



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANDRESA MESSIAS DA SILVA

**EFEITO DE ÍONS Al^{3+} , Na^{+} E Cl^{-} EM BICAMADAS DE LIPÍDIO A:
ESTUDO METODOLÓGICO E ESTRUTURAL POR DINÂMICA MOLECULAR**

Recife
2019

ANDRESA MESSIAS DA SILVA

**EFEITO DE ÍONS Al^{3+} , Na^{+} E Cl^{-} EM BICAMADAS DE LIPÍDIO A:
ESTUDO METODOLÓGICO E ESTRUTURAL POR DINÂMICA MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química

Área de concentração: Química Teórica

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Thereza Soares

Co-orientador: Dr. Frederico Pontes

Recife
2019

Catálogo na fonte
Bibliotecária Arabelly Ascoli CRB4-2068

S586e Silva, Andresa Messias da
Efeito de íons Al^{3+} , Na^+ e Cl^- em bicamadas de lipídio A: estudo metodológico e estrutural por dinâmica molecular / Andresa Messias da Silva. – 2019.
144 f.: il. fig., tab.

Orientadora: Thereza Soares
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química. Recife, 2019.
Inclui referências e apêndices.

1. Lipídio A. 2. Alumínio. 3. Rigidificação de membranas. I. Soares, Thereza (orientadora). II. Título.

541.2 CDD (22. ed.) UFPE-CCEN 2020-131

ANDRESA MESSIAS DA SILVA

**EFEITO DE ÍONS AL^{3+} , NA^{+} E CL^{-} EM BICAMADAS DE LIPÍDIO A:
ESTUDO METODOLÓGICO E ESTRUTURAL POR DINÂMICA MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química

Aprovada em: 18/12/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^a.Dr^a. Thereza Amélia Soares da Silva (Orientadora)

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a.Dr^a. Kaline Rabelo Coutinho (Examinadora Externa)

Instituto de Física
Universidade de São Paulo

Prof^o. Dr. Roberto Dias Lins Neto (Examinador Interno)

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
FIOCRUZ

Dedico este trabalho à minha mãe, Aline, por todo amor e por ser meu alicerce, me motivando a seguir meus sonhos. E aos meus grandes amigos Jéssica e Ayron que, embora não estejam mais aqui, todo amor dado por eles foi suficiente por uma vida inteira. Existem um monte de pequenas razões para as grandes coisas acontecerem em nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

Ao chegar na reta final desta etapa em minha vida, não consigo imaginar como tudo teria acontecido sem o suporte, carinho e amizade de muitas pessoas.

“Você não pode pular direto para o final, a jornada é a melhor parte.” HIMYM

Meus sinceros agradecimentos à minha orientadora, Thereza Soares, por todos estes anos de convívio científico, pela paciência, ensinamentos e incentivos a minha formação profissional e pessoal. Ao meu coorientador, Frederico Pontes, por todo suporte e discussões produtivas durante toda a produção deste trabalho.

Agradeço à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa concedida durante o crescimento deste projeto, as agências que possibilitaram a infraestrutura e participação em eventos, como: Biomol/CAPES e STINT, e ao centro de computação de alto desempenho: HPC2N (Umea University).

Aos amigos e companheiros do grupo BIOMAT pela boa convivência, conversas e muita ciência compartilhada: Breno, Diane, Manoela Paschoal, Manuela Nader, Vinícius, Yeny e em especial ao Denys pelos debates dos estudos metodológicos e à Larissa pela grande amizade e por ter me feito apreciar valiosas discussões acompanhadas sempre por uma boa xícara de café. Amizade é um reflexo involuntário. Simplesmente acontece, você não pode evitar.

Ao Fred, pelo amor, companheirismo e paciência. Por todas as vezes que segurou minhas mãos e me motivou a seguir em frente. Serei sempre grata ao universo por ter você e as nossas filhotas de 4 patas, Sirizinha e Zoezinha. É engraçado como as vezes a gente apenas... Encontra as coisas!

Às minhas amigas de longa data, Raquel, Carol, Emmely e Thais. A amizade e apoio que recebi foi o que me manteve forte. Obrigada por estarem ao meu lado em todas as minhas conquistas, porque tudo que você faz na sua vida só será legendário se seus amigos estiverem lá para ver.

Science is made up of mistakes, but they are mistakes which it is useful to make, because they lead little by little to the truth. (J. VERNE, 1864, p.75)

RESUMO

O Lipídio A é um dissacarídeo fosforilado contendo um número variável de cadeias aciladas e são uma pequena parte da estrutura da molécula de lipopolissacarídeo (LPS) que compõe a membrana externa de bactérias Gram-negativas. O Lipídio A é um poderoso estimulante do sistema imune inato e adaptativo de mamíferos e é o principal responsável pela endotoxicidade de bactérias Gram-negativas. Nos últimos anos, o Lipídio A monofosforilado combinado com sais de alumínio tem sido comumente usado como adjuvante de vacinas, pois induz perfis de citocinas similares como LPS, mas é pelo menos 100 vezes menos tóxico. Neste trabalho, investigamos a influência de cátions alumínio em bicamadas de Lipídio A mono- e difosforilado usando simulações atômicas de dinâmica molecular em diferentes regimes de concentração salina: (a) 0 mM, em que íons Al^{3+} foram adicionados apenas para neutralizar a carga total do sistema; (b) 150 mM de AlCl_3 e (c) 150 mM de NaCl . O protocolo das simulações foi decidido após extensos testes relacionados às configurações iniciais, tratamento eletrostático de longo alcance e etapas de termalização e equilíbrio. Os testes metodológicos apontaram que para sistemas bastante carregados, como os estudados neste trabalho, o ideal é realizar uma minimização de energia seguida de etapas NVT e NpT, pois isso fornece uma melhor distribuição das velocidades das partículas, resultando em valores mais estáveis de pressão e energia cinética no início da fase NpT. Este protocolo permite que os sistemas atinjam de maneira mais rápida a fase de equilíbrio em relação ao protocolo anteriormente utilizado. A estrutura do Lipídio A na montagem das bicamadas não influenciou significativamente a estrutura final das simulações, mas interferiu no tempo necessário para atingir a fase equilibrada dos sistemas. Em relação ao efeito do cátion Al^{3+} , foi observado que de forma geral o cátion provoca rigidez e grande ordenamento nas cadeias aciladas do Lipídio A, favorecendo a planaridade das bicamadas lipídicas. Nestes sistemas são obtidos valores de parâmetro de ordem típicos de membranas na fase gel. Entretanto, o cátion Na^+ diminui estes efeitos provocados pelo cátion Al^{3+} , tornando os lipídios mais fluidos e desordenados. Este aumento da desordem dos lipídios é devido a maior hidratação das membranas provocada pela presença dos cátions Na^+ .

Palavras-chave: Lipídio A. Alumínio. Rigidificação de membranas. Endotoxicidade

ABSTRACT

Lipid A is a phosphorylated disaccharide with a variable number of acyl chains and comprises a small region on Lipopolysaccharide molecules, which are the main component of Gram-negative bacteria external membrane. Lipid A is also an immune system stimulant and is mainly responsible for the bacteria endotoxicity. In the last years, monophosphorylated Lipid A combined with aluminum salts have been used as vaccine adjuvants due to agonistic properties and low toxicity. In this work we investigate the influence of aluminum cation on mono- and diphosphorylated Lipid A bilayers of *Escherichia coli* through atomistic molecular dynamics simulations at three different saline concentrations: (a) 0mM, Al^{3+} just added in order to neutralize the simulation boxes, (b) 150 mM of AlCl_3 and (c) 150 mM of NaCl . Simulation protocol was decided after tests on initial configurations, long range electrostatic treatment and thermalization/equilibration steps. Our methodological test pointed out a minimization energy followed by NVT and NpT stages are the best protocol for highly charged systems like Lipid A. This protocol provided more stable values of pressure and kinetic energy for the particles in comparison to the length of equilibration phase, but without prejudice to equilibrated phase space achievement. In general, aluminum cation induces rigidification and ordering at the Lipid A acyl chains forming planar bilayers with structural properties compatible with a gel phase. Our analysis shows a highly hydrated aluminum cation placed at the bilayer interface and coordinating with Lipid A phosphate groups. Sodium cations show an opposite effect on system, in other words, induces more fluidity on bilayers and less structuration on water in its neighborhood.

Keywords: Lipid A. Aluminum. Membrane rigidification. Endotoxicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema genérico da parede celular da bactéria Gram-negativa.....	19
Figura 2 – Estrutura química da molécula de lipopolissacarídeo da bactéria Gram-negativa <i>E. coli</i> . Podem ser observadas três regiões funcionais: o Lipídio A, cujas cadeias aciladas formam a parte lipídica da bicamada, o núcleo de oligossacarídeos, onde é dividido em dois grupos: o núcleo interno e núcleo externo, e a região do antígeno O.....	21
Figura 3 – Estrutura química do Lipídio A monofosforilado (a esquerda) e difosforilado (a direita) de <i>Escherichia coli</i>	22
Figura 4 – Mudança de fase em membranas lipídicas sobre influência da temperatura. Em A) a membrana em estado gel (L_β) e em B) no estado líquido-cristalino (L_α).	23
Figura 5 – Estrutura geral do complexo CD14/TLR4/MD2. Acima é visto o mecanismo de como o reconhecimento do LPS pelo receptor LBP acontece.....	25
Figura 6 – Representação das principais interações envolvidas que compõem a modelagem de campos de força, sendo os potenciais, referentes às interações intramoleculares: ligações, ângulos e diedros, como é visto, respectivamente, em A), B), C) e D). Os potenciais não-ligados das interações de van der Waals e eletrostáticas são mostradas em E) e F), respectivamente.	36
Figura 7 – A) Condições de contorno periódicas em três dimensões. À medida que uma partícula sai da caixa de simulação, uma partícula de imagem dessa partícula se move para substituí-la. B) Estrutura de funcionamento da busca por vizinhos onde as interações não-ligadas são calculadas, se os átomos estão situados num dado raio de corte, r_{cut} , dentro da própria caixa ou nas caixas vizinhas.	40
Figura 8 – Parâmetro de ordem de curvatura com a média no tempo projetada na superfície da membrana.	52
Figura 9 – Definição dos eixos para o cálculo dos parâmetros de ordem S_{CD} em cadeias aciladas de lipídios.....	54
Figura 10 – Relação entre as esferas de coordenação com os picos do gráfico de distribuição radial.	56

- Figura 11 – Exemplo da configuração inicial da bicamada de Lipídio A de E.coli hexa-acilado com 150mM de NaCl. Átomos da bicamada (prata para carbono, vermelho para oxigênio, azul para nitrogênio, bronze para fósforo) e íons (amarelo para Al^{3+} , roxo para Na^+ , verde para Cl^-) são representados por esferas, exceto para os átomos de carbono dos lipídios e moléculas de águas que são representados por bastões. 59
- Figura 12 – Estruturas da montagem inicial das bicamadas (esquerda) e vista superior (direita) dos sistemas A) mph-F_A, B) mph-F_F, C) mph-rand, D) dph-F_F e E) dph-rand. Os grupos fosfatos estão representados em destaque..... 63
- Figura 13 – Área por lipídio (A_L) para as bicamadas de Lipídio A contendo diferentes íons e equilibradas via diferentes protocolos. Médias foram calculadas para os últimos 100 ns de simulação. 67
- Figura 14 – Espessura média (D_{HH}) da bicamada lipídica para os sistemas estudados. Médias foram calculadas para os últimos 100 ns de simulação..... 68
- Figura 15 – Distribuição dos ângulos de curvatura calculados ao longo dos últimos 100 ns finais. As curvas pretas representam os sistemas no regime de concentração salina de 0 mM, as curvas vermelhas as bicamadas contendo $AlCl_3$ e as curvas azuis as bicamadas contendo NaCl. Sendo os triângulos invertidos os sistemas utilizando o protocolo p1, os quadrados sendo os sistemas utilizando o protocolo p2 e RF como tratamento eletrostático e círculos os sistemas utilizando p2 e PME..... 70
- Figura 16 – Arranjo estrutural das bicamadas de Lipídio A difosforilado ao final de 200 ns de simulação: A) bicamadas sem concentração salina, B) bicamadas com 150mM de $AlCl_3$ e C) bicamadas com 150mM de NaCl. Nos sistemas a esquerda foi utilizado o protocolo p1 e a direita o protocolo p2 na etapa de equilíbrio. As moléculas de água foram omitidas para maior clareza. 71
- Figura 17 – Descrição da pressão inicial nos primeiros 10 ps para a etapa de equilíbrio do NPT. Após este tempo, o valor da propriedade oscila próximo ao valor requerido de 1 bar. Triângulos invertidos representam os sistemas equilibrados com o protocolo p1, e quadrado representam a os sistemas utilizando o protocolo p2..... 73

- Figura 18 – Cálculo da energia potencial e total durante toda a trajetória simulada para os sistemas de bicamadas de Lipídio A A) monofosforilado e B) difosforilado para a energia potencial e C) monofosforilado e D) difosforilado para a energia total. Sendo linha preta para a modelagem “F_A”, linha vermelha para a modelagem “F_F” e linha azul para a modelagem “rand”. 77
- Figura 19 – Área por Lipídio em função do tempo para as bicamadas de Lipídio A A) monofosforilado e B) difosforilado nas modelagens F_A (linha preta), F_F (linha vermelha) e randômica (linha azul), tendo Al^{3+} como contraíon. 79
- Figura 20 – Estrutura inicial (t=0 ns) e final (t=300 ns) para os sistemas simulados. A saber A) mph-F_A, B) mph-F_F, C) mph-rand, D) dph-F_F, E) dph-rand. Do lado direito tem-se a vista superior (eixo z) das bicamadas ao final dos 300 ns de simulação. 80
- Figura 21 – Distribuição dos ângulos de curvatura das bicamadas de Lipídio A. A) bicamada monofosforilada e B) bicamada difosforilada. A distribuição das médias espaço-temporais foi calculada ao longo dos últimos 100 ns de simulação. 81
- Figura 22 – Perfil da área por lipídio para as bicamadas de Lipídio A de E.coli mono- e difosforilada tendo Al^{3+} como contraíon e sais específicos (Tabela 8). 84
- Figura 23 – Resultados da espessura média das bicamadas lipídicas para os sistemas estudados. A análise foi realizada para os últimos 100 ns de simulação. 86
- Figura 24 – Distribuição espacial da espessura da bicamada para os sistemas descritos na Tabela 8. Na primeira coluna estão os sistemas com Lipídio A mono- (acima) e difosforilado (abaixo) sem concentração salina, na segunda coluna estão presentes os sistemas com cloreto de alumínio e na terceira coluna estão os sistemas com cloreto de sódio. 87
- Figura 25 – Gráficos da projeção dos parâmetros de ordem de curvatura sobre a superfície da bicamada. Na primeira coluna estão os sistemas com Lipídio A mono- (acima) e difosforilado (abaixo) sem concentração salina, na segunda coluna estão presentes os sistemas com cloreto de alumínio e na terceira coluna estão os sistemas com cloreto de sódio. As estimativas dos ângulos de inclinação para os lipídios em cada bicamada foram realizadas para os últimos 100 ns de trajetória equilibrada. 89
- Figura 26 – Distribuição dos ângulos de curvatura para as bicamadas de Lipídio A, calculados ao longo dos últimos 100 ns de simulação. 90

- Figura 27 – Estruturas final das membranas de Lipídio A mono- e difosforilado. Na sequência estão A) mph-0mM, B) dph-0mM, C) mph-AlCl₃, D) dph-AlCl₃, E) mph-NaCl e F) dph-NaCl. Os lipídios foram representados em bastões e os íons (amarelo para Al³⁺, roxo para Na⁺, verde para Cl⁻) são representados por esferas. As moléculas de água foram omitidas para maior clareza. 92
- Figura 28 – Indicação das cadeias sn1, sn2, sn3 e sn4 na molécula de Lipídio A. Entre parênteses o número de átomos de carbono incluídos para análise em cada cadeia. 93
- Figura 29 – Parâmetros de ordem (S_{CD}) dos átomos de deutério para as cadeias aciladas das membranas de Lipídio A mono- e difosforilado contendo cátions Al³⁺ e concentração salina de AlCl₃ e NaCl. A análise foi realizada para os últimos 100 ns de simulação de cada sistema. 94
- Figura 30 – Perfis de densidade dos grupos: oxigênio das moléculas de água e cadeias aciladas dos lipídios para os sistemas A) mph-0mM, B) dph-0mM, C) mph-AlCl₃, D) dph-AlCl₃, E) mph-NaCl, F) dph-NaCl. O intervalo do eixo z é mantido o mesmo para todos os sistemas. 98
- Figura 31 – Perfis de densidade para os átomos de fósforo e os íons Al³⁺, Na⁺ e Cl⁻ para os sistemas A) mph-0mM, B) dph-0mM, C) mph-AlCl₃, D) dph-AlCl₃, E) mph-NaCl e F) dph-NaCl. O intervalo do eixo z é mantido o mesmo para todos os sistemas. 99
- Figura 32 – Funções de distribuição radial entre os cátions Al³⁺ e Na⁺ e os átomos de oxigênio da água para as membranas de Lipídio A mono- e difosforilado. A análise foi realizada para últimos 100 ns de simulação. 102
- Figura 33 – Funções de distribuição radial entre os cátions Al³⁺ e Na⁺ e os átomos de oxigênio dos fosfatos (OP2, OP3 e OP4) das membranas de Lipídio A mono- e difosforilado. A análise foi realizada para os últimos 100 ns de simulação. 104
- Figura 34 – Snapshot que representam os dois modos de interação observados entre o alumínio e os Lipídios A. Sendo em A) o alumínio coordenado a quatro moléculas de água e dois lipídios na primeira esfera de coordenação e em B) o segundo modo sendo o alumínio coordenado a seis moléculas de água na primeira esfera e logo em seguida a dois lipídios. 108

Figura 35 – Snapshot da configuração final de um sistema contendo o sal NaCl. É evidenciado a primeira esfera de coordenação dos cátions Na^+ próximos a interface lipídio-água..	109
Figura 36 – Estrutura do Lipídio A monofosforilado.....	122
Figura 37 – Estrutura do Lipídio A difosforilado.....	123
Figura 38 – Conformação final das bicamadas de Lipídio A difosforilado simuladas. Na sequência estão A) Bicamadas sem concentração salina, (Al-p2_{RF} e $\text{Al-p2}_{\text{PME}}$), B) com 150mM de AlCl_3 ($\text{AlCl}_3\text{-p2}_{\text{RF}}$ e $\text{AlCl}_3\text{-p2}_{\text{PME}}$) e C) com 150mM de NaCl, ($\text{NaCl-p2}_{\text{RF}}$ e $\text{NaCl-p2}_{\text{PME}}$).....	136
Figura 39 – Parâmetro de ordem para os átomos das cadeias aciladas do Lipídio A em cada simulação comparando os diferentes tratamentos eletrostáticos de longo alcance. As análises foram realizadas para os últimos 100 ns de trajetória.	137
Figura 40 – Função de distribuição radial $g(r)$ para os sistemas indicados. As linhas grossas indicam os sistemas simulados utilizando reaction field e as linhas tracejadas o uso de particle mesh Ewald como tratamento eletrostático de longo alcance. A análise foi realizada para os últimos 100 ns de simulação.	138
Figura 41 – Função de distribuição radial $g(r)$ para os sistemas indicados. As linhas grossas indicam os sistemas utilizando reaction field e as linhas tracejadas o uso de particle mesh Ewald. A análise foi realizada para os últimos 100 ns de simulação.	139
Figura 42 – Perfis de densidades parciais (nm^{-3}) ao longo do eixo z para os grupos químicos selecionados. As linhas grossas indicam os sistemas utilizando reaction field e as linhas tracejadas o uso de particle mesh Ewald.	140
Figura 43 – Função de distribuição radial $g(r)$ dos para os grupos: (Al^{3+} ou Na^+) – Cl^- e Cl^- – $\text{O}_{(\text{H}_2\text{O})}$ para os sistemas: mph- AlCl_3 , mph- NaCl , dph- AlCl_3 e dph- NaCl . E na tabela está apresentado os NC para o grupo Cl^- – $\text{O}_{(\text{H}_2\text{O})}$	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Setup das bicamadas de Lipídio A difosforilada simuladas na presença de Al^{3+} e concentrações salinas de 150mM de AlCl_3 ou NaCl . Nas colunas constam o protocolo utilizado na etapa de equilibração dos sistemas, o tratamento eletrostático de longo alcance (TELA) utilizado, número de íons, moléculas de água (H_2O) e o tempo de simulação.	60
Tabela 2 – Setup das bicamadas de Lipídio A mono e difosforilada simuladas na presença de Al^{3+} . Nas colunas constam o quimiotipo do Lipídio A, número de íons e moléculas de água, e tempo de simulação.....	62
Tabela 3 – Bicamadas simuladas em 0mM e 150mM (ver rodapé). Nas colunas constam o grau de fosforilação do grupo N-acetil glucosamina, número de moléculas de água (H_2O), íons presentes e tempo de simulação.	65
Tabela 4 – Média do RMSD das análises realizadas utilizando o programa SuAVE.	69
Tabela 5 – Média, erro estimado e RMSD da pressão na etapa de NpT nos diferentes protocolos. A análise foi realizada para os 10 ns de simulação. Este cálculo é feito através da rotina gmx energy no GROMACS v.2016.4 e a equação utilizada para o cálculo do erro estimado e o RMSD pode ser encontrado no manual do programa (APOL et al., 2016).	72
Tabela 6 – Valor médio e RMSD para a energia cinética na etapa NpT de equilibração dos sistemas no protocolo p1 e p2. Esse cálculo é feito através da rotina gmx energy no GROMACS v.2016.4. Todas as unidades são dadas em kJ.mol^{-1}	74
Tabela 7 – Média e desvio padrão dos valores de energia potencial e total para os sistemas simulados (Tabela 2). O cálculo das energias foi realizado através da rotina gmx energy no GROMACS v.2016.4. Todas as unidades são dadas em kJ.mol^{-1}	78
Tabela 8 – Valor médio com desvio-padrão para a área por lipídio para as bicamadas de Lipídio A (nm^2). Os valores foram calculados para os últimos 100 ns da trajetória equilibrada.	79
Tabela 9 – Números de coordenação entre o Al^{3+} - O (H_2O) e Al^{3+} - HPO_4^- para as bicamadas de Lipídio A mono e difosforilados. Os números de coordenação apresentados correspondem àqueles na primeira esfera de coordenação.	82

Tabela 10 – Valor médio e desvio-padrão para a A_L (nm ²) e espessura D_{HH} (nm) das bicamadas simuladas. Os valores foram calculados para os últimos 100 ns de trajetória equilibrada.	84
Tabela 11 – Análise quantitativa dos perfis de distribuição de ângulos de curvatura.	91
Tabela 12 – Valores médios com os seus respectivos desvios-padrões para o S_{CD} das membranas simuladas para os últimos 100 ns de simulação.	96
Tabela 13 – Média temporal das constantes de difusão, com os respectivos desvios, calculada ao longo dos últimos 100 ns de simulação, para os sistemas descritos na Tabela 3.	100
Tabela 14 – Números de coordenação do pares cátion - O (H ₂ O), cátion - Cl ⁻ e cátion - O _(fosfato) . Para este último par estamos avaliando os cátions com os oxigênios (denominados OP2, OP3 e OP4) dos grupos fosfatos dos lipídios. A análise foi realizada para a primeira esfera de coordenação.	106
Tabela 15 – Média do número de ligações cátion-lipídio. A análise foi realizada levando em consideração as últimas 100 configurações (frames) do sistema, calculando quantos lipídios estão interagindo aos cátions em uma distância de até $r = 0,45\text{nm}$	107
Tabela 16 – Parâmetros atoms para o resíduo LE1	124
Tabela 17 – Parâmetros bonds para o resíduo LE1	125
Tabela 18 – Parâmetros angles para o resíduo LE1	126
Tabela 19 – Parâmetros dihedrals para o resíduo LE1	127
Tabela 20 – Parâmetros atoms para o resíduo LE2	128
Tabela 21 – Parâmetros bonds para o resíduo LE2	129
Tabela 22 – Parâmetros angles para o resíduo LE2	130
Tabela 23 – Parâmetros dihedrals para o resíduo LE2	131
Tabela 24 – Valores de C^6 e C^{12} calculados entre o Al^{3+} e os átomos relevantes neste estudo...	132
Tabela 25 – Número de coordenação (NC) para a interação entre os íons cloretos (Cl ⁻) e os oxigênios das moléculas de água (O _(H₂O)) para os sistemas descritos.	142

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A_L	Área por lipídio
D_A	Coeficiente de difusão
D_{HH}	Espessura da bicamada
DM/MD	Dinâmica molecular (do inglês <i>molecular dynamics</i>)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
$g(r)$	Função de distribuição radial
GROMACS	<i>Groningen machine for chemical simulations</i>
GROMOS	<i>Groningen molecular simulation</i>
L_α	Fase líquido-cristalino
L_β	Fase gel
LPS	Lipopolissacarídeo
LBP	<i>LPS Binding Protein</i>
MC	Monte Carlo
MPLA	Lipídio A monofosforilado
N_pT	Sigla para <i>ensemble</i> isotérmico-isobárico
NVT	Sigla para <i>ensemble</i> canônico
PME	<i>Particle Mesh Ewald</i>
R_c	Raio de corte
RF	<i>Reaction Field</i>
S_{CD}	Parâmetro de ordem de deutério
TLR4	Proteína <i>Toll-like receptors-4</i>
T_m	Temperatura de transição de fase

SUMÁRIO

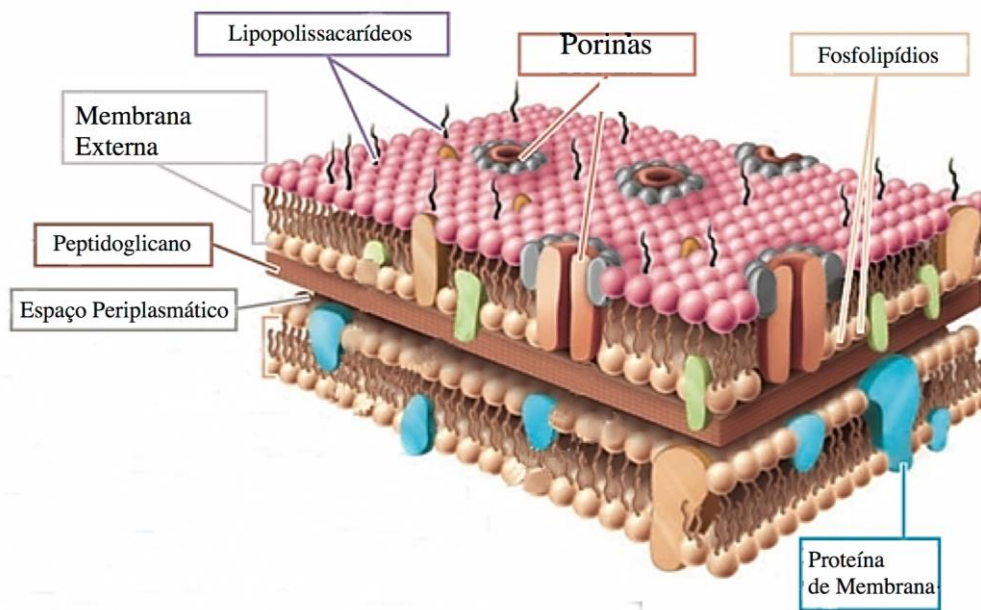
1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Estrutura e Composição do LPS	20
1.2	Lipídio A: Importância e Endotoxicidade	21
1.3	Lipídio A como Adjuvante em Vacinas	24
2	FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	27
2.1	Simulação Computacional de Biomoléculas.....	27
2.2	Algoritmos	31
2.3	Campo de Força.....	33
2.4	Configuração Inicial do Sistema	38
2.4.1	Condições Periódicas de Contorno.....	39
2.4.2	Tratamento de Interações Eletrostáticas de Longa Distância	42
2.5	Protocolo de Equilibração.....	44
2.5.1	<i>Ensemble</i> NVT.....	45
2.5.2	<i>Ensemble</i> NpT	45
2.5.3	Termostato	46
2.5.4	Barostato	47
3	ANÁLISES	49
3.1	Área por Lipídio (A_l)	49
3.2	Espessura da Bicamada.....	50
3.3	Curvatura da Membrana.....	51
3.4	Perfil de Densidade	52
3.5	Parâmetro de Ordem de Deutério S_{CD}.....	53
3.6	Difusão dos Íons	55
3.7	Função de Distribuição Radial $g(r)$	55
4	PROCEDIMENTO COMPUTACIONAL	57
4.1	Comparação do Protocolo de Equilibração	57
4.2	Construção das Bicamadas de Lipídio A mono- e difosforilado	61
4.3	Bicamadas de Lipídio A Mono- e Difosforilado na Presença do Cátion Al^{3+} e Concentrações Salinas	64

5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	66
5.1	Comparação do Protocolo de Equilibração	66
5.1.1	Área por Lipídio	66
5.1.2	Espessura e Curvatura da Bicamada.....	68
5.2	Convergência das Diferentes Configurações Iniciais	75
5.2.1	Energia Potencial e Total	76
5.2.2	Área por Lipídio	78
5.2.3	Parâmetro de Curvatura	81
5.3	O Efeito do Cátion Al^{3+} e Concentrações Salinas nas Bicamadas de Lipídio A .	83
5.3.1	Área por Lipídio e Espessura da Bicamada.....	83
5.3.2	Curvatura da Membrana	88
5.3.3	Parâmetro de Ordem de Deutério S_{CD}	93
5.3.4	Perfil de Densidade.....	97
5.3.5	Difusão dos Íons	100
5.3.6	Efeito dos Íons nas Bicamadas de Lipídio A.....	101
6	CONCLUSÕES.....	111
	REFERÊNCIAS.....	113
	APÊNDICE A – TOPOLOGIA DOS LIPÍDIOS A.....	122
	APÊNDICE B – ADICIONANDO O CÁTION Al^{3+} AO CAMPO DE FORÇA	132
	APÊNDICE C – ARQUIVOS .MDP	133
	APÊNDICE D – ANÁLISES <i>REACTION FIELD</i> X <i>PARTICLE MESH EWALD</i>	136
	APÊNDICE E – FUNÇÕES DE DISTRIBUIÇÃO RADIAL (SEÇÃO 5.3)	141
	APÊNDICE F – Q-R CODES.....	143
	APÊNDICE G – PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS.....	144

1 INTRODUÇÃO

As bactérias são divididas em dois grandes grupos denominados Gram-positivas e Gram-negativas, sendo a distinção laboratorial entre elas feita através da reação de coloração de Gram. São as diferenças presentes na estrutura da parede celular bacteriana que correspondem à essência do processo de coloração. A parede celular de bactérias Gram-negativas consiste em uma estrutura em multicamadas e bastante complexa, enquanto a Gram-positiva é normalmente muito espessa, consistindo quase que totalmente de um único tipo de molécula: o peptideoglicano. Em bactérias Gram-negativas, apenas uma pequena parte da parede celular é constituída de peptideoglicano, a outra parte é formada por uma membrana externa, correspondente a uma segunda bicamada lipídica, composta por polissacarídeos além de fosfolipídios e proteínas (Figura 1) (GARRETT; GRISHAM, 2010).

Figura 1 – Esquema genérico da parede celular da bactéria Gram-negativa.



Modificado de (DAVID, L. NELSON, MICHAEL, 2008).

Os lipídios e os polissacarídeos estão presentes na membrana externa formando uma molécula importante denominada: lipopolissacarídeo (LPS). Nas bactérias Gram-negativas, a parede peptidoglicana é a estrutura rígida em torno da qual é construída uma estrutura de membrana mais elaborada. A camada peptidoglicana envolve o espaço periplásmico e é anexada à membrana

externa através de um grupo de proteínas hidrofóbicas (DAVID, L. NELSON, MICHAEL, 2008; GARRETT; GRISHAM, 2010).

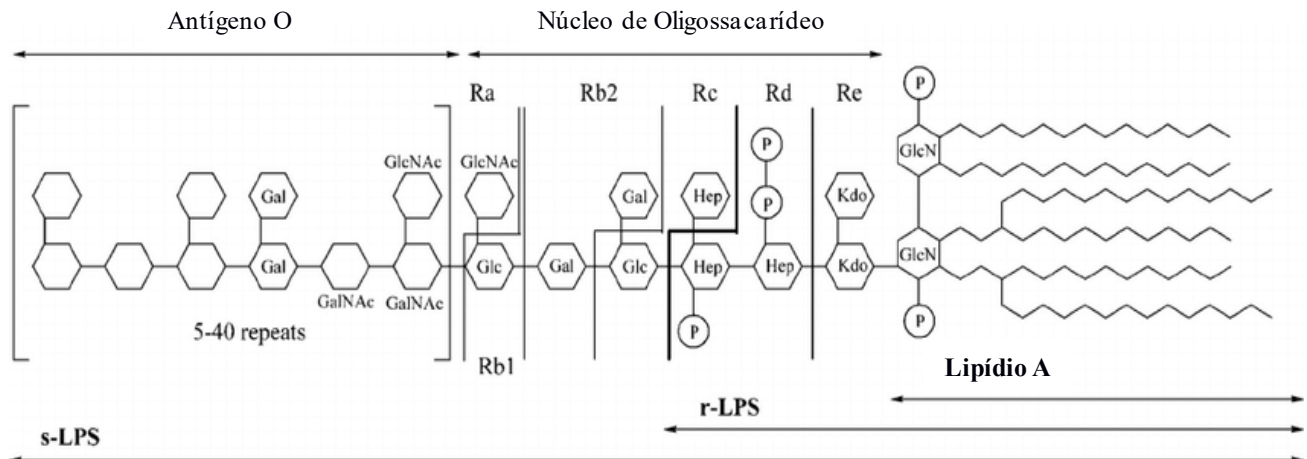
Os lipopolissacarídeos atuam como uma barreira efetiva à permeabilização de agentes antibióticos, xenobióticos e ao sistema de defesa da célula hospedeira. Tal permeabilidade tem a ver principalmente com a sua composição (COSTERTON, 1999). A grande quantidade de LPS presente nas colônias de bactérias Gram-negativas podem causar no hospedeiro choque séptico, febre e até levar a morte. Devido a isso, o LPS é um potente ativador do sistema imune de mamíferos em quantidades tão reduzidas quanto *fmol* (ADEREM; ULEVITCH, 2000).

