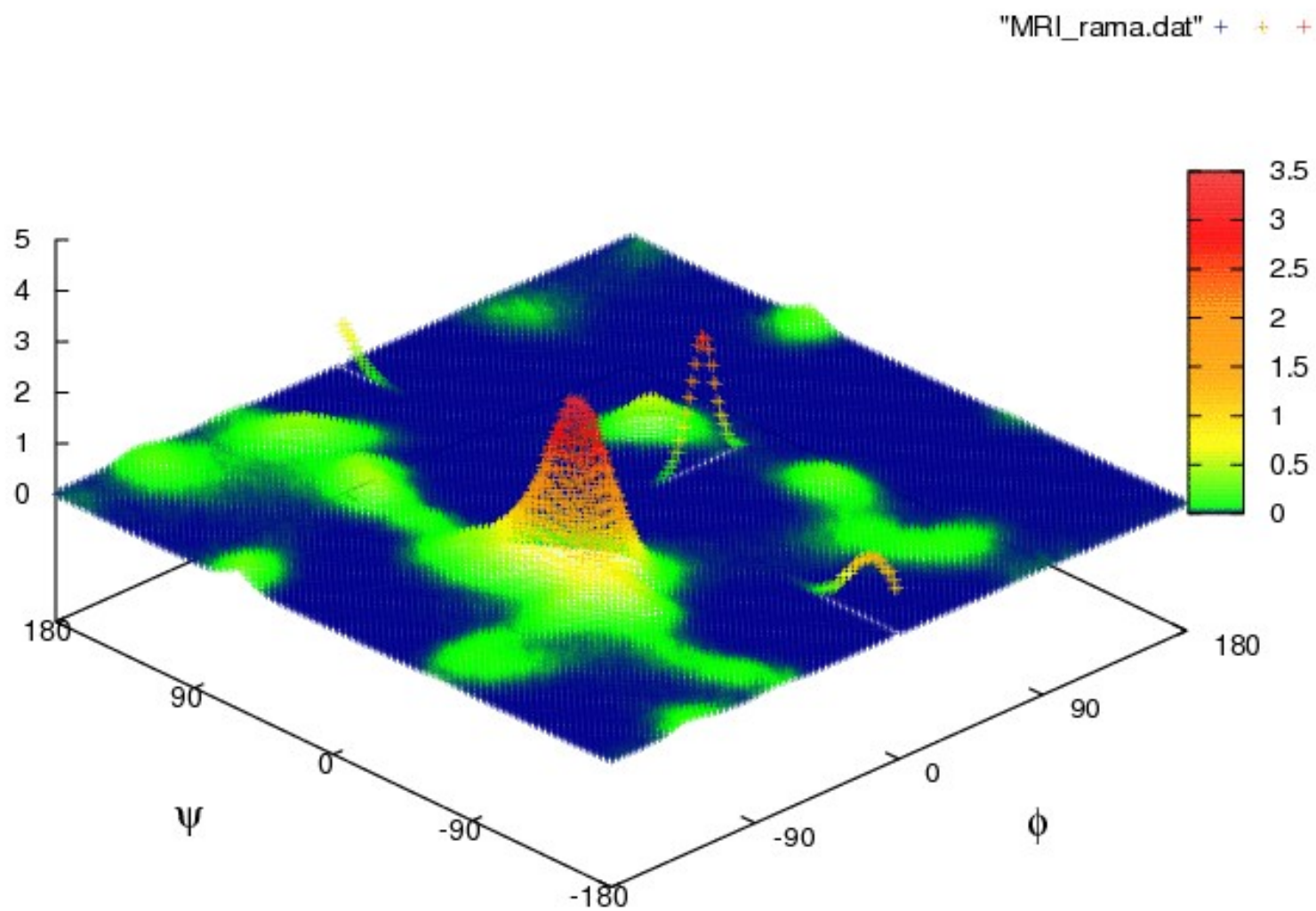
Nas Figuras 5.1.1. e 5.1.2. as  $\alpha$ -hélices (em púrpura) aparecem intercaladas com *turns* (em ciano), e os pontos nos quais a moricina se dobra são caracterizados como *coils* (em branco). Estes resíduos que perdem a configuração conectam os domínios que preservam estrutura (*turns* ou hélices). Esses aspectos são confirmados com a observação da Figura 5.1.3., que mostra o Diagrama de Ramachandran com as configurações da moricina acumuladas ao longo de 1 ns. Nesta figura, os valores de  $\phi$  e  $\psi$  que apresentam maior população são característicos de  $\alpha$ -hélice. Os aminoácidos que se dispõem como *coils* podem assumir valores de  $\phi$  e  $\psi$  não convencionais, proibidos para domínios que assumam estruturas secundárias definidas como hélices ou folhas- $\beta$ . Os *turns* têm maior restrição para esses ângulos e em função da curvatura da cadeia peptídica aparecem na região de  $\alpha$ -hélice no Diagrama de Ramachandran.

Assim, pode-se atribuir aos *coils* a reduzida ocorrência em regiões incomuns e aos *turns* e  $\alpha$ -hélices a ocorrência majoritária no terceiro quadrante do Diagrama de Ramachandran da Figura 5.1.3.. Cabe ainda salientar que a população sobre os eixos, cujos valores correspondem a zero graus para  $\phi$  ou  $\psi$ , deve-se às particularidades da cadeia lateral da Glicina que é composta apenas de um hidrogênio.



**Figura 5.1.2.** Evolução temporal (1 ns) da DESP da Moricina no vácuo (MRI): ■  $\alpha$ -hélice; ■ *turn*,  *coil*.

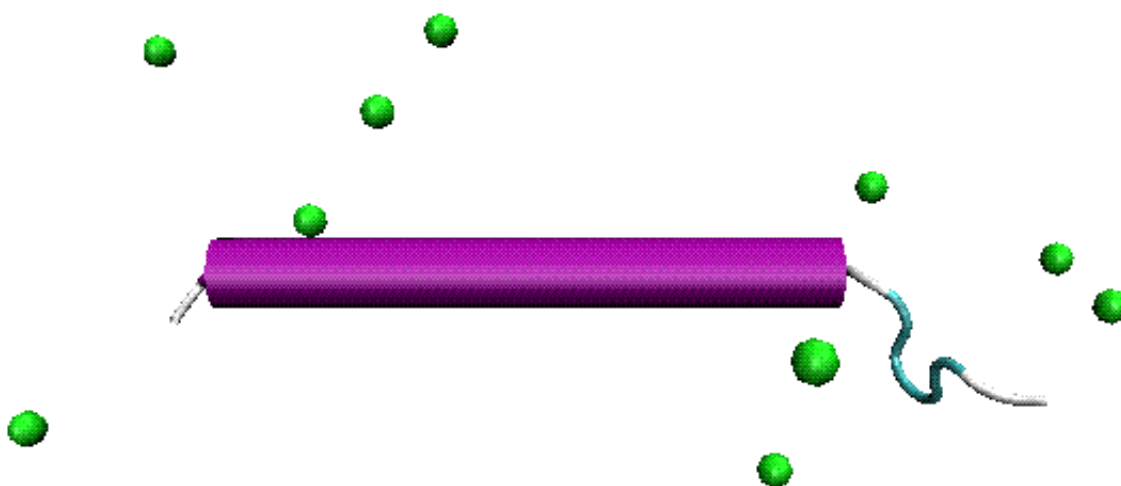




**Figura 5.1.3.** Diagrama de Ramachandran das configurações acumuladas da Moricina em vácuo (1 ns).

## 5.2 MORICINA + ÁGUA (WMRI)

Este sistema contém a moricina solvatada em água e neutralizada com 10 cloretos. O mesmo foi simulado durante 1,4 ns. O intervalo usado nas análises de estrutura secundária foi de 1 ns. As duas análises, DESP e Ramachandran, são complementares e por isso as discussões são apresentadas simultaneamente. A Figura 5.2.1. mostra a moricina ao final da simulação, com a  $\alpha$ -hélice praticamente intacta.



**Figura 5.2.1.** Estrutura da Moricina após 1,4 ns de simulação em água com contra-íons.

Na Figura 5.2.2. é apresentada a evolução temporal da estrutura secundária na análise de DESP, que mostra a preservação da  $\alpha$ -hélice (em púrpura, entre os resíduos 3 e 35) com variações insignificantes. As forças que atraíam os resíduos causando o “dobramento” do peptídeo no primeiro sistema são amenizadas com a solvatação e a hélice é estabilizada.

As Figuras 5.2.1 e 5.2.2. mostram a formação de *coils* apenas nos resíduos terminais 1; 2; 41 e 42. Além destes, o resíduo 36 faz a conexão da  $\alpha$ -hélice com um *turn*. Os resíduos terminais têm maior liberdade de movimento que os do interior da cadeia e dificilmente retêm uma configuração.

A Figura 5.2.3. mostra o Diagrama de Ramachandran da moricina neste sistema com as configurações acumuladas ao longo de 1 ns. A região mais populosa do Diagrama continua

sendo o terceiro quadrante, com ângulos característicos de  $\alpha$ -hélice e quase sem ocorrência de ângulos proibidos. Essas observações permitem dizer que não há “quebras” na estrutura da cadeia como verificado com o peptídeo no vácuo.

A  $\pi$ -hélice foi definida anteriormente no Capítulo 2. Sua formação instantânea pode ser observada na Figura 5.2.2., no intervalo em vermelho entre os resíduos 10 e 16. Há uma ligeira oscilação de  $\alpha$ -hélice para  $\pi$ -hélice e *turn* devido a variações no raio das voltas (espiral), o que não é necessariamente perda de configuração. Esse argumento pode ser sustentado com a Figura 2.10.. Os ângulos  $\phi$  e  $\psi$  detectados estão próximos dos valores característicos de  $\alpha$ -hélice sem grandes variações. Neste sistema também são registradas Glicinas (GLY) sobre os eixos do Diagrama.

A moricina é instável no vácuo por ser um peptídeo do tipo  $\alpha$ -hélice e catiônico. A integridade da estrutura secundária é preservada quando solvatada, uma vez que as cargas são estabilizadas. Por DESP (Figura 5.2.2.) pode-se ver que 33 dos 42 resíduos da moricina formam a estrutura majoritária, ficando plenamente de acordo com o Diagrama de Ramachandran (Figura 5.2.3.), segundo o qual a população se concentra em região  $\alpha$ -hélice. Apenas nas extremidades da cadeia peptídica, que podem ser desconsideradas, a moricina apresentou domínios desestruturados.

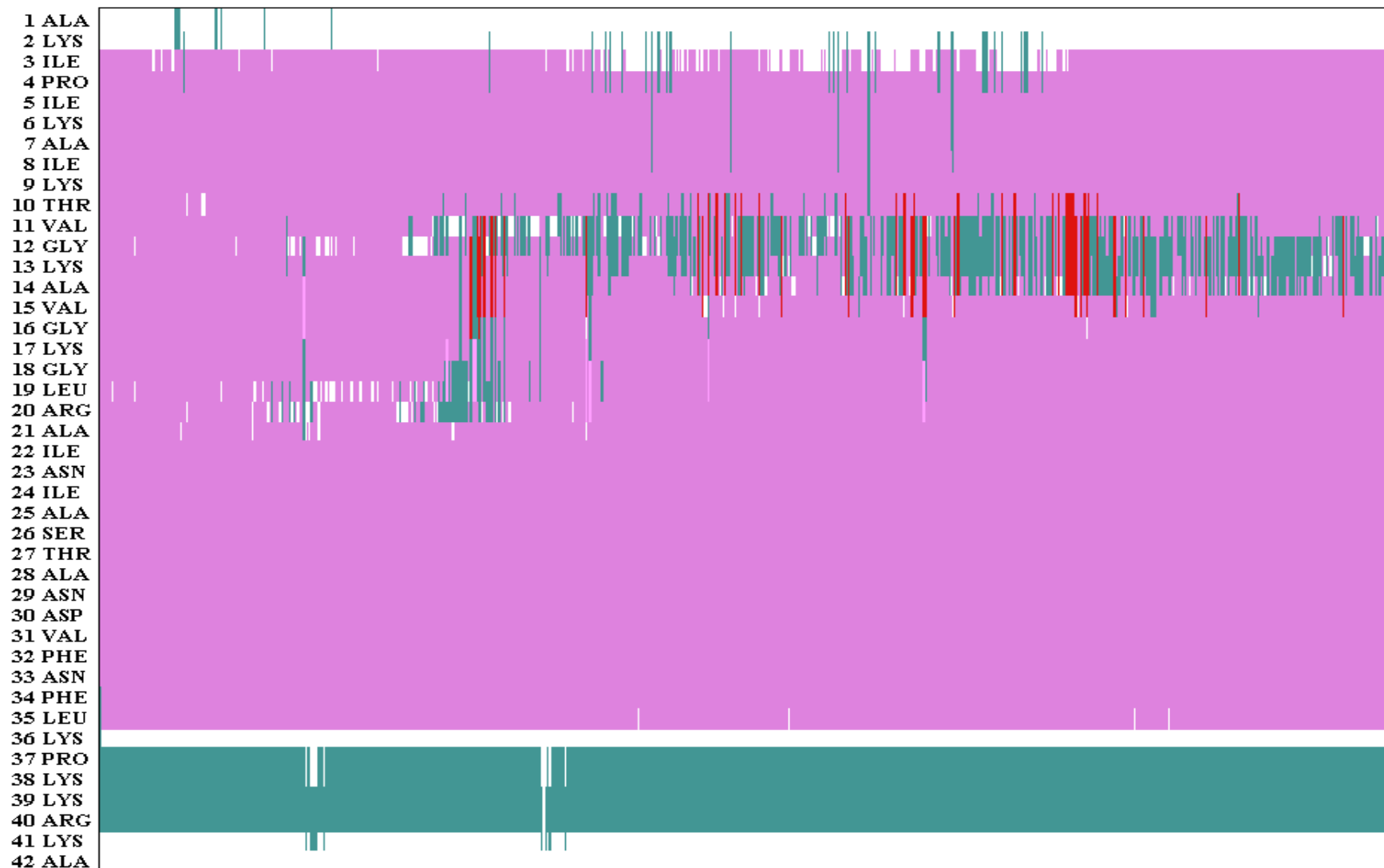
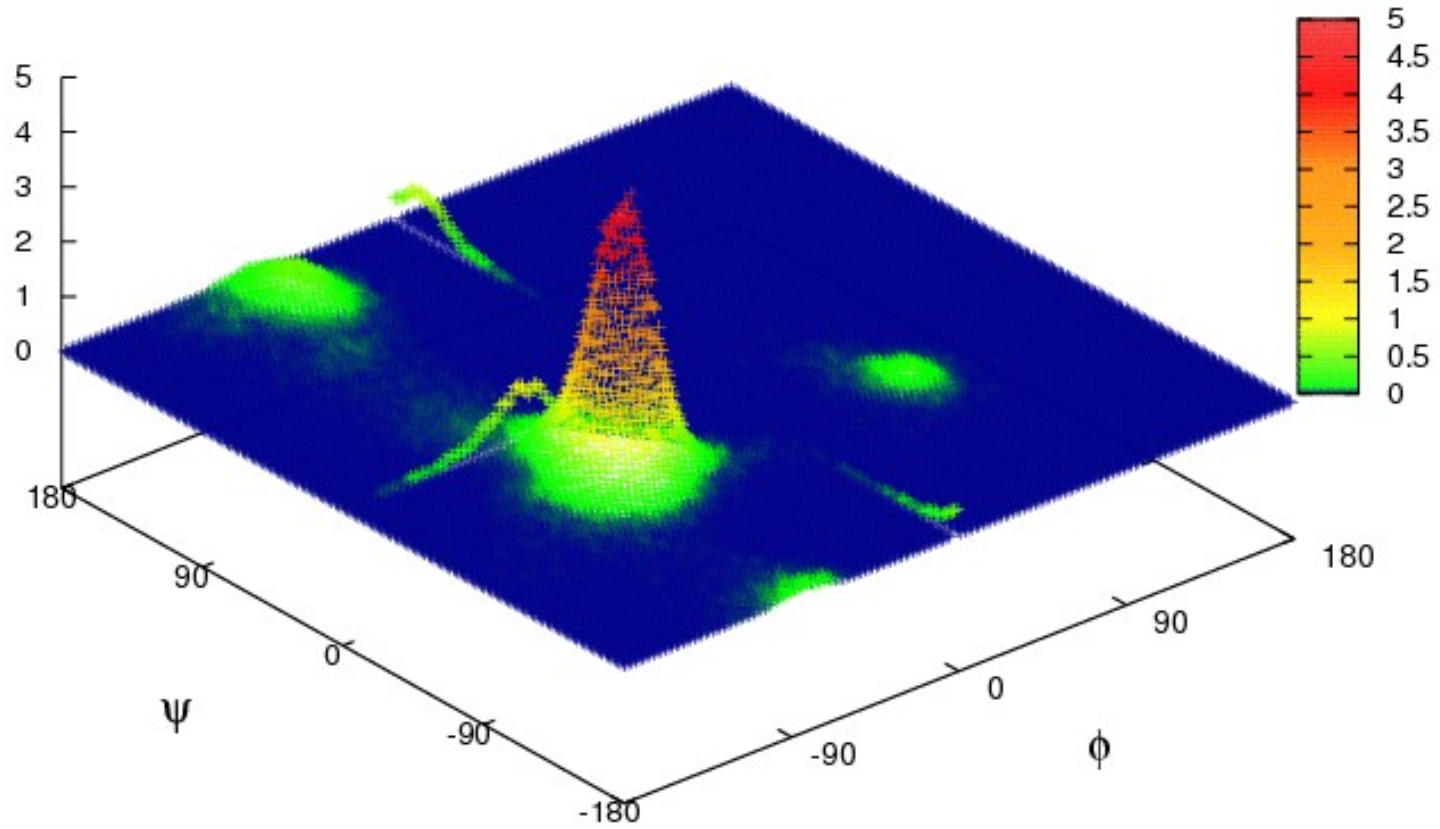


Figura 5.2.2. Evolução temporal (1 ns) DESP da Moricina em água (WMRI):  $\alpha$ -héllice;  $\pi$ -héllice; *turn*, *coil*.