1.1 Estrutura e Composição do LPS

Os LPS são constituídos principalmente pelo Lipídio A, um núcleo de oligossacarídeos e o antígeno-O (Figura 2) (STRAATSMA; SOARES, 2009). Nesta estrutura o lipídio (Lipídio A) está ligado a um polissacarídeo constituído de longas cadeias com muitas repetições diferentes e estruturas características. Estas muitas unidades únicas determinam a antigenicidade das bactérias, isto é, os sistemas imunológicos dos animais os reconhecem como substâncias estranhas e criam anticorpos contra eles. A região do LPS responsável por este reconhecimento é o antígeno O. O antígeno O é composto por polímeros de açúcares e sua composição varia para cada cepa. Por exemplo, para a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (*E.coli*) existem cerca de 160 estruturas diferentes de antígeno O (RAETZ; WHITFIELD, 2002). Ligando o antígeno O ao Lipídio A existe um núcleo de oligossacarídeos, que é formado por açúcares como heptoses e o ácido 3-deoxi-D-mano-octulosônico (KDO). Em algumas bactérias este núcleo apresenta grupamentos fosfatos, aminoácidos e etanolaminas (GARRETT; GRISHAM, 2010). O núcleo de oligossacarídios é normalmente dividido em dois grupos: núcleo interno e núcleo externo. O núcleo interno é formado por cerca de 1-3 resíduos de KDO, sendo o último resíduo desta cadeia modificado quimicamente por um grupo fosfato ou etanolamina. O núcleo externo é feito basicamente de resíduos de hexoses, sendo as mais comuns: D-glicose, D-manose e D-galactose.

O Lipídio A é uma diglucosamina fosforilada, onde o número de cadeias aciladas do lipídio e seu tamanho podem variar de acordo com a cepa (RAETZ et al., 2007). Devido a sua importância neste trabalho, as suas principais características serão tratadas na próxima seção.

Figura 2 – Estrutura química da molécula de lipopolissacarídeo da bactéria Gram-negativa *E. coli*. Podem ser observadas três regiões funcionais: o Lipídio A, cujas cadeias aciladas formam a parte lipídica da bicamada, o núcleo de oligossacarídeos, onde é dividido em dois grupos: o núcleo interno e núcleo externo, e a região do antígeno O.



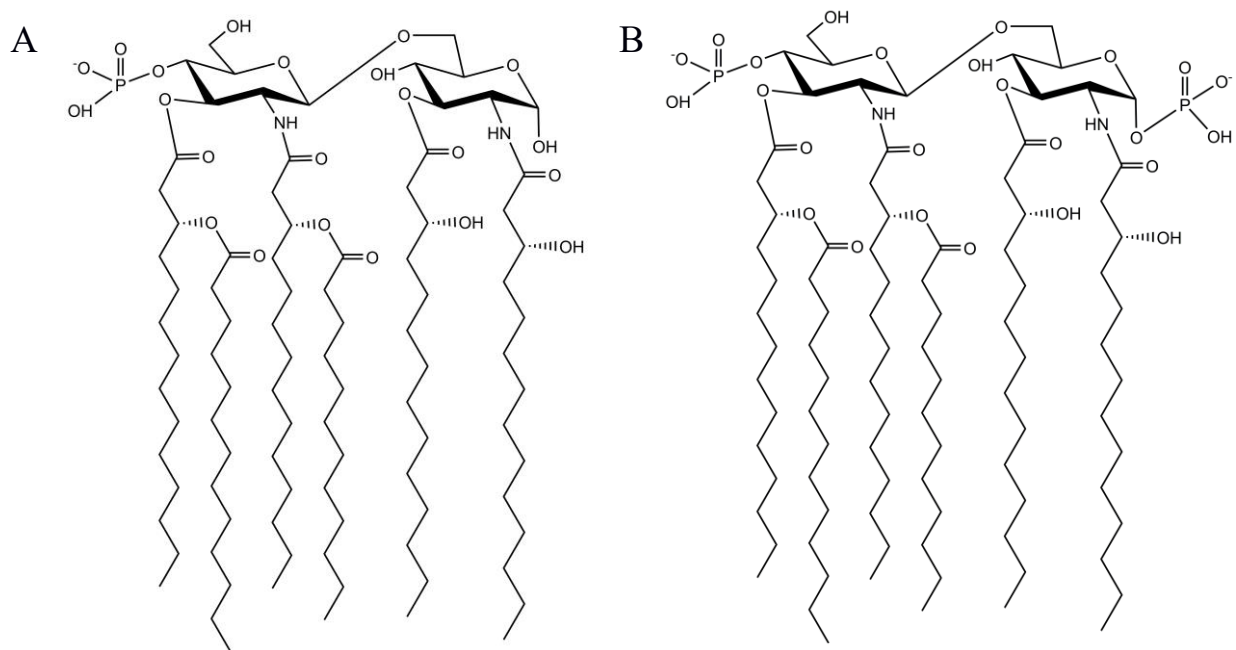
Modificado de (BAGHERI; KELLER; DATHE, 2011).

1.2 Lipídio A: Importância e Endotoxidade

O Lipídio A é constituído por duas moléculas de glucosamina ligadas covalentemente nas posições 1-6, fosfatadas nas posições 1-4, e aciladas nas posições 2-3 do sacarídeo, como mostrado na Figura 3. O Lipídio A é a região do LPS que interage com o sistema imune do hospedeiro e provoca a resposta do organismo, sendo o principal responsável pela toxicidade à maioria dos mamíferos causando doenças e infecções (COSTERTON, 1999). Os organismos dos mamíferos possuem receptores que sinalizam quando em contato com o Lipídio A. Nos humanos um destes receptores é a proteína chamada de *LPS Binding Protein* (LBP), que é o primeiro ponto de reconhecimento do LPS na célula hospedeira (UNDERHILL; OZINSKY, 2002). Quando reconhecido pelo receptor, o sistema imunológico é ativado e produz glóbulos específicos para destruírem o invasor. O LPS interage com o complexo receptor CD14/TLR4/MD2 das células do hospedeiro e promove a secreção de citosinas pró-inflamatórias, espécies reativas e peptídeos mediadores (SCHLETTER et al., 1995). Estes mediadores são capazes de atuar sozinhos ou até de maneira sinérgica, provocando efeitos semelhantes ao provocado pelas endotoxinas (UNDERHILL; OZINSKY, 2002). É visto que quando o LPS é modificado quimicamente, sem alterar a estrutura do Lipídio A, não são observadas alterações nas atividades endotóxicas. Em

contraste, as alterações da estrutura do Lipídio A influenciam a bioatividade e atividade endotóxica do LPS, dependendo da modificação realizada (BRANDENBURG; WIESE, 2004). A atividade biológica do Lipídio A é bastante dependente de seu número de cadeias aciladas, carga total e estrutura supramolecular (BRANDENBURG; WIESE, 2004). Por exemplo, a remoção de uma cadeia lipídica, no caso do Lipídio A pentaacilado, reduz a endotoxidade por um fator de 10^2 , no caso da remoção de duas cadeias lipídicas, temos a redução da endotoxidade por um fator de 10^7 . A remoção de um grupamento fosfato, como o Lipídio A monofosforilado de *E.coli* apresentado na Figura 3-A, reduz a endotoxidade por um fator de 10^3 (FLAD et al., 1993; ULMER et al., 1992).

Figura 3 – Estrutura química do Lipídio A monofosforilado (a esquerda) e difosforilado (a direita) de *Escherichia coli*.



Fonte: A autora, 2019.

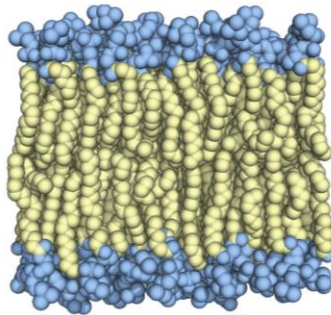
O LPS e Lipídio A, como moléculas anfifílicas, formam agregados em ambientes aquosos acima de uma concentração crítica (concentração micelar crítica) dependendo, entre outros efeitos, da sua hidrofobicidade (BRANDENBURG; WIESE, 2004). Acima da concentração micelar crítica, o Lipídio A pode adotar diferentes estruturas como: lamelar, hexagonal e cúbica. A estrutura do agregado irá depender da estrutura química da molécula e é influenciada por condições ambientais

como temperatura, pH, força iônica, concentração de íons específicos e a quantidade de água presente (BRANDENBURG; WIESE, 2004; PONTES et al., 2012; SHEPHARD et al., 2010). Este último fator é muito importante pois o aumento do grau de hidratação na parte polar dos lipídios amplifica as repulsões laterais entre as cabeças dos lipídios, provocando um aumento na área por cabeça, mudando o agregado lipídico anteriormente formado (HAFEZ; CULLIS, 2001).

Agregados lipídicos podem sofrer transições de fase nas membranas. Embora a estrutura da bicamada lipídica seja estável, cada lipídio apresenta grande liberdade de movimentação no plano da membrana. A flexibilidade da membrana irá depender da composição lipídica presente e da temperatura. Em temperaturas baixas, ocorre pouca movimentação lipídica e a bicamada existe em uma forma quase cristalina (paracristalina). Acima de uma certa temperatura, os lipídios apresentam grande movimentação (estado fluido) e no interior da bicamada os lipídios estão mais fluidos do que rígidos (Figura 4).

Figura 4 – Mudança de fase em membranas lipídicas sobre influência da temperatura. Em A) a membrana em estado gel (L_β) e em B) no estado líquido-cristalino (L_α).

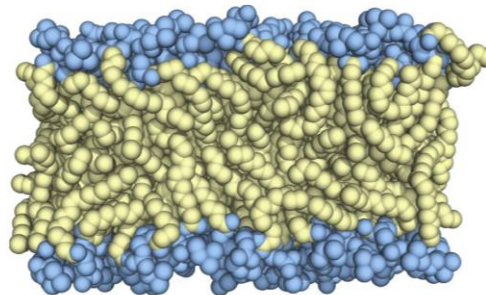
A - Estado paracristalino
(fase gel)



B – Estado fluido
(fase líquido-cristalino)



Transição $L_\beta \rightarrow L_\alpha$



Modificado de (DAVID, L. NELSON, MICHAEL, 2008).

O estado paracristalino é denominado de fase gel, L_β , já o estado fluido é denominado de fase líquido-cristalino (L_α). Quanto maior for a estabilidade da membrana no estado de agregação lamelar (L), maior deverá ser a temperatura de transição de fase, T_m , de gel (L_β) para a fase líquido-cristalino (L_α) (DAVID, L. NELSON, MICHAEL, 2008). Valores para T_m em bicamadas de Lipídio A foram determinados utilizando espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). É determinado a transição de fase quando ocorre mudanças da frequência de vibração simétrica, $\nu_s(\text{CH}_2)$ e assimétrica, $\nu_{\text{ass}}(\text{CH}_2)$, do grupo metila ao variar a temperatura do sistema (BRANDENBURG; SEYDEL, 1990). Para bicamadas de membranas biológicas a transição de fase ocorre em um intervalo de temperatura mais amplo do que para membranas fosfolipídicas (GARRETT; GRISHAM, 2010). Medidas experimentais mostram que a transição de fase gel para líquido-cristalino de membranas de Lipídio A de *E.coli* inicia-se por volta de 35°C e continua até quase 50°C (GUTSMANN et al., 2000). A transição induzida pela temperatura entre estas duas fases é influenciada pelo número de cadeias aciladas do Lipídio A, pela natureza do contração e pela conformação adotada pelo lipídio (BRANDENBURG et al., 1993; BRANDENBURG; SEYDEL, 1990; BRANDENBURG; WIESE, 2004).

O efeito combinado das propriedades dos cátions como raio iônico, carga e raio de hidratação tendem a influenciar, além da fase da membrana, na estabilidade, aderência e permeabilidade da membrana bacteriana. As células hospedeiras existem em condições onde Ca^{2+} , Na^+ , K^+ e Mg^{2+} são os cátions mais comuns. É visto que bicamadas de LPS na presença de íons monovalentes, como o Na^+ , tornam-se mais hidratadas (ABRAHAM et al., 2007). Já a presença de íons divalentes como Ca^{2+} e Mg^{2+} diminuem a penetração das moléculas de água em membranas de LPS e Lipídio A, aumentando sua estabilidade e contribuem mais no enrijecimento da membrana do que em comparação com íons monovalentes (BRANDENBURG; SEYDEL, 1984; PONTES et al., 2012; ROSENFELD; SHAI, 2006). Entretanto, poucas informações existem sobre o efeito de íons trivalentes em membranas lipopolissacarídicas e de Lipídio A (PENG et al., 2004). Um exemplo da importância de se entender esta interação é o uso do Lipídio A juntamente com sais de alumínio como adjuvante em vacinas.

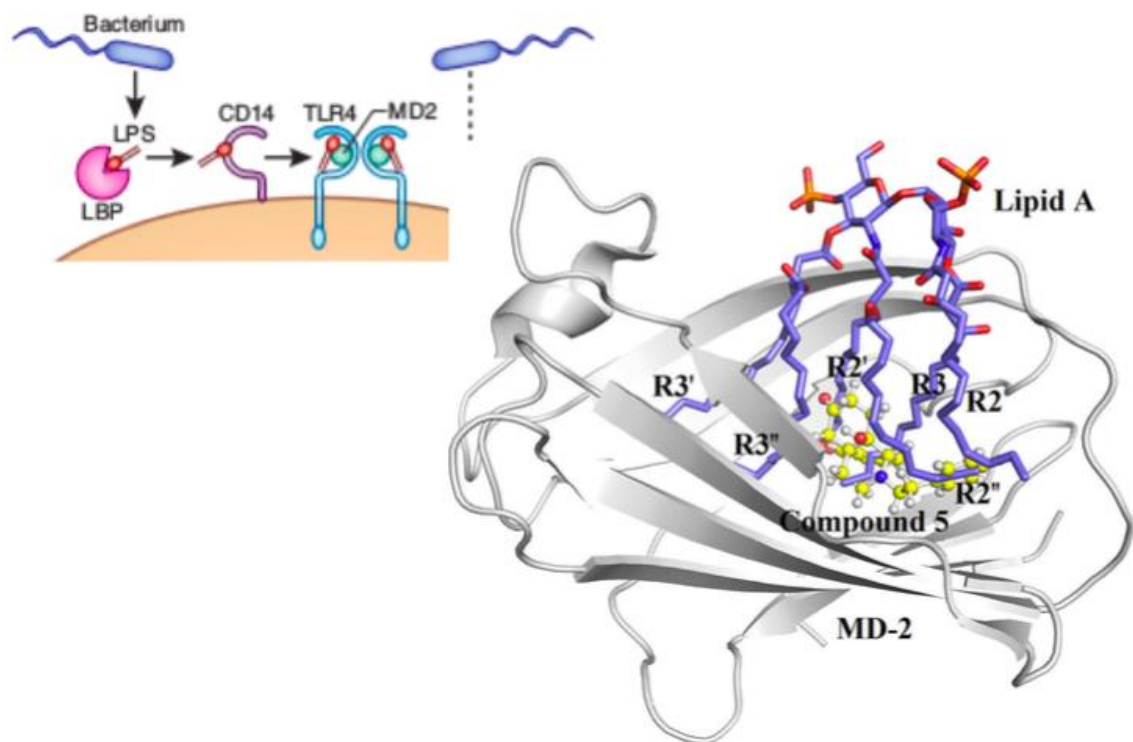
1.3 Lipídio A como Adjuvante em Vacinas

As vacinas contemporâneas de doenças infecciosas geralmente combinam um antígeno protéico recombinante, bem caracterizado, com um adjuvante para aumentar a resposta imunogênica. O

termo adjuvante originou-se da palavra latina *adjuvare* que significa ajudar. É determinado que cada molécula ou substância capaz de amplificar ou intensificar a cascata de eventos imunológicos que compõem a resposta imune pode ser classificada como um adjuvante (SCHIJS, 2003). Espera-se que um adjuvante apresente um papel quantitativo, sendo capaz de aumentar a resposta imune específica e auxiliar o antígeno a desencadear uma resposta imune precoce, elevada e duradoura, além de direcionar esta resposta protetora, evitando a doença (MOREIN et al., 1996).

Baseado no mecanismo de ação proposto, os adjuvantes comumente utilizados são: os sais de alumínio, muramil dipeptídeo, saponinas, Lipídio A monofosforilado, *Bordetella pertussis*, citocinas, dentre outros (SCHIJS, 2003). O desenvolvimento de vacinas tem por objetivo iniciar e propagar uma resposta imune apropriada para cada alvo patogênico. Em caso de infecção por bactérias Gram-negativas, a cascata de sinalização do receptor LBP é iniciada quando o Lipídio A interage com um complexo receptor chamado CD14/TLR4/MD2 (Figura 5) das células do hospedeiro, especialmente, macrófagos, células da pele e músculos (SCHLETTER et al., 1995).

Figura 5 – Estrutura geral do complexo CD14/TLR4/MD2. Acima é visto o mecanismo de como o reconhecimento do LPS pelo receptor LBP acontece.



Modificado de (ZHANG et al., 2018).

Atualmente, o Lipídio A monofosforilado (MPLA) e fosfatos de amino-alkil glucosaminídeos (AGPs) são exemplos bem estudados de adjuvantes que podem promover uma resposta imune celular (CASELLA; MITCHELL, 2008).

Como falado anteriormente, vários fatores que governam a atividade imunológica do LPS são estudados. Destes, o número total de cadeias lipídicas é o fator mais importante. Porém, grupamentos fosfato na região lipídica também afetam a atividade endotóxica do LPS (NASCIMENTO et al., 2014). A redução de um grupamento fosfato no Lipídio A difosforilado reduz por 1000 vezes a atividade endotóxica e o Lipídio A monofosforilado (MPLA) resultante é apenas um ativador fraco da resposta imune inata e é devido a isso que é utilizado o quimiotipo monofosforilado do Lipídio A como adjuvante em vacinas (PARK et al., 2009).

Junto ao Lipídio A monofosforilado de *E.coli*, como adjuvante, é utilizado também sais específicos de alumínio. Estes sais de alumínio, que incluem fosfato de alumínio, hidróxido de alumínio e cloreto de alumínio, comumente denominados “alum”, têm sido amplamente utilizados em vacinas humanas por mais de noventa anos (BAYLOR; EGAN; RICHMAN, 2002). Esta classe de adjuvantes é componente de várias vacinas virais e bacterianas, como as vacinas para o tratamento de *Leshmania*, difteria, tuberculose, entre outras (LINDBLAD et al., 1997; SAGOO; LOMBARDI; LECHLER, 2012).

É visto na literatura que o sal de alumínio parece não sinergizar ou inibir o MPLA, mas prolonga as respostas das citocinas ao MPLA no local da injeção. Este resultado suporta um modelo em que a adição de MPLA ao sal de alumínio aumenta a resposta da vacina, desencadeando rapidamente uma resposta local de citocinas, levando a uma ótima ativação do sistema imune humano (DIDIERLAURENT et al., 2009).

Como mencionado, a influência de cátions na estrutura, fase e forma e endotoxicidade das moléculas de Lipídio A já tem sido demonstrado por diferentes autores (GARIDEL et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2014; PENG et al., 2004; PONTES et al., 2012; SNYDER; KIM; MCINTOSH, 1999). Assim, neste trabalho, foi estudado, através de simulações por dinâmica molecular atomísticas, a influência de íons Al^{3+} e concentrações salinas de $AlCl_3$ e $NaCl$ em bicamadas lipídicas de Lipídio A hexaacilado de *E. coli* de dois diferentes quimiotipos: monofosforilado e difosforilado e investigar os agregados formados e correlacionar os resultados prévios de estrutura química e polimorfismo devido a influência de íons trivalentes nestes agregados.

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Simulação Computacional de Biomoléculas

As técnicas de simulação molecular são uma importante ferramenta para entender e prever as propriedades micro- e macroscópicas, estrutura e função de sistemas moleculares, possibilitando uma estreita ligação entre a teoria e o experimento, permitindo o avanço de ambos os campos (FRENKEL, D.; SMIT, 2001). É importante entender como, a partir da simulação, pode-se transformar informações em nível microscópico (posições atômicas, forças e velocidades) em informações detalhadas em termos macroscópicos (ALLEN, M.P.; TILDESLEY, 1987).

Suponha que se deseja determinar experimentalmente o valor de uma propriedade de um sistema, como a pressão ou a energia interna. Em geral, estas propriedades dependem das posições e momento das N partículas que compõem o sistema. O valor instantâneo da propriedade A pode, portanto, ser escrito como $A(p^N(t), r^N(t))$, em que $p^N(t)$ e $r^N(t)$ representam os N momentos e posições, respectivamente, no tempo t (LEACH, 2001). Com o tempo, o valor instantâneo da propriedade A varia como resultado das interações entre as partículas e é razoável supor que quando o tempo aumentar para o infinito, o valor da integral da equação 2-1 se aproxima do valor médio “verdadeiro” da propriedade:

$$A_{med} = \lim_{\tau \rightarrow \infty} \frac{1}{\tau} \int_{t=0}^{\tau} A(p^N(t), r^N(t)) dt. \quad (2-1)$$

As equações de movimento de Newton, que governam a evolução temporal para um sistema clássico simples, têm soluções bem conhecidas e, portanto, apropriadas para calcular valores médios das propriedades e simular o comportamento dinâmico do sistema ao longo do tempo. A tarefa é possível de ser realizada calculando as forças sobre cada átomo a partir da diferenciação de uma função de energia potencial. As integrações das equações de movimento produzirão as posições, velocidades e aceleração das partículas ao longo do tempo de simulação e podem ser armazenadas e utilizadas para calcular propriedades do sistema. Porém, para sistemas macroscópicos, temos valores de partículas da ordem de 10^{23} e não seria factível resolver a equação 2-1 para a posição e momento de cada partícula deste sistema e assim obter a sua evolução temporal. Diante disto, a mecânica estatística é introduzida e um único sistema evoluindo no tempo

pode ser agora substituído por um grande número de réplicas deste sistema que são tratados simultaneamente. A média no tempo é então substituída por uma média no *ensemble*:

$$\langle A \rangle = \iint dp^N dr^N A(p^N, r^N) \rho(p^N, r^N). \quad (2-2)$$

Na mecânica estatística um *ensemble* é um conjunto de microestados de um sistema que pertencem ao mesmo estado termodinâmico. O colchete $\langle \rangle$, na equação 2-2, indicam a média sobre o *ensemble*, ou valor esperado, ou seja, o valor médio da propriedade A levando em consideração todas as réplicas do *ensemble* gerado para a simulação. $\rho(p^N, r^N)$ é a densidade de probabilidade do *ensemble*, isto é, a probabilidade de encontrar a configuração com momento p^N e posição r^N . Para se construir um *ensemble*, o estado termodinâmico do sistema é geralmente definido por um pequeno conjunto de parâmetros (número de partículas N, temperatura T, volume V, pressão p, potencial químico μ , entre outros), onde este conjunto é replicado M vezes. Todas as posições e momentos do sistema são pensados como microestados em um espaço multidimensional chamado espaço de fase, onde os microestados são distribuídos de acordo com a densidade de probabilidade daquele *ensemble*. Para um sistema de N átomos, este espaço possui 6N dimensões (três coordenadas por átomo e três componentes do momento). De acordo com a hipótese ergódica, que é um dos axiomas fundamentais da mecânica estatística, a média no *ensemble* é igual a média no tempo para um sistema em equilíbrio durante o curso de sua evolução natural, mostrando que elas devem produzir os mesmos resultados (FRENKEL, D.; SMIT, 2001). Cada microestado tem um peso sobre o *ensemble* que é proporcional a sua energia:

$$K(E_i, T) = e^{\frac{-E_i}{RT}}, \quad (2-3)$$

onde E_i é a energia associada ao microestado i e R é a constante dos gases. A soma dos pesos das contribuições energéticas de cada microestado dentro do espaço de fase constitui a função de partição, equação 2-4, e através do qual pode ser calculada a probabilidade de existência de cada microestado dentro do conjunto total, equação 2-5.

$$Q(T) = \sum_{i=1}^M e^{\frac{-E_i}{RT}} \quad (2-4)$$

$$\rho(E_i, T) = \frac{K}{Q}. \quad (2-5)$$

A função de partição contém todas as informações necessárias para o cálculo das propriedades termodinâmicas do sistema e cada função de partição é construída para representar um conjunto estatístico específico. Alguns *ensembles* são adotados na simulação computacional como o: NpT (número de partículas, pressão e temperatura fixas), NVT (número de partículas, volume e temperatura fixos), NVE (número de partículas, volume e energia fixos) ou μ VT (potencial químico, volume e temperatura fixos) (MORGON, NELSON H; COUTINHO, 2007). A densidade de probabilidade e função de partição é calculado de acordo com as condições termodinâmicas fixadas para cada *ensemble*. Podemos calcular estes *ensembles* termodinâmicos através da média do tempo (abordagem da Dinâmica Molecular) ou pela média das configurações (abordagem de Monte Carlo). A técnica de Dinâmica Molecular (DM) é baseada em modelos determinísticos da natureza, enquanto Monte Carlo (MC) é baseado em modelos estocásticos de amostragens aleatórias. No modelo de DM, as partículas se movimentam obedecendo as leis da mecânica clássica e possuem carga e massa específica (LEACH, 2001). O grau de resolução adotado da técnica de DM pode variar: existem técnicas de todos átomos (*all-atoms*) com a representação de todos os átomos do sistema; a resolução de átomos unidos (*united atoms*) onde pode-se incorporar o comportamento de alguns átomos em grupos, como os átomos de hidrogênio de um carbono alifático saturado podem ser incorporados num super átomo de massa e tamanho correspondente ao grupo CH_n ; além da resolução de grão-grosso (*coarse grain*) com partículas de massa e tamanho correspondentes a grupos de átomos (BRAUN et al., 2019). Para simulações de sistemas moleculares, há vantagens no uso de DM ao invés de MC, quando se quer informações sobre as propriedades dinâmicas temporais destes sistemas (FRENKEL, D.; SMIT, 2001). Para o presente estudo, reconhecemos que a investigação da dinâmica e estrutura das moléculas e suas interações específicas são mais bem realizadas com o emprego da técnica de DM.

Desde a publicação da primeira simulação de dinâmica molecular, aplicada a biomoléculas, em 1977 (MCCAMMON, J.A.; GELIN, 1977), o progressivo desenvolvimento e aperfeiçoamento de algoritmos, softwares e hardwares tem permitido a consolidação da DM como uma ferramenta

precisa e acessível para detalhar a dinâmica de biomoléculas (KLEPEIS et al., 2009). Apesar das primeiras simulações atomísticas aplicadas a biomoléculas (proteínas) terem ocorrido ainda na década de 70, a sua utilização para o estudo de membranas lipídicas só ocorreu no início da década de 90, com os trabalhos de Helmut *et al* (HELLER; SCHAEFER; SCHULTEN, 1993) e Damodaran *et al.* (DAMODARAN; MERZ; GABER, 1992). As simulações limitavam-se a sistemas de até 200 moléculas de lipídios com no máximo 200 ps de simulação, mas que já conseguiam reproduzir alguns dados experimentais com precisão razoável, além de mostrar a ferramenta como promissora e obter detalhes importantes, acerca destes sistemas, que medidas experimentais não conseguiriam fornecer. A partir daí, o uso de simulações atomísticas foi se incorporando na rotina de pesquisa envolvendo sistemas lipídicos à nível molecular. Devido ao aumento da potência e dos algoritmos dos computadores, os tempos de trajetória aumentaram de centenas de picossegundos para centenas de nanossegundos (DA HORA et al., 2016) e até microssegundos (HONG; TIELEMAN; WANG, 2014). Houve grandes avanços nas metodologias de amostragem e parametrização dos lipídios, hoje pode-se ter informações precisas e reprodutíveis em termos espaço-temporais sobre a estrutura, mecânica, termodinâmica, cinética e dinâmica destas membranas (SMITH; KLAUDA; SODT, 2019).

A metodologia DM é baseada nos princípios básicos da mecânica Newtoniana e da mecânica estatística. Nesta modelagem, os átomos são definidos como partículas carregadas, cujas cargas são previamente avaliadas em cálculos mecânico-quânticos e assumidas como constantes durante toda a simulação. É possível, nesta abordagem, determinar os movimentos das partículas do sistema do qual se conhecem o potencial de interação entre estas partículas e as forças que agem sobre cada uma delas em cada instante de tempo. Utilizando a segunda lei de Newton, resolve-se numericamente as equações de movimento clássico de cada partícula:

$$a_i = \frac{F_i}{m_i}, \quad (2-6)$$

onde a_i é a aceleração do átomo i e F_i é a força resultante atuando sobre o átomo i , de massa m_i . Resolvendo esta equação para cada partícula se obtêm a velocidade e a posição que resulta nas trajetórias da dinâmica molecular durante o tempo de simulação. As forças que atuam sobre cada partícula dentro do sistema são calculadas a partir das derivadas de uma função energia potencial $V(r)$ agindo sobre cada partícula:

$$F_i = - \frac{dV(r)}{dr_i}. \quad (2-7)$$

A equação acima é a base do método de DM e os detalhes envolvidos serão descritos nas próximas seções. A integração das equações de movimento deve então produzir uma trajetória que descreva como as posições, velocidades e acelerações das partículas variam e, para isso, são utilizados alguns algoritmos e aproximações, introduzidos na seção 2.2. A função energia potencial ($V(r)$), capaz de calcular as forças intra e intermoleculares do sistema, é comumente denominada campo de força e será descrito na seção 2.3. As simulações são geradas a partir das posições e velocidades iniciais, que devem entrar como dados para os cálculos das configurações seguintes. Na seção 2.4 é mostrado como é feita a escolha destas configurações iniciais. Por fim, na seção 2-5 é descrito como pode-se adequar as simulações as condições termodinâmicas desejadas.

2.2 Algoritmos

A escolha do algoritmo para a integração das equações de Newton é uma escolha importante a ser realizada. Para isso, devem ser feitas considerações importantes como o esforço computacional requerido e a conservação da energia. O algoritmo *Verlet* (VERLET, 1967) calcula as posições e acelerações dos átomos no tempo t atual e as posições dos mesmos no passo anterior, para calcular a posição e aceleração do passo seguinte. Estes cálculos são feitos a cada intervalo de tempo fixo (δt), durante o qual a força é considerada constante. Porém, um problema no algoritmo, para simulações de DM, é que as velocidades não aparecem explicitamente e conseqüentemente não há um controle da energia cinética do sistema. O método *Leap-Frog*, derivado do algoritmo *Verlet*, foi desenvolvido para solucionar estes problemas. Neste método, as velocidades das partículas do sistema são consideradas durante o cálculo das posições ao longo do tempo de simulação, além de calcular corretamente a energia cinética do sistema. As equações básicas do algoritmo são:

$$r(t + \delta t) = r(t) + \delta t v(t + \frac{1}{2} \delta t) \quad (2-8)$$

$$v(t + \frac{1}{2} \delta t) = v(t - \frac{1}{2} \delta t) + \delta t a(t), \quad (2-9)$$

em que r é a posição, t é o instante de tempo, a é aceleração e v a velocidade de cada partícula do sistema. Pela equação 2-9, as velocidades $v(t + \frac{1}{2}\delta t)$ são calculadas a partir das velocidades no tempo $t - \frac{1}{2}\delta t$ e acelerações no tempo t . Já as posições $r(t+\delta t)$ são deduzidas das velocidades calculadas com as posições $r(t)$ no tempo t . As velocidades para o tempo t são calculadas pela equação 2-10.

$$v(t) = \frac{1}{2} \left[v(t + \frac{1}{2}\delta t) + v(t - \frac{1}{2}\delta t) \right]. \quad (2-10)$$

Neste algoritmo, as velocidades obtidas num dado instante são calculadas a partir das velocidades no instante anterior ($t - \frac{1}{2}\delta t$) e posterior ($t + \frac{1}{2}\delta t$). (LEACH, 2001) O valor do passo de integração δt deve ser pequeno o bastante para permitir a descrição dos movimentos mais rápidos do sistema, que são os movimentos de vibração dos átomos da ordem de femtosegundos (FRENKEL, D.; SMIT, 2001). Em simulações de biomoléculas, geralmente, é considerado δt de 2 femtosegundos. Isso significa que uma simulação de, por exemplo, 100 ns, requer a execução de 50.000.000 passos, envolvendo o cálculo das forças entre todos os pares de átomos (para sistemas de biomoléculas isso é em torno de 10^4 - 10^6 átomos, em que a maioria são moléculas de água) a cada passo. Assim, diante a necessidade do valor δt ser pequeno, devido à escala de tempo dos processos biomoleculares, as simulações de dinâmica molecular são computacionalmente caras e demanda o uso de supercomputadores.

A demanda computacional de uma simulação de DM pode ser reduzida com o uso de restrições a certos movimentos dos átomos, por exemplo, as vibrações das ligações entre os átomos, especialmente aquelas envolvendo átomos de hidrogênio. Estas oscilações possuem uma frequência relativamente alta e uma baixa amplitude. Utilizando-se de algoritmos para manter o comprimento de ligação constante (*constraints*), podemos obter simulações significativamente mais longas. Neste trabalho, o algoritmo LINCS (HESS, 2008; HESS et al., 1997) foi aplicado para controlar o comprimento de ligações envolvendo átomos de hidrogênio. O algoritmo LINCS é uma metodologia que redefine os comprimentos de ligação dos átomos utilizando álgebra matricial. A equação aplicada sobre os átomos é dada na equação 2-11.

$$g(r) = |r_{i1} - r_{i2}| - d_i = 0 \quad i = 1, 2, 3, \dots \quad (2-11)$$

onde r_{i1} e r_{i2} são as posições dos átomos envolvidos na i -ésima equação de restrição e d_i é o comprimento da ligação realizada entre estes átomos. Trata-se de um método bastante estável, o qual evita flutuações, além de ser mais preciso e mais rápido que os primeiros algoritmos utilizados para restrição de movimento em DM (LEACH, 2001). Uma descrição mais detalhada sobre o algoritmo pode ser encontrado na referência (HESS et al., 1997).

2.3 Campo de Força

Pode-se definir campo de força como um conjunto de equações analíticas com parâmetros ajustáveis utilizados para descrever a energia potencial de um sistema de partículas. Neste modelo, os graus eletrônicos das moléculas são ignorados e apenas os movimentos dos núcleos são calculados. O pressuposto fundamental implícito a todas as metodologias da mecânica molecular é a aproximação de Born-Oppenheimer, que permite separar movimentos nucleares e eletrônicos (que ocorrem em diferentes escalas de tempo) e, portanto, escrever o potencial de um sistema em função apenas das coordenadas nucleares (LEACH, 2001). No modelo de campo de força, temos uma aproximação comum para o tratamento das interações inter e intramoleculares entre os átomos ou moléculas dentro de um sistema sob condições predeterminadas. Estas interações são determinadas empiricamente por princípios físicos, dados experimentais e parâmetros calculados por mecânica quântica durante o processo de parametrização. A obtenção destes parâmetros que compõe o campo de força é primordial e não é uma etapa trivial, pois para que estes parâmetros sejam válidos precisam reproduzir propriedades estruturais e/ou termodinâmicas como, por exemplo: densidade e entalpia de vaporização (líquidos); energia livre de solvatação dos íons em solução, coeficientes de transporte, constante dielétrica, entre outras (MONTICELLI; TIELEMAN, 2013). Na literatura existem diversas propostas de campos de força desenvolvidos e parametrizados de modo a melhor compreender os fenômenos de interesse em sistemas moleculares. Alguns exemplos de campo de força são o OPLS (*Optimized Potentials for Liquid Simulations*), com parâmetros desenvolvidos para proteínas, sacarídeos e especialmente no papel de solventes no estado líquido (JORGENSEN; TIRADO-RIVES, 1988); CHARMM (*Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics*) desenvolvido para reproduzir a dinâmica de moléculas em solução e em sólidos cristalinos (BROOKS et al., 1983); AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*) desenvolvido para dinâmica conformacional de ácidos nucleicos e proteínas

(WEINER et al., 1984) e GROMOS (*Groningen Molecular Simulation*) desenvolvido para reproduzir propriedades de biomoléculas em geral, como sacarídeos, peptídeos, proteínas e lipídios (VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1987), além de muitos outros campos de força que têm se desenvolvido para aplicações nos mais diversos sistemas. A escolha de qual campo de força aplicar para a modelagem do sistema em estudo é muito importante, considerando a forma com a qual seus parâmetros tenham sido obtidos e com que acurácia eles reproduzem tendências experimentais (MORGON, NELSONH; COUTINHO, 2007). A parametrização de biomoléculas como proteínas e lipídios é complexa, devido à dificuldade de desenvolvimento de um potencial que reproduza todas as classes de propriedades simultaneamente. Os primeiros modelos atomísticos de membranas de LPS e Lipídio A para uso em simulações de DM surgiram no início da década passada (LINS; STRAATSMA, 2001) baseados no campo de força GLYCAM_93 (WOODS et al., 1995) e AMBER95 (CORNELL et al., 1995), modelos estes que foram bem testados e validados (LINS et al., 2008; SHROLL; STRAATSMA, 2002; SOARES; STRAATSMA, 2008; STRAATSMA; SOARES, 2009). Desde então, este campo de força tem sofrido várias contribuições dando continuidade ao trabalho de parametrizações e validações. Neste trabalho, uma extensão do campo de força GROMOS foi usada com base no conjunto de parâmetros de carboidratos 45A4 (LINS; HÜNENBERGER, 2005). Esta extensão se consiste de resíduos de glucosamina previamente validados e abrange parâmetros de ligação padrão entre a porção de açúcar e as cadeias aciladas compatíveis com o conjunto de parâmetros lipídicos GROMOS 53A6 (CHANDRASEKHAR et al., 2003; OOSTENBRINK et al., 2005). Este conjunto de parâmetros foi testado e validado anteriormente para as bicamadas de Lipídio A (PONTES et al., 2012).

O potencial que engloba o campo de força pode ser considerado como a soma entre potenciais envolvendo átomos ligados quimicamente (V_{ligado}), onde é considerado até o terceiro átomo vizinho, e potenciais de interações entre átomos que não apresentam esta conexão ($V_{não-ligados}$), como é visto nas equações 2-12 a 2-14 e representado na Figura 6. Como foi utilizado o campo de força GROMOS (VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1987), as equações a seguir apresentadas refere-se ao que está definido pelo manual referenciado:

$$V_{total}(r) = V_{ligado}(r) + V_{n\tilde{a}o-ligado}(r) \quad (2-12)$$

$$V_{ligado}(r) = \sum_{lig} \frac{1}{4} k_r (r_{ij}^2 - r_0^2)^2 + \sum_{\tilde{a}ng} \frac{1}{2} k_\theta (\cos(\theta_{ijk}) - \cos(\theta_0))^2 + \\ + \sum_{died-p} k_\phi (1 + \cos(n\phi_{ijkl} - \phi_0)) + \sum_{died-i} \frac{1}{2} k_\xi (\phi_{ijkl} - \phi_0)^2 \quad (2-13)$$

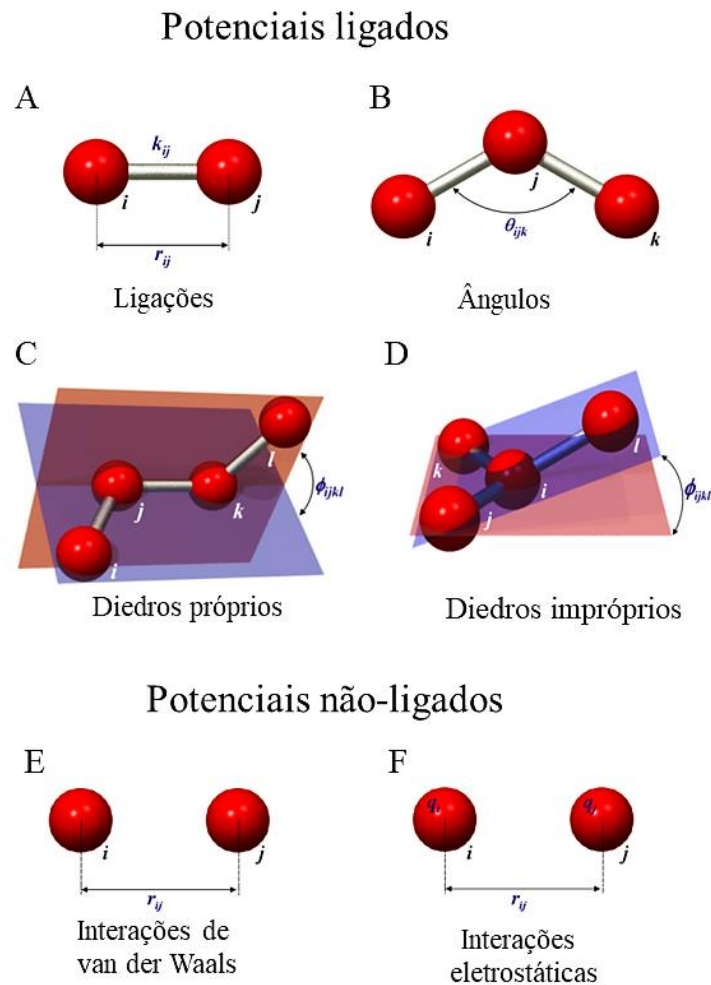
$$V_{n\tilde{a}o-ligado}(r) = \sum_{LJ(i,j)} \left[\frac{C_{ij}^{(12)}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}^{(6)}}{r_{ij}^6} \right] + \sum_{elet(i,j)} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{ij}} \quad (2-14)$$

Como a energia potencial é uma grandeza escalar, a soma de todos estes potenciais em relação a cada partícula do sistema configura a descrição necessária para utilização da equação 2-7 e desenvolvimento da evolução temporal do sistema através da dinâmica molecular.

O $V_{ligado}(r)$ refere-se às interações intramoleculares. O primeiro termo da equação 2-13 é referente ao termo de estiramento da ligação covalente estabelecida entre duas partículas i e j , como mostrado na Figura 6-A. A ligação química entre duas partículas nesta abordagem pode ser entendida como uma mola, utilizando um modelo clássico de vibração e expressam o quão distorcido está uma ligação química em relação a um dado valor de referência, r_0 . k_r representa a constante de força da ligação e geralmente é muito alta, indicando que é necessária uma grande quantidade de energia para esticar ou comprimir significativamente uma ligação química. Para o campo de força escolhido, o valor de k é obtido de dados espectroscópicos, enquanto o valor de equilíbrio para a ligação é extraído de difração de raio-X (VAN GUNSTEREN; KARPLUS, 1982). O r_{ij} é a distância entre as partículas i e j conectadas em cada instante da simulação e é obtido vetorialmente como a norma do vetor que liga as duas partículas. O segundo termo da equação 2-13 descreve o potencial formado pela oscilação dos ângulos calculados entre as partículas i , j e k , como mostrado na Figura 6-B. O modelo matemático que descreve este potencial é análogo ao do potencial harmônico de estiramento, mas os valores das constantes de força, k_θ , são geralmente mais baixos do que o de estiramento da ligação, indicando que é necessário menos energia para que um ângulo de ligação se desvie do seu valor de referência θ_0 . Assim como no exemplo anterior, k_θ e θ_0 são obtidos experimentalmente por medidas espectroscópicas e de difração de raios-X (VAN GUNSTEREN; KARPLUS, 1982). O valor do cosseno do ângulo θ_{ijk} também é medido vetorialmente durante a simulação. O terceiro termo da equação 2-13 é frequentemente chamado

de termo torsional e representa a energia potencial do sistema molecular em função da rotação em torno de cada ângulo diédrico.

Figura 6 – Representação das principais interações envolvidas que compõem a modelagem de campos de força, sendo os potenciais, referentes às interações intramoleculares: ligações, ângulos e diedros, como é visto, respectivamente, em A), B), C) e D). Os potenciais não-ligados das interações de van der Waals e eletrostáticas são mostradas em E) e F), respectivamente.



As energias envolvidas neste caso são significativamente mais baixas do que no estiramento de ligação e flexão de ângulo. Da forma como é definida no GROMOS, o termo torsional inclui átomos que estão separados por 3 ligações (Figura 6-C) e utiliza o potencial de interação do tipo 1-4 entre átomos não ligados para ser corretamente descrito (OOSTENBRINK et al., 2004). O valor de $k\theta$ é associado à altura da barreira rotacional descrita em relação a um ângulo torsional de referência θ_0 e n é um inteiro equivalente a periodicidade desta barreira. O valor de n depende da

sequência de átomos e, para o campo de força escolhido, pode ser obtido na referência (VANGUNSTEREN; BERENDSEN, 1987). O último termo da equação é o chamado potencial torsional impróprio, também conhecido como torção fora do plano. Este tipo de potencial pode ser aplicado quando se deseja manter uma conformação planar de 4 átomos e calcular o ângulo a partir de um valor de referência θ_0 , como mostrado na Figura 6-D.

O $V_{\text{não-ligado}}(r)$, definido pela equação 2-14 considera as interações entre os átomos que não estão ligados covalentemente entre si. O primeiro termo da equação nos dá as interações de van der Waals (Figura 6-E), utilizando o potencial de Lennard-Jones. Ele contém um termo atrativo e um repulsivo. A origem física do termo atrativo está nas forças de dispersão geradas entre dipolos instantâneos, que surgem a partir da polarizabilidade das moléculas. O termo repulsivo reflete a observação de que, abaixo de uma certa distância, normalmente em torno de 0,3 nm, os átomos se repelem. r_{ij} é a distância entre os átomos i e j , $C_{ij}^{(12)}$ e $C_{ij}^{(6)}$ são parâmetros que descrevem as interações entre os átomos e que dependem dos tipo de átomos e da característica da sua interação que diz respeito a função química que estes átomos desempenham, por exemplo, para a adição de íons no campo de força escolhido é preciso realizar a correta definição dos átomos que irão interagir com aquele íon. Uma vez realizada a correta definição dos átomos, os termos de interação entre eles podem ser encontrados através de regras de combinação para C_{ij}^{12} e C_{ij}^6 dadas por:

$$C_{ij}^{(12)} = \sqrt{C_i^{12} C_j^{12}} = 4\epsilon_{ij} \sigma_{ij}^{12} \quad (2-15)$$

$$C_{ij}^{(6)} = \sqrt{C_i^6 C_j^6} = 4\epsilon_{ij} \sigma_{ij}^6, \quad (2-16)$$

com $\epsilon_{ij} = \sqrt{\epsilon_i \epsilon_j}$ e $\sigma_{ij} = \frac{\sigma_i + \sigma_j}{2}$, sendo ϵ o poço de potencial e σ a distância interatômica em que a energia é zero. A interação de van der Waals é considerada de curto alcance e é computada numericamente com o uso de raios de corte. O segundo termo da equação 2-14 calcula o potencial das atrações eletrostática (Figura 6-F). Nessa equação q_i e q_j são as cargas dos átomos i e j que estão interagindo, ϵ_0 é a permissividade elétrica do vácuo e ϵ_r é a permissividade relativa do meio em que os átomos se encontram em relação ao seu valor quando no vácuo. Diferentemente das interações de van der Waals, as interações eletrostáticas decaem lentamente com a distância. Embora esta seja uma equação simples, o custo computacional referente ao cálculo do potencial eletrostático para todo o sistema é bem alto. Para corrigir este problema e tentar otimizar o tempo de

processamento de cálculo, algumas abordagens podem ser encontradas. Entre elas estão o uso de máquinas mais eficientes (utilização de placas GPU para efetuar as simulações), o aumento do intervalo de integração das equações de movimento (restringindo os modos vibracionais de osciladores muito rápidos, como átomos de hidrogênio) ou diminuindo o número de partículas sobre as quais serão levados em conta o processo de cálculo. Desta última metodologia decorrem modificações importantes nas funções potenciais utilizadas. Estes termos serão tratados mais adiante na seção 2-4-1, através das metodologias de tratamento eletrostático de longa distância.

2.4 Configuração Inicial do Sistema

Numa simulação de DM é necessário especificar uma configuração inicial bem definida, assim como suas velocidades iniciais. Para as velocidades iniciais das partículas, normalmente são atribuídas direções aleatórias, segundo a distribuição de Maxwell-Boltzmann correspondente à temperatura desejada.(ALLEN, 2004) Já para as posições iniciais, primeiramente, é necessário criar uma “caixa de simulação” (cúbica, ortorrômbica, ou de outra geometria) contendo as N moléculas do sistema em um volume V que corresponda a densidade desejada. As posições das moléculas iniciais devem ser compatíveis com a estrutura que se pretende estudar. Para simulações de membranas lipídicas, esta configuração deve capturar corretamente as propriedades estruturais, mecânicas, termodinâmicas e/ou dinâmicas relevantes do sistema.(SMITH; KLAUDA; SODT, 2019) A configuração inicial comumente adotada nestes sistemas é de uma bicamada plana com condições de contorno periódicas adequadas (ver seção 2.4.1). Normalmente, na preparação destes sistemas, os lipídios são pré-arranjados em uma bicamada, com as regiões hidrofóbicas dos lipídios em contato umas com as outras, enquanto a região hidrofílica interage com o solvente. A partir daí outros componentes como: íons e demais solutos são adicionados.(SMITH; KLAUDA; SODT, 2019) Para simulações contendo lipídios de estrutura mais complexa, como é o caso do Lipídio A, onde ele apresenta um número variado de cadeias aciladas e grupos fosfatos, sendo necessário adição de cátions para neutralizar o sistema, há grande flexibilidade conformacional e a forma como essa bicamada é montada e como os lipídios são orientados, pode afetar o resultado final destas simulações. Por isso é importante testar e validar a montagem das bicamadas para obter resultados reprodutíveis e confiáveis. Para mais informações sobre boas práticas na montagem de membranas lipídicas, ver a referência (SMITH; KLAUDA; SODT, 2019).

Durante a montagem da caixa de simulação é possível que haja superposições entre dois átomos ou ligações químicas que tenham comprimentos muito diferentes dos comprimentos de equilíbrio ditado pelo campo de força. Isto irá gerar forças muito intensas e causar instabilidade ao iniciar a dinâmica. Para evitar isto, utiliza-se de métodos de minimização de energia para aliviar as distorções dos sistemas em relação a um mínimo local da superfície de energia potencial. Métodos de otimização como *steepest descent*, algoritmo utilizado neste trabalho, são frequentemente usados em simulações de biomoléculas.(FRENKEL, D.; SMIT, 2001; LEACH, 2001)

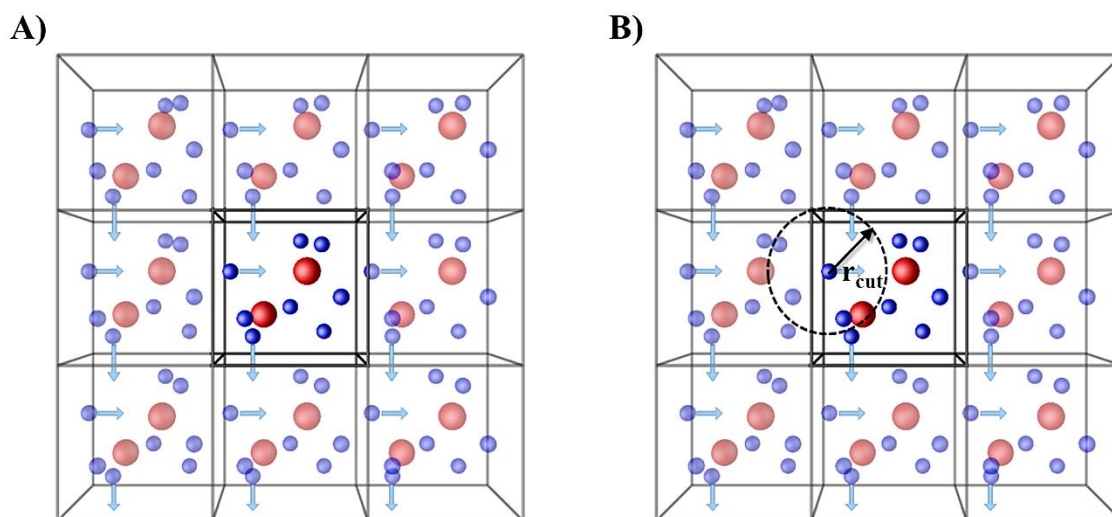
2.4.1 Condições Periódicas de Contorno

É comum, após a construção da caixa de simulação, que uma quantidade grande de partículas se situe nas faces da caixa. Estas partículas experimentam forças e efeitos de superfície que não são condizentes com o sistema experimental equivalente. Como o número N de átomos na caixa de simulação é muito pequeno em comparação ao experimento, um número significativo de átomos estará nas bordas da caixa e isto afetará os valores estimados das propriedades do sistema, pois estes átomos estariam interagindo em parte com o vácuo ao invés de com outras partículas do sistema. Com isto, os efeitos de superfície, isto é, as interações de átomos na fronteira da caixa, são bastante significativas. Para minimizar estes efeitos, empregam-se condições periódicas de contorno: réplicas idênticas da caixa de simulação são consideradas como estando dispostas ao redor da célula principal, computando apenas as propriedades das partículas contida na caixa central, não desprezando as suas interações com as caixas vizinhas, assim, formando um sistema que tende ao limite termodinâmico – com o número de partículas (N) e volume (V) tendendo ao infinito, porém tendo N/V uma constante - onde as partículas se movimentam de maneira idêntica à movimentação da célula principal, garantindo a permanência dos átomos e moléculas dentro da caixa.(ALLEN, 2004; MORGON, NELSON H; COUTINHO, 2007) No curso da simulação, se um átomo deixar a caixa de simulação principal, o mesmo será encontrado em uma réplica com a mesma velocidade, como é mostrado na Figura 7. Este método mostra-se bastante útil, mas é importante ter em mente a periodicidade artificial imposta ao considerar propriedades que são influenciadas por interações de longo alcance. Nas interações de longo alcance, cada elemento interage com todos os outros componentes do sistema. O decaimento das interações é mais lento que r^{-n} sendo que n é a dimensionalidade do sistema. O melhor exemplo de interação de longo

alcance que exige atenção em simulações de DM é a eletrostática, especialmente se a simulação é composta por espécies carregadas. O custo computacional referente ao cálculo do potencial eletrostático para o sistema inteiro vai com o número de partículas ao quadrado, N^2 . Para tentar otimizar o tempo computacional utilizado neste processo algumas modificações podem ser realizadas, como desprezar a interação em distância superior a um dado valor de corte.

Existem várias formas de aproximar o cálculo das interações de longo alcance, a mais comum é utilizando um raio de corte (do inglês – *cutoff*) (Figura 7B), onde fora deste raio as contribuições destas partículas não serão mais contabilizadas.

Figura 7 – A) Condições de contorno periódicas em três dimensões. À medida que uma partícula sai da caixa de simulação, uma partícula de imagem dessa partícula se move para substituí-la. B) Estrutura de funcionamento da busca por vizinhos onde as interações não-ligadas são calculadas, se os átomos estão situados num dado raio de corte, r_{cut} , dentro da própria caixa ou nas caixas vizinhas.



Modificado de (CENTRAL MICHIGAN UNIVERSITY, [s.d.]).

O valor escolhido para o raio de corte irá depender da necessidade de cada sistema a ser simulado e o equilíbrio entre a precisão da interação e a rapidez desejada, mas é preciso ter em mente que para evitar que as partículas projetadas interajam com as suas próprias imagens, nas condições periódicas de contorno, o tamanho da caixa de simulação deve ser maior que o raio especificado e que quanto maior o seu valor mais precisa será a energia calculada, entretando, será maior o número de interações calculadas e maior o custo computacional da dinâmica. Porém,

utilizar apenas um raio de corte para lidar com as interações de longo alcance nas simulações, torna as propriedades do sistema fortemente dependentes deste raio e causa artefatos significativos.

A razão para isso é que, para distâncias além do valor do raio, há uma descontinuidade no potencial e, conseqüentemente, no cálculo da força e de sua derivada. Assim, para permitir o uso do raio de corte, mas mantendo de certa forma as interações realizadas entre um átomo de interesse e aqueles que estão a sua volta, várias metodologias foram desenvolvidas para evitar estes problemas, como o campo de reação, campo de reação generalizado, soma de Ewald, onde a partir deste método foram desenvolvidos vários outras metodologias, entre outros.(CISNEROS et al., 2014) A escolha de qual tratamento eletrostático de longo alcance será utilizado na simulação não é arbitrária e deve ser tomada com cuidado dependendo do sistema que se quer simular, mas principalmente do campo de força que está sendo utilizado, pois a precisão do campo de força não é mantida ao alternar entre métodos diferentes para calcular interações eletrostáticas. Como exemplo disso, no caso bastante sensível de uma bicamada lipídica, Anezo *et al* compararam simulações de bicamadas de DPPC modificando os algoritmos de interação eletrostática e vários outros parâmetros de simulação, mas mantendo o mesmo campo de força e encontraram diferenças significativas na estrutura da bicamada.(ANÉZO et al., 2003) Portanto, é crucial ter o conhecimento de como o campo de força escolhido foi desenvolvido e como as moléculas que serão simuladas se comportam com diferentes tratamentos eletrostáticos. Foi demonstrado no trabalho de David *et al* (POGER; MARK, 2012), que o uso de *particle mesh Ewald* (PME) ou *reaction field* (RF) para o tratamento de interações eletrostáticas de longo alcance não influenciou significativamente as propriedades estruturais de bicamadas lipídicas utilizando diferentes extensões do campo de força GROMOS (campo de força utilizado neste trabalho). Já em simulações de peptídeos, Lins *et al* mostraram que o uso de PME produziu uma menor variação conformacional e uma tendência de estabilização estrutural maior do que quando utilizado RF como tratamento eletrostático.(LINS; RÖTHLISBERGER, 2006) Estes trabalhos mostram que a discussão sobre o melhor tratamento eletrostático de longo alcance para simulação de sistemas moleculares não é consenso e exige uma investigação cuidadosa, pois as conclusões obtidas numa classe de moléculas não podem ser estendidas a outros sistemas. Neste trabalho, foram testados o comportamento das bicamadas lipídicas utilizando os métodos de RF e PME para o tratamento das interações eletrostáticas.

2.4.2 Tratamento de Interações Eletrostáticas de Longa Distância

Particle Mesh Ewald

A utilização das condições periódicas de contorno, necessárias para evitar o problema de efeito de borda, gera a necessidade de contabilizar as interações eletrostáticas de todas as partículas na caixa de simulação com todas as réplicas periódicas do sistema. Assumindo a caixa de simulação como um cubo de lado L contendo N cargas, a soma das contribuições das interações eletrostáticas é dada por:

$$V_{ele} = \frac{f}{2} \sum_{n_x} \sum_{n_y} \sum_{n_z} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{\epsilon_r r_{ij}}, \quad (2-17)$$

onde n_x , n_y e n_z são a quantidade de réplicas do sistema em cada direção cartesiana. Nesta equação introduzimos a constante f dada pelo inverso de $4\pi\epsilon_0$. Existe, portanto, uma contribuição para a energia total das interações na caixa central e todas as caixas das réplicas. O problema é que o somatório na equação 2-17 é condicionalmente convergente. (LEACH, 2001) Para contornar este problema, é utilizado a soma de Ewald, introduzida por Ewald em 1921, que converte esta soma em duas séries, cada uma das quais converge muito mais rapidamente. A base matemática para isto é a seguinte identidade matemática:

$$\frac{1}{r} = \frac{f(r)}{r} + \frac{1 - f(r)}{r}. \quad (2-18)$$

O objetivo é escolher uma função apropriada, $f(r)$, em que o primeiro termo da equação decaia rapidamente para os valores de r menores que o raio de corte, enquanto o segundo termo decai lentamente para qualquer valor de r sendo expresso no espaço recíproco. No método Ewald, cada carga é considerada cercada por uma distribuição de carga neutralizante de magnitude igual, mas de sinal oposto. Através desta metodologia, o potencial elétrico total do sistema é dado pela soma do potencial no espaço real e no espaço recíproco. No espaço real é introduzido uma função de erro complementar, $erfc$:

$$erfc(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_x^\infty e^{-t^2} dt. \quad (2-19)$$

O ponto crucial é que este novo somatório envolvendo a função de erro converge muito rapidamente e, além de alguma distância do raio de corte, seu valor pode ser considerado desprezível, porém o algoritmo tem um escalonamento que vai com o quadrado do número de partículas do sistema. Uma alternativa a este problema é a utilização de uma interpolação multidimensional por partes do somatório no espaço recíproco seguindo a metodologia *particle-mesh* com auxílio das transformadas rápidas de fourier (FFT).(DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993) Nesta metodologia conhecida como *particle-mesh* Ewald (PME) há uma melhora no escalonamento do algoritmo chegando a um processo que depende de $N \cdot \ln(N)$. Para mais informações sobre a implementação da soma e algoritmos ver a referência (DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993). Uma das vantagens deste método de Ewald é que há menos aproximações para o cálculo das interações eletrostáticas, porém como o método transforma o sistema de simulação em um sistema verdadeiramente periódico, isso pode induzir certos artifícios na distribuição de carga.(SAGUI; DARDEN, 1999)

Reaction Field

No método de campo de reação (*reaction field*) (TIRONI et al., 1995), é determinada uma esfera com um raio de corte ao redor de uma molécula e definido que dentro deste raio as interações entre as partículas são calculadas explicitamente pelo segundo termo da equação 2-14, mas para além do raio de corte a molécula vê essencialmente um ambiente homogêneo de constante dielétrica (ϵ). Esta descrição pode ser observada na equação 2-20.

$$V_{ele} = f \frac{q_i q_j}{\epsilon_r} \left[\frac{1}{r_{ij}} + k_{rf} r_{ij}^2 - c_{rf} \right]. \quad (2-20)$$

As constantes do campo de reação expressas acima são descritas nas equações 2-21 e 2-22 fazendo uso das definições de raio de corte, r_c , e a constante dielétrica do campo de reação ϵ_{rf} .(ABRAHAM et al., 2015; TIRONI et al., 1995)

$$k_{rf} = \frac{1}{r_c^3} \frac{\epsilon_{rf} - \epsilon_r}{(2\epsilon_{rf} + \epsilon_r)} \quad (2-21)$$

$$c_{rf} = \frac{1}{r_c} \frac{3\varepsilon_{rf}}{(2\varepsilon_{rf} + \varepsilon_r)}. \quad (2-22)$$

O valor da constante dielétrica do campo de reação pode ser obtido através de estudos computacionais para se determinar qual valor reproduz as propriedades de um determinado meio experimental.(GLÄTTLI; DAURA; VAN GUNSTEREN, 2002) Neste método existe uma boa base física, pois em solução, após alguma distância é razoável supor que um átomo carregado não vê mais as cargas individuais, mas sim as propriedades dielétricas médias daquele meio. Uma outra vantagem é que ele é computacionalmente barato e fácil de paralelizar em um grande número de processadores. Uma desvantagem que pode ocasionar artefatos é o fato de que a constante dielétrica de um sistema pode não ser homogênea.(WONG-EKKABUT; KARTTUNEN, 2016)

2.5 Protocolo de Equilibração

A escolha do *ensemble* para realizar a DM é feita levando em consideração o sistema que está sendo estudado e o que se quer determinar deste sistema. Os *ensembles* termodinâmicos mais relevantes para a dinâmica de membranas lipídicas são os conjuntos canônico (NVT) e isobárico/isotérmico (NpT)(CISNEROS et al., 2014), porém como vimos no tópico anterior, sistemas heterogêneos e muito carregados como os que estão sendo estudados neste trabalho, necessitam de uma configuração inicial adequada e estável, além disso, é necessário manter as variáveis termodinâmicas próximas as requeridas para, assim, iniciar a dinâmica propriamente dita. Isto é feito através de pequenas simulações do sistema, em diferentes *ensembles* permitindo que o sistema se equilibre e possa amostrar as configurações mais relevantes, ou mais prováveis, no conjunto de interesse de equilíbrio. Esta fase de equilíbrio pode ser monitorada através da avaliação da temperatura e pressão do sistema, bem como da energia cinética e potencial, para garantir que eles atinjam um estado estacionário em média. Se não feita corretamente, esta etapa de equilíbrio das variáveis termodinâmicas pode causar artefatos e fornecer dados que não são reprodutíveis.(SMITH; KLAUDA; SODT, 2019) Devido ao aumento da capacidade computacional e a facilidade de simular muitos sistemas por um longo tempo, a equilibração muitas vezes é deixada de lado e pode influenciar nos resultados. Quando o equilíbrio estiver completo, pode-se começar a coletar dados para análise. Normalmente, esta fase é chamada de "produção". A principal diferença entre equilíbrio e produção é simplesmente que, na simulação de produção

se planeja reter e analisar os dados coletados. A produção deve sempre ser precedida de um equilíbrio apropriado para o conjunto de produção de interesse.(BRAUN et al., 2019) Os *ensemble* utilizados neste trabalho foram NVT e NpT.

2.5.1 *Ensemble* NVT

Em muitos casos, para emular experimentos feitos em condições de laboratório, a amostragem do conjunto canônico (temperatura constante) é desejada.(HÜNENBERGER, 2005) No *ensemble* canônico, a temperatura, o volume e o número de partículas são mantidos constantes. O volume é mantido constante fixando-se as dimensões da caixa de simulação. A forma como a temperatura é mantida fixa será explicada na seção 2.5.3. É importante frisar que numa simulação NVT, a energia total não é conservada. Este *ensemble* é utilizado normalmente na etapa de termalização do sistema.

2.5.2 *Ensemble* NpT

No *ensemble* NPT, a temperatura e a pressão são mantidas constantes por métodos que serão descritos na seção 2.5.3 e 2.5.4. Já o volume do sistema pode mudar durante a simulação através do escalonamento das dimensões da caixa de simulação por um fator $\gamma = \sqrt[3]{p(t)/p^{desejada}}$. A pressão de um dado instante da simulação pode ser computada através do teorema do virial. Mudando o volume da caixa de simulação muda-se as distâncias e as forças intermoleculares, mantendo-se o controle sobre a pressão exercida pelo sistema.(MORGON, NELSON H; COUTINHO, 2007) Neste *ensemble*, a energia total também não é conservada e isso deve-se a troca de calor com o reservatório térmico e a realização de trabalho expansivo pelo pistão externo (ambos fictícios). Este *ensemble* é particularmente útil na etapa de preparação e termalização de bicamadas lipídicas, e é um dos conjuntos mais utilizados nas simulações de DM. Para manter a temperatura e/ou pressão constante nos *ensembles* faz-se uso de algoritmos numéricos de acoplamento que introduzem pequenas modificações no sistema fazendo com que as variáveis termodinâmicas se mantenham constantes ao longo de toda a simulação. São eles o termostato (acoplamento de temperatura) e barostato (acoplamento de pressão). Neste trabalho utilizamos o barostato e termostato de Berendsen.

2.5.3 Termostato

O objetivo do termostato é manter o sistema com uma temperatura constante, em média, e no valor desejado, T_0 . O aquecimento indesejável é observado através da variação da energia total do sistema. A temperatura de uma simulação de DM é normalmente medida usando energias cinéticas, conforme definido no teorema da equipartição:

$$\frac{3}{2} N \kappa_B T = \left\langle \sum_{i=1}^N \frac{m_i v_i^2}{2} \right\rangle, \quad (2-23)$$

onde N é o número de graus de liberdade, κ_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura. Os colchetes angulares indicam que a temperatura é definida como uma quantidade média do tempo. (LEACH, 2001) Assim, a equação de temperatura é obtida isolando o T . Considerando que, no termostato de Berendsen, a variação da temperatura pode ser descrita como o resultado do escalonamento da velocidade, podemos escrever ΔT da seguinte maneira:

$$\Delta T = (\lambda^2 - 1)T(t), \quad (2-24)$$

onde λ é o fator de escalonamento e isolado é escrito da seguinte forma:

$$\lambda = \sqrt{\frac{T_0}{T(t)}}, \quad (2-25)$$

onde T_0 é a temperatura de referência. Para evitar a brusca variação de temperatura é usado um banho térmico acoplado ao sistema que funciona como uma fonte termal adicionando ou removendo calor de acordo com a necessidade na simulação. No termostato de Berendsen (BERENDSEN et al., 1984), o algoritmo é dado por um acoplamento fraco descrevendo uma cinética de primeira ordem:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T(t)}{\tau}, \quad (2-26)$$

onde a temperatura T é derivada em relação ao tempo t e τ é o parâmetro de acoplamento e tem unidade de tempo, este termo indica o quanto o banho e o sistema estão acoplados. A frequência do acoplamento é definida pelo usuário.