"WMRI\_rama.dat" + + +



**Figura 5.2.3.** Diagrama de Ramachandran da Moricina em água (WMRI), com as configurações de 1 ns acumuladas.

### 5.3 MEMBRANA (MEM)

Este sistema é composto por uma bicamada lipídica hidratada, formada por 96 POPE e 32 POPG (são 64 lipídios em cada lâmina), com 48 íons (40 cátions sódio e 8 ânions cloreto) que neutralizam as cargas do POPG (a membrana possui uma carga de  $-32 e$ ).

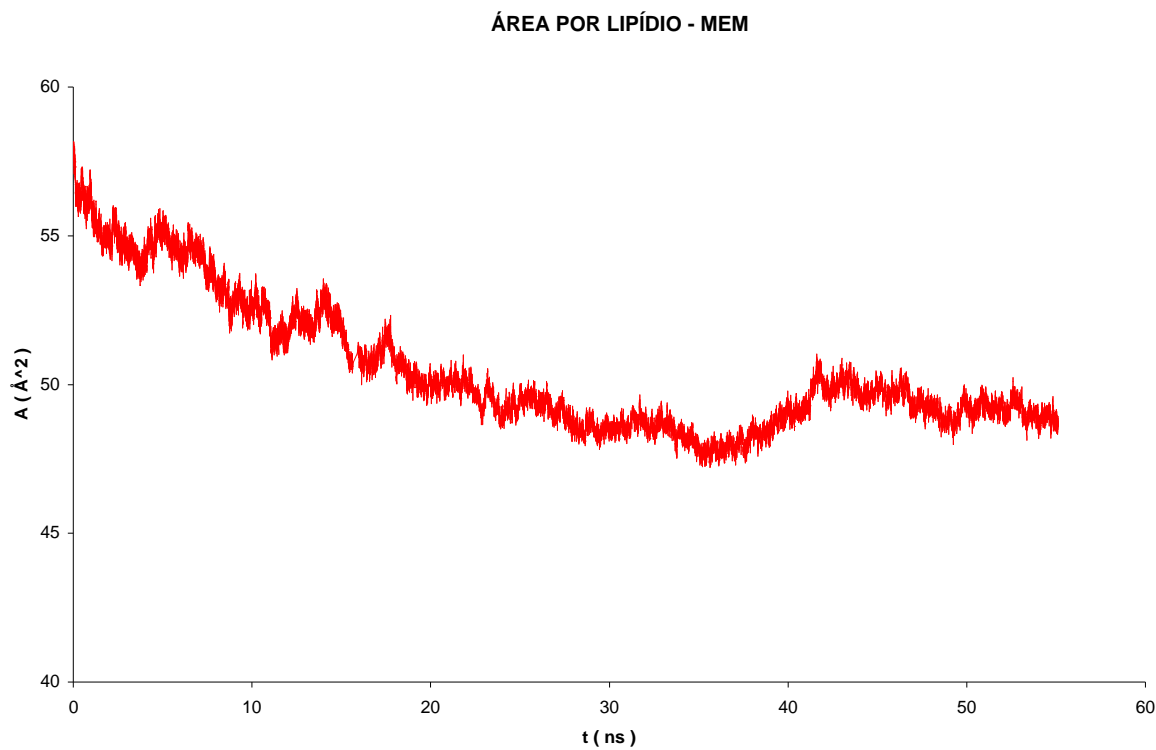
Foram simulados 55 ns. Como a área por lipídio usada como critério de equilíbrio não converge rapidamente, foram feitas análises a cada 10 ns de cálculo com o sistema equilibrado, em intervalos de 2 ns definidos na Tabela 5.3.

**Tabela 5.3.** Propriedades do sistema MEM analisadas em 4 intervalos de tempo (I):  $A_P$  (área/Lipídio);  $D_P$  (distância P – P);  $D_{SP}$  (distância no fim da primeira camada de solvatação P – P);  $n_P$  (número de lipídios vizinhos);  $D_{OH}$  (distância P – OH);  $D_{SW}$  (distância no fim da primeira camada de solvatação P – OH);  $n_W$  (número de águas coordenadas);  $d$  (distância de repetição da bicamada);  $IW$  (dimensão da interface água – membrana); P.O. (parâmetro de ordem).

Propriedade	MEM 2	MEM 3	MEM 4	MEM 5
<b>I (ns)</b>	20 – 22	30 – 32	40 – 42	50 – 52
<b><math>A_P</math> (Å<sup>2</sup>)</b>	49,9 ± 0,4	48,7 ± 0,3	49,5 ± 0,6	49,2 ± 0,2
<b><math>D_P</math> (Å)</b>	5,6	5,5	5,5	5,7
<b><math>D_{SP}</math></b>	7,2	7,2	7,2	7,2
<b><math>n_P</math></b>	1,3	1,3	1,3	1,3
<b><math>D_{OH}</math> (Å)</b>	3,8	3,8	3,8	3,8
<b><math>D_{SW}</math></b>	4,6	4,6	4,6	4,6
<b><math>n_W</math></b>	6,3	6,3	6,3	6,3
<b><math>d</math> (Å)</b>	50	51	50	50
<b><math>IW</math> (Å)</b>	8,6	7,5	8,3	8,5
<b>P.O. Palmitoil</b>	0,33 ± 0,04	0,34 ± 0,04	0,33 ± 0,04	0,32 ± 0,04
<b>P.O. Oleil</b>	0,23 ± 0,1	0,26 ± 0,07	0,23 ± 0,09	0,23 ± 0,09

Também são apresentadas nesta tabela as médias da área por lipídio em cada intervalo. A área calculada ao longo de toda a simulação é apresentada na Figura 5.3.1.. Depois de 20 ns a mesma converge para  $49,1 \pm 0,7 \text{ Å}^2$ . Esta área apresenta uma queda moderada no período de equilíbrio e a partir do vigésimo nanosegundo começa a convergir. Antes de 20 ns o comportamento do sistema é diferente do observado para o sistema equilibrado. São

apresentados os resultados apenas do sistema equilibrado, segundo os intervalos da Tabela 5.3..



**Figura 5.3.1.** Evolução temporal da área por fosfolipídio para o sistema MEM.

A partir da FDR P – P pode-se obter a distância mais provável entre dois fosfolipídios vizinhos,  $D_P$ , que corresponde ao primeiro máximo desta função. O número de lipídios da primeira camada de solvatação,  $n_P$ , é determinado pela integral da  $g(r)$  para a distância do primeiro mínimo,  $D_{SP}$ , que corresponde ao final da primeira camada de solvatação na Figura 5.3.3.. A distância entre o fósforo e as moléculas de água coordenadas à cabeça polar é determinada pelo primeiro máximo da FDR P – OH,  $D_{OH}$ , e o número de moléculas de água coordenadas,  $n_W$ , é calculado pela integral da  $g(r)$  até o final da primeira camada de solvatação, distância do primeiro mínimo,  $D_{SW}$ . Esses dados são indicados na Tabela 5.3. Os átomos de fósforo utilizados para as análises são do total que compõe a membrana. Foram utilizados os fósforos do POPE e do POPG, sem distinção.

A área superficial da membrana é determinada pela separação dos lipídios. Com o sistema equilibrado, as distâncias P – P apresentam pequenas variações que podem ser vistas com a sobreposição das FDRs para os 4 intervalos analisados, na Figura 5.3.2.. O valor obtido para o final da primeira camada de solvatação foi 7,2 Å, coerente com a literatura<sup>[10]</sup> que

apresenta valores calculados de 7 Å. O número de fosfolipídios correspondentes à primeira camada foi de 1,3.

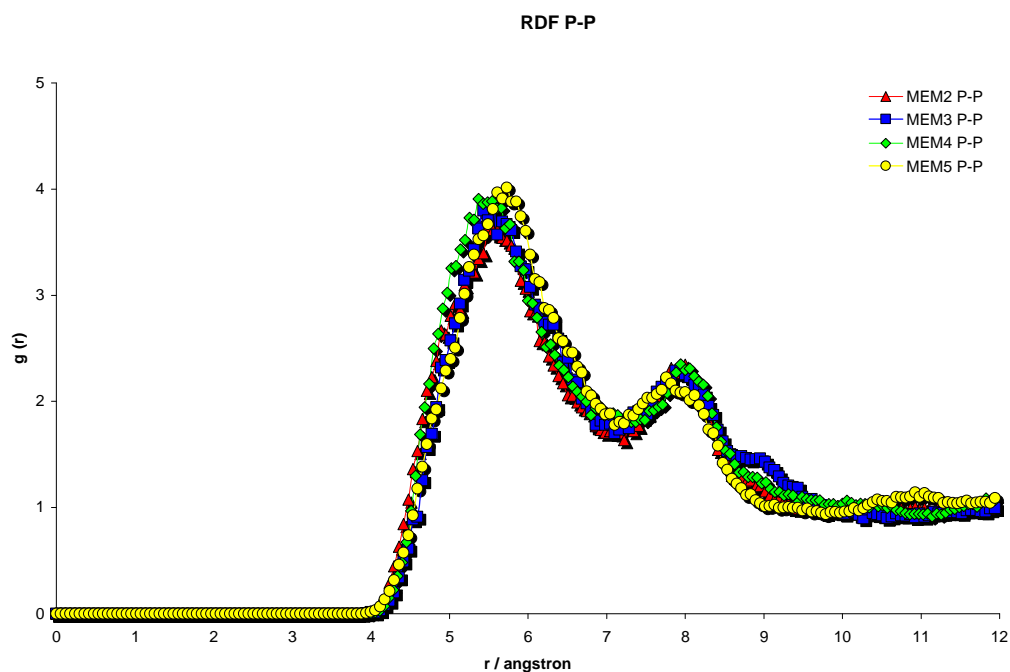


Figura 5.3.2. FDR P – P para o sistema MEM (a partir de 20 ns).

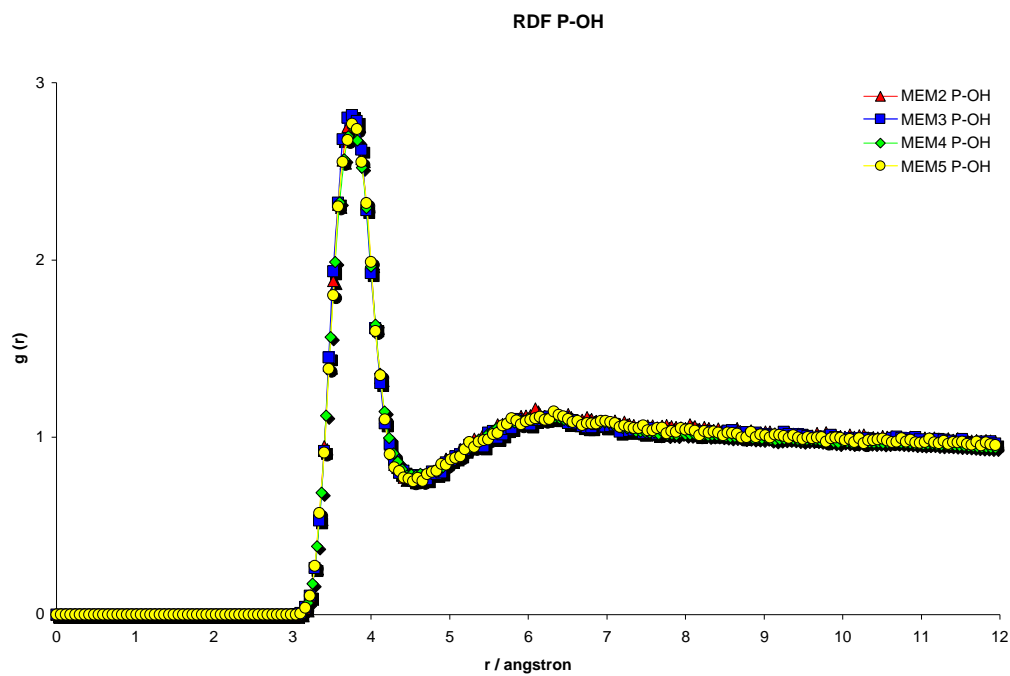
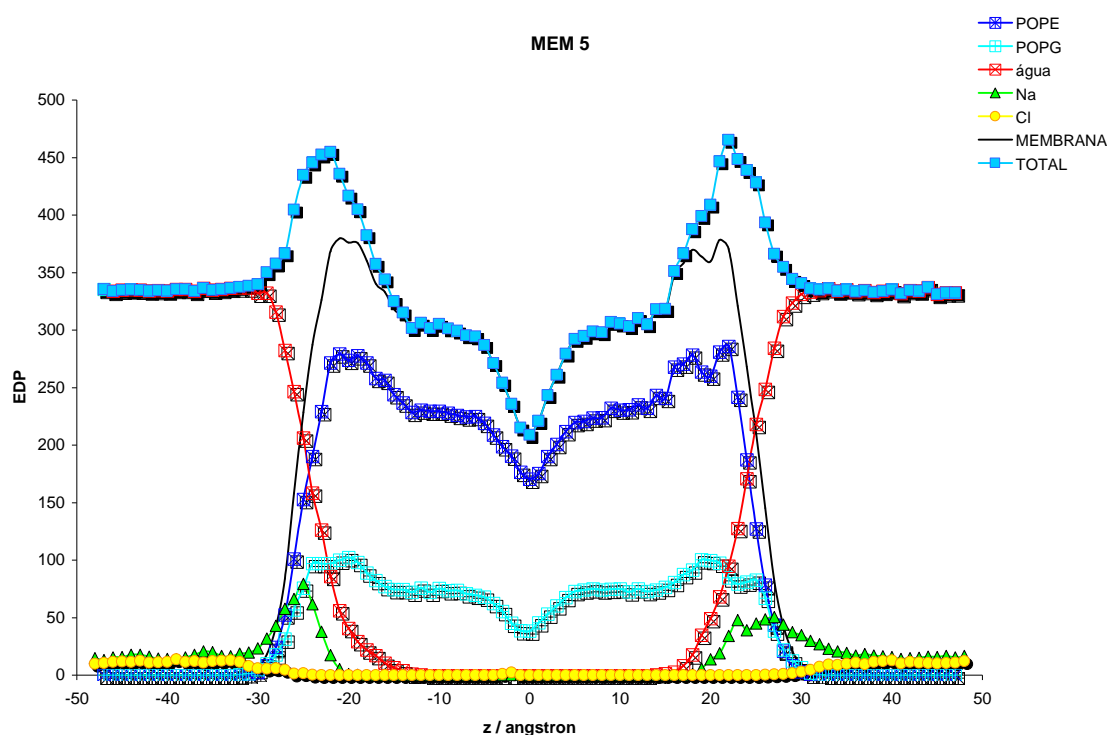


Figura 5.3.3. FDR P – OH para o sistema MEM (a partir de 20 ns).