2.5.4 Barostato

Para obter uma pressão não-atmosférica, algum dispositivo, como um pistão, gás inerte etc., seria necessário para controlar a pressão e o volume do sistema. Assim como no uso do termostato, se a pressão deve ser mantida em uma simulação será necessário um algoritmo de barostato para amostrar este conjunto.(BRAUN et al., 2019) A pressão numa simulação de DM é comumente calculada a partir da diferença entre a energia cinética e o virial(BERENDSEN et al., 1984):

$$P = \frac{2}{3V} (E_{kin} - \mathcal{E}) , \quad (2-27)$$

sendo

$$\mathcal{E} = - \frac{1}{2} \sum_{i < j} r_{ij} \cdot F_{ij} , \quad (2-28)$$

onde V é o volume da caixa de simulação, E_{kin} é a energia cinética, F_{ij} a força exercida na partícula i pela partícula j , r_{ij} é a distância entre estas partículas ou a distância entre a partícula i e a imagem mais próxima da partícula j e \mathcal{E} é o virial interno para potenciais aditivos de pares. Nas simulações deste trabalho foi utilizado o barostato de Berendsen(BERENDSEN et al., 1984) como um banho de pressão de interação fraca, de forma análoga ao termostato. Este banho dimensiona o volume periodicamente por um fator μ :

$$\mu = 1 - \frac{\beta \Delta t}{3\tau_p} (P_0 - P) , \quad (2-29)$$

onde τ_p é a constante de acoplamento da pressão, β é a compressibilidade isotérmica do sistema e P_0 é o valor de pressão que se deseja manter constante ao longo da simulação. Através deste fator a nova posição das partículas é dada pela equação:

$$r'_i = \mu r_i , \quad (2-30)$$

onde r'_i é a posição redimensionada da partícula i . Caso o sistema não se apresente em uma distribuição isotrópica de pressão, como para sistemas anisotrópicos ou com outros formatos de caixa que não sejam cúbicos, as equações 2-29 e 2-30 podem se apresentar como equações tensoriais.(BERENDSEN et al., 1984)

3 ANÁLISES

Ao final de cada simulação foram realizadas análises de propriedades estruturais, dinâmicas e energéticas dos sistemas em estudo. Para isto, foram utilizados os arquivos de trajetória contendo a posição e as velocidades das partículas, e os arquivos de energia contendo os componentes energéticos salvos durante a simulação. Foram utilizados dois pacotes de programas que tornam estas análises possíveis. O primeiro é o GROMACS v.2016.4 (ABRAHAM et al., 2015) que oferece diferentes rotinas computacionais para calcular diversas propriedades de interesse. O segundo programa utilizado é o SuAVE (SANTOS et al., 2019), um pacote de ferramentas de análises desenvolvido no nosso grupo. O SuAVE utiliza um procedimento que mapeia a superfície, com formatos generalizados, a partir da construção de uma grade utilizando átomos de referência no sistema. Para os sistemas de bicamadas lipídicas deste trabalho, este mapeamento permite o cálculo de propriedades afetadas por transições estruturais que induzem mudança na planaridade da bicamada. O programa VMD (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996) foi utilizado para a produção das imagens.

3.1 Área por Lipídio (A_L)

A área por lipídio, A_L , é uma medida da área bidimensional ocupada por uma molécula lipídica como parte de uma bicamada ou monocamada, e sendo, portanto, uma propriedade descritiva do empacotamento dos lipídios pertencentes a estes sistemas. Esta propriedade também é capaz de informar se a estrutura de uma bicamada atingiu o estado de equilíbrio e é um ótimo ponto de referência para comparações com dados experimentais, uma vez que estes podem ser estimados experimentalmente para vários sistemas lamelares. (NAGLE; TRISTRAM-NAGLE, 2000) A A_L é comumente calculada a cada instante da simulação como a área da membrana projetada sobre o plano xy, e dividida pelo número de lipídios compondo a bicamada. Esta abordagem consegue obter valores próximos a resultados experimentais, porém não garante que o resultado seja exato, principalmente em sistemas onde há formação de curvatura, onde, neste caso, a área por lipídio passa a ser subestimada. Esta medida pode ser corrigida a partir da utilização da rotina *s_area* do software SuAVE que calcula a área de membranas lipídicas através de superfícies ajustadas a cada monocamada. Esta superfície é criada a partir de uma malha de ajuste, construída com base em átomos de referência da região de interface, que melhor representa a morfologia desta superfície

lipídica. Para os sistemas deste trabalho, foram utilizados os átomos de fósforo do grupo fosfato como átomos de referência por estarem presentes na cabeça dos lipídios e apresentarem baixa mobilidade durante a simulação. O cálculo da A_L é dado pela equação 3-1.

$$A_L = \frac{A_t}{n_{lipidio}}, \quad (3-1)$$

onde A_t é a área medida pelo programa, levando em consideração a curvatura da membrana, e $n_{lipidio}$ é o número de lipídios em cada lamela da bicamada. Para mais detalhes sobre a implementação do SuAVE, ver a referência (SANTOS et al., 2019).

3.2 Espessura da Bicamada

A espessura da bicamada é uma medida simples e reflete o tamanho das cadeias lipídicas presentes na membrana, além de poder também refletir a fase estrutural em que esta bicamada se encontra. A espessura de bicamadas lipídicas, assim como a área por lipídio, é uma propriedade estrutural importante e que também pode ser extraída através de algumas técnicas experimentais. (NAGLE; TRISTRAM-NAGLE, 2000) No procedimento para estimativa da espessura da interface hidrofóbica, é comum utilizar a distância entre os picos referentes aos grupos fosfatos, no perfil de densidade do sistema. Podemos obter resultados condizentes com valores experimentais, mas, assim como no caso da área por lipídio, apenas para sistemas onde não há formação significativa de curvatura na superfície da bicamada. Portanto, para realizar a análise levando em consideração a morfologia do sistema, faz-se necessário a utilização da malha de ajuste desenvolvida pelo SuAVE. A rotina *s_thick* calcula a espessura da bicamada como a distância entre os pontos de cada malha de ajuste criada sobre cada monocamada. Com estas duas malhas de ajuste o SuAVE consegue exprimir uma média espacial da espessura como função do tempo, ou de cada frame da trajetória, e uma média temporal como função da localização dos pontos superfície de ajuste. (SANTOS et al., 2019).

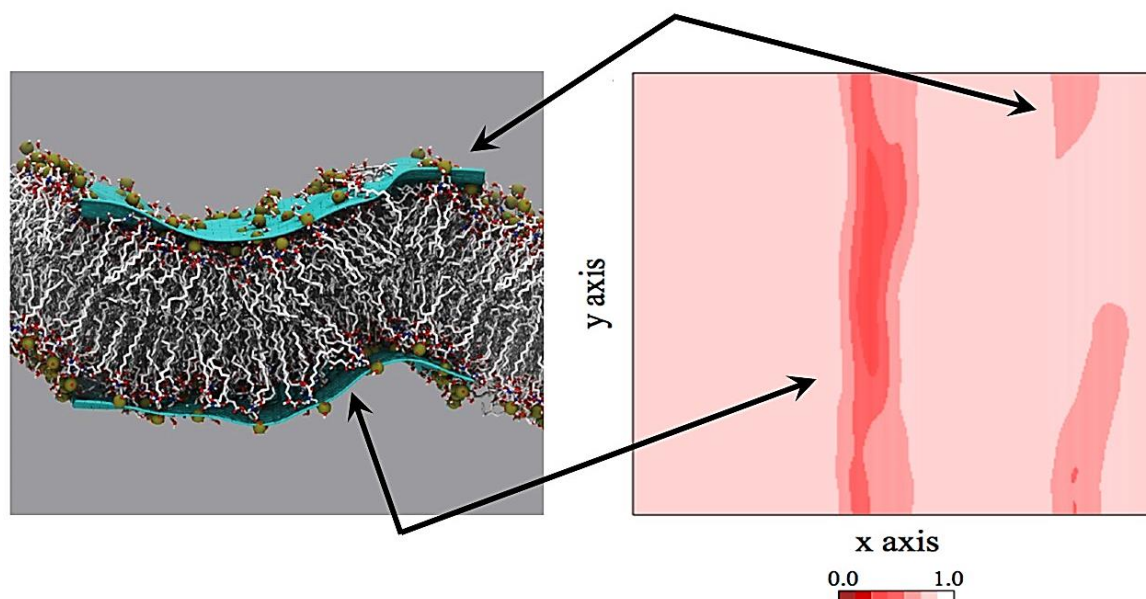
3.3 Curvatura da Membrana

A curvatura da membrana é uma análise que, apesar de não poder ser medida experimentalmente, pode ser de grande utilidade em mostrar e localizar modificações estruturais nas bicamadas que interferem em sua estrutura. O cálculo para esta análise é feito através da rotina *s_order* implementada no programa SuAVE, que descreve todo o campo de vetores normais à superfície da membrana e calcula o desvio angular definido entre cada vetor e o eixo normal ao sistema, que por definição é o eixo z quando a membrana está distribuída ao longo do plano xy. Calculando estes ângulos sobre todos os quadros no arquivo de entrada de simulação, esta medição fornece a frequência na qual um certo ângulo aparece na superfície. Com isto, é possível preparar um histograma da frequência média para todos os valores de ângulo levando em consideração todos os quadros que compõem o arquivo de entrada. O valor do ângulo de desvio está definido no intervalo entre 0° e 90°, sendo o primeiro caso quando o vetor normal é paralelo ao eixo normal do sistema, e o segundo caso quando o vetor é ortogonal ao eixo normal do sistema. Com a distribuição dos ângulos de desvio para toda a extensão da membrana, pode-se então calcular o parâmetro de ordem de curvatura, definido pela equação 3-2, derivada da expressão do polinômio de Legendre de segunda ordem com o cosseno dos ângulos calculados no passo anterior (SANTOS et al., 2019):

$$S_c(\theta) = \frac{1}{2}(3\cos^2(\theta) - 1), \quad (3-2)$$

em que, θ é o ângulo de desvio calculado e S_c é o parâmetro de ordem de curvatura. Nesta medida, o parâmetro de curvatura assume um valor de 1 quando a superfície local é normal ao eixo z do sistema, isto é, quando $\theta = 0^\circ$, e um valor de -0,5 quando a superfície é paralela ao eixo z, isto é, quando $\theta = 90^\circ$. O programa *s_order* também fornece uma distribuição bidimensional da média de S_c , medido em cada seção retangular da malha de ajuste ao longo de toda a simulação. Este mapa de cores é ilustrado para uma bicamada curvada na Figura 8, mostrando um gradiente de cores de branco a vermelho representando as regiões com curvatura menor e maior, respectivamente.

Figura 8 – Parâmetro de ordem de curvatura com a média no tempo projetada na superfície da membrana.



Modificado de (SANTOS et al., 2019).

3.4 Perfil de Densidade

Os perfis de densidade parcial dos componentes do sistema são uma descrição espacial de como estes componentes se encontram distribuídos ao longo de um eixo de orientação escolhido, e inferir quais grupos interagem entre si, devido à sua proximidade. Na análise dos diferentes grupos químicos do lipídio, pode-se obter propriedades estruturais importantes da membrana lipídica como a forma de agregação, espessura da membrana, permeabilidade a água, etc. A escolha do eixo interfere diretamente no formato do gráfico de densidade. Para sistemas compostos por bicamadas, é escolhido como orientação de referência o eixo normal a membrana, já que para bicamadas simétricas, ou seja, com o mesmo tipo de lipídio em cada lamela, o gráfico de densidade da membrana apresenta simetria em relação ao centro da bicamada. O perfil de densidade é uma propriedade que pode ser diretamente comparada com medidas experimentais através de dados de difração de raio-X, como mostra o trabalho de Snyder *et al* (SNYDER; KIM; MCINTOSH, 1999) onde utilizaram a técnica em sistemas multilamelares de lipopolissacarídeos, e dados de difração de nêutrons. (NAGLE; TRISTRAM-NAGLE, 2000) Nas simulações de membranas lipídicas o cálculo desta propriedade é bem simples. Estando a membrana lipídica sobre o plano xy de modo

que o vetor normal à bicamada coincida com o eixo z do sistema, o perfil de densidade é obtido avaliando a densidade de cada grupo químico compondo o sistema em diferentes fatias ao longo do eixo z. Porém para sistemas com superfície curvada ou ondulada há um erro na descrição dos componentes da análise. A rotina *s_dens*, presente no SuAVE, corrige estes problemas. Uma superfície de ajuste é desenvolvida para cada uma das interfaces da bicamada e a distribuição de cada grupo químico analisado no cálculo em relação a média das superfícies de ajuste e sua projeção em relação ao vetor normal do sistema é o ponto para construção do gráfico de densidade.

Todas as análises oferecidas pelo programa SuAVE fornecem os valores de RMSD daquela análise. O RMSD calculado entre a superfície de ajuste e a interface química de interesse é uma ferramenta útil para avaliar o quanto da superfície pode ser explicado pelo modelo da superfície de ajuste. Em outras palavras, o valor do RMSD indica se uma análise estrutural baseada na superfície de ajuste do programa SuAVE pode realmente descrever a interface química de interesse corretamente e obter, como resultado, valores coerentes com a realidade do sistema. Pelo que foi mostrado no trabalho de Santos *et al.* (2019)(SANTOS *et al.*, 2019), os valores de RMSD calculados para cada análise do programa devem, idealmente, ser os menores possíveis, de modo que os resultados das análises estruturais desenvolvidas pelo SuAVE sejam fiéis à dinâmica estrutural da interface de interesse. Contudo, não há uma estimativa do valor máximo de RMSD obtido em uma análise, a partir do qual, as propriedades estruturais calculadas nesta análise não possam mais ser tomadas como condizentes com a realidade do sistema. Pode-se, entretanto, citar que para a maioria dos estudos realizados por Santos *et al.* (2019) os valores de RMSD aceitáveis para membranas lipídicas se mostraram abaixo de 0,2 nm.

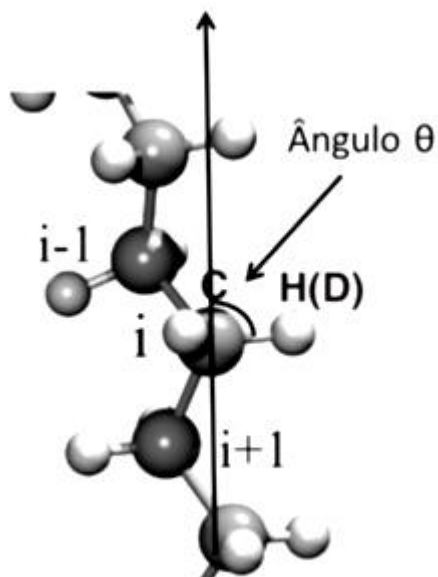
3.5 Parâmetro de Ordem de Deutério S_{CD}

A análise do ordenamento das cadeias lipídicas oferece informações sobre a fluidez do sistema. Acima da temperatura de transição T_m entre as fases gel e líquido-cristalino, as cadeias lipídicas exibem uma maior mobilidade conformacional.(DEVIREDDY, 2010) A ordem/desordem conformacional e de orientação pode ser quantificada através do parâmetro de ordem de deutério. O cálculo, como mostrado na equação 3-3, descreve a orientação do vetor de ligação C-H em relação ao vetor normal a bicamada (normalmente o eixo z em uma simulação de membrana), calculando a média de todos os lipídios e de todo o tempo de amostragem.(PIGGOT *et al.*, 2017)

$$S_{CD} = \frac{3\langle \cos^2 \theta_i \rangle - 1}{2}, \quad (3-3)$$

onde θ_i é o ângulo entre a ligação química C-H e o vetor normal a bicamada. O eixo molecular i é definido para a n -ésima unidade CH_2 e o eixo formado pelos átomos de carbono ($i-1$) e ($i+1$) como indicado na Figura 9. Se as cadeias lipídicas estiverem perfeitamente ordenadas na membrana, o ângulo entre as ligações C-H da cadeia e o vetor normal da bicamada será de 90° com parâmetro de ordem no valor de -0,5. Já quando a orientação das ligações C-H é em torno de 0° o valor do parâmetro de ordem será de 0. O parâmetro de ordem é normalmente definido para todos os carbonos saturados que possuem dois átomos de carbono vizinho. (ALLISON; ROLAND, 2010) No nosso caso, que utilizamos o modelo de átomos unidos para os carbonos acilados, a rotina computacional posiciona átomos de hidrogênios aos carbonos de maneira a obter uma configuração tetraédrica para o elemento. Os parâmetros de ordem foram calculados com a rotina *gmx order* do programa GROMACS.

Figura 9 – Definição dos eixos para o cálculo dos parâmetros de ordem S_{CD} em cadeias aciladas de lipídios.



Adaptado de (NAGLE; TRISTRAM-NAGLE, 2000).

3.6 Difusão dos Íons

A difusão dos íons dentro do sistema é uma análise importante a ser calculada, pois se relaciona diretamente com as leis de transporte de massa às quais todo sistema deve obedecer. Para determinar o coeficiente de difusão, D_A , dos íons, ou de qualquer molécula dentro do sistema, pode-se usar a relação de Einstein (ALLEN, M.P.; TILDESLEY, 1987):

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \langle \|r_i(t) - r_i(0)\|^2 \rangle = 6D_A t, \quad (3-4)$$

onde o primeiro termo da equação representa o desvio médio quadrático da posição das partículas compondo o sistema ao longo de toda a simulação e D_A é a constante de difusão da partícula em relação ao sistema em que ela se encontra. Este desvio médio quadrático e D_A são calculados pela rotina *gmx msd* também presente no GROMACS. Este programa utiliza alguns pontos para ajustar a reta e calcular o coeficiente de difusão. Para moléculas constituídas por mais de um átomo, r_i pode ser tomado como o centro das posições de massa das moléculas.

3.7 Função de Distribuição Radial $g(r)$

A função de distribuição radial, $g(r)$, é uma medida da correlação entre as partículas de um sistema de muitas partículas. (MADEIRA; VITIELLO, 2012) Esta função descreve como a distribuição das partículas j existentes no sistema, estão em torno de uma partícula i de referência. Com esta análise podemos determinar as camadas de solvatação ao redor de um íon em solução e calcular o seu número de coordenação. A função de distribuição radial é definida como:

$$g_{ij}(r) = \frac{N_{ij}(r, r + \Delta r)}{4\pi r^2 \Delta r \rho_j}, \quad (3-5)$$

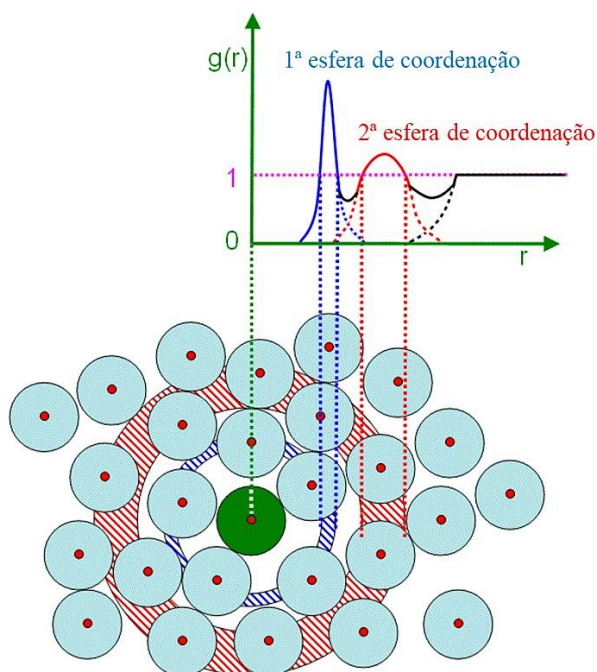
onde r é a separação entre os átomos i e j , $N_{ij}(r, r + \Delta r)$ é o número médio de átomos localizados entre o intervalo espacial de r até $r + \Delta r$ e centrado no átomo i . O elemento de volume esférico é representado pelo termo $4\pi r^2 \Delta r$, e ρ_j representa a densidade total do átomo j no raio total de integração da propriedade. A distribuição $g_{ij}(r)$ é armazenada num histograma de distribuição entre os pares selecionados. A Figura 10 mostra como os picos do gráfico se relaciona com a

distribuição radial de uma partícula em relação a outra. Quando $g_{ij}(r) = 1$, a densidade será a média do sistema. A integração de $g(r)$ nos fornece o número de coordenação de uma molécula naquele intervalo espacial integrado, como mostra a equação 3-6:

$$N(r) = 4\pi\rho \int_0^r g(r)r^2 dr. \quad (3-6)$$

A função de distribuição radial de pares pode ser calculada através da rotina computacional *gmx rdf* implementada no programa GROMACS.

Figura 10 – Relação entre as esferas de coordenação com os picos do gráfico de distribuição radial.



Modificado de <http://www.compsoc.man.ac.uk/~lucky/Democritus/Theory/rdf.html>.

4 PROCEDIMENTO COMPUTACIONAL

Os resultados desta dissertação foram divididos em três partes e a metodologia adotada em cada etapa será descrita nesta seção. Na primeira etapa foi estudado como diferentes protocolos utilizados na etapa de equilibração dos sistemas afetam as simulações de bicamadas lipídicas de Lipídio A de *E.coli* (seção 4.1). Após ser decidido qual o protocolo foi mais eficiente na simulação destes sistemas, foi estudado se diferentes formas de construir as bicamadas afetavam a dinâmica e propriedades dos sistemas (seção 4.2). Na última parte, após determinar o conjunto de condições iniciais que mais se adequou aos sistemas apresentados, foi discutido em detalhes a influência do íon Al^{3+} e sais de $AlCl_3$ e $NaCl$ em bicamadas de Lipídio A (seção 4.3).

4.1 Comparação do Protocolo de Equilibração

Nesta etapa, foi investigado como diferentes protocolos de simulação afetam bicamadas de Lipídio A sob diferentes regimes de solução salina.

Foram preparadas nove simulações compostas por bicamadas de Lipídio A de *E.coli* com estrutura hexaacilada difosforilada. As estruturas químicas dos lipídios simulados nesta dissertação são descritas na Figura 3 e as topologias moleculares e parâmetros atômicos dos lipídios encontram-se descritos no Apêndice A. Cada monocamada contém 81 unidades lipídicas distribuídas num arranjo de 9x9. As bicamadas foram construídas a partir de uma única unidade de Lipídio A que teve sua estrutura alinhada no plano xy e replicada para formar uma lamela de dimensão 9x9. Esta lamela foi duplicada e sua orientação no eixo z foi invertida. A partir da concatenação dessas duas lamelas obteve-se a bicamada lipídica utilizada nestas simulações. Uma descrição mais detalhada da montagem destas bicamadas será relatada na seção 4.2. Posteriormente, a caixa de simulação teve sua dimensão no eixo z expandida para 12 nm e 40325 moléculas de água foram adicionadas. O modelo de água utilizado nas simulações foi SPC. A bicamada foi centralizada para que tivesse a mesma proporção de moléculas de água na lamela superior e inferior. A molécula de Lipídio A em pH neutro têm carga -2e para a espécie difosforilada. Para neutralizar a carga total do sistema, adicionou-se 108 cátions Al^{3+} . As bicamadas de Lipídio A foram simuladas em três diferentes regimes de concentração salina: i. sem adição de concentração salina, exceto os contra-íons Al^{3+} necessários para garantir a eletroneutralidade do sistema, ii. concentração salina de 150mM de $AlCl_3$ e iii. concentração salina

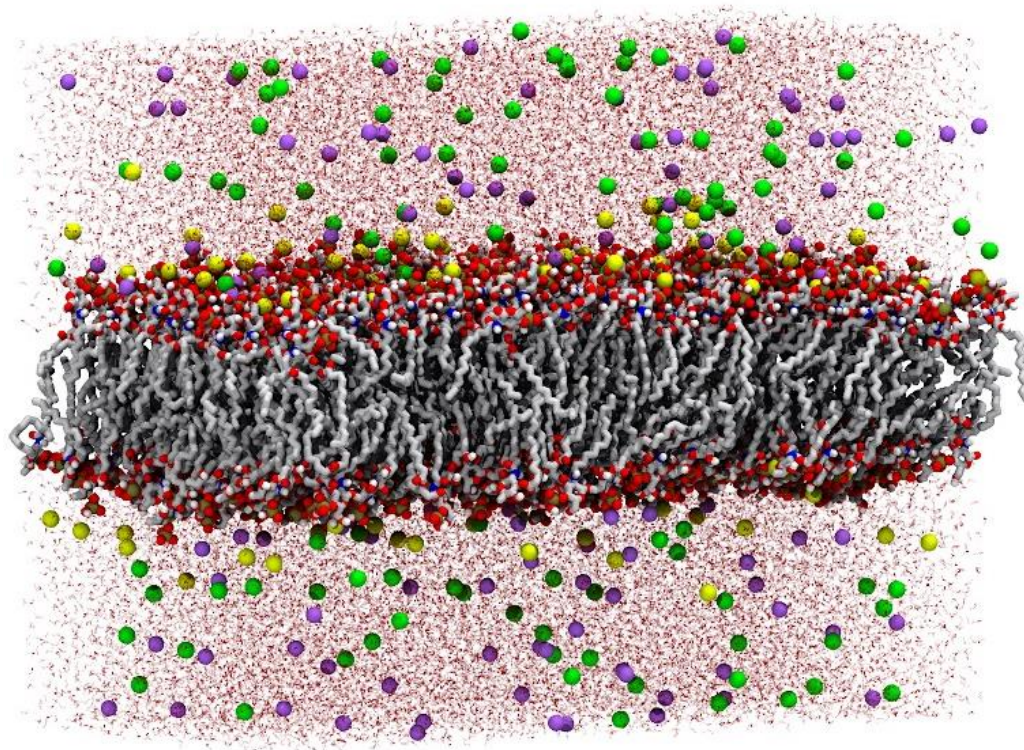
de 150mM de NaCl. Foi escolhido utilizar a concentração de 150mM já que é essa a concentração salina típica no ambiente celular.(LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, 2000) Na Tabela 1 estão reunidos os detalhes destes sistemas simulados. A concentração salina foi calculada com base no volume do solvente, excluindo o volume ocupado pela bicamada. Cada íon foi adicionado através da substituição de uma molécula do solvente do sistema original. Todos os sistemas tiveram sua geometria otimizada usando o algoritmo de minimização *steepest descent* sem restrições por 5000 passos. O algoritmo foi utilizado até que a maior força encontrada sobre as partículas do sistema fosse menor que $10 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-1}$. A dimensão da caixa de simulação foi de, aproximadamente, $10 \times 14 \times 12 \text{ nm}^3$. O sistema foi construído a partir de rotinas internas do software GROMACS v.2016.4. Todos os sistemas foram simulados utilizando uma extensão do campo de força GROMOS(LINS; HÜNENBERGER, 2005) como foi mencionado na seção 2.3. Os parâmetros dos íons Na^+ e Cl^- foram analisados no campo de força GROMOS 53A6, enquanto os potenciais de interação para o íon Al^{3+} foram retirados da referência (FARO; THIM; SKAF, 2010). O detalhamento da implementação dos potenciais do cátion Al^{3+} no campo de força utilizado é exposto no Apêndice B. Na Figura 11 pode ser observado um exemplo do sistema na sua configuração inicial.

Para a etapa de equilibração, dois protocolos foram aplicados aos sistemas antes da etapa de produção. No primeiro protocolo (p1) foi realizada uma simulação no *ensemble* NpT. A temperatura foi mantida constante nas proximidades de 300 K usando o termostato Berendsen(BERENDSEN et al., 1984) com uma constante de acoplamento de 0,4 ps. A distribuição de velocidade das partículas foi inicialmente calculada a uma temperatura de 10 K ($\text{gen_tem} = 10$) para garantir que a temperatura não fosse abruptamente elevada a 300 K. A pressão foi mantida constante através do barostato de Berendsen, no valor de 1 bar, com uma constante de acoplamento de 0,4 ps e compressibilidade de $4,5 \times 10^{-10} \text{ m}^2.\text{N}^{-1}$, correspondendo ao valor próprio para o solvente aquoso na temperatura da simulação. O esquema de pressão foi semi-isotrópico, ou seja, o acoplamento no eixo z se desenvolveu de forma independente do acoplamento nos outros eixos. A escolha deste esquema é necessária em simulações de membranas devido à diferente natureza química do sistema ao longo dos eixos x/y (lipídios) e z (água).

No segundo protocolo (p2), um relaxamento de 100 ps foi realizado no *ensemble* NVT combinado com o termostato de Berendsen ajustado para 300 K e um tempo de relaxamento de 0,4 ps, onde a distribuição de velocidade das partículas também foi inicialmente calculada a uma

temperatura de 10 K. Uma vez que a temperatura convergiu, o sistema foi equilibrado em relação a pressão, no *ensemble* NPT, num tempo de 10 ns. Um raio de corte de 1,4 nm para as interações eletrostáticas e van der Waals foi utilizado em todas as fases de equilíbrio e produção. Nos dois protocolos, o tratamento eletrostático de longo alcance foi realizado usando o método de campo de reação (RF)(TIRONI et al., 1995) com uma constante dielétrica de 66.(ESSEX, 1998)

Figura 11 – Exemplo da configuração inicial da bicamada de Lipídio A de E.coli hexa-acilado com 150mM de NaCl. Átomos da bicamada (prata para carbono, vermelho para oxigênio, azul para nitrogênio, bronze para fósforo) e íons (amarelo para Al^{3+} , roxo para Na^+ , verde para Cl^-) são representados por esferas, exceto para os átomos de carbono dos lipídios e moléculas de águas que são representados por bastões.



Fonte: A autora, 2019.

Após a fase de equilíbrio, todos os sistemas foram simulados no conjunto NpT por 200 ns usando o algoritmo *leapfrog* com um passo de integração de 2 fs. Os comprimentos das ligações no soluto foram restringidos usando o algoritmo LINCS.(HESS et al., 1997) Durante a fase de produção, a frequência do acoplamento de pressão foi ajustada para 1,0 ps. Para os sistemas que foram equilibrados com o protocolo p2, dois esquemas eletrostáticos de longo alcance foram usados durante a fase de produção para garantir que o comportamento observado fosse

independente da aproximação usada para tratar essas interações: o *reaction field* (RF)(TIRONI et al., 1995), convencionalmente utilizado com o campo de força GROMOS, e o somatório de *particle mesh Ewald* (PME).(DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993) Nas simulações com RF, uma constante dielétrica de 66(ESSEX, 1998) foi aplicada às interações eletrostáticas além do raio de corte de 1,4 nm. Nas simulações com PME, as cargas foram projetadas em uma grade de 0,16 nm usando uma interpolação cúbica para o cálculo de interações eletrostáticas de longo alcance no espaço recíproco. O esquema de corte Verlet foi utilizado e, como foi resultado da implementação do programa GROMACS v.2016.4 para a simulação, os valores *nstlist* e *rlist* foram ajustados automaticamente de 5 para 25 e de 1,4 para 1,422 nm, respectivamente. Os arquivos *.mdp* de equilíbrio e produção utilizados nestas simulações estão expostos no Apêndice C. Ao final dos 200 ns de simulação, as bicamadas de Lipídio A foram analisadas.

Tabela 1 – Setup das bicamadas de Lipídio A difosforilada simuladas na presença de Al^{3+} e concentrações salinas de 150mM de AlCl_3 ou NaCl . Nas colunas constam o protocolo utilizado na etapa de equilíbrio dos sistemas, o tratamento eletrostático de longo alcance (TELA) utilizado, número de íons, moléculas de água (H_2O) e o tempo de simulação.

Sistemas	Protocolo	TELA	Número de Moléculas				Tempo [ns]
			Al^{3+}	Na^+	Cl^-	H_2O	
Al-p1	p1	RF ^a	108	0	0	40217	200
Al-p2 _{RF}	p2	RF	108	0	0	40217	200
Al-p2 _{PME}	p2	PME ^b	108	0	0	40217	200
AlCl_3 -p1	p1	RF	219	0	333	39773	200
AlCl_3 -p2 _{RF}	p2	RF	219	0	333	39773	200
AlCl_3 -p2 _{PME}	p2	PME	219	0	333	39773	200
NaCl -p1	p1	RF	108	111	111	39995	200
NaCl -p2 _{RF}	p2	PME	108	111	111	39995	200
NaCl -p2 _{PME}	p2	PME	108	111	111	39995	200

^aReaction field ; ^bParticle mesh Ewald

Fonte: A autora, 2019.

4.2 Construção das Bicamadas de Lipídio A mono- e difosforilado

Após a determinação do protocolo de equilibração para os sistemas simulados, foi investigado se diferentes montagens das bicamadas influenciariam a simulação, e consequentemente, as propriedades e fase de agregação das bicamadas de Lipídio A.

Foi utilizado dois métodos principais para reunir os lipídios em bicamadas: (1) montagem ordenada e (2) montagem randômica. No método de montagem ordenada, a bicamada foi construída a partir de uma única unidade de Lipídio A que teve sua estrutura alinhada no plano xy e replicada, utilizando a função *gmx genconf*, para formar uma monocamada de dimensão 9x9. Em seguida, esta monocamada é replicada e sua orientação no eixo z é invertida de maneira que, a partir da concatenação destas duas monocamadas, obtém-se a bicamada lipídica com as caudas viradas para dentro e as cabeças apontadas para a parte externa da caixa. Para o Lipídio A monofosforilado, os lipídios são alinhados de modo a ter seus grupos fosfatos igualmente orientados e próximos ao grupamento de açúcar do lipídio vizinho, como é visto na Figura 12-A. Para facilitar o entendimento do estudo, será utilizada a terminação “F_A” (fosfato-açúcar) para indicar esta modelagem. Para a bicamada difosforilada, devido a presença de dois grupos fosfatos, os mesmos estão mais próximos entre um lipídio e outro (Figura 12-D). Como no Lipídio A monofosforilado há apenas um grupamento fosfato, também foi montado uma bicamada onde os lipídios foram replicados de modo a manter os grupos fosfatos próximos (Figura 12-B). Nestes sistemas será utilizada a terminação “F_F” (fosfato-fosfato). Após a criação da bicamada, a caixa de simulação teve sua dimensão no eixo z expandida, a bicamada foi centralizada na caixa e em seguida as moléculas de água e íons foram adicionadas no sistema utilizando a função *gmx genbox* e *gmx genion*, respectivamente.