Na Figura 5.3.3. são apresentadas as  $g(r)$  fósforo – água. Comparando-se as FDRs P – OH dos 4 intervalos, pode-se ver que a sobreposição é maior que para as  $g(r)$  P – P. As interações da cabeça polar com as moléculas de água não são afetadas, a primeira camada de solvatação tem o mesmo perfil em cada intervalo. Logo, as distâncias e o número de águas coordenadas à cabeça polar não se modificam.

A altura da membrana ou distância de repetição da bicamada,  $d$ , bem como a dimensão da interface água – membrana,  $IW$ , são obtidas a partir dos PDMs. Esses valores são apresentados na Tabela 5.3. Como a variação nos perfis de densidade de massa para o sistema equilibrado não é significativa, apenas o PDM do último intervalo é apresentado na Figura 5.3.4.



**Figura 5.3.4.** PDM do sistema MEM (intervalo 1).

Os perfis de densidade de massa apontam a posição de uma molécula em relação ao eixo  $z$  (Normal da membrana). Como se pode observar na Figura 5.3.4, a densidade da membrana está entre  $-25\text{Å}$  e  $+25\text{Å}$ . Nesses  $50\text{Å}$  que correspondem à distância de repetição da bicamada lipídica, os perfis do sódio, do cloreto e da água são nulos, o que permite afirmar que não há moléculas de água ou íons no interior da membrana.

Na região das cabeças polares, onde o perfil de densidade da membrana apresenta seu máximo, começam a aparecer moléculas de água na interface água – membrana, assim como os íons sódio que se concentram nessa altura devido às interações eletrostáticas entre as cabeças polares aniônicas e esses cátions. O PDM dos ânions indica que estes estão dispersos em água, não concentrados próximos às cabeças polares, e apresentam densidade eletrônica menor que a do sódio (são apenas 8 cloretos contra 40 sódios). Os valores referentes aos íons foram multiplicados por 10 para melhorar a visualização.

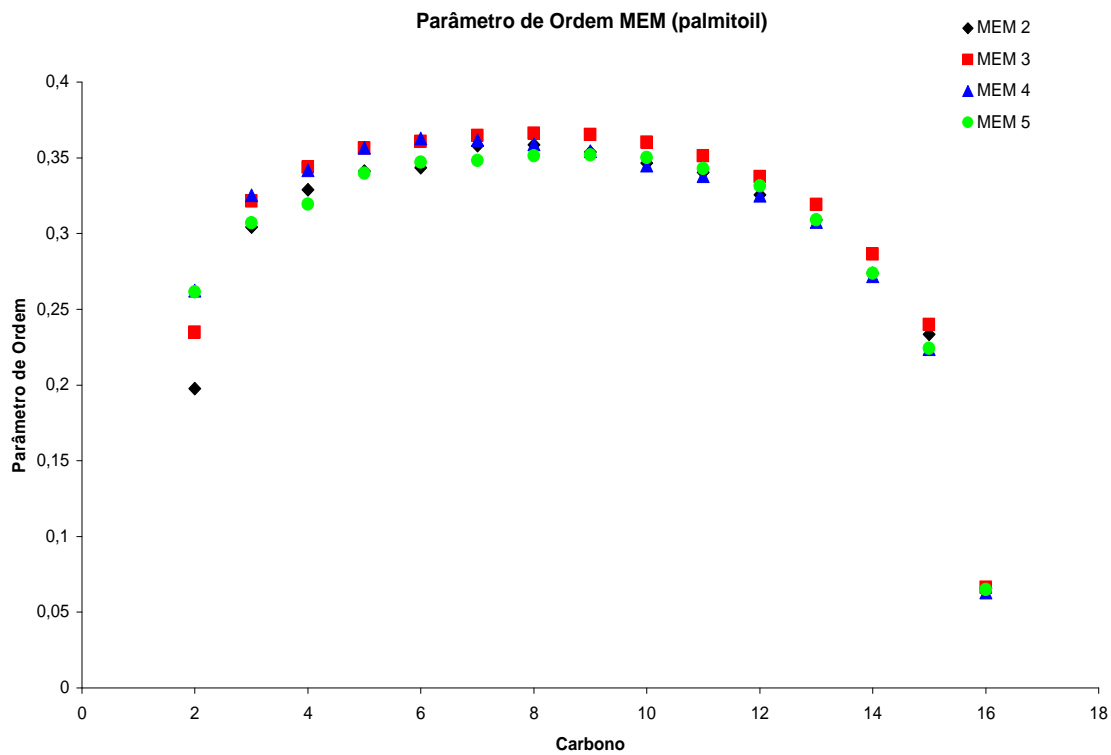
As densidades do POPE e do POPG são somadas, e se obtém o perfil de densidade de massa da membrana; os valores de PDM para o POPG são menores em relação aos do POPE, pois aqueles estão em número menor na membrana. No PDM TOTAL foram somados os perfis de densidade da membrana e da água. A região de menor densidade do sistema fica no centro da membrana. Esta região também apresenta a maior fluidez, devido à grande mobilidade das terminações das cadeias alifáticas.

Os Parâmetros de Ordem (P.O.) das cadeias de Palmitoil (16 carbonos, saturada) e Oleil (18 carbonos, insaturação no carbono 9) dos quatro intervalos são mostrados nas Figuras 5.3.5 e 5.3.6 respectivamente. As médias apresentadas na Tabela 5.3 são calculadas a partir dos parâmetros dos carbonos 4 a 15 para o palmitoil, e 4 a 17 para o oleil.<sup>[10]</sup> De acordo com a definição, quanto maior o alinhamento dos carbonos na cadeia, maior o parâmetro de ordem.

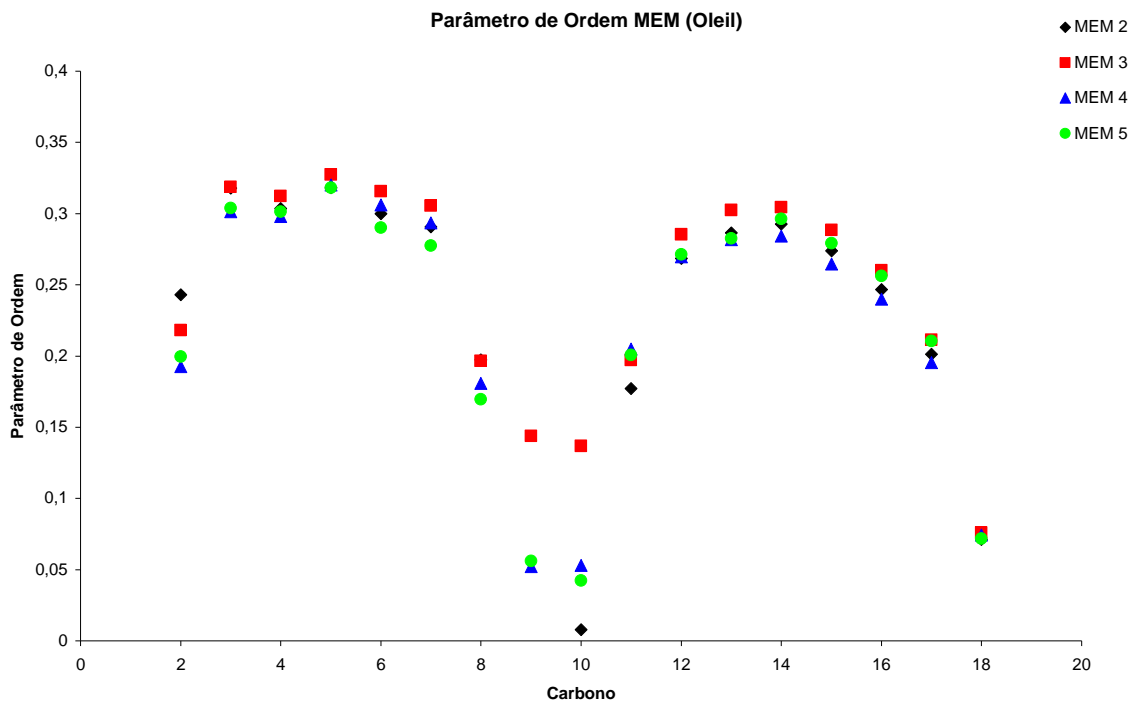
Partindo deste princípio, a diminuição da área da membrana sugere uma proximidade maior entre os lipídios restringindo a movimentação das cadeias alifáticas, podendo ser relacionado com o aumento da ordem do sistema. Da mesma forma o aumento da área confere maior mobilidade às cadeias, e o parâmetro de ordem deve diminuir.

As análises realizadas com o sistema equilibrado em 4 intervalos mostram que os parâmetros de ordem seguem a tendência descrita acima. Assim como as variações da área, os valores dos P.O. apresentam uma pequena oscilação. As cadeias saturadas permitem um empacotamento maior, enquanto as insaturadas, cuja dupla ligação tem configuração *cis*, dificultam esse ajuste. O efeito da redução da área é maior para as cadeias oleil. Os valores encontrados na literatura para POPE são  $0,30 \pm 0,1$  para palmitoil e  $0,39 \pm 0,1$  para oleil.<sup>[10]</sup> Para POPG os valores são de  $0,35 \pm 0,1$  para palmitoil e  $0,45 \pm 0,1$  para oleil.

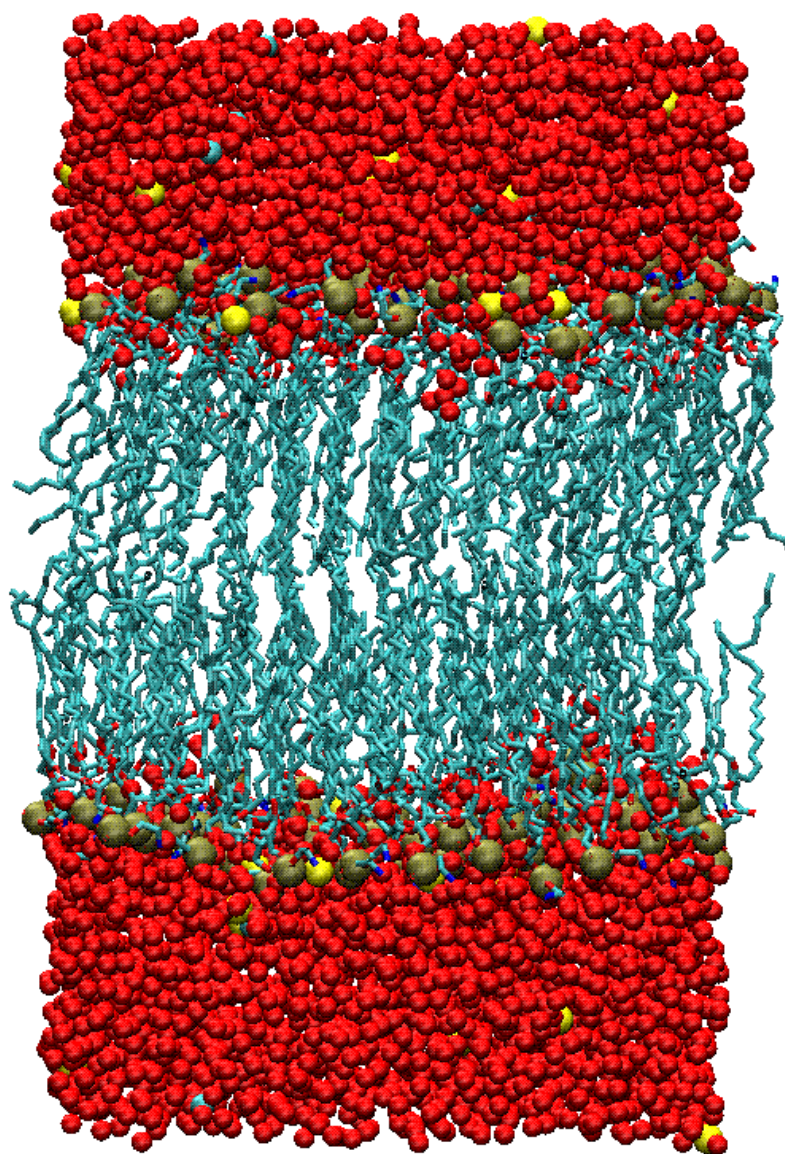
A Figura 5.3.7. mostra o sistema MEM ao final dos 55 ns de simulação.



**Figura 5.3.5.** Parâmetro de Ordem do Palmitoil, sistema MEM.



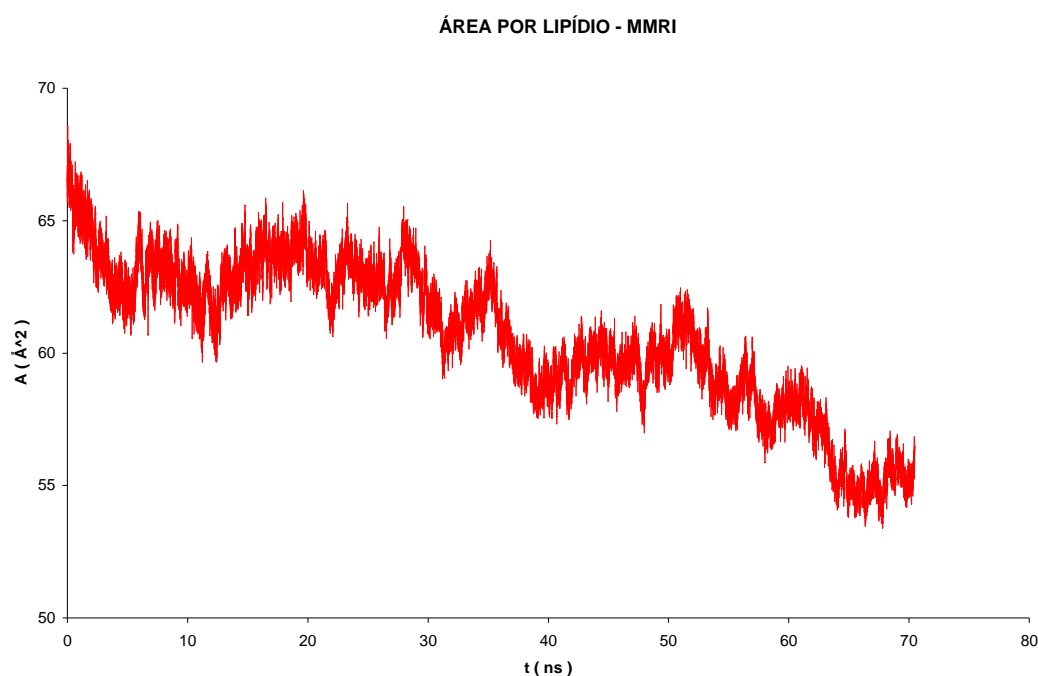
**Figura 5.3.6.** Parâmetro de Ordem do Palmitoil, sistema MEM.