No método de montagem randômica, as bicamadas foram construídas novamente a partir de uma única unidade de Lipídio A, porém ao ser utilizado a função *gmx genconf*, para a replicação do lipídio, os subcomandos *-rot* e *-maxrot* foram selecionados. O subcomando *-rot* gera diferentes conformações do lipídio que é rotacionado randomicamente nos eixos xyz num intervalo de ângulos determinado utilizando o *-maxrot* (nas nossas bicamadas utilizamos *-maxrot 60 60 30*). Desta maneira, a monocamada 9x9 é formada com lipídios de diferentes alinhamentos no plano xyz sem seguir um padrão. Nesta modelagem a monocamada não é replicada e invertida, e sim realizada a montagem de outra monocamada com lipídios randômicos e em seguida as duas estruturas são concatenadas formando a bicamada, como pode ser visto na Figura 12-C para o

Lipídio A monofosforilado e Figura 12-E para o difosforilado. Também pode ser observado que nesta montagem os grupamentos fosfatos estão aleatoriamente mais próximos ou mais distantes uns dos outros. Devido à grande desordem entre os lipídios, foi realizado uma minimização de energia para, enfim, ter a dimensão da caixa expandida no eixo z e adicionado as moléculas de água e íons. Nestes sistemas de lipídios randômicos, a nomenclatura terminará com o termo “rand”.

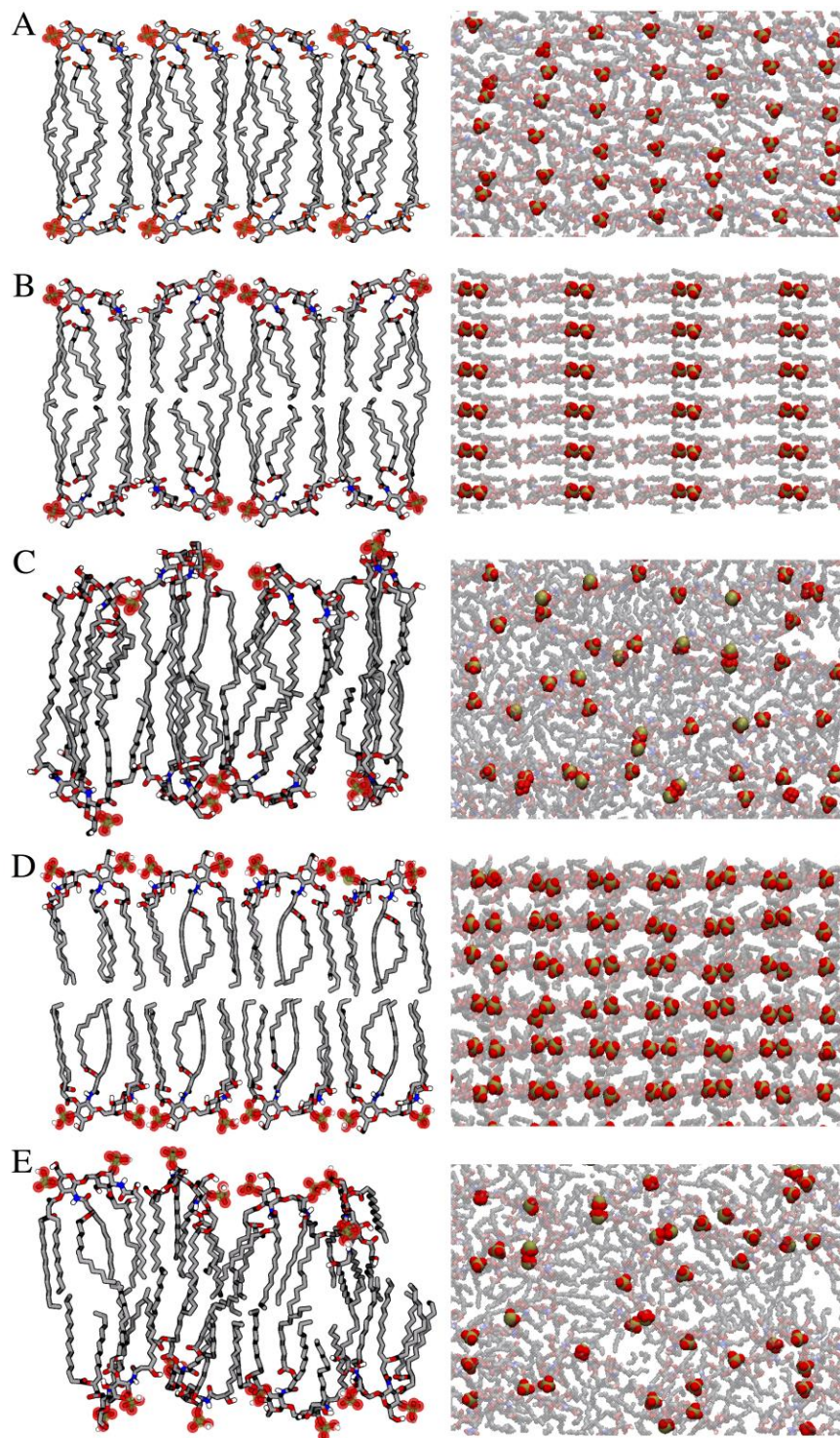
As caixas de simulação foram construídas visando manter o mesmo número de lipídios e moléculas de solvente, de acordo com cada quimiotipo do Lipídio A simulado, para poderem ser comparadas. A molécula de Lipídio A é negativamente carregada com uma carga total -1e para a espécie monofosforilada e -2e para a espécie difosforilada. Para neutralizar a carga total do sistema, adicionou-se 54 cátions alumínio, sendo necessário o dobro de cátions para os lipídios difosforilados. Na Tabela 2 estão reunidos os detalhes dos sistemas estudados.

Tabela 2 – Setup das bicamadas de Lipídio A mono e difosforilada simuladas na presença de Al^{3+} . Nas colunas constam o quimiotipo do Lipídio A, número de íons e moléculas de água, e tempo de simulação.

Sistemas	Quimiotipo	Número de Moléculas		Tempo [ns]
		Al^{3+}	H_2O	
mph-F_A	Monofosforilado	54	37250	300
mph-F_F	Monofosforilado	54	37532	300
mph-rand	Monofosforilado	54	37488	300
dph-F_F	Difosforilado	108	40217	300
dph-rand	Difosforilado	108	40568	300

Fonte: A autora, 2019.

Figura 12 – Estruturas da montagem inicial das bicamadas (esquerda) e vista superior (direita) dos sistemas A) mph-F_A, B) mph-F_F, C) mph-rand, D) dph-F_F e E) dph-rand. Os grupos fosfatos estão representados em destaque.



Fonte: A autora, 2019.

Após os sistemas serem construídos, foi realizada uma rápida minimização de energia para otimizar as interações e evitar superposição de átomos e deslocamentos bruscos na dinâmica. Em seguida, foi realizada a etapa de equilíbrio dos sistemas. Nesta etapa foi realizada simulações de NVT e NpT a temperatura de 300 K e pressão de 1 bar e os mesmos parâmetros de simulação, descritos na seção 4.1, para equilibrar os sistemas, foram utilizados.

Devido a diferença na forma de montagem das bicamadas, e como estamos interessados em amostrar as configurações mais prováveis dos sistemas, foi necessário investir um tempo maior de simulação para ter certeza de que o sistema entrou em equilíbrio e as propriedades dinâmicas e estruturais não mudariam mais com o tempo. Assim, as bicamadas foram simuladas por 300 ns, sendo utilizado para as análises os últimos 100 ns de trajetória equilibrada. Os parâmetros usados para a etapa de produção também foram iguais aos descritos na seção 4.1 no uso de *reaction field* como tratamento eletrostático de longo alcance, sendo apenas mudado o número de passos (*nsteps*) para chegar ao tempo de simulação desejado. Os arquivos *.mdp* utilizados na etapa de equilíbrio e produção podem ser encontrados no Apêndice C.

A preparação e simulação dos sistemas foram realizadas utilizando ferramentas do programa GROMACS v.2016.4 (ABRAHAM et al., 2015) e as análises foram realizadas usando os programas GROMACS v.2016.4 e SuAVE (SANTOS et al., 2019).

4.3 Bicamadas de Lipídio A Mono- e Difosforilado na Presença do Cátion Al^{3+} e Concentrações Salinas

Após determinar a forma de montagem das bicamadas, foi realizado o estudo sobre o efeito dos cátions Al^{3+} nas bicamadas de Lipídio A mono- e difosforilado.

Foram simulados seis sistemas dos quais, três são compostos por bicamadas de Lipídio A monofosforilado de *E. coli* e os três restantes são compostos por Lipídio A difosforilado (Tabela 3). As montagens das bicamadas correspondem às configurações iniciais mph-F_A para a bicamada de Lipídio A monofosforilado e dph-F_F para a bicamada de Lipídio A difosforilado, descritas na seção 4-2. As bicamadas de Lipídio A (mono- e difosforilado) foram simuladas nos três diferentes regimes de concentração salina já mencionados: i. concentração salina zero (0mM), contendo os cátions Al^{3+} exclusivamente como contra-íons para garantir a eletroneutralidade do sistema, ii. concentração salina de 150mM com o sal $AlCl_3$ e iii. concentração salina de 150mM com o sal $NaCl$. Na Tabela 3 estão reunidos os detalhes dos sistemas.

Tabela 3 – Bicamadas simuladas em 0mM e 150mM (ver rodapé). Nas colunas constam o grau de fosforilação do grupo N-acetil glucosamina, número de moléculas de água (H₂O), íons presentes e tempo de simulação.

Sistemas	Quimiotipo	Número de Moléculas				Tempo [ns]
		H ₂ O	Al ³⁺	Na ⁺	Cl ⁻	
mph-0mM*	Monofosforilado	37250	54	0	0	300
mph-AlCl ₃ #	Monofosforilado	36842	156	0	306	300
mph-NaCl@	Monofosforilado	37100	54	102	102	300
dph-0mM	Difosforilado	40217	108	0	0	300
dph-AlCl ₃	Difosforilado	39773	219	0	333	300
dph-NaCl	Difosforilado	39995	108	111	111	300

*sistemas simulados sem concentração salina

#sistemas simulados com concentração salina de 150mM de AlCl₃

@sistemas simulados com concentração salina de 150mM de NaCl

Fonte: A autora, 2019.

Os sistemas foram submetidos ao protocolo de equilíbrio p2 (NVT + NpT) discutido na seção 4-1. Os parâmetros usados para a etapa de produção também foram iguais aos descritos na seção 4-1 no uso de *reaction field* como tratamento eletrostático de longo alcance. Neste estudo, a etapa de produção se estendeu até 300 ns. Os arquivos *.mdp* podem ser encontrados no Apêndice C.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Comparação do Protocolo de Equilibração

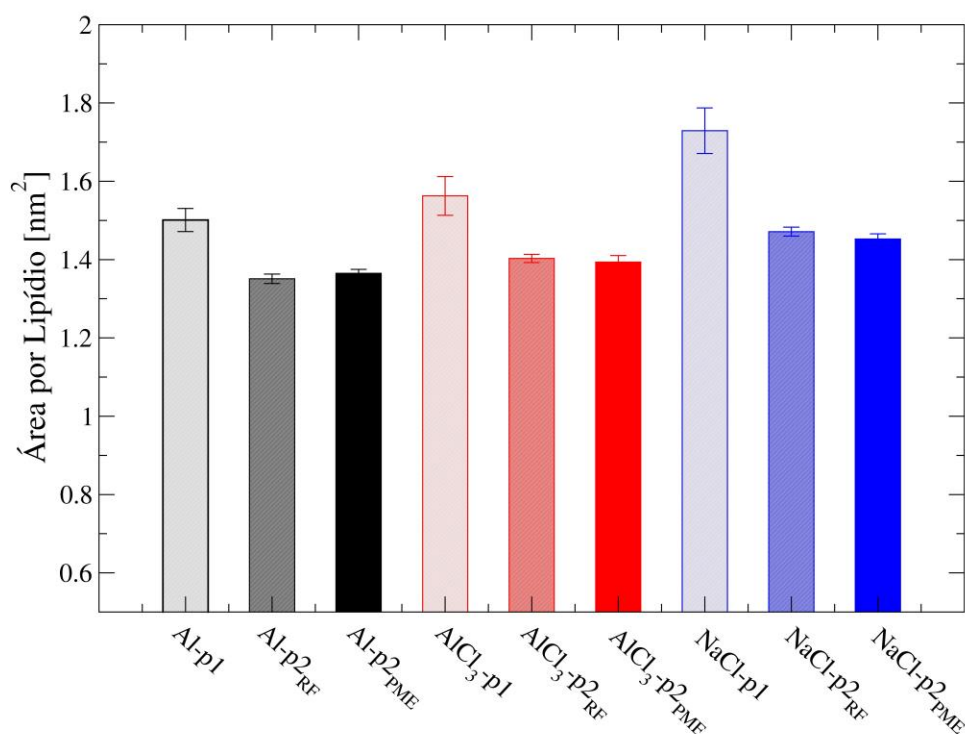
Recentes discussões envolvendo reprodutibilidade (GROMACS, 2016), validação de protocolos e artefatos (POGER; MARK, 2012; REISSER et al., 2017) em simulações de bicamadas lipídicas nos motivou a realizar uma investigação sobre o comportamento de nossos sistemas frente a diferentes protocolos. O objetivo inicial foi verificar se inconsistências em simulações anteriores (SILVA, 2017) foram causadas por problemas com implementações recentes do GROMACS (LIMA et al., 2019; REISSER et al., 2017) e/ou por artefatos devido ao protocolo de equilíbrio. De fato, a alta densidade de cargas em membranas lipopolissacarídicas e de Lipídio A juntamente com o tratamento explícito de concentrações salinas contendo íons trivalentes tornam estas bicamadas mais sensíveis a diferentes protocolos de equilíbrio e simulação. Para isto, foram simuladas bicamadas de Lipídio A mono- e difosforilado usando dois diferentes protocolos de equilíbrio e dois tratamentos de interações eletrostáticas de longa distância. Ao final de cada simulação computacional foram realizadas análises de propriedades estruturais, dinâmicas e energéticas dos sistemas simulados. As análises estruturais escolhidas para esta etapa do trabalho foram a área por lipídio A_L , espessura da bicamada D_{HH} e o parâmetro de curvatura S_C . Foram investigados potenciais fatores envolvidos em mudanças estruturais observadas nas bicamadas, assim como possíveis efeitos do tratamento eletrostático de longo alcance.

5.1.1 Área por Lipídio

A área por lipídio é uma propriedade que fornece indicativos da convergência estrutural e fase de agregação em simulações de bicamadas e membranas. Uma vantagem da análise desta propriedade consiste no fato de a mesma ser uma grandeza medida experimentalmente e um parâmetro de validação de um modelo teórico. O valor médio e desvio-padrão da A_L para cada sistema está mostrado na Figura 13. É possível observar diferenças no valor da A_L dependendo do protocolo utilizado durante a equilíbrio. Os sistemas equilibrados com o protocolo p1 apresentam maiores valores de A_L que aqueles obtidos com o protocolo p2. O desvio-padrão

também é maior para os sistemas equilibrados com o protocolo p1 indicando uma maior dispersão de valores para a A_L mesmo com o cálculo tendo sido realizado após a etapa de produção.

Figura 13 – Área por lipídio (A_L) para as bicamadas de Lipídio A contendo diferentes íons e equilibradas via diferentes protocolos. Médias foram calculadas para os últimos 100 ns de simulação.



Fonte: A autora, 2019.

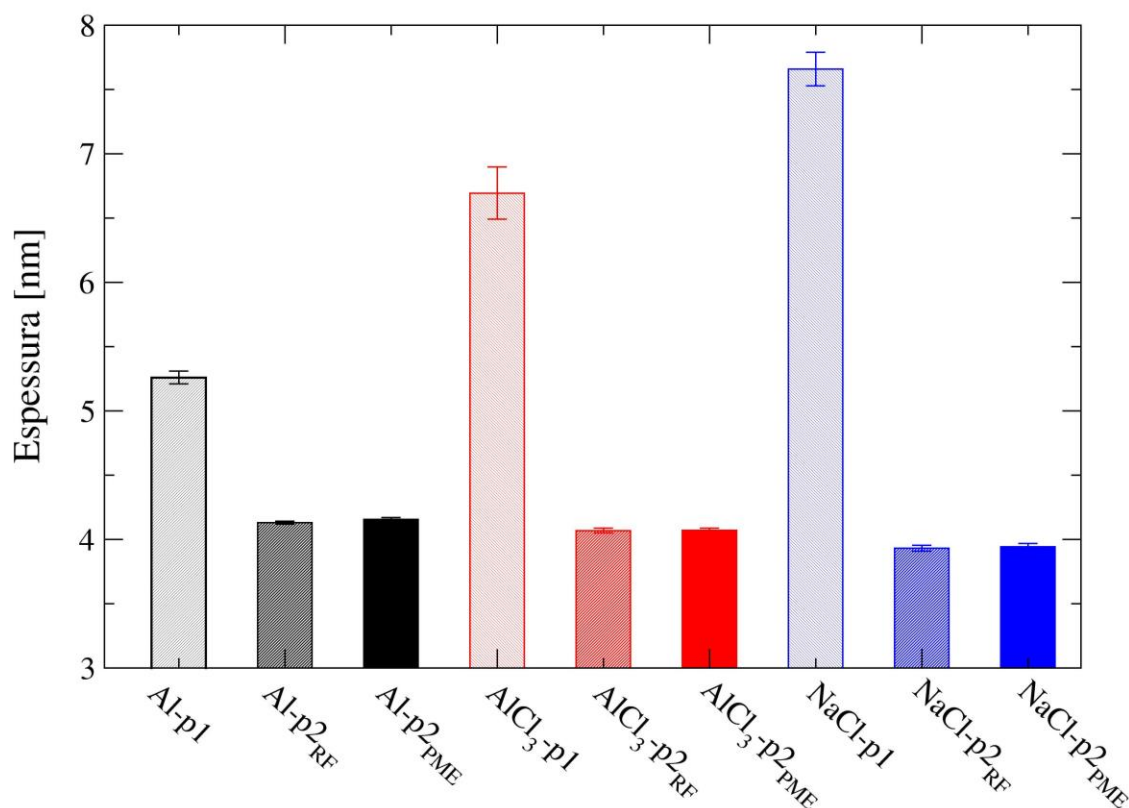
Os valores do desvio-padrão dos sistemas equilibrados com protocolo p1 são maiores à medida que o número de íons é aumentado nos sistemas em consideração. Os sistemas com protocolo p2 apresentam valores de A_L entre 1,35 e 1,46 nm^2 , consistente com medidas experimentais de A_L em membranas lipopolissacarídicas hexa-aciladas (MONTICELLI; TIELEMAN, 2013). Estes sistemas possuem também valores de desvio-padrão significativamente mais baixos (Figura 13). Pode-se observar que não há diferenças significativas entre os valores de A_L utilizando diferentes correções eletrostáticas de longa distância, seja RF ou PME. O protocolo p2 também resulta em maior consistência entre os valores de A_L para os sistemas. Os sistemas simulados em presença de NaCl exibem uma A_L ligeiramente maior que as bicamadas contendo apenas Al^{3+} . Como dito na descrição das análises utilizando o software SuAVE, o programa fornece valores de RMSD entre a superfície de ajuste criada e os átomos de referência utilizados (neste trabalho foram escolhidos

os átomos de fósforos), indicando se a análise pode descrever corretamente a interface química de interesse. Os sistemas equilibrados com o protocolo p1 possuem valores médios de RMSD da análise de A_L acima de 0,8 nm chegando a mais de 2,0 nm para os sistemas contendo NaCl (Tabela 4). Portanto valores das análises nestes sistemas podem perder parte de sua significância estatística, mas qualitativamente podem indicar uma tendência nos resultados. O alto valor do RMSD nos sistemas simulados com o protocolo p1 deve estar relacionada a perda de estrutura lamelar das bicamadas prejudicando o cálculo da propriedade ao longo do tempo.

5.1.2 Espessura e Curvatura da Bicamada

Na Figura 14 são mostrados os dados de espessura média (D_{HH}) das bicamadas. Pode-se observar novamente diferenças entre os valores de D_{HH} em função do protocolo de equilíbrio utilizado.

Figura 14 – Espessura média (D_{HH}) da bicamada lipídica para os sistemas estudados. Médias foram calculadas para os últimos 100 ns de simulação.



Fonte: A autora, 2019.

Os sistemas equilibrados com o protocolo p2 exibem D_{HH} em torno de 4,2 nm e baixos valores de desvio padrão para os sistemas contendo exclusivamente Al^{3+} como cátion. Os sistemas contendo NaCl apresentam espessura um pouco abaixo de 4,0 nm e valores reduzidos de desvio padrão. Portanto, o protocolo p2 resulta A_L e D_{HH} similares para os sistemas contendo exclusivamente Al^{3+} , enquanto o tratamento de concentração salina pela adição de NaCl provoca um ligeiro aumento de A_L e diminuição de D_{HH} para os sistemas considerados.

Nos sistemas com o protocolo p1 essa relação não é observada, a espessura da bicamada cresce com o aumento gradual do número de íons, estando também associados a valores altos de desvio padrão. Novamente o valor do RMSD da análise (Tabela 4) foi bastante elevado para os sistemas com o protocolo p1 não fornecendo valores estatisticamente confiáveis para a propriedade.

Tabela 4 – Média do RMSD das análises realizadas utilizando o programa SuAVE.

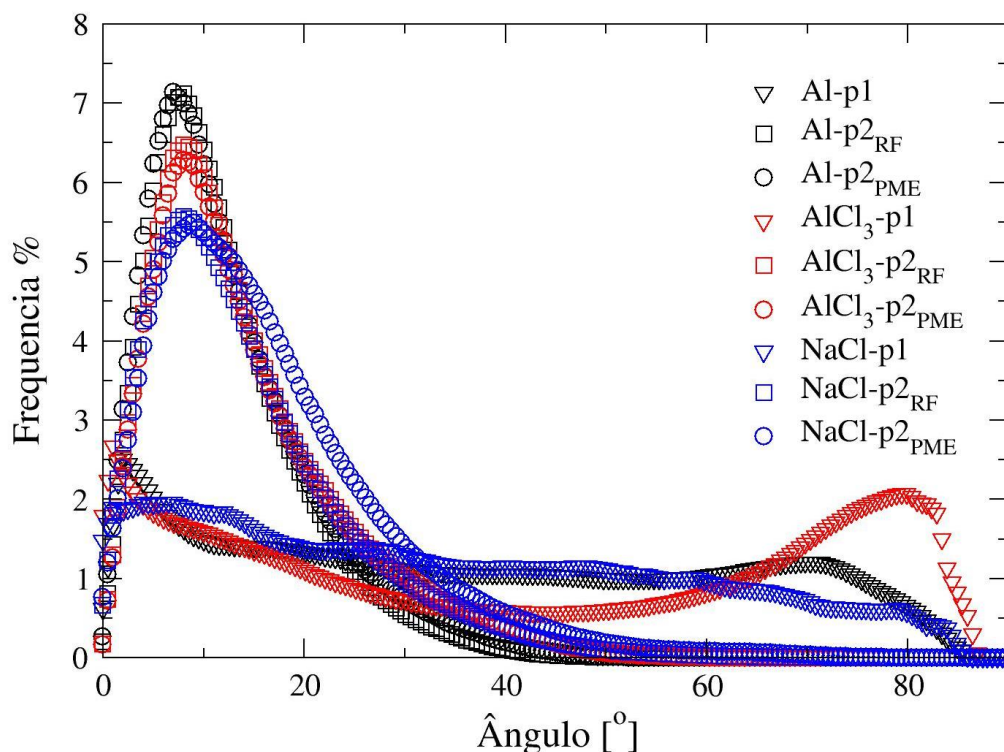
Sistema	Área por Lipídio [nm]	Espessura da bicamada [nm]	Parâmetro de curvatura [nm]
Al-p1	$0,86 \pm 0,04$	$0,84 \pm 0,04$	$0,85 \pm 0,03$
Al-p2 _{RF}	$0,094 \pm 0,003$	$0,094 \pm 0,004$	$0,095 \pm 0,004$
Al-p2 _{PME}	$0,101 \pm 0,004$	$0,101 \pm 0,003$	$0,101 \pm 0,003$
AlCl ₃ -p1	$1,32 \pm 0,07$	$1,32 \pm 0,07$	$1,31 \pm 0,09$
AlCl ₃ -p2 _{RF}	$0,099 \pm 0,002$	$0,099 \pm 0,002$	$0,096 \pm 0,002$
AlCl ₃ -p2 _{PME}	$0,095 \pm 0,003$	$0,095 \pm 0,003$	$0,093 \pm 0,003$
NaCl-p1	$2,22 \pm 0,08$	$2,21 \pm 0,07$	$2,02 \pm 0,06$
NaCl-p2 _{RF}	$0,115 \pm 0,005$	$0,113 \pm 0,004$	$0,113 \pm 0,004$
NaCl-p2 _{PME}	$0,123 \pm 0,007$	$0,118 \pm 0,007$	$0,123 \pm 0,006$

Fonte: A autora, 2019.

Outra forma de avaliar a estrutura de diferentes protocolos de equilíbrio para o tratamento de bicamadas de Lipídio A é através da distribuição dos ângulos de curvatura da superfície da membrana (Figura 15). É possível perceber que o protocolo p1 resulta em uma ampla distribuição dos ângulos de curvatura da superfície, com valores máximos de desvio acima de setenta graus, indicativo de curvatura acentuada das membranas. Contrariamente, o protocolo p2 resulta em uma distribuição de pequenos ângulos de curvatura na superfície, com valores médios em torno de cinco graus de desvio e baixa distribuição. A baixa frequência de ângulos de inclinação com valores altos

indica que estes sistemas apresentam um arranjo lamelar com lipídios alinhados ao eixo z da membrana. Não se observa diferenças significativas de curvatura ou arranjo tridimensional devido ao uso de correções de interações de longa distância via RF ou PME.

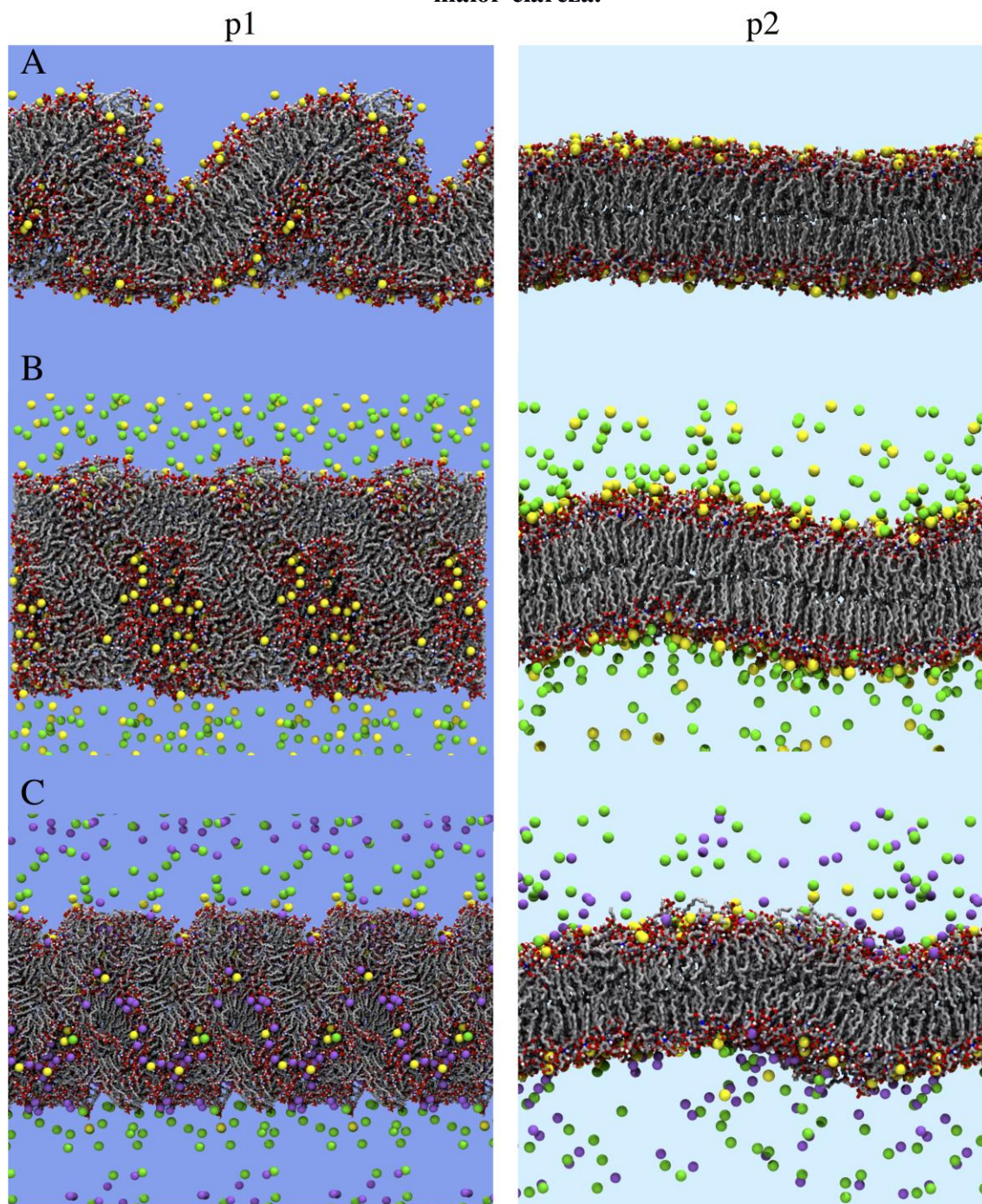
Figura 15 – Distribuição dos ângulos de curvatura calculados ao longo dos últimos 100 ns finais. As curvas pretas representam os sistemas no regime de concentração salina de 0 mM, as curvas vermelhas as bicamadas contendo AlCl_3 e as curvas azuis as bicamadas contendo NaCl . Sendo os triângulos invertidos os sistemas utilizando o protocolo p1, os quadrados sendo os sistemas utilizando o protocolo p2 e RF como tratamento eletrostático e círculos os sistemas utilizando p2 e PME.



Fonte: A autora, 2019.

Observa-se novamente um valor elevado do RMSD para a análise em questão (Tabela 4). Os resultados quantitativos apresentados até aqui podem ser corroborados pela visualização da conformação final das bicamadas simuladas (Figura 16). O *ensemble* estrutural obtido via equilíbrio com o protocolo p1 apresenta um arranjo não-lamelar enquanto o uso do protocolo p2 resulta na manutenção do arranjo lamelar da bicamada de Lipídio A.

Figura 16 – Arranjo estrutural das bicamadas de Lipídio A difosforilado ao final de 200 ns de simulação: A) bicamadas sem concentração salina, B) bicamadas com 150mM de AlCl_3 e C) bicamadas com 150mM de NaCl . Nos sistemas a esquerda foi utilizado o protocolo p1 e a direita o protocolo p2 na etapa de equilíbrio. As moléculas de água foram omitidas para maior clareza.



Fonte: A autora, 2019.

Análises adicionais comparando o efeito dos diferentes tratamentos eletrostáticos de longa distância, bem como uma comparação das estruturas finais, são apresentadas no Apêndice D. Foi possível observar que não há diferenças estruturais significativas em função do uso de correções do tipo RF ou PME para os sistemas simulados. Desta forma, os valores das diferentes propriedades usando os diferentes tratamentos eletrostáticos de longo alcance são análogos e não apresentam qualquer discrepância. De maneira geral, o protocolo de equilíbrio p2 apresenta resultados mais concordantes entre os diferentes sistemas para as suas formas de agregação e propriedades estruturais, com maior confiabilidade estatística das propriedades calculadas e valores mais próximos aos valores experimentais. No entanto, somente isto não é suficiente para assegurar a eficiência do protocolo.

É preciso entender o possível motivo para as diferenças observadas mudando o protocolo de equilíbrio dos sistemas. A diferença básica entre os protocolos é a etapa NVT que permite uma estabilização no valor do volume da caixa de simulação e da temperatura. Devido a isto, investigamos a velocidade e a pressão após o início de cada etapa. Ao compararmos o valor médio e RMSD da pressão na primeira etapa de NpT no protocolo p2, após a etapa curta de NVT, e na etapa de NpT no protocolo p1, obtemos, para o protocolo p1, valores baixo de pressão e com valores altos de desvio-padrão, enquanto para o protocolo p2, obtemos a pressão desejada e com pequenos valores de desvio (Tabela 5).

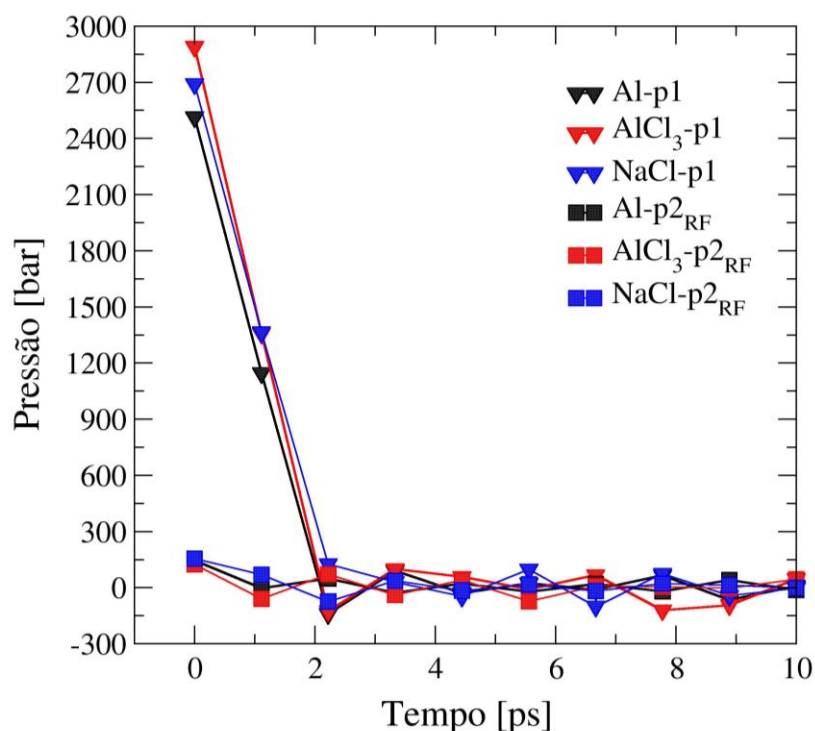
Tabela 5 – Média, erro estimado e RMSD da pressão na etapa de NpT nos diferentes protocolos. A análise foi realizada para os 10 ns de simulação. Este cálculo é feito através da rotina *gmx energy* no GROMACS v.2016.4 e a equação utilizada para o cálculo do erro estimado e o RMSD pode ser encontrado no manual do programa (APOL et al., 2016).