**Figura 5.3.7.** Sistema MEM após 55 ns de simulação.

## 5.4 MEMBRANA + 1 MORICINA (MMRI)

A partir deste sistema começam a ser avaliados os efeitos da moricina na bicamada, analisando as alterações na estrutura da moricina com base nos sistemas MRI e WMRI, além das modificações na membrana em comparação com o sistema MEM. O tempo total de simulação foi de 75 ns. A convergência da área e, consequentemente, a equilibração desta bicamada é mais lenta se comparada ao sistema anterior. A evolução temporal da área por lipídio ao longo de toda a simulação é apresentada na Figura 5.4.1.. Em função dos declínios da área foram considerados para análise apenas os dados a partir de 40 ns.



**Figura 5.4.1.** Evolução temporal da área por fosfolipídio para o sistema MMRI.

Com relação aos efeitos da proteína no interior da membrana, no sistema MEM foi simulada uma membrana de mesma composição (POPE 3:1 POPG), sem peptídeo inserido. A área converge logo após 20 ns de cálculo (Figura 5.3.1.). Neste sistema (MMRI), após 60 ns de cálculo a área volta a apresentar variações. Para o sistema anterior (MEM), a maior diferença verificada entre as áreas calculadas nos intervalos foi de  $1,2 \text{ \AA}^2$ ; para o sistema atual chega a  $4,4 \text{ \AA}^2$  (ver Tabela 5.4).

O que se pode perceber é que a membrana continua sendo comprimida, e o ajuste dos lipídios nesse processo é lento. As variações na área como resultado da mudança de

configuração dos lipídios aparecem após intervalos nos quais esta se mantém praticamente estável. A área oscila em torno de  $63\text{\AA}^2$  até 35 ns, quando apresenta uma queda e permanece dos 40 ns aos 62 ns em torno de  $59\text{\AA}^2$ . A partir de então há uma nova queda no valor da área por lipídio que estabiliza aos 65 ns em aproximadamente  $56\text{\AA}^2$ . A dificuldade na estabilização da área pode ser percebida com a sobreposição das FDRs P – P de cada intervalo, apresentada na Figura 5.4.2. Como a área varia com a movimentação dos lipídios, a  $g(r)$  reflete o comportamento das cabeças polares no intervalo, e há uma sensível alteração no perfil dessas funções. As distâncias P – P registradas (nos intervalos de 2 ns) estão relacionadas na Tabela 5.4..

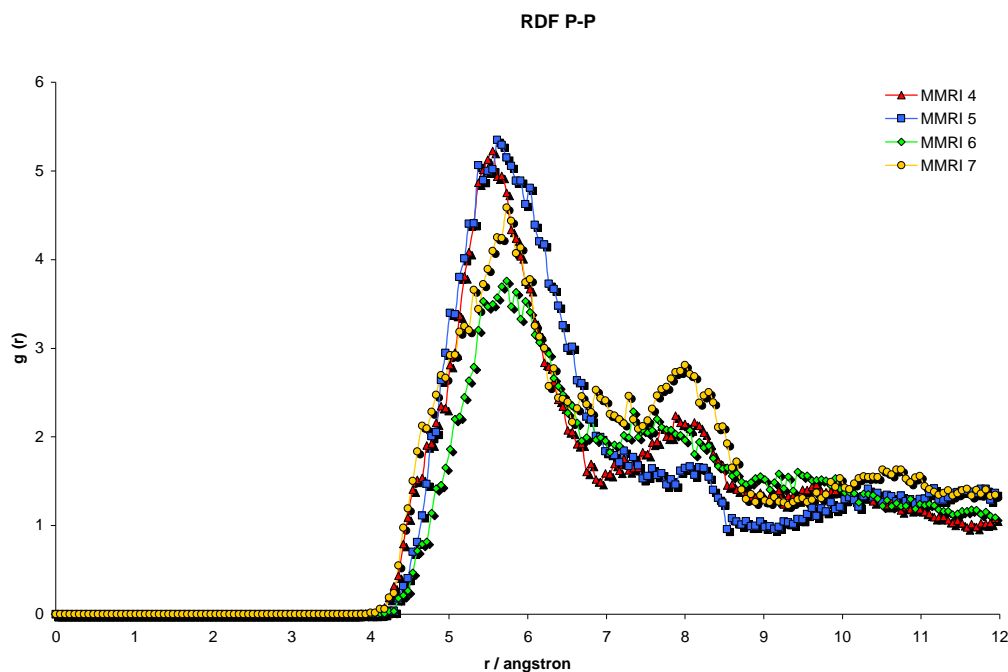
**Tabela 5.4.** Propriedades do sistema MMRI analisadas em 4 intervalos de tempo (I):  $A_P$  (área/Lipídio);  $D_P$  (distância P – P);  $D_{SP}$  (distância no fim da primeira camada de solvatação P – P);  $n_P$  (número de lipídios vizinhos);  $D_{OH}$  (distância P – OH);  $D_{SW}$  (distância no fim da primeira camada de solvatação P – OH);  $n_W$  (número de águas coordenadas);  $d$  (distância de repetição da bicamada);  $IW$  (dimensão da interface água – membrana); P.O. (parâmetro de ordem).

Propriedade	MMRI 4	MMRI 5	MMRI 6	MMRI 7
<b>I (ns)</b>	40 – 42	50 – 52	60 – 62	70 – 72
<b><math>A_P</math> (<math>\text{\AA}^2</math>)</b>	$59,0 \pm 0,6$	$60,9 \pm 0,7$	$58,1 \pm 0,5$	$56,5 \pm 0,9$
<b><math>D_P</math> (<math>\text{\AA}</math>)</b>	5,6	5,7	5,7	5,7
<b><math>D_{SP}</math></b>	6,9	7,4	7,0	7,0
<b><math>n_P</math></b>	0,8	1,1	0,7	0,9
<b><math>D_{OH}</math> (<math>\text{\AA}</math>)</b>	3,8	3,8	3,8	3,8
<b><math>D_{SW}</math></b>	4,5	4,5	4,5	4,5
<b><math>n_W</math></b>	4,7	4,7	4,7	4,7
<b><math>d</math> (<math>\text{\AA}</math>)</b>	45	45	47	48,5
<b><math>IW</math> (<math>\text{\AA}</math>)</b>	10,5	9,5	10	10
<b>P.O. Palmitoil</b>	$0,25 \pm 0,05$	$0,23 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,04$
<b>P.O. Oleil</b>	$0,17 \pm 0,08$	$0,18 \pm 0,04$	$0,19 \pm 0,04$	$0,21 \pm 0,04$

No sistema anterior a área converge para  $49,1 \text{\AA}^2$ ; utilizando-se a área do intervalo MMRI 7 para comparação, houve um aumento de  $7,4 \text{\AA}^2$  por lipídio. Numa bicamada com 30 lipídios em cada lâmina corresponde a um aumento de  $222 \text{\AA}^2$  na área desta membrana. Cabe lembrar que a área por lipídio foi calculada dividindo-se a área total da caixa (em xy) pelo

número de lipídios de cada lâmina, o que inclui a área ocupada pela moricina. Parte do acréscimo na área calculada aqui se deve, portanto, à área ocupada pelo peptídeo dentro da membrana. Se o raio da cavidade onde a moricina se encontra for menor que 8,4 Å (que corresponde à área de 222 Å<sup>2</sup>), a diferença citada acima representa um aumento na área por lipídio.

A evolução das distâncias P – P mostra que para o intervalo MMRI 5 (Figura 5.4.2.), no qual a área por lipídio é maior, há um aumento na separação entre as cabeças polares. Para o intervalo MMRI 7 (menor área por lipídio) há um aumento no número de lipídios na primeira camada de solvatação em relação ao intervalo MMRI 6. Em relação ao sistema anterior (MEM) foi observada uma redução nesse número, uma vez que para as mesmas distâncias P – P as integrais do sistema MEM apresentam maior número de moléculas. Pode-se considerar então que há um aumento na área por lipídio.



**Figura 5.4.2.** FDR P-P para o sistema MMRI (a partir de 40 ns).

Para as  $g(r)$  P – OH, a Figura 5.4.3. mostra a sobreposição das funções de todos os intervalos. As variações da área, que afetam as distâncias P – P, não modificam as interações das cabeças polares com as moléculas de água. A distância de 4,5 Å para a primeira camada de solvatação é a mesma para o sistema MEM, com uma pequena redução no número de moléculas coordenadas.

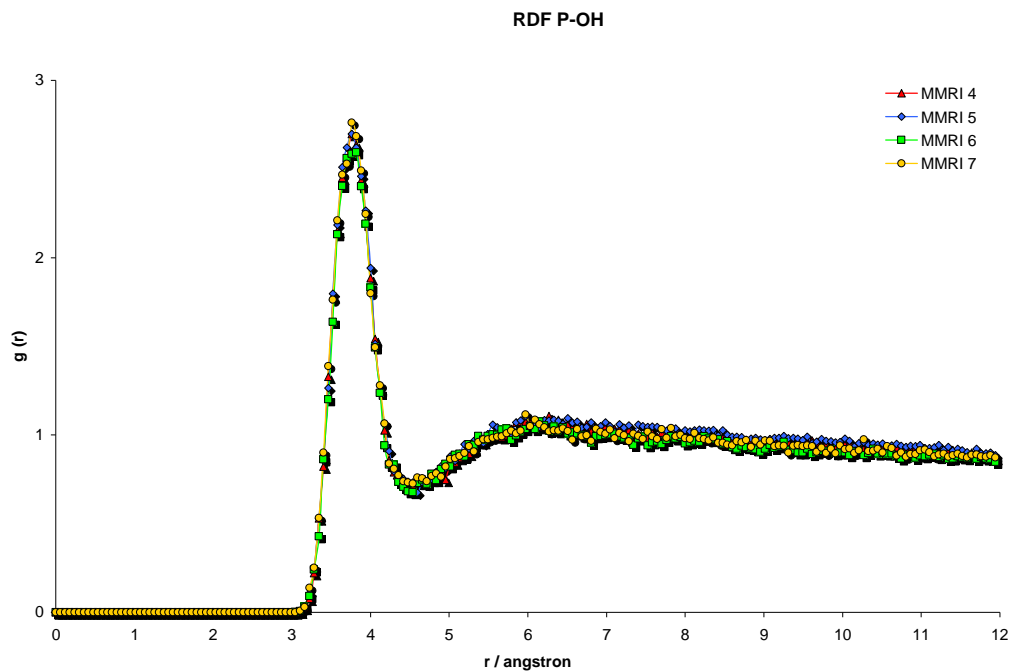


Figura 5.4.3. FDR P-OH para o sistema MMRI (a partir de 40 ns).

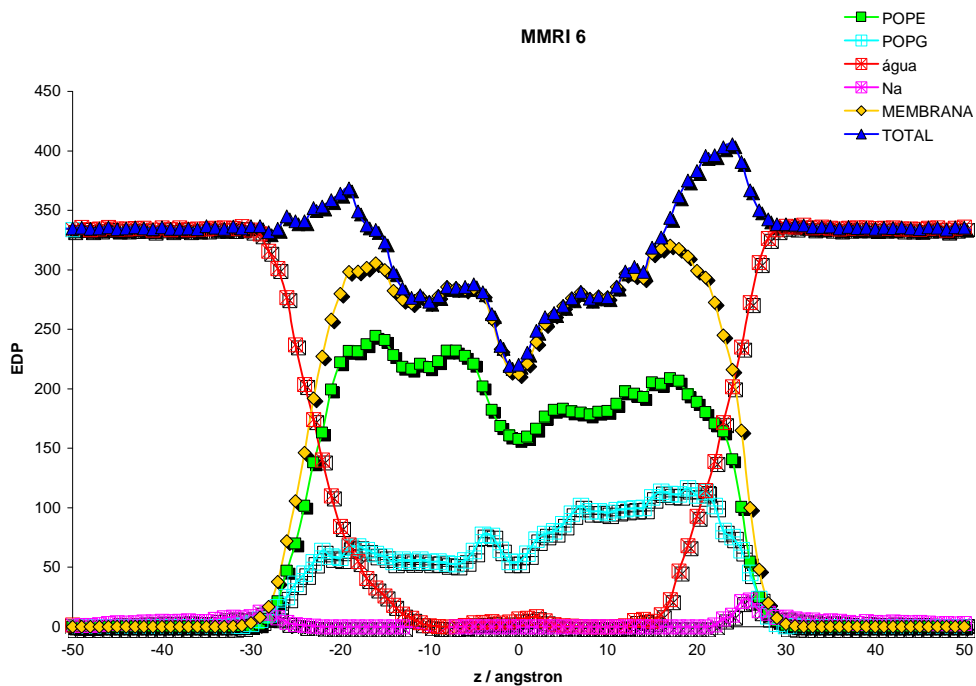


Figura 5.4.4. PDM do intervalo MMRI 6 (60 – 62 ns).

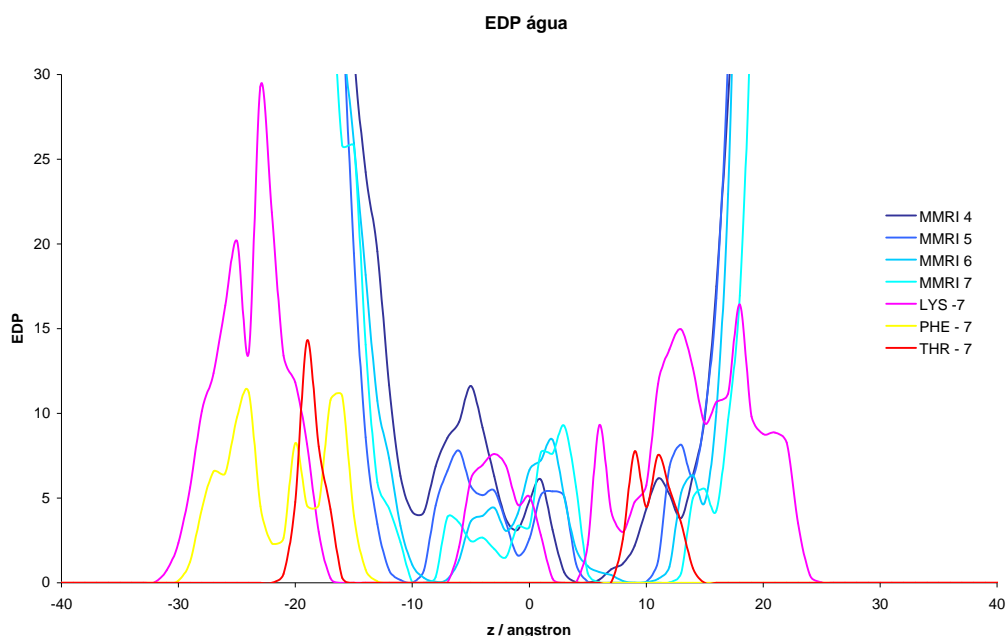
A Figura 5.4.4. mostra os PDMs deste sistema para o intervalo MMRI 6. A Figura 5.4.5. mostra os PDMs da água no interior da membrana para os 4 intervalos, com alguns



resíduos da moricina identificados. Os dados da altura da bicamada e dimensão da interface água-membrana são apresentados na Tabela 5.4. Estes apontam um pequeno aumento na distância de repetição da membrana. Como a área (xy) está diminuindo, essa modificação é previsível. Quanto à interface água-membrana, as variações não são significativas, o que está de acordo com as FDRs P – OH que já indicaram que as interações das cabeças polares com a água não foram afetadas pelas transformações na área da membrana.

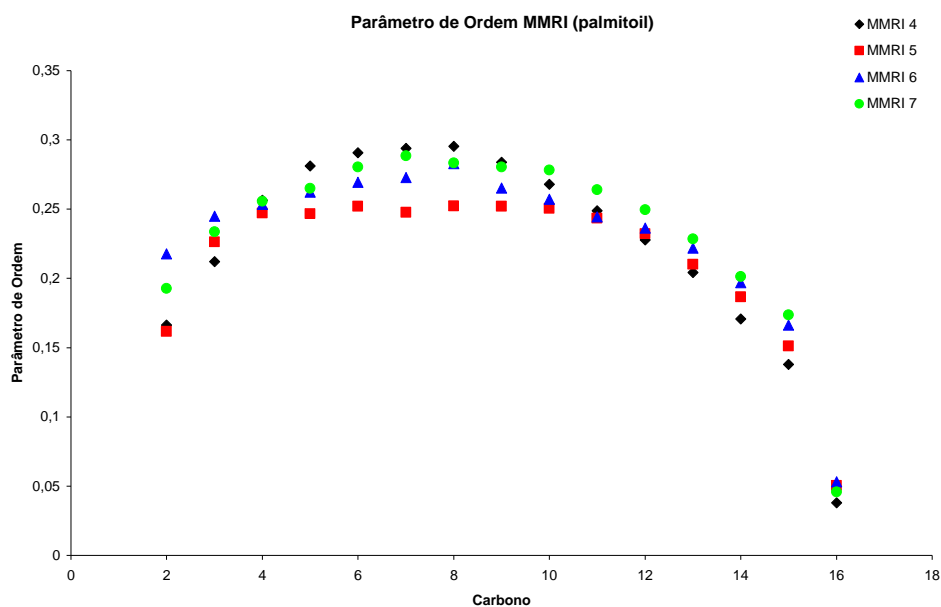
Como esta membrana não possui as duas lâminas idênticas, pois embora ambas possuam 30 lipídios cada, uma apresenta 21 POPE e 9 POPG e a outra 22 POPE e 8 POPG, os perfis dos lipídios não são simétricos com relação ao centro da membrana ( $z=0$ ). O PDM total da membrana, por se tratar da soma desses perfis (POPE + POPG), não apresenta grande diferença entre as lâminas. O PDM total do sistema, que é a soma das densidades de massa da membrana e da água, aponta a região de maior densidade como sendo a das cabeças polares, e de menor densidade o centro da membrana. Conforme comentado para MEM, essa região é a de maior fluidez, o empacotamento é menor em função da maior mobilidade das terminações das cadeias alifáticas.

Pela comparação com os PDMs do sistema MEM, verificou-se a diminuição da altura de repetição da bicamada, o que é coerente com o aumento da área da membrana, bem como um aumento da interface água-lipídio. Com os lipídios mais afastados, as moléculas de água penetram mais na membrana. O mais importante é a detecção de água no interior da bicamada, o que não foi verificado no sistema anterior, na ausência de peptídeo.

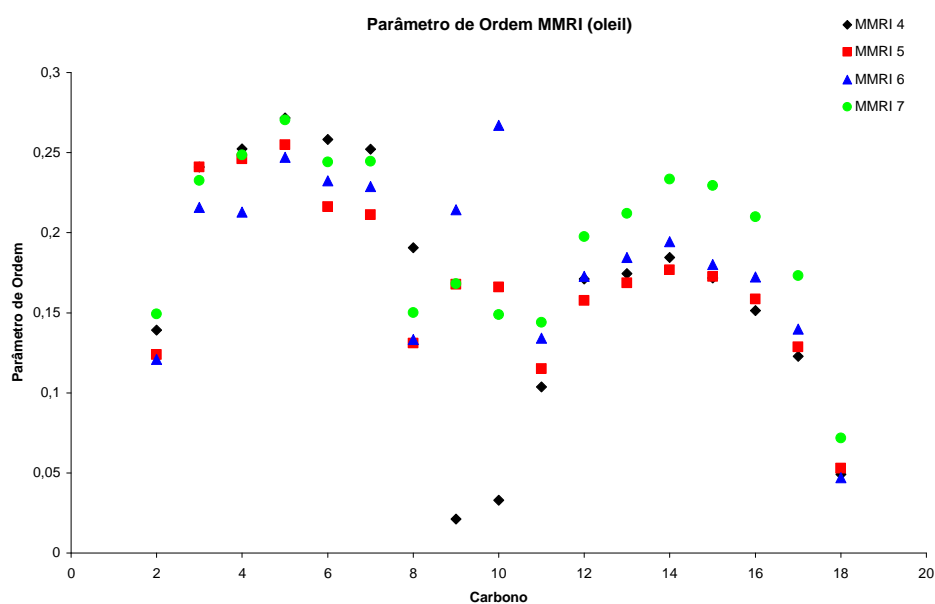


**Figura 5.4.5.** PDM da água, sistema MMRI (todos os intervalos).

Nas Figuras 5.4.6. e 5.4.7. são apresentados os P.O. do sistema MMRI para Palmitoil e Oleil, respectivamente. As médias de cada intervalo estão na Tabela 5.4. Comparados aos dados do sistema anterior (MEM), os parâmetros das duas cadeias apresentaram valores inferiores. Com a inserção da proteína a área por lipídio teve um acréscimo considerável, conferindo às cadeias maior mobilidade. Assim, o alinhamento imposto é menor, o que diminui o parâmetro de ordem e consequentemente o empacotamento dos lipídios.



**Figura 5.4.6.** Parâmetro de Ordem do Palmitoil, sistema MMRI (todos os intervalos).



**Figura 5.4.7.** Parâmetro de Ordem do Oleil, sistema MMRI (todos os intervalos).

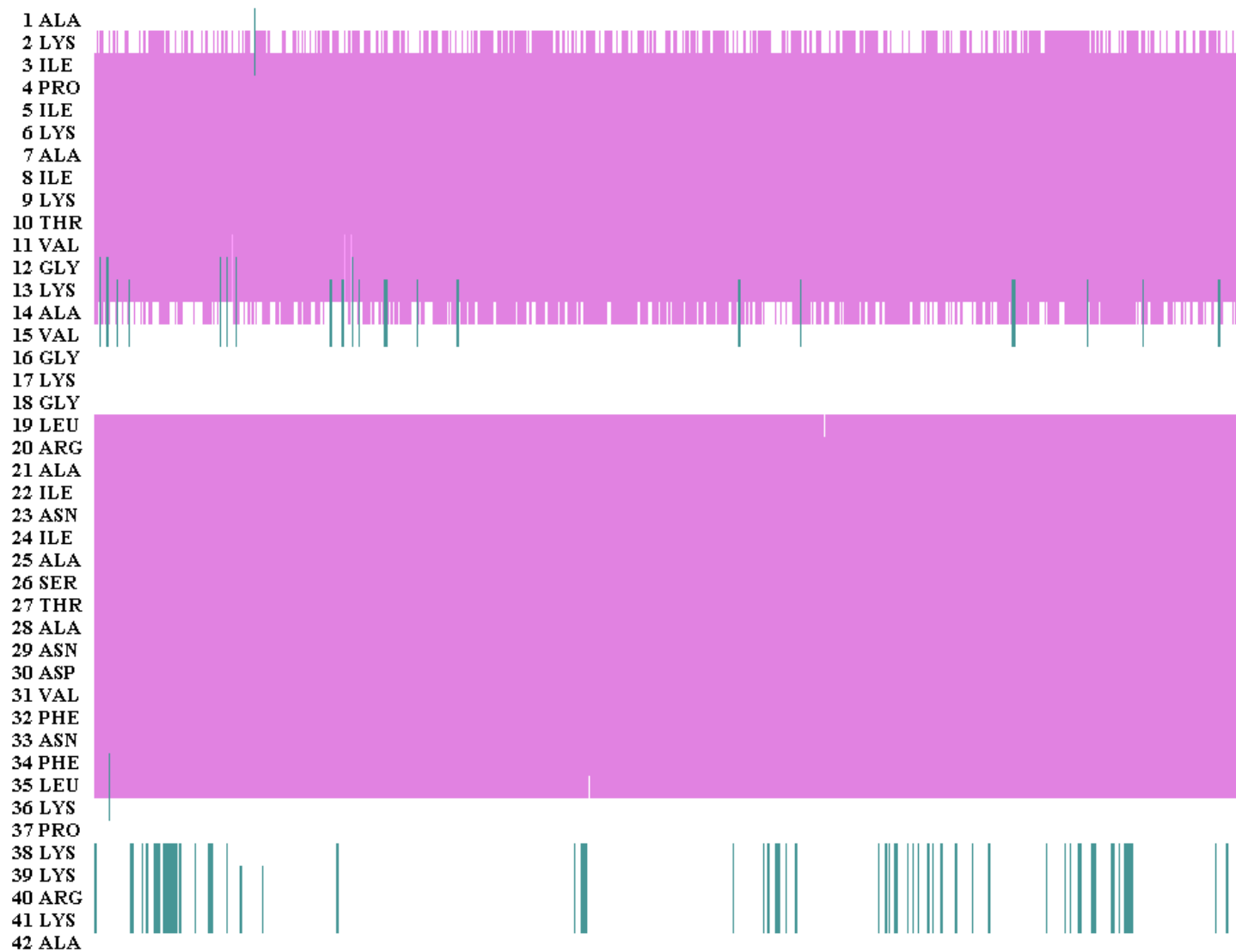
Com a presença da moricina houve um aumento na área da membrana, quando comparado ao sistema anterior, MEM, que não contém peptídeo. Todas as propriedades da membrana analisadas no sistema MMRI são consistentes com o aumento verificado na área por lipídio.

Nas análises de estrutura secundária da moricina, para todos os intervalos, as DSSP se mostram muito semelhantes. Na Figura 5.4.8. é apresentada a DESP do intervalo MMRI 7. A integridade da  $\alpha$ -hélice é quebrada nos resíduos terminais (1-2, e 36-42), o que é previsível. Além desses, também há uma perturbação da estrutura da proteína entre os resíduos 15 a 18 (VAL-GLY-LYS-GLY). Pelo PDM da Figura 5.4.5., aproximadamente em  $z = 0\text{Å}$ , a região da caixa com menor densidade de massa, pode ser identificada em rosa a lisina do resíduo 17.

No vácuo, Figura 5.1.1., a hélice “quebra” exatamente nos resíduos 17 e 18 formando *coil*, e entre 12 e 16 a  $\alpha$ -hélice se deforma e origina um *turn*. Quando solvatada, a proteína conserva a  $\alpha$ -hélice do resíduo 3 ao 35 (Figura 5.2.1.). No sistema MMRI, as hélices preservadas dos resíduos 3 a 14 e 19 a 35 estão “alojadas” no interior da membrana em regiões de maior densidade de massa.

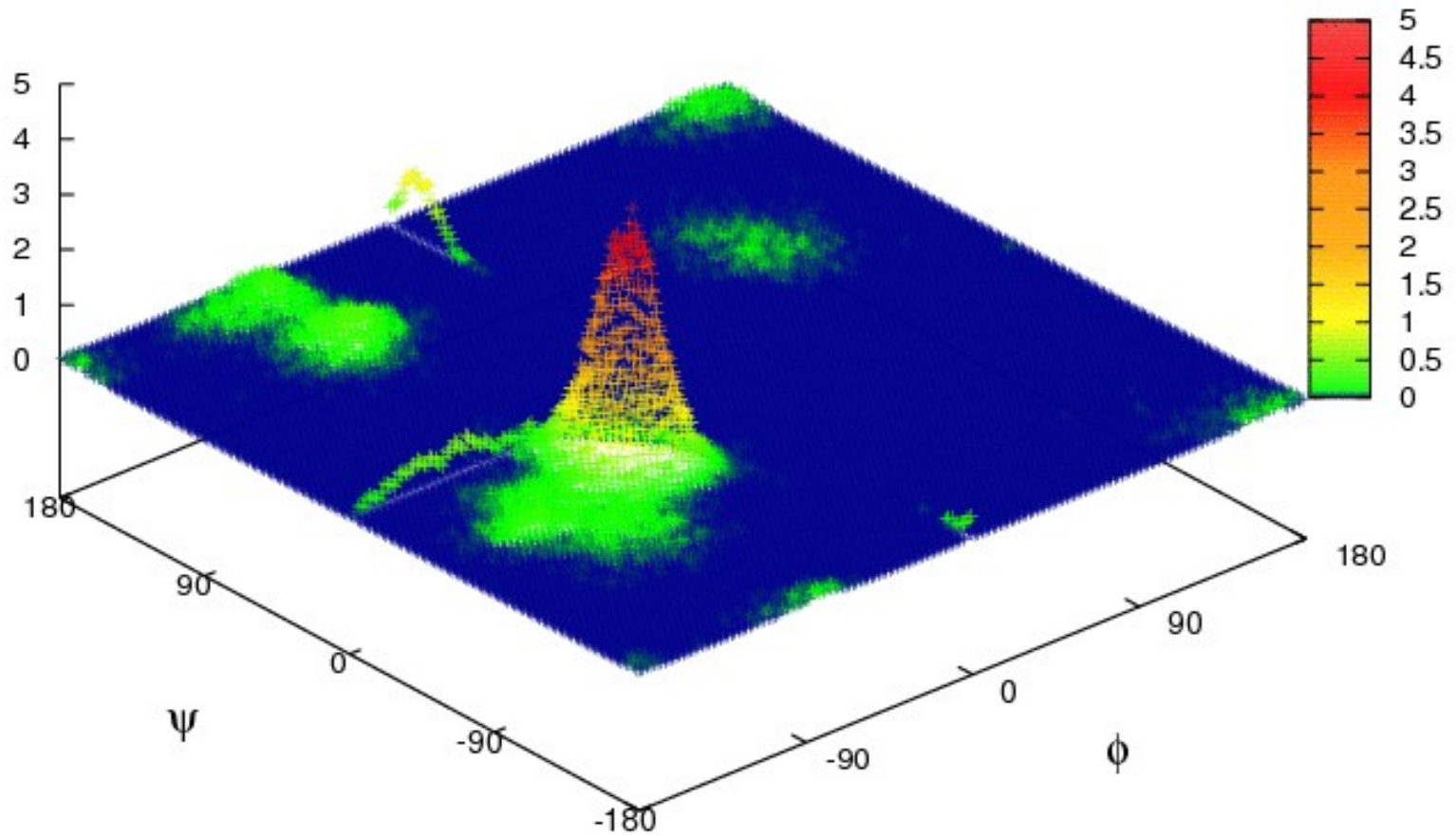
Com relação aos Diagramas de Ramachandran, o máximo de ocorrência para ângulos característicos de  $\alpha$ -hélice chega a 5 pontos em todos os intervalos. Em função da grande semelhança dos Diagramas de cada intervalo, na Figura 5.4.9. são apresentadas as configurações acumuladas durante o intervalo MMRI 7.

A Figura 5.4.10. apresenta o sistema MMRI ao final dos 75 ns de simulação. Pode-se observar a quebra da moricina no interior da membrana, entre resíduos 15 e 18. Nesta Figura pode-se distinguir os átomos de fósforo das cabeças polares (na cor ocre), bem como o peptídeo (colorido conforme a estrutura secundária, com  $\alpha$ -hélice em púrpura; *coil* em branco e *turn* em ciano) no interior da bicamada.