Sistema	Média da Pressão + Erro estimado (bar)	RMSD (bar)
Al-p1	$0,9 \pm 0,2$	67,7
Al-p2	$1,00 \pm 0,01$	51,60
AlCl ₃ -p1	$0,9 \pm 0,2$	68,8
AlCl ₃ -p2	$1,00 \pm 0,01$	51,61
NaCl-p1	$0,9 \pm 0,1$	78,1
NaCl-p1	$1,01 \pm 0,05$	62,50

Fonte: A autora, 2019

É possível observar para todos os sistemas que a pressão média ao longo dos 10 ns de simulação possui um alto valor do RMSD. Esta alta flutuação é esperada porque a isoterma volume-pressão é extremamente acentuada: é necessário uma grande mudança na pressão para gerar uma pequena alteração de volume e, inversamente: pequenas mudanças no volume produzem uma grande variação da pressão. No entanto, a pressão inicial no sistema utilizando o protocolo p1 é bem maior (acima de 2514 bar) do que no protocolo p2 (cerca de 145 bar) (Figura 17). A menor flutuação da pressão inicial só é obtida após a equilibração no *ensemble* NVT do protocolo p2.

Figura 17 – Descrição da pressão inicial nos primeiros 10 ps para a etapa de equilíbrio do NPT. Após este tempo, o valor da propriedade oscila próximo ao valor requerido de 1 bar. Triângulos invertidos representam os sistemas equilibrados com o protocolo p1, e quadrado representam a os sistemas utilizando o protocolo p2.



Fonte: A autora, 2019.

Nas simulações de DM, a pressão de um sistema isolado é composta pela energia cinética e pelas forças intermoleculares entre as partículas, isto é, interações não ligadas. As forças intermoleculares contribuem para a pressão total de acordo com a equação do virial. Nas simulações, a pressão total é calculada através da equação 2-27, sendo o virial dado pela equação

2-28. Entretanto, o valor da energia cinética E_{kin} é diretamente proporcional a temperatura, que é mantida constante por um termostato, e pode ser calculada como:

$$E_{kin} = \frac{1}{2} N_{df} k_B T ,$$

sendo

$$N_{df} = 3N - N_c - N_{com}$$

onde N_{df} é o número de graus de liberdade, k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura.

No protocolo p1, a equilibração da temperatura e da pressão é feita simultaneamente. Como a temperatura é elevada a 300 K (presença da palavra-chave `gen_vel = yes` no protocolo de simulação), as velocidades das partículas flutuam causando também flutuações dos valores da energia cinética dos sistemas (Tabela 6). Esta maior flutuação faz com que a pressão se desvie do valor desejado e maior será o redimensionamento do tamanho do sistema.

Tabela 6 – Valor médio e RMSD para a energia cinética na etapa NpT de equilibração dos sistemas no protocolo p1 e p2. Esse cálculo é feito através da rotina *gmx energy* no GROMACS v.2016.4. Todas as unidades são dadas em kJ.mol⁻¹.

Sistemas	Energia cinética E_{kin} (kJ.mol ⁻¹)	RMSD da E_{kin} (kJ.mol ⁻¹)
Al-p1	$4,6 \times 10^5 \pm 88,0$	3142,2
Al-p2 _{RF}	$4,0 \times 10^5 \pm 0,2$	689,9
AlCl ₃ -p1	$4,4 \times 10^5 \pm 62,0$	3142,8
AlCl ₃ -p2 _{RF}	$3,5 \times 10^5 \pm 0,2$	615,2
NaCl-p1	$4,5 \times 10^5 \pm 78,0$	3176,4
NaCl-p2 _{RF}	$3,8 \times 10^5 \pm 0,2$	667,5

Fonte: A autora, 2019.

Portanto, se a configuração inicial de uma simulação MD no conjunto NpT possuir regiões de forças excessivamente altas entre as partículas, um desvio significativo da pressão em relação ao

valor alvo pode ocorrer, e resultar em configurações fora do equilíbrio. Já no protocolo de equilíbrio p2, a etapa NVT permite que o volume e a temperatura dos sistemas sejam equilibrados, gerando uma boa distribuição de velocidades das partículas e, portanto, valores de energia cinética com menores flutuações a uma dada temperatura (Tabela 6), influenciando no início da etapa NpT posterior que se inicia com a temperatura já estabilizada e sem grandes flutuações, calculando a pressão com as velocidades obtidas no passo anterior. Isto fornece uma configuração inicial mais adequada para a etapa de produção, onde obtém-se uma simulação mais estável e reproduzível, independente do tratamento eletrostático de longa distância utilizado.

Assim, para os sistemas compostos por bicamadas de Lipídio A é necessária uma fase inicial de equilíbrio a volume e temperatura constantes. Só após a obtenção da temperatura e energia desejada é realizada a equilibrção da pressão alvo. Esta fase de equilíbrio pode ser monitorada através da avaliação da temperatura e pressão do sistema, bem como da energia cinética e do virial para assegurar que estes atinjam um valor estável sem muitas flutuações. Uma vez que estas propriedades tenham convergido em torno de valores constantes ao longo do tempo, o período de equilíbrio chegou ao fim e pode ser iniciada a fase de produção.

As demais simulações discutidas neste trabalho foram equilibradas utilizando o protocolo p2. Como foi demonstrado (consultar análises no Apêndice D) que o uso de RF ou PME não influenciou significativamente os sistemas com o protocolos de equilíbrio p2, o uso do campo de reação (*reaction field*), utilizado previamente para parametrização do campo de força GROMOS, foi utilizado nas simulações atomísticas de bicamadas de Lipídio A apresentadas nesta dissertação.

5.2 Convergência das Diferentes Configurações Iniciais

O objetivo principal da modelagem utilizada para a construção de membrana lipídicas deve ser o de reproduzir corretamente as propriedades estruturais, mecânicas e dinâmicas relevantes, além de prever e fornecer detalhes nem sempre acessíveis por medidas experimentais. Um dos aspectos mais importantes da simulação computacional é a construção da caixa de simulação.(BRAUN et al., 2019) A caixa de simulação deve ser construída de maneira a reproduzir ao máximo as posições dos átomos no sistema experimental que pretendemos reproduzir computacionalmente. A construção incorreta da caixa de simulação pode levar a resultados espúrios e influenciar as

conclusões. O objetivo desta seção é investigar o efeito da estrutura inicial na simulação das bicamadas.

Os dois grupos n-acetilglucosamina do Lipídio A podem ser mono- ou difosforilado com grupo hidroxila substituindo o segundo grupo fosfato na espécie monofosforilada. Sabe-se que os cátions desempenham um papel estrutural importante na bicamada ao se complexar com os grupos fosfatos formando pontes de interação entre os lipídios. Para o Lipídio A monofosforilado a proximidade (ou não) entre os grupos fosfatos de cada unidade lipídica indica uma possibilidade diferente de construir a bicamada lipídica. Diante disto, foi avaliado se existe um efeito da estrutura inicial do lipídio nas simulações de bicamadas de Lipídio A.

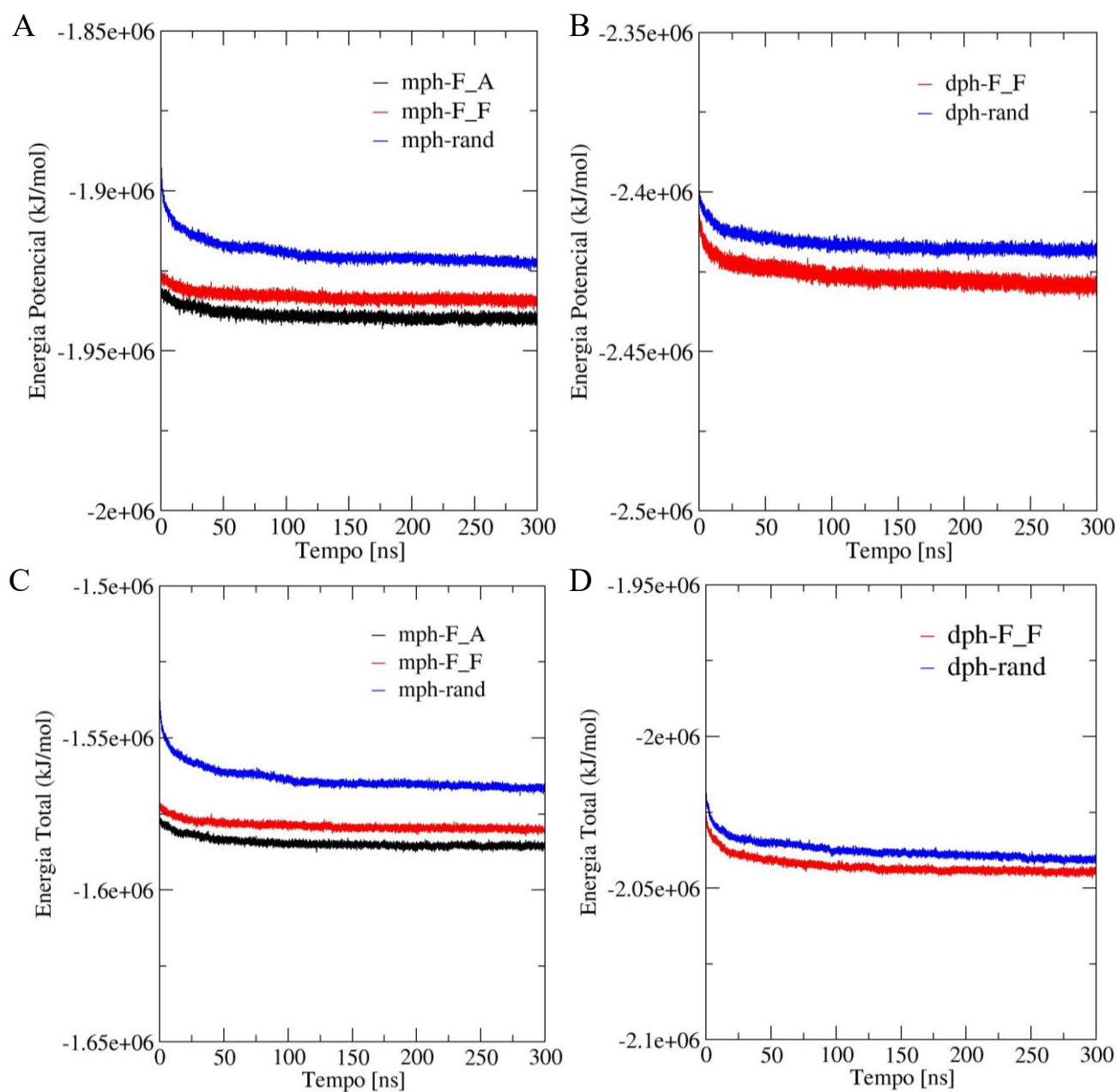
Para avaliar tanto o efeito da monofosforilação versus difosforilação como o efeito da estrutura inicial na amostragem dos sistemas foram analisadas propriedades do ponto de vista energético e do ponto de vista estrutural: Energia potencial, energia total, área por lipídio (A_L), parâmetro de curvatura e função de distribuição radial (RDF). As análises foram apresentadas separando os sistemas de bicamadas de Lipídio A monofosforilado dos sistemas difosforilados, já que o objetivo deste estudo é mostrar a influência da construção da bicamada em cada quimiotipo.

5.2.1 Energia Potencial e Total

Inicialmente, certificou-se que os sistemas atingiram o equilíbrio termodinâmico através da energia potencial e total em função do tempo, (Figura 18). A partir do gráfico, observa-se que todos os sistemas atingem a convergência energética após cerca de 100 ns de simulação. Esta convergência é mais rápida para os sistemas na modelagem F_A e F_F, independentemente do quimiotipo do Lipídio A. Para as bicamadas de Lipídio A monofosforilado, as modelagens ordenadas (mph-F_A e mph-F_F) convergem para valores muito próximos, embora o sistema mph-F_A tenha uma menor energia potencial e total. É interessante notar que na modelagem randômica, para ambos os quimiotipos, observa-se uma convergência mais lenta e valores de energia potencial e total ligeiramente mais altas (Tabela 7), independente do quimiotipo.

A construção da bicamada randômica gerou lipídios com conformações desfavoráveis, especialmente nas cadeias aciladas, e que, provavelmente, a simulação não foi capaz de reverter por completo. Desta maneira, o sistema não conseguiu atingir o mesmo mínimo energético das outras configurações, como pode-se notar pelo valor da energia potencial e total ao longo do tempo para as outras configurações.

Figura 18 – Cálculo da energia potencial e total durante toda a trajetória simulada para os sistemas de bicamadas de Lipídio A A) monofosforilado e B) difosforilado para a energia potencial e C) monofosforilado e D) difosforilado para a energia total. Sendo linha preta para a modelagem “F_A”, linha vermelha para a modelagem “F_F” e linha azul para a modelagem “rand”.



Fonte: A autora, 2019.

Tabela 7 – Média e desvio padrão dos valores de energia potencial e total para os sistemas simulados (Tabela 2). O cálculo das energias foi realizado através da rotina *gmx energy* no GROMACS v.2016.4. Todas as unidades são dadas em kJ.mol^{-1} .

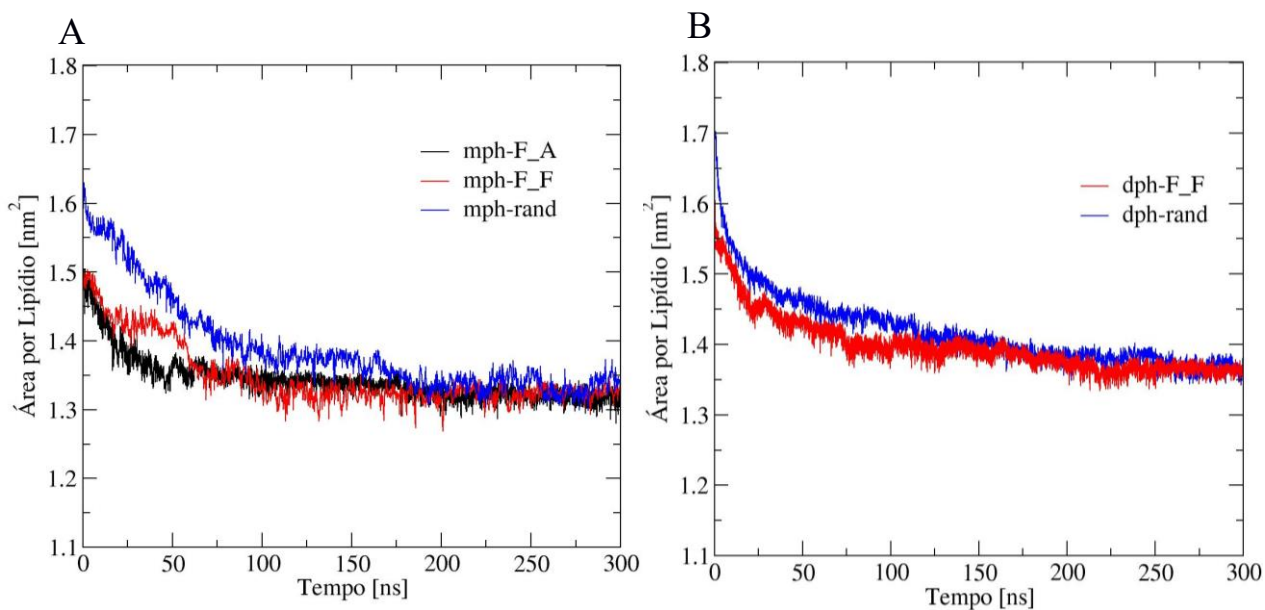
Sistemas	Energia Potencial (10^6 kJ.mol^{-1})	Energia Total (10^6 kJ.mol^{-1})
mph-F_A	$-1,940 \pm 0,002$	$-1,583 \pm 0,002$
mph-F_F	$-1,930 \pm 0,002$	$-1,582 \pm 0,001$
mph-rand	$-1,911 \pm 0,004$	$-1,564 \pm 0,006$
dph-F_F	$-2,436 \pm 0,003$	$-2,042 \pm 0,003$
dph-rand	$-2,411 \pm 0,004$	$-2,025 \pm 0,007$

Fonte: A autora, 2019.

5.2.2 Área por Lipídio

A A_L foi calculada para toda a trajetória para avaliar como a convergência se deu ao longo da simulação. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 19. Os valores de A_L para as bicamadas de Lipídio A mono e difosforilado estão dentro de um intervalo consistente com medidas experimentais para membranas de Lipídio A. (SNYDER; KIM; MCINTOSH, 1999) Os valores de A_L para os sistemas monofosforilado e difosforilados estão em torno de $1,31 \text{ nm}^2$ e $1,36 \text{ nm}^2$, respectivamente. Para os sistemas mph-F_A e mph-F_F os valores da A_L são bem próximos durante todo o tempo de simulação. Entretanto, é possível observar que nas bicamadas de Lipídio A mono e difosforilado com configuração randômica dos lipídios, a convergência da A_L ocorre depois de 200 ns de simulação, enquanto para os demais sistemas ocorre após 100 ns. Este comportamento pode ser explicado pela existência de regiões de maior densidade de lipídios próximos na membrana que podem necessitar de um tempo maior de simulação para convergência da A_L . (SMITH; KLAUDA; SODT, 2019) Após 200 ns, todos os sistemas convergem para o mesmo valor de A_L . Na Tabela 8, observa-se que o valor médio da A_L para os últimos 100 ns de simulação são bem próximos, corroborando a necessidade de um tempo de simulação razoavelmente longo para convergência entre diferentes configurações iniciais.

Figura 19 – Área por Lipídio em função do tempo para as bicamadas de Lipídio A A) monofosforilado e B) difosforilado nas modelagens F_A (linha preta), F_F (linha vermelha) e randômica (linha azul), tendo Al^{3+} como contraíon.



Fonte: A autora, 2019.

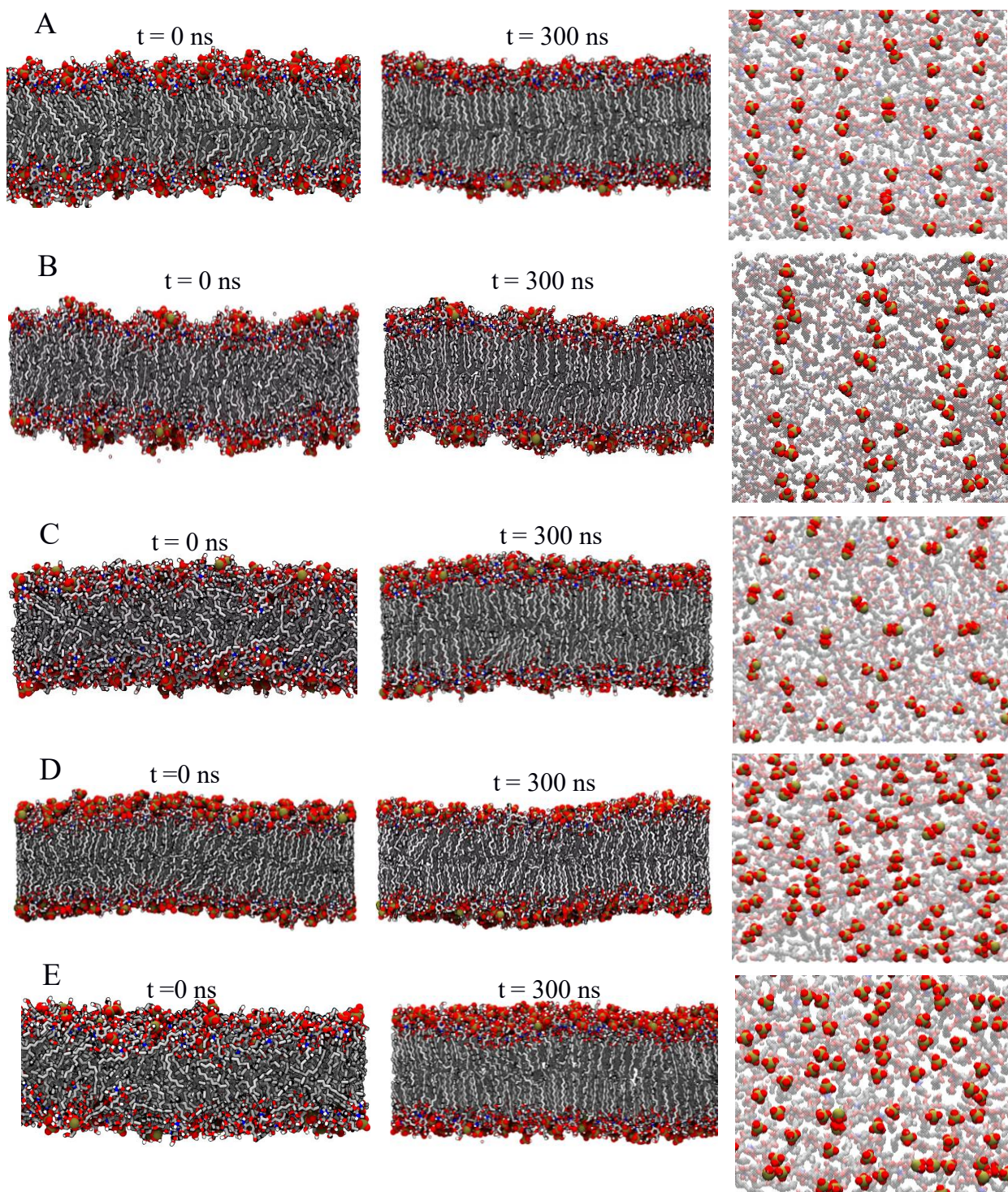
Igualmente, é possível observar que o desvio padrão da área por cabeça é ligeiramente menor para os sistemas mph-F_A, mph-F_F e dph-F_F do que para os sistemas mph-rand e dph-rand. As estruturas finais de cada simulação estão apresentadas na Figura 20.

Tabela 8 – Valor médio com desvio-padrão para a área por lipídio para as bicamadas de Lipídio A (nm²). Os valores foram calculados para os últimos 100 ns da trajetória equilibrada.

Sistemas	Área por lipídio (nm²)
mph-F_A	1,31 ± 0,01
mph-F_F	1,31 ± 0,04
mph-rand	1,33 ± 0,09
dph-F_F	1,35 ± 0,01
dph-rand	1,36 ± 0,12

Fonte: A autora, 2019.

Figura 20 – Estrutura inicial ($t=0$ ns) e final ($t=300$ ns) para os sistemas simulados. A saber A) mph-F_A, B) mph-F_F, C) mph-rand, D) dph-F_F, E) dph-rand. Do lado direito tem-se a vista superior (eixo z) das bicamadas ao final dos 300 ns de simulação.



Fonte: A autora, 2019.

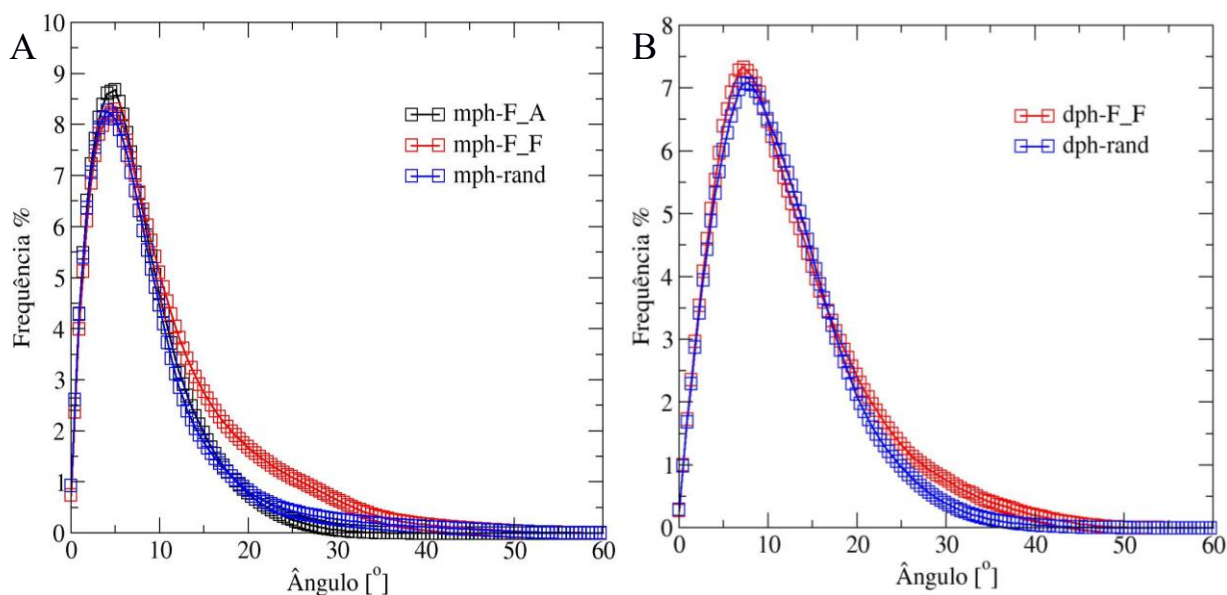
Na Figura 20 é observado que apesar dos sistemas iniciarem em estruturas diferentes, ao final da simulação observamos as cadeias lipídicas bem orientadas de forma semelhante em todas as bicamadas. As mudanças mais acentuadas nas cadeias lipídicas são vistas nos sistemas na modelagem randômica, onde os lipídios se iniciam com as cadeias aciladas desorganizadas e ao final da simulação observamos estas cadeias ordenadas e rígidas. É interessante notar que, observando a bicamada de cima (eixo z), pode-se ver como os grupos fosfatos dos lipídios nos sistemas randômicos, antes bem bagunçados (Figura 12), ao final da simulação tendem ao mesmo ordenamento que os sistemas nas outras modelagens. Para melhor visualização dos efeitos observados, vídeos de trechos das simulações destes sistemas estão disponibilizados num drive online que pode ser acessado via Qr-code disponível no Apêndice F.

As tendências observadas no ordenamento dos lipídios são causadas pela presença dos cátions Al^{3+} nas bicamadas, e será melhor discutida na seção 5.3.

5.2.3 Parâmetro de Curvatura

As análises dos ângulos de curvatura da superfície foram realizadas para as bicamadas mono- e difosforiladas e estão apresentadas na Figura 21.

Figura 21 – Distribuição dos ângulos de curvatura das bicamadas de Lipídio A. A) bicamada monofosforilada e B) bicamada difosforilada. A distribuição das médias espaço-temporais foi calculada ao longo dos últimos 100 ns de simulação.



Fonte: A autora, 2019.

É possível observar que não há grandes diferenças entre as distribuições do ângulo de curvatura para os sistemas com diferentes configurações iniciais. A distribuição dos ângulos de curvatura da superfície atinge frequência máxima em torno de 7° graus. Esta análise é mais um indicativo que os sistemas atingiram convergência mesmo a partir de diferentes estruturas iniciais.

Observa-se até o momento uma convergência estrutural para as bicamadas de cada quimiotipo, independente da forma de construção da bicamada, mas como a interação do alumínio com a bicamada é o resultado de maior interesse desta dissertação, é necessário verificar se as vizinhanças do alumínio são as mesmas para as diferentes configurações. A melhor maneira de investigar a estrutura do sistema é através do cálculo da função de distribuição radial de pares entre o alumínio e alguns grupos químicos. Por conta disso, calculamos os números de coordenação destes pares. Escolhemos os seguintes pares de átomos para analisar: cátions Al^{3+} em relação aos átomos de oxigênio da água ($\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$) e em relação aos átomos de fosfato e de oxigênio do grupo fosfato ($\text{O}_{\text{HPO}_4^-}$). Os números de coordenação dos pares analisados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Números de coordenação entre o Al^{3+} - $\text{O}_{(\text{H}_2\text{O})}$ e Al^{3+} - HPO_4^- para as bicamadas de Lipídio A mono e difosforilados. Os números de coordenação apresentados correspondem àqueles na primeira esfera de coordenação.

Sistemas	$\text{Al}^{3+} - \text{O}_{(\text{H}_2\text{O})}$	$\text{Al}^{3+} - \text{O}_{(\text{HPO}_4^-)}$
mph-F_A	4,6	1,4
mph-F_F	4,6	1,3
mph-rand	4,7	1,2
dph-F_F	4,5	1,5
dph-rand	4,7	1,4

Fonte: A autora, 2019.

Observa-se que os números de coordenação são próximos entre os sistemas, independentemente da configuração inicial utilizada. Isto mostra que o cátion Al^{3+} se coordena os grupos fosfatos de forma similar nos sistemas simulados, indicando que para as diferentes formas de construção da bicamada utilizadas neste trabalho, o sistema se encaminha para a mesma estrutura. Desde que diferentes configurações iniciais das bicamadas de Lipídio A mono- e difosforilado na presença de cátions Al^{3+} não influencia de forma significativa as estruturas amostradas após 300 ns de

simulação, foi determinada a modelagem F_A para a construção das bicamadas de Lipídio A monofosforilado e a modelagem F_F para as bicamadas de Lipídio A difosforilado. A escolha destas configurações foi em parte devido ao menor tempo de convergência observado para estes sistemas e pela praticidade de montagem da estrutura inicial da bicamada.

5.3 O Efeito do Cátion Al^{3+} e Concentrações Salinas nas Bicamadas de Lipídio A

As seções anteriores dos resultados permitiram determinar um protocolo confiável de simulação computacional de bicamadas de Lipídio A, além de eliminar possíveis dúvidas em relação à escolha da forma de construção dos sistemas apresentados e tratamento eletrostático de longo alcance. Esta última seção tem por objetivo caracterizar do ponto de vista estrutural e dinâmico o efeito do cátion Al^{3+} em bicamadas de Lipídio A de *Escherichia coli* de quimiotipos mono- e difosforilados e correlacionar com dados experimentais existentes.

As análises realizadas neste estudo focam na caracterização da dinâmica estrutural das membranas em presença de Al^{3+} e concentrações salinas. O primeiro passo foi verificar a estabilidade estrutural do sistema através da estimativa da área por lipídio e espessura da bicamada.

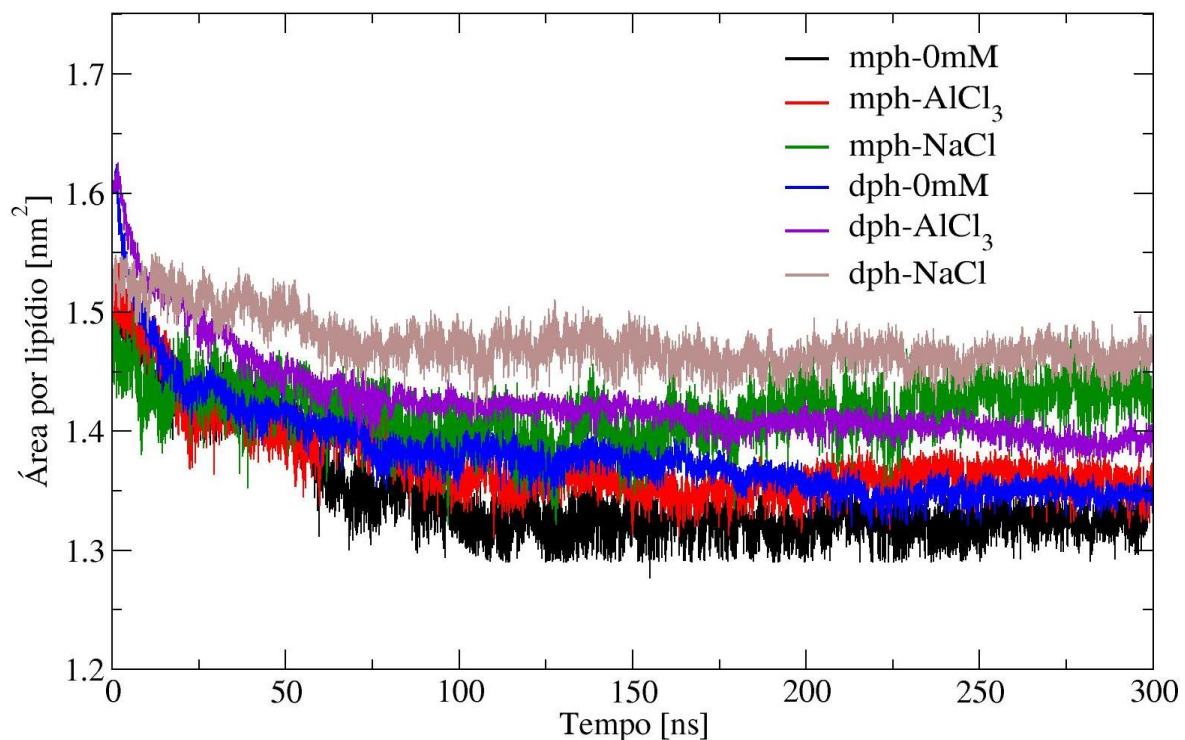
5.3.1 Área por Lipídio e Espessura da Bicamada

A área por lipídio fornece uma medida do grau de empacotamento dos lipídios em membranas e sua fase de agregação (gel ou líquido-cristalino, por exemplo). Esta grandeza tem relação direta com as forças de interação entre cada molécula e com o número de cadeias aciladas em cada lipídio. Para um mesmo lipídio, o valor da A_L pode ser afetada pelo grau de hidratação, temperatura e efeito de íons presentes no sistema. (NASCIMENTO et al., 2014; PONTES et al., 2012) A estimativa da A_L foi realizada ao longo de toda trajetória da simulação. O comportamento da propriedade ao longo do tempo está mostrado na Figura 22.

Através da análise da A_L observamos que todos os sistemas começam a estabilizar a partir dos 100 ns de simulação. Para melhor entendimento, os valores médios da A_L obtidos para os últimos 100 ns de simulação são apresentados na tabela 10. Todos os valores médios apresentados são compatíveis com medidas experimentais disponíveis de A_L de membranas lipopolissacarídicas de *Salmonella minnesota* na fase gel, cujos valores variam de 1,29 nm² e 1,42 nm². (SNYDER; KIM; MCINTOSH, 1999) A A_L costuma ser maior para membranas de LPS com maiores quantidades de

anéis de açúcar em sua composição. Algumas destas medidas de A_L foram realizadas em temperaturas ligeiramente (293,15 K) abaixo da temperatura das simulações realizadas nesta dissertação (300 K).