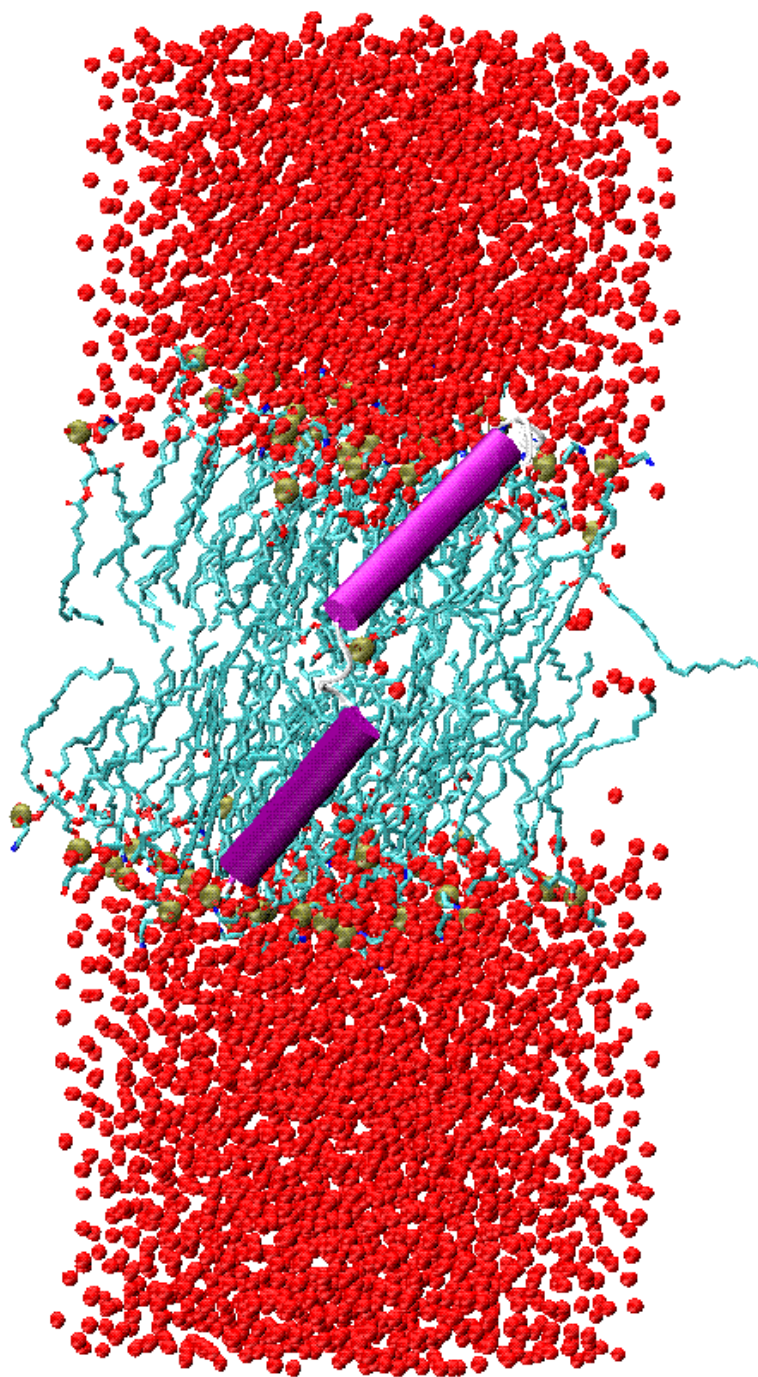


**Figura 5.4.8.** DESP do sistema MMRI, entre 70 e 72 ns: ■  $\alpha$ -hélice; ■  $\pi$ -hélice; ■ *turn*,  *coil*.

"MMR17\_rama.dat" + + +



**Figura 5.4.9.** Diagrama de Ramachandran do sistema MMRI (configurações acumuladas entre 70 e 72 ns).

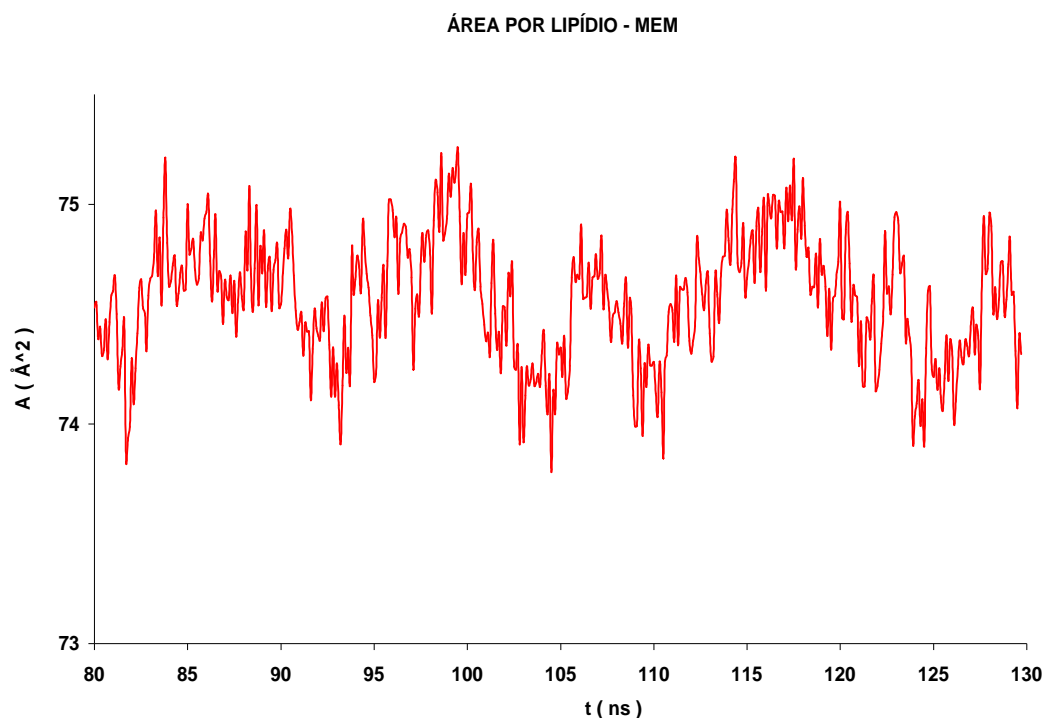


**Figura 5.4.10.** Sistema MMRI após 75 ns de simulação.

## 5.5 MEMBRANA + 6 MORICINAS (CANAL)

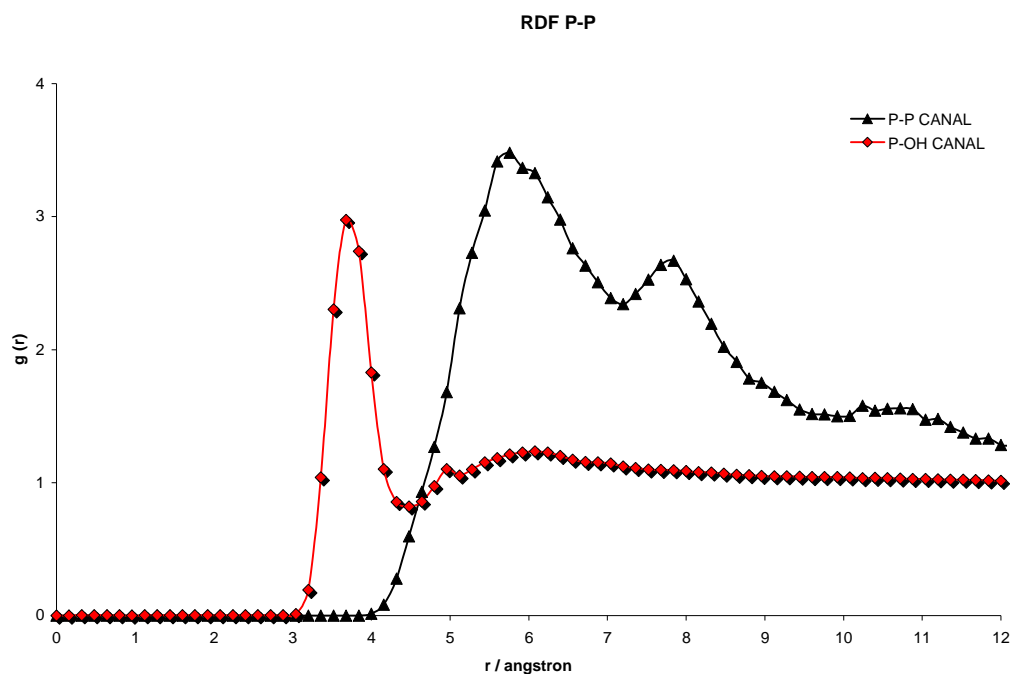
Esse sistema é formado por uma membrana de 122 POPE e 40 POPG, além de 17165 moléculas de água, 49 cloretos e 69 sódios. No interior da membrana foram inseridas 6 moricinas (conforme justificativa do capítulo 4, item 4.5) dispostas como as tabuas de um barril, formando um poro. Os resíduos polares são orientados para o interior do canal, e os apolares para os lipídios da membrana, fazendo a ancoragem do canal.

A simulação deste sistema teve duração total de 130 ns, sendo 80 ns de equilíbrio e 50 ns de aquisição. O intervalo usado para as análises corresponde aos últimos 10 ns. A área por fosfolipídio entre 80 ns e 130 ns é apresentada na Figura 5.5.1.. O valor médio obtido foi de  $74,57 \pm 0,28 \text{ \AA}^2$ , aproximadamente  $25 \text{ \AA}^2$  a mais que no sistema MEM, que corresponde a membrana sem moricina. O sistema MMRI continha 1 peptídeo no interior da membrana e registrou um aumento de  $7,4 \text{ \AA}^2$  na área de cada lipídio em relação ao MEM. No CANAL, se dividirmos o aumento na área pelo número de proteínas, veremos que cada uma corresponde a um aumento de menos de  $4,2 \text{ \AA}^2$  por lipídio, se comparado ao MEM. Isso sugere uma maior compactação da membrana com relação ao MMRI.



**Figura 5.5.1.** Evolução temporal da área por fosfolipídio para o CANAL.

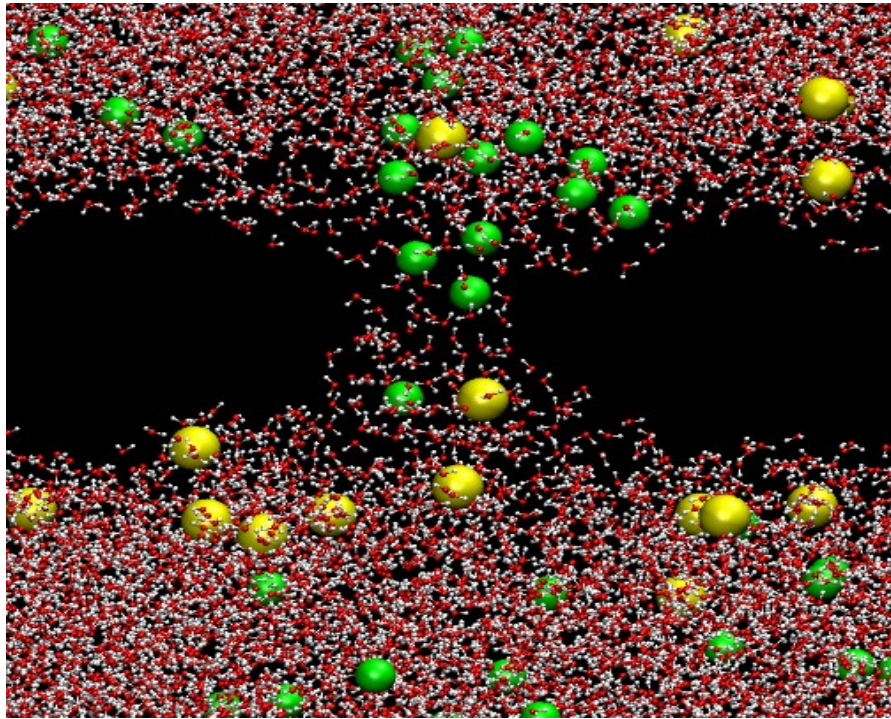
As  $g(r)$  apresentadas na Figura 5.5.2. mostram que as distâncias P – P e P – OH neste sistema são aproximadamente as mesmas verificadas nos sistemas anteriores, MEM e MMRI: 5,8 Å para os lipídios vizinhos; 7,2 Å no final da primeira camada de solvatação; 3,7 Å para as águas coordenadas; 4,5 Å no final da primeira camada de solvatação. Deve-se observar que as interações das cabeças polares com as águas coordenadas não foram modificadas.



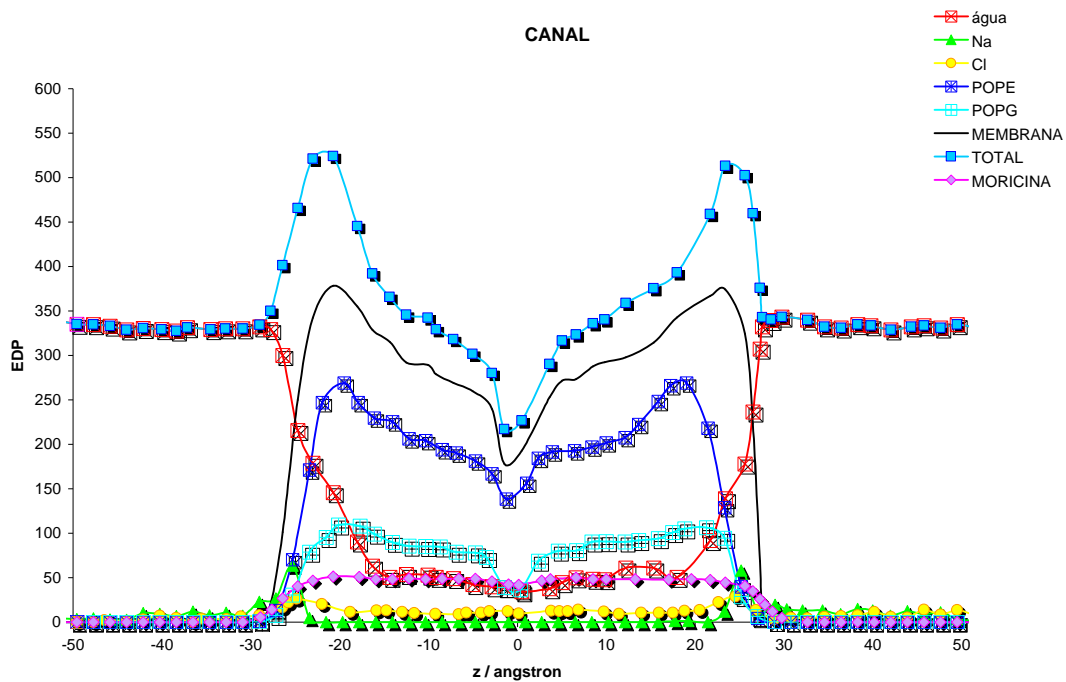
**Figura 5.5.2.** FDR P – P e P – OH do CANAL, calculada entre 120 e 130 ns.

A Figura 5.5.3. mostra moléculas de água e íons no interior do canal. A Figura 5.5.4. mostra o PDM do sistema. Os lipídios e as moricinas não são exibidos para melhor visualização do interior do poro. A altura da bicamada para este sistema foi 47,7 Å, bastante próxima da encontrada para o sistema MMRI, que também apresenta peptídeo no interior da membrana. No sistema MEM, em que foi simulada apenas a membrana, essa altura foi maior, de aproximadamente 50 Å.



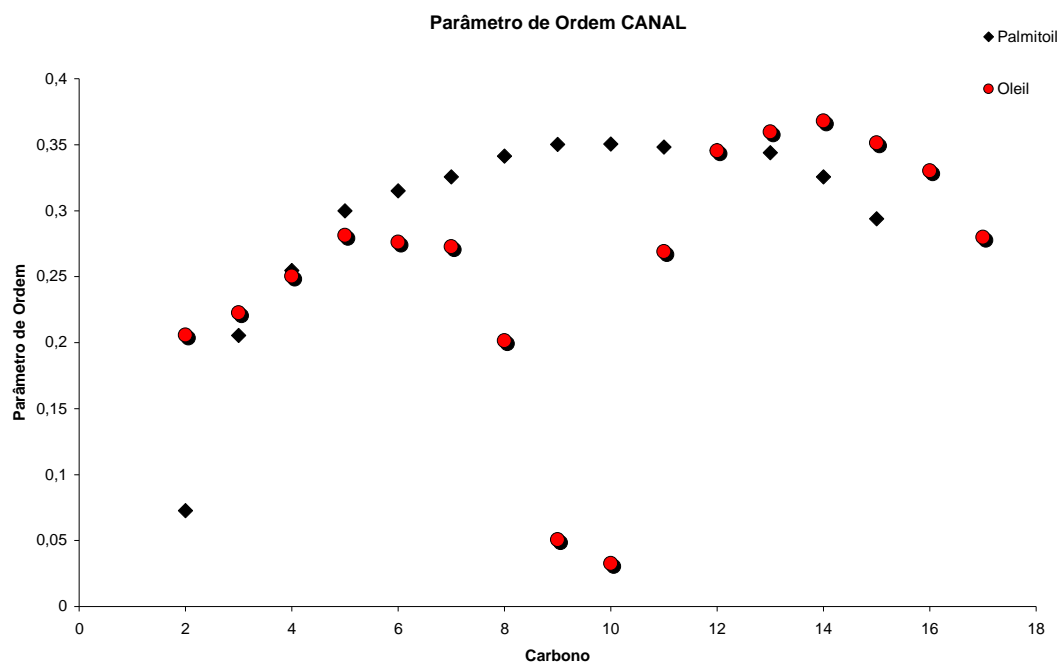


**Figura 5.5.3.** Presença de água e íons (cloreto em verde e sódio em amarelo) no interior do poro formado por 6 moricinas (CANAL).



**Figura 5.5.4.** PDM do CANAL (entre 120 e 130 ns).

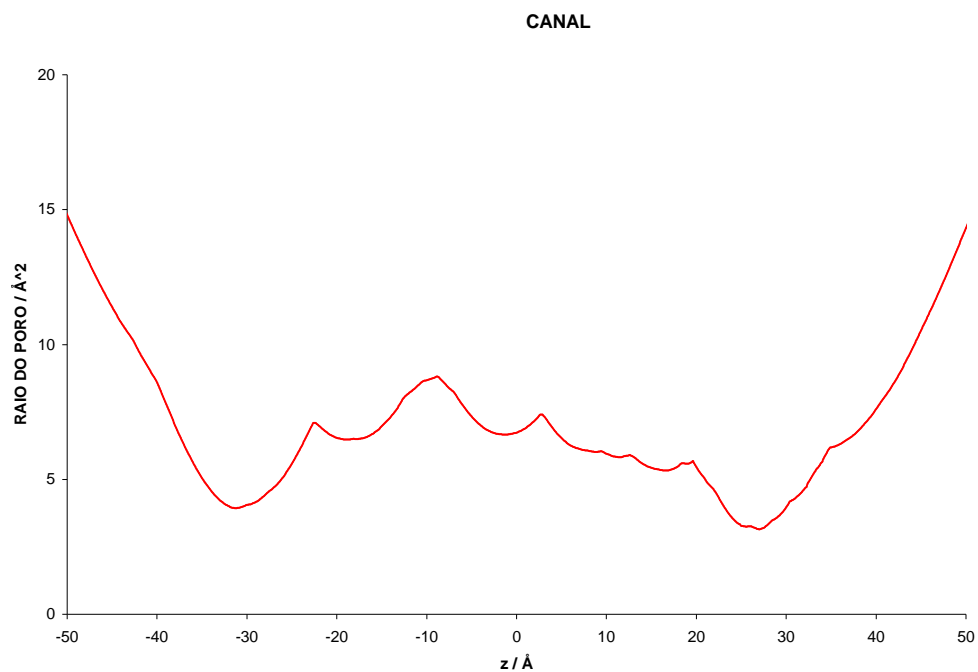
Com relação aos Parâmetros de Ordem das cadeias alifáticas (Figura 5.5.5.), os valores obtidos para este sistema foram  $0,32 \pm 0,03$  para Palmitoil e  $0,26 \pm 0,1$  para Oleil; bastante semelhantes aos parâmetros do sistema MEM, cuja área se manteve estável. As médias calculadas para o sistema MMRI foram menores, o que pode ser atribuído à área deste, que apresentou variações mais pronunciadas. As principais diferenças apresentadas com relação ao sistema MMRI são referentes às propriedades dos lipídios. Assim como as variações da área, as demais análises são influenciadas pelas movimentações destes.



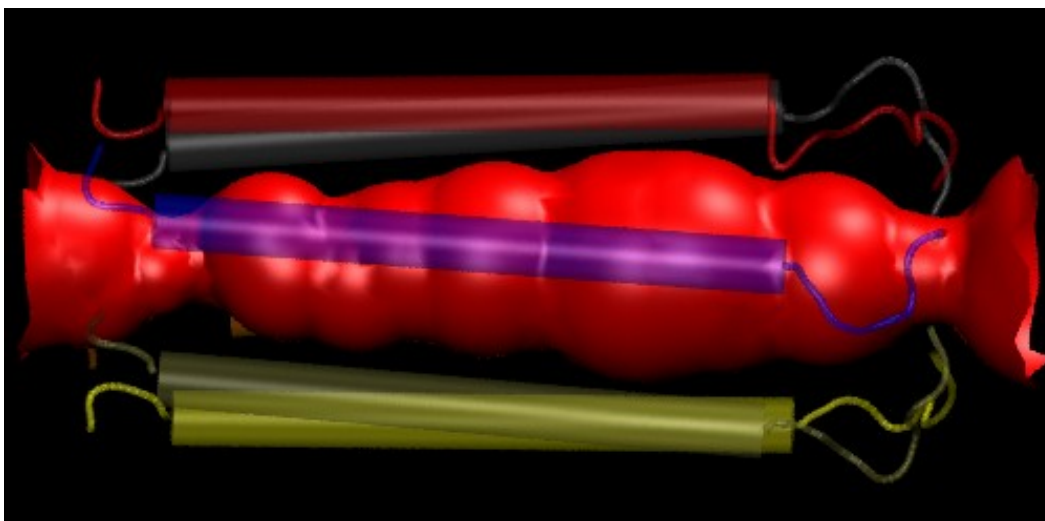
**Figura 5.5.5.** Parâmetros de Ordem para Palmitoil e Oleil, no sistema CANAL.

As Figuras 5.5.6. e 5.5.7. apresentam o perfil do raio interno do canal, ao longo da do eixo z. O cálculo foi feito com o software HOLE<sup>[86],[87]</sup>, conforme o item f deste capítulo. O raio mínimo foi de 3,14 Å.

As análises de DESP e Ramachandran da estrutura secundária das moricinas no canal são apresentadas nas Figuras 5.5.8. e 5.5.9., respectivamente. Na DESP pode ser verificada a formação de  $\pi$ -hélice, quando o número de resíduos num *turn* passa de 3 para 5 com a formação de ligação de hidrogênio entre os resíduos 2 e 7, aumentando o “diâmetro” da hélice. Nesse caso, os ângulos  $\phi$  e  $\psi$  são praticamente os mesmos da  $\alpha$ -hélice e a região ocupada no Diagrama de Ramachandran continua sendo a mesma.



**Figura 5.5.6.** Perfil do Raio do Poro do CANAL em  $\text{\AA}^2$ , avaliado entre 120 ns e 130 ns.

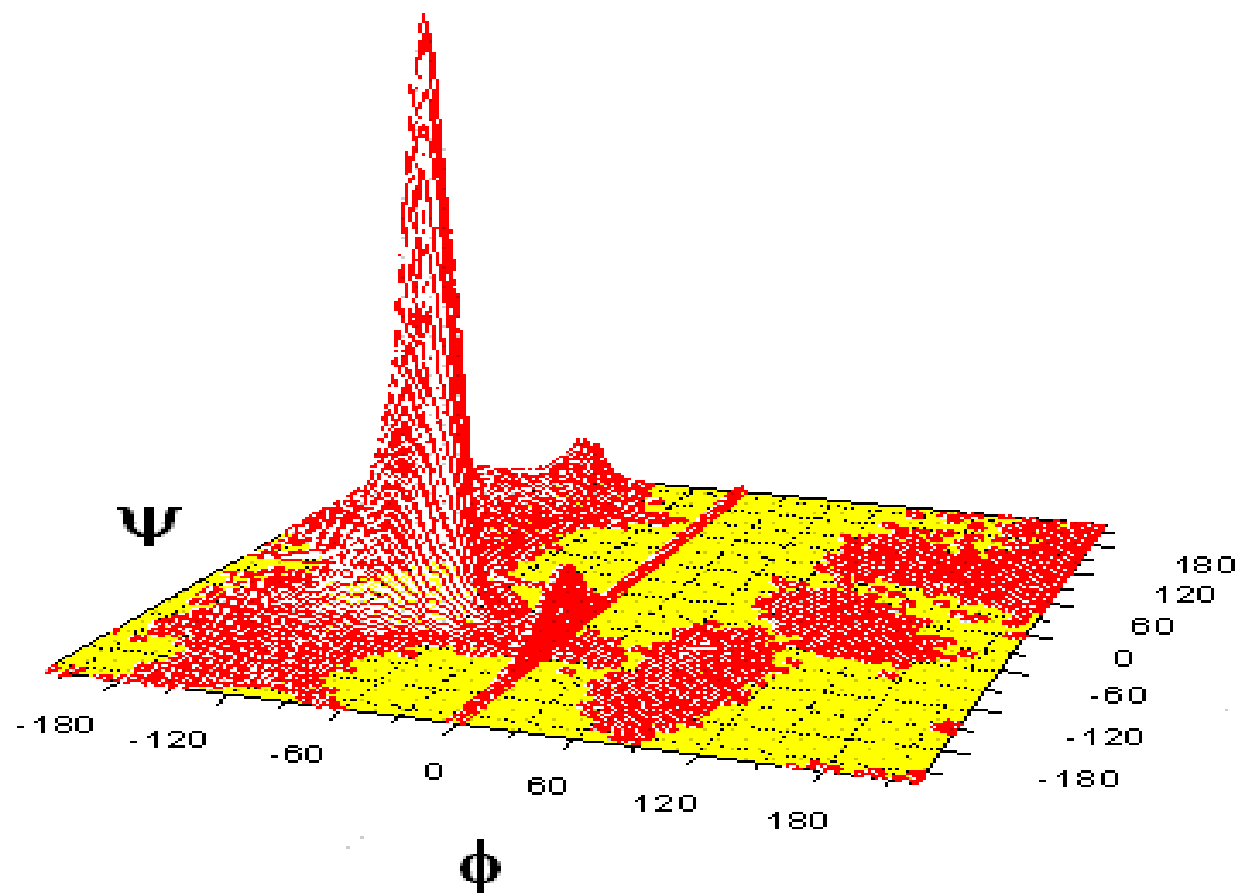


**Figura 5.5.7.** Preenchimento volumétrico do poro, em vermelho, formado por 6 moricinas no sistema CANAL.

Outra observação é referente aos resíduos 15 a 18, que no sistema MMRI apresentaram desestruturação da  $\alpha$ -hélice, “quebrando” a moricina. Comparando-se as análises de DESP deste e daquele sistemas percebe-se que a faixa branca, que corresponde a formação de *coil*, não aparece aqui para estes resíduos, e a hélice é conservada. A perda da estrutura  $\alpha$ -hélice ocorre principalmente nos resíduos terminais 40 a 42. Do 1 ao 11 o que se verifica é a oscilação entre *turn*,  $\alpha$  e  $\pi$ -hélice, com pequenas variações nos ângulos  $\phi$  e  $\psi$ .



Figura 5.5.8. DESP do sistema CANAL, entre 120 e 130 ns: ■  $\alpha$ -hélice; ■  $\pi$ -hélice; ■ *turn*,  *coil*.

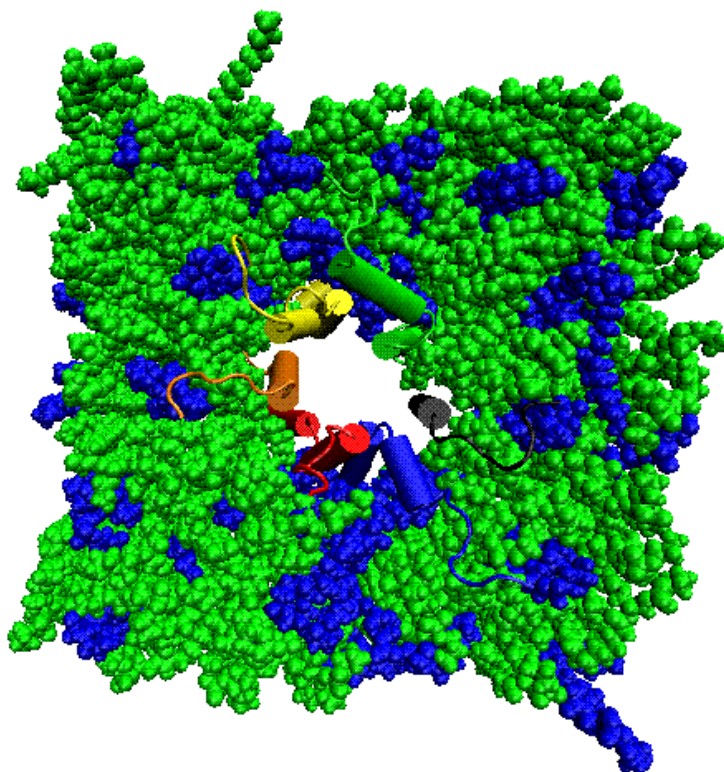


**Figura 5.5.9.** Diagrama de Ramachandran do CANAL, configurações acumuladas entre 120 e 130 ns.

Com a formação do canal, a integridade da  $\alpha$ -hélice é mantida mesmo na região de maior fluidez da membrana. A orientação dos resíduos hidrofílicos de todas as moricinas para o centro do poro estabilizou a estrutura destas. Apenas os resíduos hidrofóbicos estão em contato com os lipídios. Sem “dobramentos” das moricinas, a área por lipídio também apresenta menor variação.

A permeabilidade da membrana é regulada pela bactéria, permitindo manter o gradiente eletrolítico estabelecido no interior da célula em relação ao meio. A passagem de moléculas de água e de íons pela membrana, através do canal, desfaz essa condição e desestabiliza a célula.

A Figura 5.5.10. mostra uma vista superior (na direção da Normal da membrana) do sistema CANAL. Nesta imagem foram omitidas as moléculas de água e íons, e pode-se observar a disposição das moricinas originando o poro no interior da bicamada.



**Figura 5.5.10.** Vista superior do sistema CANAL, com os lipídios POPE em verde e POPG em azul.

## 6. CONCLUSÃO

A partir dos 5 sistemas simulados foi possível verificar a perturbação da membrana pela moricina, o que valida a metodologia aplicada. Este peptídeo catiônico tem atividade bactericida constatada<sup>[71]</sup>, e segundo os modelos de atuação sugeridos a moricina deve agir inserindo-se na membrana bacteriana<sup>[22],[23]</sup>. A permeabilidade da membrana é regulada pela bactéria a fim de manter o equilíbrio interno da célula. Dessa forma, é possível manter através da bicamada um gradiente eletrolítico que preserva o microorganismo. Quando a moricina é inserida na bicamada, provoca um aumento da área por lipídio, o que resulta num aumento da permeabilidade da membrana.

No sistema contendo uma moricina no vácuo foi observado o “dobramento” da cadeia peptídica, com perda da estrutura  $\alpha$ -hélice. Os resíduos carregados não estabilizados se aproximam, causando a “quebra” da hélice em vários pontos, originando *turns* e *coils*. Com a solvatação em água a integridade da hélice é preservada, com perda da estrutura apenas nos resíduos terminais, o que é previsível, considerando sua maior mobilidade.

Para a bicamada hidratada sem proteína e com íons, a estabilização é facilmente atingida após 20 ns de simulação. Este sistema apresenta o maior empacotamento, correspondendo a menor área por lipídio, ao maior parâmetro de ordem e à maior altura de repetição.