Figura 22 – Perfil da área por lipídio para as bicamadas de Lipídio A de *E.coli* mono- e difosforilada tendo Al^{3+} como contraíon e sais específicos (Tabela 8).



Fonte: A autora, 2019.

Tabela 10 – Valor médio e desvio-padrão para a A_L (nm^2) e espessura D_{HH} (nm) das bicamadas simuladas. Os valores foram calculados para os últimos 100 ns de trajetória equilibrada.

Sistemas	Área por lipídio (nm^2)	Espessura Média (nm)
mph-0mM	$1,32 \pm 0,01$	$3,91 \pm 0,01$
mph- $AlCl_3$	$1,36 \pm 0,01$	$3,89 \pm 0,01$
mph-NaCl	$1,41 \pm 0,02$	$3,82 \pm 0,02$
dph-0mM	$1,36 \pm 0,01$	$4,08 \pm 0,01$
dph- $AlCl_3$	$1,40 \pm 0,01$	$4,06 \pm 0,01$
dph-NaCl	$1,44 \pm 0,01$	$3,98 \pm 0,02$

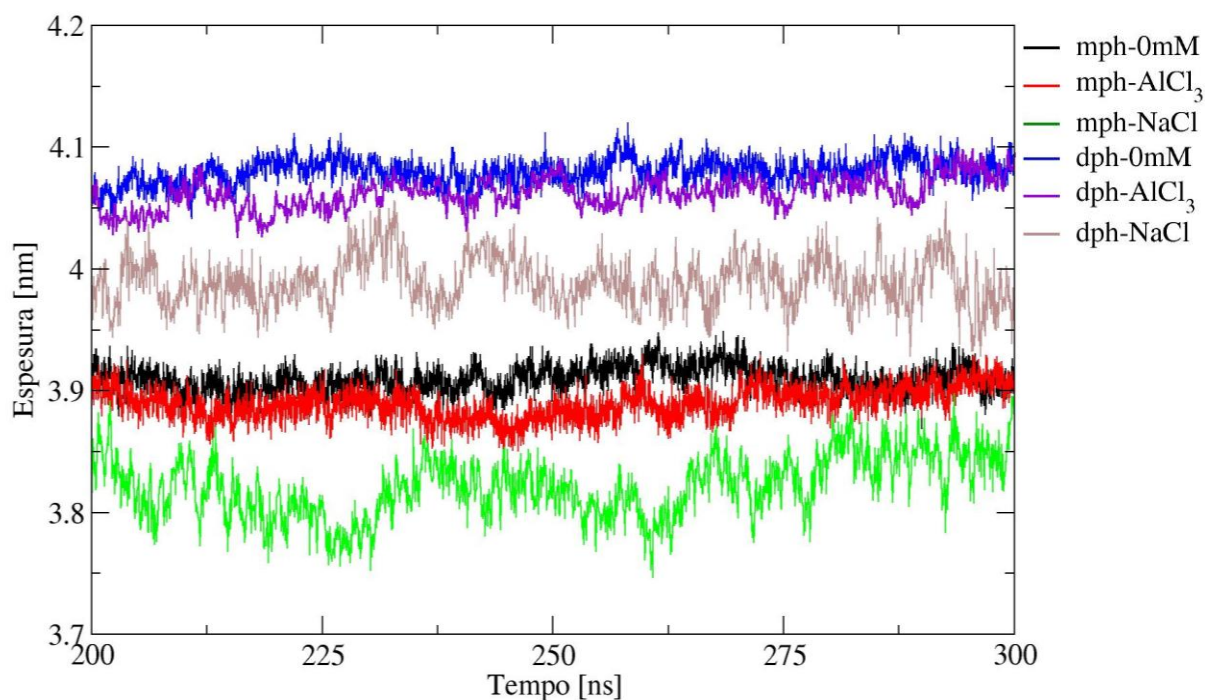
De qualquer forma, consideramos as estimativas obtidas neste trabalho compatíveis com os dados experimentais disponíveis. Todos valores obtidos de A_L para os sistemas apresentados são menores do que a A_L obtida em simulações de dinâmica molecular de bicamadas de Lipídio A, também de *Escherichia coli*, na presença de cátions Mg^{2+} . (PONTES, 2013) Como é visto que cátions divalentes mantêm a estrutura de bicamada de Lipídio A lamelar e plana, não causando grandes efeitos na bicamada, pode-se concluir que a presença de cátions Al^{3+} provoca a diminuição na área por cabeça de bicamadas de Lipídio A. Uma possível explicação microscópica para isso é que o cátion Al^{3+} é menor e mais carregado que o cátion Mg^{2+} provocando uma maior aproximação dos grupos fosfatos dos lipídios, diminuindo a área por lipídio.

A partir da análise de A_L para os sistemas simulados, pode-se observar duas tendências interessantes. A primeira é em relação ao quimiotipo do Lipídio A empregado. Para o mesmo regime de concentração salina, os sistemas com o Lipídio A difosforilado apresentam uma área por lipídio ligeiramente maior do que para as bicamadas de Lipídio A monofosforilado, esta diferença é de aproximadamente $0,04 \text{ nm}^2$. Esta diferença é esperada devido a presença de mais um grupamento fosfato no Lipídio A difosforilado que aumenta a área entre os lipídios. A segunda tendência diz respeito a influência da concentração salina no valor da propriedade. As bicamadas na presença de NaCl apresentam valores de A_L maiores do que para os outros dois regimes, independentemente do quimiotipo do Lipídio A. Também é observado que na presença de $AlCl_3$ há um aumento na área quando comparado as bicamadas sem concentração salina. Em resumo, percebe-se que a adição de sais ($AlCl_3$ ou NaCl) provoca um aumento no valor da A_L das bicamadas, independente do quimiotipo do Lipídio A, quando comparado ao valor de A_L para os sistemas sem concentração salina. A baixa variação no valor da propriedade, ao longo de toda a simulação, é um indicativo de que não houve mudanças significativas na forma de agregação das bicamadas.

Assim como a A_L , a espessura das bicamadas pode ser usada como indicativo de estabilidade dos sistemas. Esta análise foi calculada para os últimos 100 ns de trajetória, como pode ser visto na Figura 23. A partir do gráfico podemos observar que para o mesmo regime de concentração salina, os valores de D_{HH} para as bicamadas de Lipídio A monofosforilado são ligeiramente menores do que no caso das bicamadas de Lipídio A difosforilado. Como as cadeias lipídicas têm o mesmo comprimento nos dois quimitipos, pode-se supor que para as bicamadas monofosforiladas ocorre uma maior interdigitalização entre as cadeias lipídicas da camada

superior e inferior. A média dos valores de D_{HH} são apresentados na tabela 10. Também é observado que não há diferenças significativas entre os valores das espessuras das bicamadas sem concentração salina e na adição de cloreto de alumínio, sendo o valor médio de $\sim 3,9$ nm nas bicamadas de quimiotipo mono- e $\sim 4,1$ para as bicamadas de quimiotipo difosforilado. Porém a presença de NaCl produz uma diminuição no valor da propriedade.

Figura 23 – Resultados da espessura média das bicamadas lipídicas para os sistemas estudados. A análise foi realizada para os últimos 100 ns de simulação.

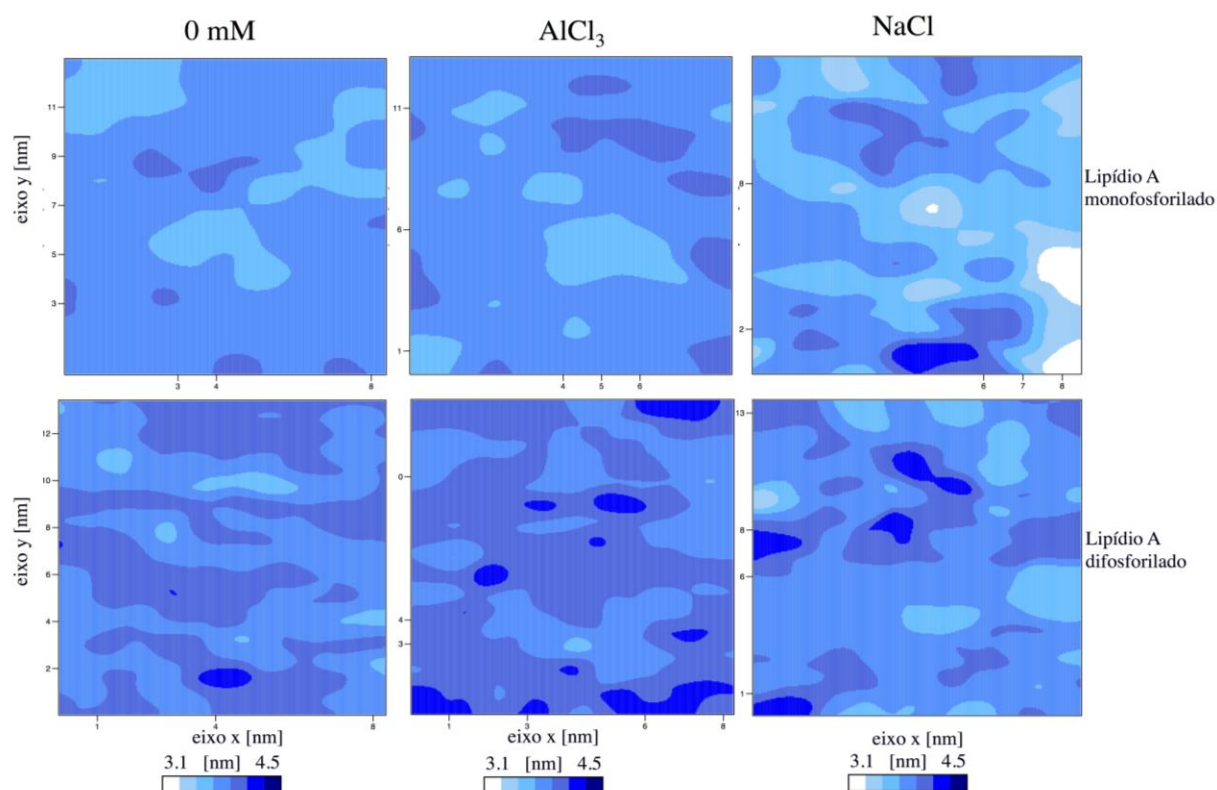


Fonte: A autora, 2019.

Esta tendência também é observada independente do quimiotipo do Lipídio A. O cálculo da espessura das bicamadas lipídicas pode ser tomado de duas formas, sendo a primeira apresentada anteriormente, onde obtemos um perfil temporal de uma média espacial da espessura em toda a extensão da membrana. A segunda, entretanto, é uma média temporal da distribuição espacial da espessura da membrana ao longo de toda sua extensão. Nesta forma, é possível observar a projeção da espessura média da membrana, onde é plotada a distribuição da espessura da bicamada ponto a ponto da superfície criada na forma de uma variação na intensidade da cor, mostrada na legenda, em cada ponto da grade sobre a superfície. Como nesta grade, os pontos são igualmente espaçados nos sentidos x e y, o mapa da distribuição espacial apresenta forma quadrada, não correspondendo

à exata forma da membrana. Para os sistemas simulados, as distribuições espaciais da espessura das bicamadas são apresentadas na Figura 24.

Figura 24 – Distribuição espacial da espessura da bicamada para os sistemas descritos na Tabela 8. Na primeira coluna estão os sistemas com Lipídio A mono- (acima) e difosforilado (abaixo) sem concentração salina, na segunda coluna estão presentes os sistemas com cloreto de alumínio e na terceira coluna estão os sistemas com cloreto de sódio.



Fonte: A autora, 2019

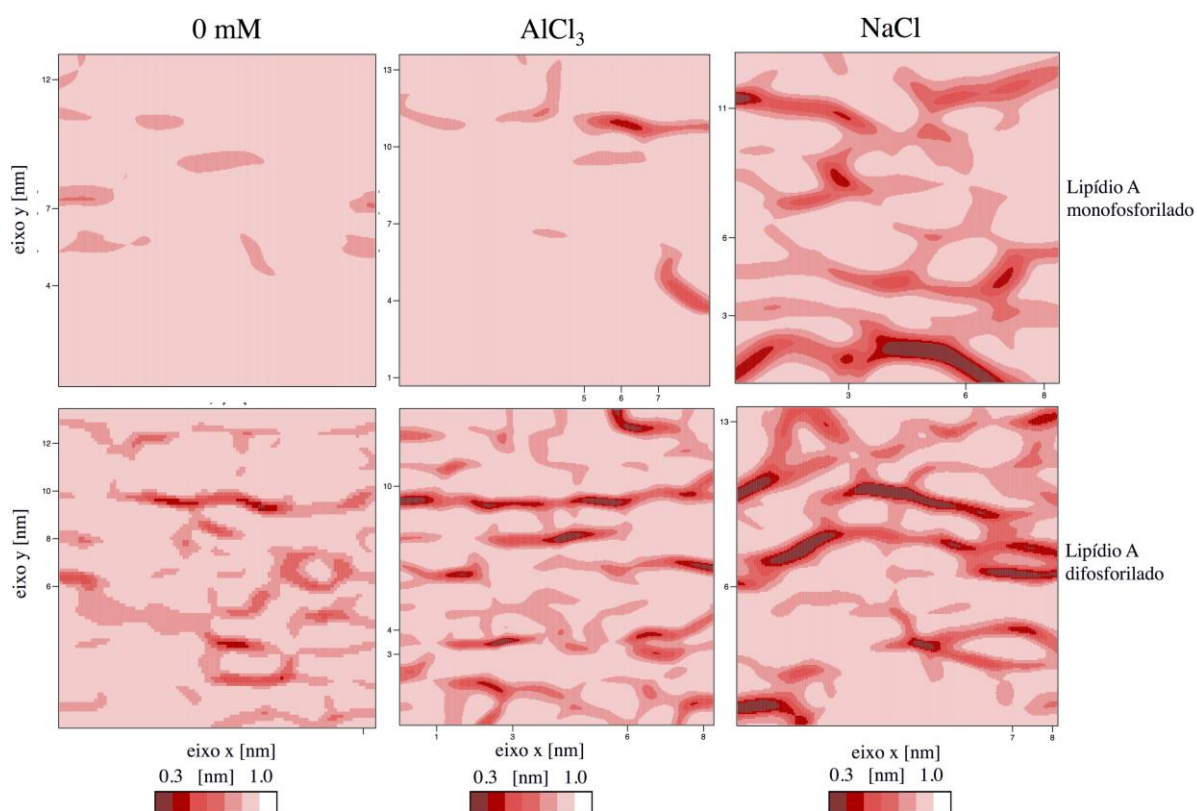
O mapa bidimensional indica uma correlação entre o aumento do número de partículas carregadas com um maior valor da espessura da membrana. O sistema mph-0mM apresenta valores baixos para espessura e a medida que aumentamos a quantidade de grupos carregados no sistema através de grupos fosfatos (dph-0mM) ou concentração salina (AlCl_3 ou NaCl) a bicamada começa a apresentar valores maiores de espessura e maiores diferenças na D_{HH} para um mesmo quimiotipo de Lipídio A.

5.3.2 Curvatura da Membrana

Também foi realizado um levantamento sobre a curvatura das membranas. O parâmetro de ordem de curvatura pode ser calculado como descrito na subsecção 3.3, através dos ângulos de curvatura ou desvio em relação a normal do sistema. Lipídios mais ordenados em relação ao eixo z tem valores de ângulo de inclinação baixo, enquanto valores mais altos do ângulo de inclinação indicam lipídios se aglomerando de forma mais desordenada. Assim como na espessura da bicamada, utilizando o programa SuAVE, os valores de curvatura podem ser apresentados de duas formas. A primeira é que podemos obter a curvatura bidimensional das bicamadas, sendo os valores obtidos apresentados por um mapeamento em cores. Neste tipo de análise, a intensidade da coloração de uma região é representativa do valor do ângulo de desvio entre o vetor normal da superfície em relação a normal do sistema. Para os nossos sistemas, os gráficos das projeções dos parâmetros de ordem de curvatura sobre a superfície das bicamadas são apresentados na Figura 25.

Pode-se verificar que nos sistemas compostos por bicamadas de Lipídio A monofosforilado na presença apenas de íons alumínio e na concentração de 150mM de AlCl_3 há poucos pontos de alta angulação, o que indica que nestes sistemas não há nenhuma modificação na estrutura lamelar. As bicamadas de Lipídio A difosforilado, no mesmo regime de concentração salina, apresentam uma maior diversidade de gradientes angulares ao longo de toda a superfície quando comparado com as bicamadas de Lipídio A monofosforilado, porém ainda indicam que houve poucas modificações estruturais na bicamada. Entretanto, para os sistemas com NaCl observamos que há uma modificação estrutural evidenciada pelo aumento das regiões com coloração mais intensa. Esta variação estrutural está relacionada com uma maior flexibilidade nos lipídios da bicamada e formação de leve curvatura, que não é verificada nos outros sistemas. Em geral, observa-se uma tendência já verificada durante as estimativas de espessura da bicamada, as maiores curvaturas nas bicamadas são observadas em sistemas com maior número de grupos carregados. Especialmente na presença do sal NaCl. A segunda forma de apresentar os resultados de curvatura é através do, já apresentado, perfil de distribuição de ângulos de curvatura. As estimativas dos ângulos em cada bicamada estão apresentadas na Figura 26.

Figura 25 – Gráficos da projeção dos parâmetros de ordem de curvatura sobre a superfície da bicamada. Na primeira coluna estão os sistemas com Lipídio A mono- (acima) e difosforilado (abaixo) sem concentração salina, na segunda coluna estão presentes os sistemas com cloreto de alumínio e na terceira coluna estão os sistemas com cloreto de sódio. As estimativas dos ângulos de inclinação para os lipídios em cada bicamada foram realizadas para os últimos 100 ns de trajetória equilibrada

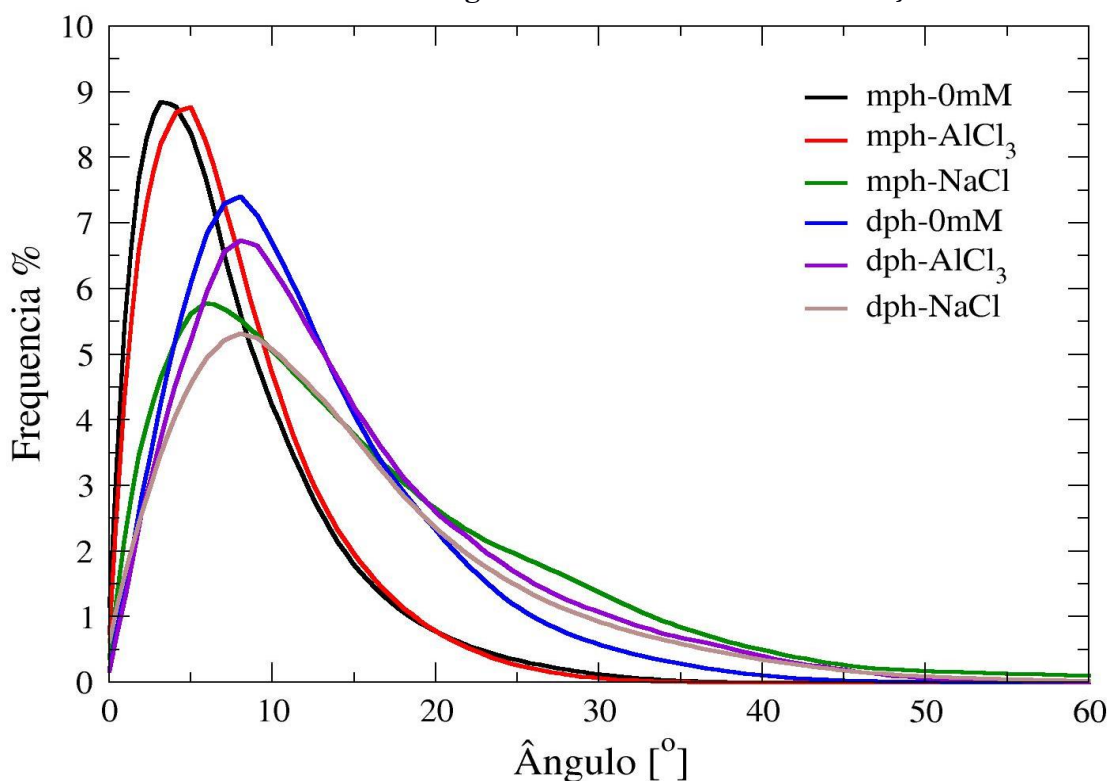


Fonte: A autora, 2019.

É possível observar que as bicamadas apresentam uma distribuição de ângulos com pouco espalhamento, o que indica que todas as bicamadas apresentam aproximadamente um formato plano. Porém as bicamadas de Lipídio A monofosforilado apenas com cátions Al^{3+} e com concentração salina de AlCl_3 apresentam valores máximos em ângulos em torno de cinco graus de desvio. Ângulos de inclinação mais altos são bem poucos frequentes. Este resultado indica o alto grau de ordenação dos lipídios nestas bicamadas. As bicamadas de Lipídio A difosforilado nos mesmos regimes de concentração salina também se mostram bem ordenadas, com ângulos em torno de dez graus de desvio, porém com frequências um pouco menores e com maior diversidade de ângulos do que no caso do Lipídio A monofosforilado. Já as bicamadas na presença de cloreto de sódio, indendentemente do quimiotipo do Lipídio A, têm maior espalhamento de ângulos, o que

indica uma maior desordem dos lipídios nestas bicamadas e a presença de curvatura (Figura 26). Entretanto, estes sistemas ainda têm seus ângulos de inclinação mais altos em torno de dez graus, apresentando poucos pontos de grande angulação, e de acordo com outros trabalhos utilizando o software SuAVE (LIMA et al., 2019; SANTOS et al., 2017), os valores para estes sistemas ainda indicam a manutenção da bicamada. O gráfico da distribuição de ângulos permite separar as bicamadas em três grupos compatíveis com o perfil de cada curva. As bicamadas de Lipídio A monofosforilado contendo apenas o cátion Al^{3+} são os mais ordenados (mph-0mM e mph- AlCl_3), seguido das bicamadas de Lipídio A difosforilado contendo também apenas o cátion Al^{3+} (dph-0mM e dph- AlCl_3). As distribuições com maiores ângulos de inclinação são obtidas justamente quando o cátion Na^+ está presente.

Figura 26 – Distribuição dos ângulos de curvatura para as bicamadas de Lipídio A, calculados ao longo dos últimos 100 ns de simulação.



Fonte: A autora, 2019.

Uma outra maneira de quantificar os dados desta mesma análise é através da integração dos perfis de distribuição de ângulos de curvatura dado na Tabela 11. Na segunda coluna desta tabela, encontram-se os resultados do intervalo de ângulos que cobrem 90% das frequências observadas e podemos observar a mesma conclusão anterior. Estes resultados mostram que as bicamadas de

Lipídio A monofosforilado apresentam, em 90% da superfície, ângulos menores do que para os respectivos regimes de concentração salina nas bicamadas de Lipídio A difosforilado. Os sistemas monofosforilados no primeiro e segundo regime apresentam ângulos da superfície entre 0 e 19°, o que indica que nestes sistemas 90% da superfície encontra-se com alto aspecto de planaridade. Para as bicamadas de lipídio difosforilado, o intervalo é entre 0 e 24°. Com a inserção de 150mM de cloreto de sódio, pode-se observar um aumento do intervalo, portando, nestes sistemas, há uma maior distribuição das frequências e maior mobilidade dos lipídios nestes sistemas, onde os ângulos chegam a 32°.

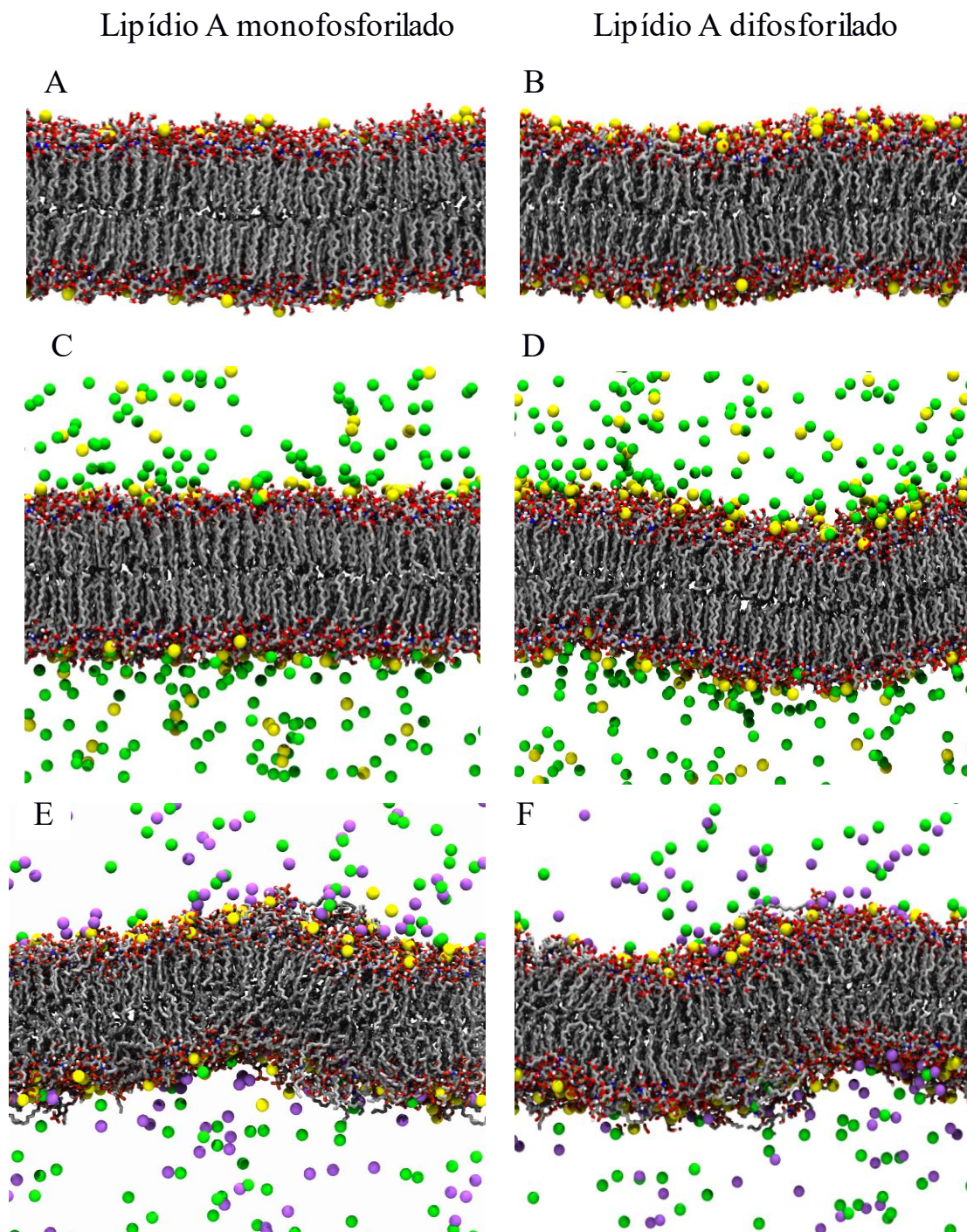
Tabela 11 – Análise quantitativa dos perfis de distribuição de ângulos de curvatura.

Sistema	Intervalo com 90% da área da curva	Média do parâmetro de curvatura S_{CD}
mph-0mM	0° – 17,21°	0,960 ± 0,005
mph-AlCl ₃	0° – 18,72°	0,950 ± 0,005
mph-NaCl	0° – 29,44°	0,89 ± 0,02
dph-0mM	0° – 19,15°	0,920 ± 0,007
dph-AlCl ₃	0° – 24,41°	0,90 ± 0,01
dph-NaCl	0° – 31,89°	0,88 ± 0,02

Fonte: A autora, 2019.

Toda esta discussão detalhada pode ser resumida na observação da Figura 27, onde são visualizadas as estruturas finais dos sistemas simulados. Para os sistemas mph-0mM e mph-AlCl₃, temos uma estrutura plana com todos os cátions Al³⁺ (esferas amarelas) localizadas na região da interface água-membrana. Não há formação de curvatura, como previsto anteriormente, e é interessante notar como os lipídios se apresentam bem ordenados e rígidos nas bicamadas. Este mesmo ordenamento é visto para os sistemas dph-0mM e dph-AlCl₃, onde os 108 íons alumínio também se encontram muito próximos a interface membrana-água. Embora o sistema de Lipídio A difosforilado com AlCl₃ apresente uma leve curvatura, os lipídios ainda permanecem rígidos e ordenados. A presença desta curvatura deve-se a maior concentração de cátions Al³⁺ no sistema e uma possível competição dos dois grupamentos fosfatos presentes no Lipídio A pelos cátions Al³⁺.

Figura 27 – Estruturas final das membranas de Lipídio A mono- e difosforilado. Na sequência estão A) mph-0mM, B) dph-0mM, C) mph-AlCl₃, D) dph-AlCl₃, E) mph-NaCl e F) dph-NaCl. Os lipídios foram representados em bastões e os íons (amarelo para Al³⁺, roxo para Na⁺, verde para Cl⁻) são representados por esferas. As moléculas de água foram omitidas para maior clareza.



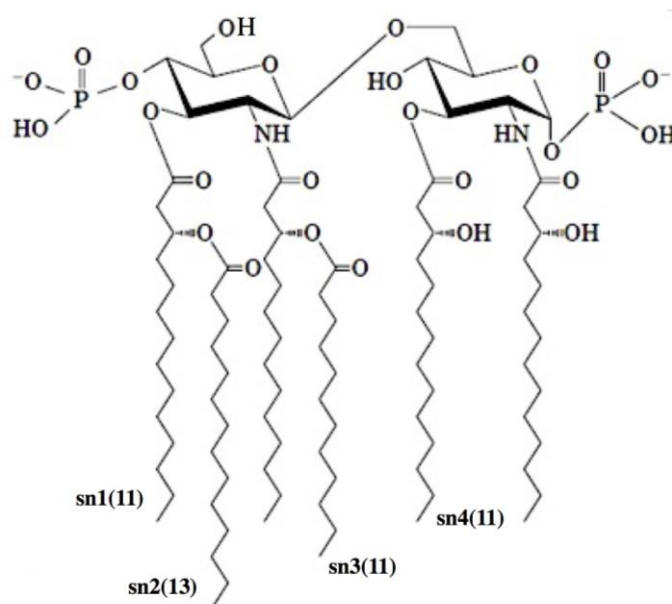
Fonte: A autora, 2019.

Entretanto, outras observações são vistas nos sistemas com concentração salina de NaCl. Observamos, para ambos os quimiotipos, lipídios mais fluidos e desordenados, o que corrobora com os gráficos da projeção do parâmetro de ordem (Figura 25) e distribuição dos ângulos de curvatura (Figura 26) obtidos para estes sistemas. É possível observar a formação de curvatura e a presença de alguns cátions Na^+ bem próximos a bicamada ou localizados em solução próximos aos cloretos, enquanto quase todos os cátions Al^{3+} ainda estão próximos aos grupos lipídicos, indicando uma maior preferência destes cátions a permanecerem interagindo com a bicamada. Estas observações serão discutidas com profundidade mais a frente.

5.3.3 Parâmetro de Ordem de Deutério S_{CD}

Nas mudanças de fase ou de agregação, o principal aspecto estrutural modificado é a organização das cadeias aciladas. Para a medida de alinhamento destas cadeias, calcula-se o parâmetro de ordem de deutério S_{CD} . Quanto maior o valor do parâmetro de ordem, mais organizada estão as cadeias aciladas de cada bicamada. Para as membranas de Lipídio A mono- e difosforilado foram calculados o S_{CD} das cadeias aciladas sn1, sn2, sn3 e sn4 (ver Figura 28). Nesta análise apenas os átomos de carbono (CH_2) das cadeias foram calculados.

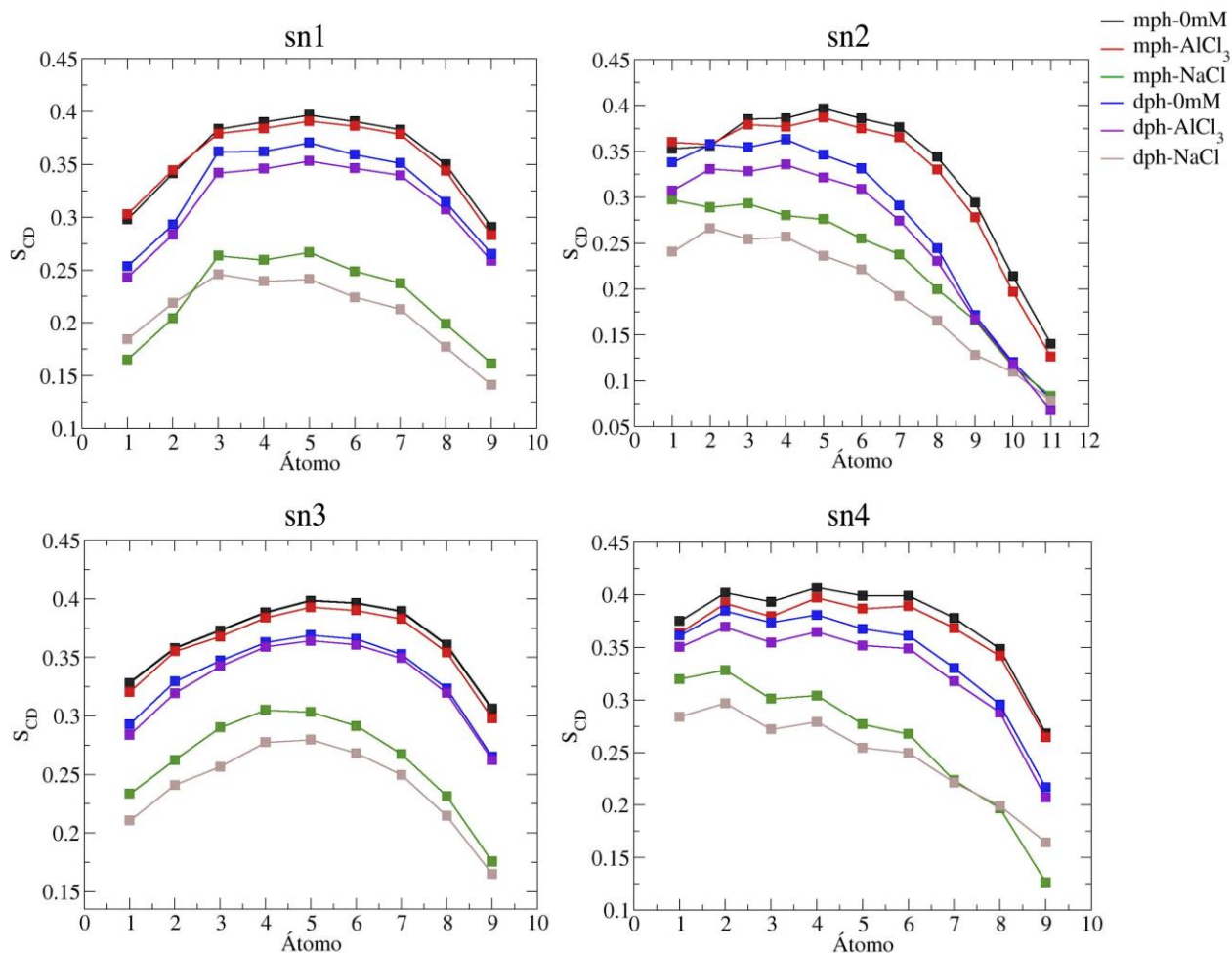
Figura 28 – Indicação das cadeias sn1, sn2, sn3 e sn4 na molécula de Lipídio A. Entre parênteses o número de átomos de carbono incluídos para análise em cada cadeia.