Com a inserção de uma molécula de moricina foi verificada a desestabilização da membrana, refletida na variação das propriedades analisadas. Essas interações também causam a quebra da  $\alpha$ -hélice dos resíduos localizados na região de maior fluidez, ou menor densidade. Houve penetração de um pequeno número de moléculas de água no interior da membrana na cavidade que contém proteína.

Não é possível prever o comportamento de íons cloreto caso estes fossem adicionados ao sistema, mas considerando a penetração de algumas moléculas de água na membrana deve-se considerar a possibilidade de estas “carregarem” ânions consigo. Embora as cargas do sistema tenham sido neutralizadas, a não inserção de cloretos no sistema MMRI pode ter sido um equívoco. Em função do alto custo computacional das simulações de membranas os cálculos não foram repetidos neste trabalho.

Com a inserção do hexâmero na membrana, a redução dos contatos desfavoráveis entre os resíduos carregados da moricina e as cadeias alifáticas dos lipídios estabilizou a  $\alpha$ -

hélice. Com o interior do poro totalmente hidrofílico, verifica-se o preenchimento total do canal por moléculas de água e íons; o gradiente de concentrações através da membrana (necessárias para manutenção das funções celulares) é destruído, e a bactéria é consumida.

O processo bactericida é desencadeado pela fixação do *CPA* (peptídeo catiônico) no interior da membrana. A ancoragem do peptídeo na bicamada não foi investigada aqui, mas para os sistemas estudados acreditamos que sejam os resíduos apolares os responsáveis devido às interações com as cadeias hidrofóbicas dos lipídios. Em função das interações desfavorecidas entre os resíduos hidrofílicos com o interior hidrofóbico da membrana, estes devem estar voltados para o interior do canal. Desta forma, são os resíduos polares e carregados que promovem o escoamento da água e íons através da membrana.

A finalização deste trabalho deixa questões em aberto que podem ser apontadas como perspectivas. As mais relevantes dizem respeito a estudos estruturais do peptídeo, para identificação das funções desempenhadas pelos resíduos que o compõe. Dessa forma pode ser possível apontar os resíduos fundamentais na atividade bactericida, desde a penetração e ancoragem na membrana bacteriana até o estabelecimento do fluxo através desta. O estudo das interações de moricinas mutantes, além de outros peptídeos da mesma família, com membranas pode ser utilizado para identificação funcional dos resíduos.

Outro aspecto que deve ser considerado na continuidade deste estudo é a simulação do sistema MMRI com a inserção de íons cloreto e sódio. Esses cálculos poderiam esclarecer o comportamento da área da membrana que não estabilizou, ou a “quebra” verificada na estrutura  $\alpha$ -hélice da moricina.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Cooper, G.M.; *A Célula: Uma Abordagem Molecular*; Artmed: Porto Alegre, 2001.
- [2]. Voet, D.; Voet, J.G.; Pratt, C.W.; *Fundamentos de Bioquímica*; Artmed: Porto Alegre, 2000.
- [3]. Devlin, T.M.; *Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas*; Edgard Blücher: São Paulo, 2003.
- [4]. MacCallum, J.L.; Mukhopadhyay, P.; Luo, H.; Tieleman, D.P.; In *Proceedings of the 17th Annual International Symposium on High Performance Computing Systems and Applications and the OSCAR Symposium*, Senechal D.(Edt.), NRC Research Press; Ottawa: Canada, **2003**, p 115.
- [5]. Byrne, B.; Iwata, S.; *J. Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, 12, 239.
- [6]. Oizumi, Y.; Hemmi, H.; Minami, M.; Asaoka, A.; Yamakawa, M.; *Biochim. Biophys. Acta*, **2005**, 1752, 83.
- [7]. La Rocca, P.; Biggin, P.C.; Tieleman, D.P.; Sansom, M.S.P.; *Biochim. Biophys. Acta.* **1999**, 1462, 185.
- [8]. Epand, R.M.; Vogel, H.J.; *Biochim. Biophys. Acta.* **1999**, 1462, 11.
- [9]. Ding, B.; Guan, Q.; Walsh, J.P.; Boswell, J.S.; Winter, T.W.; Winter, E.S.; Boyd, S.S.; Li, C.; Savage, P.B.; *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 663.
- [10]. Murzyn, K.; Róg, T.; Pasenkiewicz-Gierula, M.; *Biophys. J.* **2005**, 88, 1091.
- [11]. Róg, T.; Murzyn, K.; Pasenkiewicz-Gierula, M.; *Acta Biochim. Polon.* **2003**, 50 (3), 789.
- [12]. Pasenkiewicz-Gierula, M.P.; Murzyn, K.; Róg, T.; Czaplewski, C.; *Acta Biochim. Polon.* **2000**, 47 (3), 601.
- [13]. Hara, S.; Yamakawa, M.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 220 (3), 664.
- [14]. Hemmi, H.; Ishibashi, J.; Hara, S.; Yamakawa, M.; *FEBS Lett.*, **2002**, 518, 33.
- [15]. Hara, S.; Yamakawa, M.; *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270 (50), 29923.
- [16]. Essmann, U.; Berkowitz, M.L.; *Biophys. J.* **1999**, 76, 2081.
- [17]. Anézo, C.; de Vries, A.H.; Höltje, H.D.; Tieleman, D.P.; Marrink, S.J.; *J. Phys. Chem. B*, **2003**, 107, 9424.
- [18]. Forrest, L.R.; Sansom, M.S.P.; *J. Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, 10, 174.
- [19]. Feller, S.E.; *J. Curr Opin. Coll. Int. Sci.* **2000**, 5, 217.

- [20]. Widom, B.; Bhimalapuram, P.; Koga, K.; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, 5 (15), 3085.
- [21]. Navas, B.P.; Raghunathan, V.A.; Katsaras, J.; Rappolt, M.; Lohner, K.; Pabst, G.; *Phys. Rev. Lett.*, **2003**, 91 (2), id. 028101.
- [22]. Wennerström, H.; Sparr, E. *Pure Appl. Chem.*, **2003**, 75 (7), 905.
- [23]. Polozov, I.V.; Gawrish, K. *Biophys. J.*, **2004**, 87, 1741.
- [24]. Leviski, R.S.; Stassen, H.K.; Gonçalves, P.F.B.; em preparação.
- [25]. Böckmann, R.A.; Grubmüller, H.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 1021.
- [26]. Pandit, S.A.; Bostick, D.; Berkowitz, M.L.; *Biophys. J.* **2003**, 84, 3743.
- [27]. Mukhopadhyay, P.; Monticelli, L.; Tieleman, D.P.; *Biophys. J.* **2004**, 86, 1601.
- [28]. Simons, K.; Vaz, W.L.C.; *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2004**, 33, 269.
- [29]. Jacobson, K.; Dietrich, C.; *Trends in Cell Biol.* **1999**, 9, 87.
- [30]. Dowhan, W.; *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, 66, 199.
- [31]. Edidin, M.; *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2003**, 32, 257.
- [32]. Domene, C.; Bond, P.J.; Deol, S.S.; Sansom, M.S.P.; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14966.
- [33]. Cascales, J.J.L.; de la Torre, J.G.; Marrink, S.J.; Berendsen, H.J.C.; *J. Chem. Phys.* **1996**, 104 (7), 2713.
- [34]. Suits, F.; Pitman, M.C.; Feller, S. E.; *J. Chem. Phys.*, **2005**, 122, 244714.
- [35]. Tieleman, D.P.; Berendsen, H.J.C.; *J. Chem. Phys.*, **1996**, 105, 4871.
- [36]. Tieleman, D.P.; *Theoretical studies of membrane models: molecular dynamics of water, lipids and membrane proteins*. PhD thesis, University of Groningen, **1998**. ISBN: 90 367 0997 0.
- [37]. Feller, S.; Pastor, R.W.; *J. Chem. Phys.*, **1999**, 111, 1281.
- [38]. Feller, S.E.; Zhang, Y.; Pastor, R.W.; *J. Chem. Phys.*, **1995**, 103, 10267.
- [39]. de Vries, A.H.; Chandrasekhar, I.; van Gunsteren, W.F.; Hunenberger, P.H.; *J. Chem. Phys. B.* **2005**, 109, 11643.
- [40]. Edholm, O.; Nagle, J.F.; *Biophys. J.* **2005**, 89, 1827.
- [41]. Ash, W.L.; Zlomislic, M.R.; Oloo, E.O.; Tieleman, D.P.; *Biochim. Biophys. Acta.* **2004**, 1666, 158.
- [42]. Engelman, D.M.; *Nature*, **2005**, 438, 578.
- [43]. Shinoda, W.; Namiki, N.; Okazaki, S.; *J. Chem. Phys.*, **1997**, 106, 5731.
- [44]. Pandit, S.A.; Berkowitz, M.L.; *Biophys. J.* **2002**, 82, 1818.
- [45]. Biggin, P.C.; Sansom, M.S.P.; *Biophys. Chem.* **1999**, 76, 161.

- [46]. Jorgensen, W.L.; Madura, J.D.; *Mol. Phys.*, **1985**, 56, 1381
- [47]. Kabsch, W.; Sander, C.; *Biopolymers*, **1983**, 22 (12), 2577.
- [48]. Savage, P.B.; Li, C.; Taotafa, U.; Ding, B.; Guan, Q.; *FEMS Microbiol. Lett.* **2002**, 217, 1.
- [49]. Hancock, R.E.; Lehrer, R.; *Trends Biotechnol.* **1998**, 16 (2), 82.
- [50]. La Rocca, P.; Shai, Y.; Sansom, M.S.P.; *Biophys. Chem.*, **1999**, 76, 145.
- [51]. van Gunsteren, W.F.; Berendsen, J.C.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 992.
- [52]. Kale, L.; Skeel, R.; Bhandarkar, M.; Brunner, R.; Gursoy, A.; Krawetz, N.; Phillips, J.; Shinozaki, A.; Varadarajan, K.; Schulten, K. *Journal of Computational Physics*, **1999**, 151, 283.
- [53]. [www.gromacs.org](http://www.gromacs.org)
- [54]. MacKerell, A.D., Jr., Feig, M., Brooks, C.L., *J. Comp. Chem.*, **2004**, 25, 1400.
- [55]. MacKerell, Jr., A. D.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack Jr., R.L.; Evanseck, J.D.; Field, M.J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F.T.K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D.T.; Prodhom, B.; Reiher, W.E.; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J.C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiorkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M.; *J. Phys. Chem. B.*, **1998**, 102, 3586.
- [56]. Feller, S.E. Gawrisch, G.; MacKerell, Jr., A.D.; *JACS*, **2002**, 124, 318.
- [57]. Feller, S. and MacKerell, Jr., *J. Phys. Chem. B.*, **2000**, 104, 7510.
- [58]. Schlenkrich, M., Brickmann, J., MacKerell, Jr., A.D.; Karplus, M.; in *Biological Membranes: A Molecular Perspective from Computation and Experiment*, K.M. Merz, B. Roux, Birkhauser: Boston, **1996**, 31-81.
- [59]. Beglov, D.; Roux, B.; *J. Chem. Phys.*, **1994**, 100, 9050.
- [60]. Brooks, B.R.; Bruccoleri, R.E.; Olafson, B.D.; States, D.J.; Swaminathan, S.; Karplus, M.; *J. Comp. Chem.* **1983**, 4 (2), 187. Polozov, I.V.; Gawrish, K. *Biophys. J.*, **2004**, 87, 1741.
- [61]. Foloppe, N.; Mackerell Jr., A. *J. Comp. Chem.*, **2000**, 21, 86.
- [62]. Brünger, A.T.; *X-PLOR, Version 3.1, A System for X-ray Crystallography and NMR*. The Howard Hughes Medical Institute and Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University, 1992.
- [63]. Allen, M.P.; Tildesley, D.J.; *Computer Simulation of Liquids*; Oxford University Press; Nova Iorque, 1987

- [64]. Bhandarkar, M.; Brunner, R.; Chipot, C.; Dalke, A.; Dixit, S.; Grayson, P.; Gullingsrud, J.; Gursoy, A.; Humphrey, W.; Hurwitz, D.; Krawetz, N.; Nelson, M.; Phillips, J.; Shinozaki, A.; Zheng, G.; Zhu, F.; *Namd User Guide*, Theoretical Biophysics Group, Beckman Institute, University of Illinois, 2002.
- [65]. Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. *J. Chem. Phys.* **1983**, 79, 926.
- [66]. Mahoney, M.W.; Jorgensen, W.L.; *J. Chem. Phys.*, **2000**, 112, 8910
- [67]. [www.ks.uiuc.edu/Research/namd/mailling\\_list/namaz.cgi?query=TIP3](http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/mailling_list/namaz.cgi?query=TIP3)
- [68]. Thornton, J.B.; Marion, S.T.; *Classical Dynamics of Particles and Systems*; Thomson Brooks/Cole: Pacific Grove, 1995.
- [69]. Frenkel, D.; Smit, B.; *Understanding Molecular Simulation*; Academic Press; Nova Iorque, 1996.
- [70]. Berry, R.S.; Rice, S.A.; Ross, J.; *Physical Chemistry*, Oxford; Nova Iorque, 2000.
- [71]. Feller, S.E.; Zhang, Y.H.; Pastor, R.W.; Brooks, B.R.; *J. Chem. Phys.*, **1995**, 103, 4613.
- [72]. Martyna, G.J.; Tobias, D.J.; Klein, M.L.; *J. Chem. Phys.*, **1994**, 101, 5.
- [73]. Feller, S.E.; Zhang, Y.; Pastor, B.R.; *J. Chem. Phys.*, **1995**, 103, 11.
- [74]. Isgro, T.; Phillips, J.; Sotomayor, M.; Villa, E.; *Namd Tutorial*, Theoretical Biophysics Group, Beckman Institute, University of Illinois, 2005.
- [75]. Van der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; van Buuren, A.R.; Apol, E.; Meulenhoff, P.J.; Tieleman, D.P.; Sijbers, A.L.T.M.; Feenstra, K.A.; van Drunen, R.; Berendsen, H.J.C.; *Gromacs User Manual version 3.2*, [www.gromacs.org](http://www.gromacs.org) (2004)
- [76]. Ryckaert, J.P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H.J.C.; *J. Comp. Phys.*, **1977**, 23 (3), 327.
- [77]. Andersen, H.C.; *J. Comput. Phys.*, **1983**, 52, 24.
- [78]. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K.; *J. Molec. Graph.* **1996**, 14.1, 33.
- [79]. Darden, T.A.; York, D.; Pedersen, L.G.; *J. Chem. Phys.*, **1993**, 98, 10089.
- [80]. [www.expasy.org/cgi-bin/get-pdb.pl?1kv4](http://www.expasy.org/cgi-bin/get-pdb.pl?1kv4)
- [81]. [www.antheprot-pbil.ibcp.fr/helical\\_wheel.html](http://www.antheprot-pbil.ibcp.fr/helical_wheel.html)
- [82]. Gullingsrud, J.; Schulten, K.; *Biophys. J.* **2004**, 86 (6), 3496.
- [83]. Souza, M.H.L.; Elias, D.O.; *Fundamentos da Circulação Extra Corpórea*; Centro Editorial Alfa-Rio: Rio de Janeiro, 1995.
- [84]. Feller, S.E.; "Molecular Dynamics Simulation of Phospholipid Bilayers" in Katsaras, J.; Gutberlet, T.; *Lipid Bilayers*. (Eds.), Springer, **2000**:89-107.
- [85]. *IUPAC Compend. Chem. Terminol.*, **1994**, 66, 587.

- [86]. [www.csb.yale.edu/userguides/graphics/hole/doc/hole\\_d00.html](http://www.csb.yale.edu/userguides/graphics/hole/doc/hole_d00.html)
- [87]. Smart, O.S.; Goodfellow, J.M.; Wallace, B.A.; *Biophys. J.*, **1993**, 65, 2455.