Fonte: A autora, 2019.

Como explicado na seção 3-5, o ângulo de inclinação do n -ésimo carbono em relação ao eixo normal da bicamada é calculada a partir da posição dos átomos de carbono $n+1$ e $n-1$. Portanto, os átomos iniciais e finais da cadeia servem apenas como referência e não tem os seus respectivos parâmetros de ordem calculados. Deste modo, para cada cadeia, o número de átomos indicados no gráfico do S_{CD} é menor em duas unidades ao indicado na Figura 28. As medidas de parâmetro de ordem estão apresentadas na Figura 29.

Figura 29 – Parâmetros de ordem (S_{CD}) dos átomos de deutério para as cadeias aciladas das membranas de Lipídio A mono- e difosforilado contendo cátions Al^{3+} e concentração salina de $AlCl_3$ e $NaCl$. A análise foi realizada para os últimos 100 ns de simulação de cada sistema.



Fonte: A autora, 2019.

O comportamento esperado para o S_{CD} de cadeias lipídicas é um gráfico onde o valor do parâmetro cai gradativamente para os átomos de carbono da extremidade, ou seja, no sentido da cabeça do lipídio para a região hidrofóbica, por conta da menor restrição dos graus de liberdade dos grupos terminais das cadeias lipídicas. Este comportamento é observado apenas para a cadeia sn4. Os gráficos para as cadeias sn1, sn2 e sn3 apresentam um comportamento diferente para os S_{CD} dos primeiros átomos. Uma explicação para isso é a presença dos grupos ceto-ésteres que causa interações atrativas entre os átomos de oxigênio e os átomos de carbono das cadeias lipídicas. Esta interação atrativa limita o movimento dos átomos mais centrais das cadeias, conferindo aos átomos de carbono mais rigidez, refletindo no formato do gráfico obtido. Nas cadeias sn2 observa-se os menores valores de S_{CD} no final da cadeia lipídica devido ao seu maior comprimento em comparação as outras cadeias o que aumenta o grau de liberdade para os últimos átomos de carbono.

As bicamadas de Lipídio A monofosforilado, para cada regime de concentração salina, apresentam valores maiores de S_{CD} do que quando comparado as bicamadas de Lipídio A difosforilado, indicando uma maior organização das cadeias lipídicas para os Lipídio A monofosforilado. Pode-se observar que as caudas dos Lipídios A difosforilados apenas com cátions Al^{3+} apresentam organização levemente maior que as na presença de $AlCl_3$, entretanto para o Lipídio A monofosforilado a diferença entre estes dois regimes de concentração salina é praticamente eliminada, relacionada ao alto alinhamento das caudas. Para os sistemas com NaCl observa-se uma diminuição nos valores de S_{CD} indicando que nestes sistemas há uma maior fluidez e desordem nas cadeias lipídicas. Como visto na Figura 22, os sistemas na presença de NaCl tem um valor de A_L maior, o que fornece mais espaço para os movimentos das cadeias aciladas e, portanto, resulta no menor parâmetro S_{CD} .

Ao contrário de outras membranas biológicas onde os parâmetros de ordem de deutério das cadeias lipídicas podem ser medidas através de RMN de próton (DOULIEZ; LEONARD; DUFOURC, 1995), as medidas da orientação das cadeias aciladas de membranas lipopolissacarídicas e de Lipídio A são feitas utilizando refletância total atenuada e o resultado é tratado com a técnica de transformada de Fourier e um espectro de absorbância é obtido. Os coeficientes de absorção são ajustados aos parâmetros de ordem das cadeias (BRANDENBURG; SEYDEL, 1990). O parâmetro de ordem obtido por esta técnica é um valor para toda a membrana e não valores individuais para os átomos de carbono da cadeia, por esse motivo foi estimado o

valor médio dos parâmetros de ordem calculados para as membranas e comparamos com medidas disponíveis na literatura.(BRANDENBURG et al., 2003) Os resultados obtidos estão na tabela 12.

Os sistemas contendo exclusivamente Al^{3+} apresentam valores acima de 0,30 indicando que as cadeias aciladas nestes sistemas estão bem ordenadas e rígidas. Estatisticamente os valores para o S_{CD} dos sistemas contendo apenas Al^{3+} não apresentam diferenças, indicando o mesmo grau de ordenamento nestes sistemas. Já foi relatado que a presença do alumínio produz rigidez em membranas fosfolipídicas(DELEERS; SERVAIS; WÜLFERT, 1986) o que aumenta o grau de ordenamento levando o valores maiores de S_{CD} , além disso, já foi relatado que, através de técnicas de microscopia de fluorescência e interferometria de dupla polarização, a presença de íons alumínio em bicamadas de fosfolipídios induz a formação de domínios, indicando uma transição de fase de uma fase desordenada para uma fase ordenada densamente compactada.(WAYMENT-STEELE et al., 2016)

Tabela 12 – Valores médios com os seus respectivos desvios-padrões para o S_{CD} das membranas simuladas para os últimos 100 ns de simulação.

Sistemas	Valores médios de S_{CD}
mph-0mM	$0,36 \pm 0,04$
mph- $AlCl_3$	$0,35 \pm 0,04$
mph-NaCl	$0,25 \pm 0,05$
dph-0mM	$0,33 \pm 0,05$
dph- $AlCl_3$	$0,32 \pm 0,05$
dph-NaCl	$0,24 \pm 0,04$

Fonte: A autora, 2019.

Para os sistemas simulados, a presença de NaCl diminui a rigidez das cadeias aciladas provocada pelos cátions Al^{3+} e obtêm-se valores de S_{CD} acima de 0,24. Valores de S_{CD} para cadeias aciladas de Lipídio A são da ordem de 0,28 (*Pseudomonas aeruginosa*), 0,27 (*Rhodobacter capsulatus*) e 0,15 (*Rhodocyclis gelatinosus*). (BRANDENBURG et al., 2003) Portanto, os valores calculados de S_{CD} estão dentro da faixa de valores experimentais. Apesar da diferença entre os valores de S_{CD}

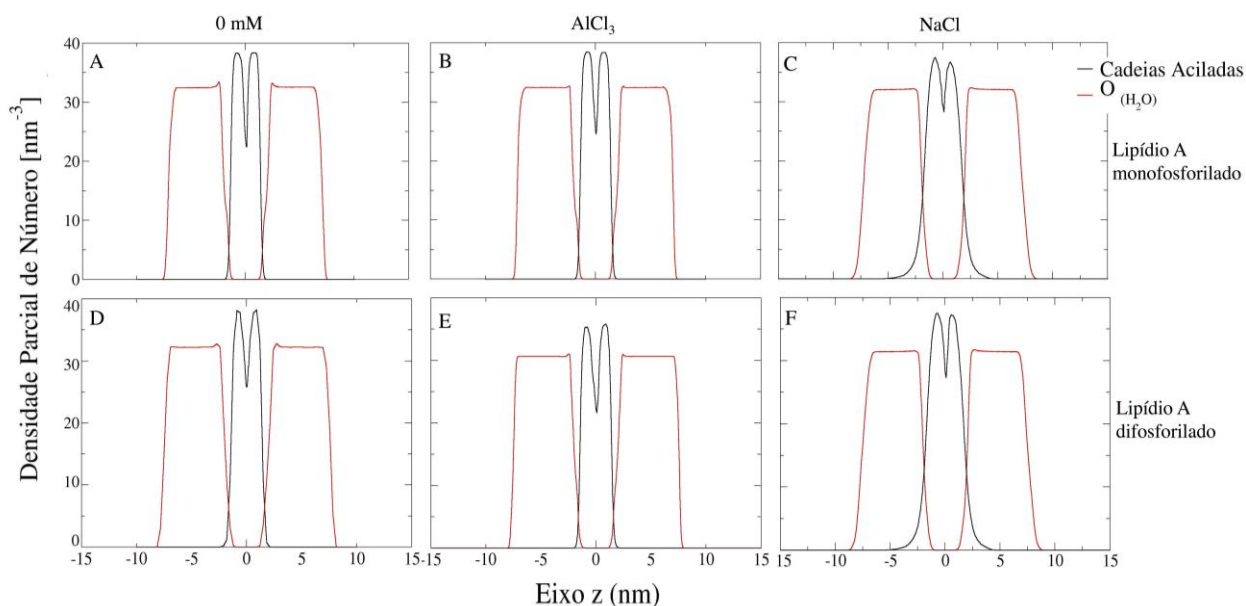
pode-se concluir que as membranas em todos os sistemas se encontram na mesma fase gel. Este resultado é condizente com medidas experimentais de membranas de Lipídio A hexaacilado de *E.coli* na temperatura de 300 K escolhida para as simulações deste trabalho.(GUTSMANN et al., 2000)

5.3.4 Perfil de Densidade

Para descrever a localização de alguns grupamentos químicos do sistema, calculamos o perfil de densidade parcial, analisando a distribuição ao longo do eixo z. Esta análise fornece informações qualitativas sobre o grau de hidratação das bicamadas, a coordenação entre estes grupos químicos e indica se as membranas seguem um perfil lamelar, onde as curvas se tornam simétricas em torno do centro do sistema, além de poderem ser comparados com medidas experimentais de difração de nêutrons.(MONTICELLI; KATSARAS, 2014)

Os grupos analisados foram: átomos de fósforo dos grupos fosfatos, os átomos de oxigênio das moléculas de água, os átomos de carbono das cadeias aciladas dos lipídios e os íons presentes no sistema (Al^{3+} , Na^+ e Cl^-). Estes perfis foram calculados para todos os sistemas simulados. A análise foi realizada de acordo com a posição ocupada por cada grupo em relação ao eixo z da caixa de simulação. Para melhor visualização dos resultados, os gráficos foram divididos em dois grupos: o perfil de densidade dos oxigênios das moléculas de água juntamente com as cadeias aciladas (Figura 30) e o segundo grupo é formado pelo perfil de densidade dos átomos de fósforo e os íons presentes (Figura 31).

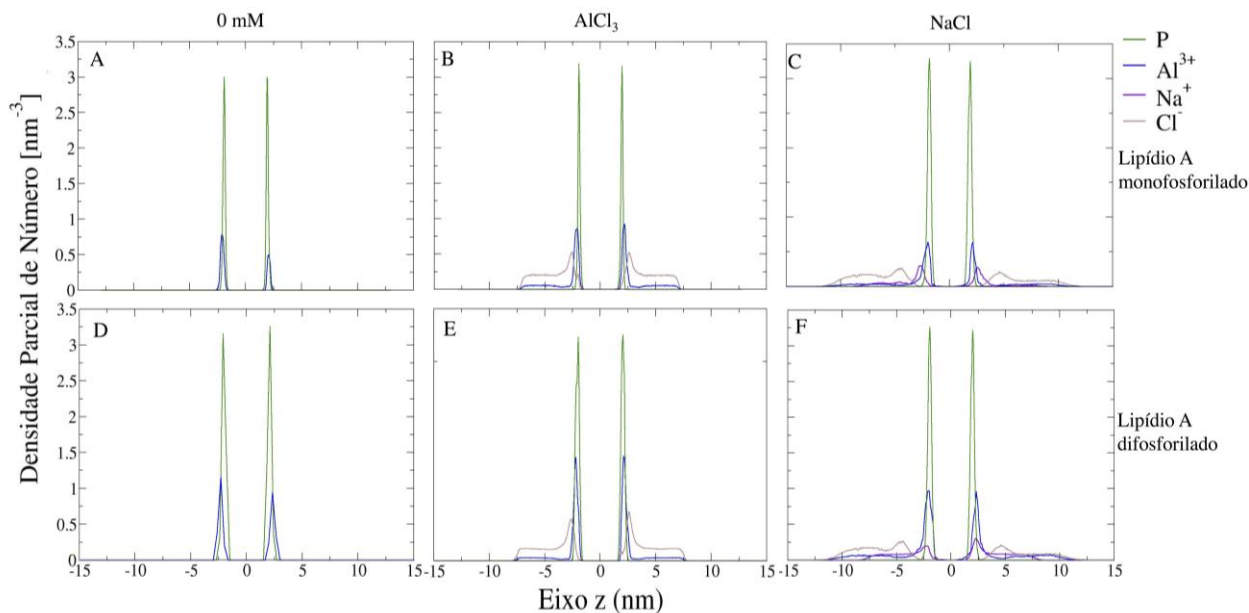
Figura 30 – Perfis de densidade dos grupos: oxigênio das moléculas de água e cadeias aciladas dos lipídios para os sistemas A) mph-0mM, B) dph-0mM, C) mph- AlCl_3 , D) dph- AlCl_3 , E) mph-NaCl, F) dph-NaCl. O intervalo do eixo z é mantido o mesmo para todos os sistemas.



Fonte: A autora, 2019.

Os sistemas, de forma geral, possuem um perfil bastante simétrico, típico de membranas lamelares e estão consistentes com simulações anteriores. (DIAS et al., 2014; PONTES et al., 2012; SANTOS et al., 2017) A intersecção entre as curvas da Figura 30 indica a penetração da água no interior da membrana. Para os sistemas sem concentração salina observamos a pequena intersecção entre os grupos $\text{O}_{(\text{H}_2\text{O})}$ e das cadeias aciladas mostrando uma baixa hidratação na membrana. O mesmo pode ser observado para os sistemas contendo AlCl_3 . Além disso, nota-se o espaçamento entre estas curvas devido ao alinhamento das caudas lipídicas que se encontram na fase gel. Já para as bicamadas na presença de NaCl, observa-se uma maior hidratação na membrana e a distribuição das cadeias aciladas apresentam uma menor simetria quando comparado aos outros sistemas. O maior espalhamento dos picos referentes as cadeias aciladas nos gráficos para os sistemas com NaCl indica um maior entrelaçamento entre as cadeias aciladas das camadas superior e inferior da bicamada.

Figura 31 – Perfis de densidade para os átomos de fósforo e os íons Al^{3+} , Na^+ e Cl^- para os sistemas A) mph-0mM, B) dph-0mM, C) mph- AlCl_3 , D) dph- AlCl_3 , E) mph- NaCl e F) dph- NaCl . O intervalo do eixo z é mantido o mesmo para todos os sistemas.



Fonte: A autora, 2019.

Para os perfis de densidade dos íons juntamente aos átomos de fósforo (Figura 31), observamos que, em todos os sistemas, os átomos de fósforo e os íons alumínio ocupam basicamente a mesma região no eixo z das membranas indicando coordenação entre estes dois grupos. Nos sistemas com força iônica proveniente do AlCl_3 , há alguns íons alumínio ainda em solução juntos aos ânions cloretos, mesmo que em pouca quantidade. É importante notar que nestes sistemas, logo após a interface externa aos fosfatos das bicamadas, temos os picos máximos dos cloretos, que devem estar coordenados a alguns alumínio que estão na interface lipídio-água. Para os sistemas com NaCl , observamos que alguns sódios interagem com os grupos fosfatos, porém a maior parte dos cátions Na^+ encontram-se em solução junto aos ânions cloreto e os alumínio permanecem próximos aos lipídios. Este resultado indica que os cátions Al^{3+} tem maior preferência em permanecer próximo a membrana do que o Na^+ .

5.3.5 Difusão dos Íons

A dinâmica dos íons nas bicamadas pode ser investigada através das suas difusividades nos sistemas. Os valores obtidos nas simulações deste trabalho estão descritos na tabela 13.

A difusão dos íons (Al^{3+} , Na^+ e Cl^-) nas bicamadas de Lipídio A ocorre majoritariamente no plano xy, independentemente do quimiotipo do quimiotipo e do regime de concentração salina. Entretanto, a difusão é significativamente maior para os íons Na^+ e Cl^- do que para os cations Al^{3+} o que indica que o alumínio não se movimenta muito quando estão próximos a bicamada nos últimos 100 ns de simulação.

Tabela 13 – Média temporal das constantes de difusão, com os respectivos desvios, calculada ao longo dos últimos 100 ns de simulação, para os sistemas descritos na Tabela 3.

Sistemas	Coeficiente de difusão (Difusividade molar) [$10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$]					
	Plano xy			Eixo Z		
	Al^{3+}	Na^+	Cl^-	Al^{3+}	Na^+	Cl^-
mph-0mM	1,27±0,01	-	-	0,39±0,01	-	-
mph- AlCl_3	27,65±1,08	-	178,2±3,7	17,00±0,21	-	74,6±16,8
mph- NaCl	1,68±0,06	188±38	302,9±19,0	1,38±0,72	107±47	107,2±41,8
dph-0mM	1,48±0,06	-	-	0,35±0,07	-	-
dph- AlCl_3	38,58±0,01	-	157,4±9,4	15,74±1,52	-	82,4±8,3
dph- NaCl	1,83±0,08	244±67	341,0±11,1	1,00±0,020	107±41	49,0±18,6

Fonte: A autora, 2019.

A difusividade molar do cátion Al^{3+} é maior para os sistemas com concentração salina de 150mM de AlCl_3 do que para os outros sistemas, isto acontece pois, como o valor é uma média de todos os íons, muitos cátions Al^{3+} estão em solução e não se ligam aos lipídios. É interessante notar que nestes sistemas há também um valor mais alto da propriedade para o eixo z da caixa de simulação. Isto pode indicar que os cátions Al^{3+} em solução tentam se aproximar da bicamada devido a forte atração eletrostática pelos grupos fosfatos, porém devem ser repelidos pelos cátions Al^{3+} já presentes na interface lipídio-água o que aumentaria a movimentação dos cátions no eixo z. A difusividade dos cátions Al^{3+} são uma ordem de grandeza menor que a dos outros íons

presentes na simulação. Esta diferença é devida a maior coordenação dos cátions Al^{3+} aos grupos fosfatos o que reduziria a sua mobilidade no sistema.

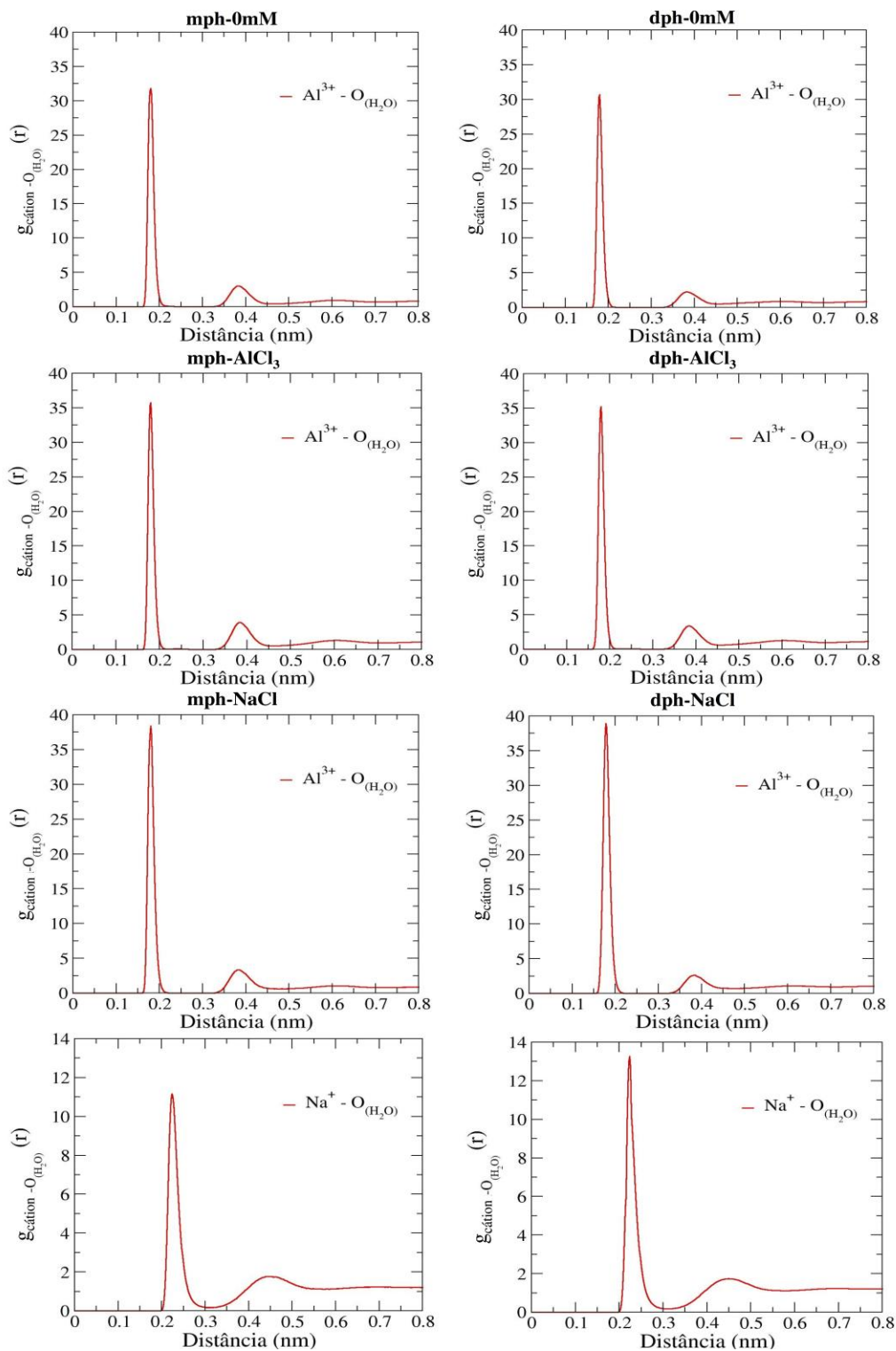
5.3.6 Efeito dos Íons nas Bicamadas de Lipídio A

É evidente o efeito dos cátions Al^{3+} em causar rigidez a membrana diminuindo a área por cabeça, em relação a outros cátions como o Mg^{2+} , e aumentar o parâmetro de ordem dos lipídios, enquanto a presença de cátions Na^+ diminui este efeito. Assim, a interação cátion-Lipídio A é o fator chave para entender o efeito destes cátions nas bicamadas. Foram analisados os grupos cátion (Na^+ e Al^{3+}) - Lipídio A calculando a interação do grupamento fosfato, presente nos lipídios, com o cátion dentro de sua primeira e segunda esfera de coordenação e avaliar os possíveis complexos estequiométricos entre os cátions e os lipídios. A melhor maneira de investigar microscopicamente a estrutura do sistema é através do cálculo da função de distribuição radial de pares (RDF) e, em seguida, integrando o perfil de distribuição de zero a uma distância de corte escolhida. Foi determinado os seguintes pares de átomos para serem analisados: cátions (Al^{3+} ou Na^+) em relação aos átomos de oxigênio das moléculas de água, bem como em relação ao fósforo e átomos de oxigênio do grupo fosfato denominados de OP2, OP3 e OP4 (ver Figura 36 e 37). O átomo OP1, também pertencente ao grupamento fosfato, não foi calculado pois está ligado aos açúcares do Lipídio A e não há qualquer coordenação dos cátions com este oxigênio.

Função de Distribuição Radial de Pares: Cátion – $\text{O}_{(\text{H}_2\text{O})}$

O RDF para os cátions e o átomo de oxigênio das moléculas de água para os sistemas simulados estão apresentadas na Figura 32. As distribuições radiais de pares entre os cátions Al^{3+} ou Na^+ e o átomo de oxigênio das moléculas de água apresentam um perfil geral parecido para os seis sistemas analisados. Para o cátion Al^{3+} observa-se um pico mais intenso e definido que começa em 0,15 e termina por volta de 0,22 nm e outro, bem mais largo e menos intenso por volta de 0,45 nm. Depois disso a distribuição assume o valor de 1 como, esperado. Os valores de distância do primeiro e segundo pico definem a primeira e segunda esfera de coordenação para o cátion Al^{3+} . Os valores são condizentes com dados de difração de raios X em soluções aquosas contendo alumínio, sendo a distância calculada para a primeira e segunda esfera de coordenação para o alumínio são 2,0 e 4,1 angstroms, respectivamente.(BOL; WELZEN, 1977)

Figura 32 – Funções de distribuição radial entre os cátions Al^{3+} e Na^+ e os átomos de oxigênio da água para as membranas de Lipídio A mono- e difosforilado. A análise foi realizada para últimos 100 ns de simulação.



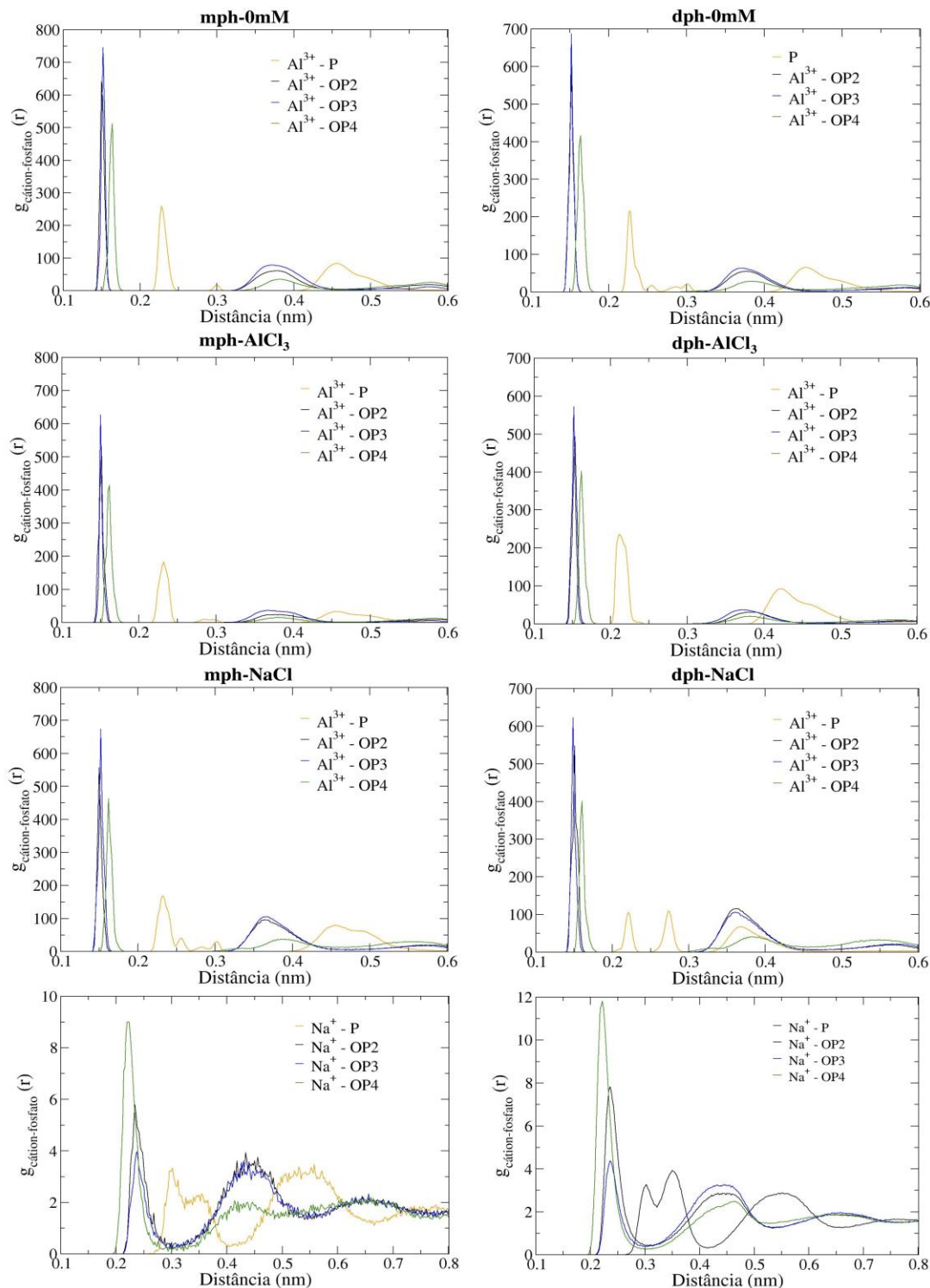
Fonte: A autora, 2019.

Para o cátion Na^+ o primeiro pico mais intenso termina por volta de 0,3 nm e o segundo ocorre um pouco antes de 0,5 para em seguida também assumir o valor de uma unidade. Estes valores também definem a primeira e segunda esfera de coordenação do cátion Na^+ e também estão condizentes com dados de difração de raio X para o sódio. (PASCHINA; PICCALUGA; MAGINI, 1984) Apesar da semelhança dos perfis para ambos os cátions, observa-se que para o cátion Al^{3+} a intensidade do primeiro pico é maior que para o cátion Na^+ . Os perfis da interação do Al^{3+} - $\text{O}_{(\text{H}_2\text{O})}$ são muito parecidos. A principal diferença é em relação a intensidade do primeiro pico: nas membranas de Lipídio A mono- ou difosforilado contendo NaCl o pico é mais intenso que para as bicamadas sem concentração salina que possuem a mesma quantidade de íons Al^{3+} (Tabela 3). Pode-se concluir que as moléculas de água estão mais estruturadas ao redor do cátion Al^{3+} que ao redor do cátion Na^+ . As diferenças observadas em relação a distância e intensidade do primeiro e segundo pico para o alumínio e sódio se dá pelo tamanho e carga dos seus cátions. Íons menores com alta densidade de carga tendem a se ligar firmemente as moléculas de água e formam ligações de hidrogênio curtas e fortes entre as moléculas de água circundantes. Já íons maiores, com menor carga enfraquecem as ligações de hidrogênio das moléculas de água nas proximidades. (WALUYO et al., 2011) O cátion Na^+ tem um tamanho de 1,02 Å, enquanto o cátion Al^{3+} tem um tamanho pequeno, cerca de 0,54 Å, e uma maior densidade de carga que interage fortemente com as moléculas de água coordenadas. Isso pode ser comprovado pelo tempo de vida das moléculas de água na primeira esfera de coordenação do Al^{3+} que é de aproximadamente 1 s, enquanto para o Na^+ a ordem de magnitude deste período é de 10^{-12} s. (SMIRNOV; TROSTIN, 2013)

Função de Distribuição Radial de Pares: Cátion-Fosfato

O RDF dos pares cátion(Al^{3+} ou Na^+) – fósforo e cátion(Al^{3+} ou Na^+) – oxigênios do grupamento fosfato (OP2, OP3 e OP4) estão apresentados na Figura 33. Os perfis não apresentam diferenças entre os dois quimiotipos do Lipídio A se tratando do mesmo cátion, mas as diferenças entre os gráficos para os cátions Al^{3+} ou Na^+ são grandes. Nos perfis da interação dos oxigênios com o cátion Al^{3+} observa-se perfis parecidos: picos muito intensos e definidos que indica uma forte interação entre o alumínio e os oxigênios do grupamento fosfato.

Figura 33 – Funções de distribuição radial entre os cátions Al^{3+} e Na^+ e os átomos de oxigênio dos fosfatos (OP2, OP3 e OP4) das membranas de Lipídio A mono- e difosforilado. A análise foi realizada para os últimos 100 ns de simulação.



Fonte: A autora, 2019.

Mas é interessante notar que o primeiro pico de interação para os oxigênios OP2 e OP3 do fosfato são quase coincidentes e terminam numa distância menor (cerca de 0,16 nm) do que para o oxigênio OP4 (cerca de 0,19 nm) e são bem mais intensos, o que indica que na primeira esfera de coordenação o alumínio interage primeiramente e mais fortemente aos átomos de oxigênio OP2 e OP3 e numa maior distância ao oxigênio OP4. Essa preferência deve-se a maior carga negativa presente nestes oxigênios (ver Apêndice A), enquanto o oxigênio OP4, além de possuir carga negativa menor, ainda está ligado a um átomo de hidrogênio. Um segundo pico, com menor intensidade e mais largo, é observado em 0,45 nm, o que indica que na segunda esfera de coordenação do cátion Al^{3+} também há interações com os grupos fosfatos dos lipídios. É interessante notar que para os perfis do cátion Al^{3+} nos sistemas contendo NaCl, o segundo pico é mais intenso do que para os outros sistemas. Após o segundo pico, em torno de 0,45 nm, a distribuição assume o valor de 1.

A adição do sal AlCl_3 aos sistemas mono- e difosforilado provocam uma diminuição na intensidade dos picos na primeira e segunda esfera de coordenação do íon Al^{3+} . Isso deve ocorrer devido a maior quantidade do cátion em solução e de caráter mais fluxional e menos diretamente ligado a outros grupos fosfatos devido a repulsão de carga entre os cátions. Analisando os gráficos da distribuição radial para o cátion Na^+ observa-se que a intensidade dos picos é menor e mais larga do que comparados ao cátion Al^{3+} , indicando uma baixa interação do sódio pelos oxigênios do grupamento fosfato. O primeiro pico termina em 0,3 nm e é interessante notar que, enquanto para os cátions Al^{3+} observa-se uma distância menor de interação com os átomos de oxigênio OP2 e OP3 e maior distância para o oxigênio OP4, para os cátions Na^+ tem-se o oposto disso. O pico para o oxigênio OP4 é mais intenso e se inicia numa menor distância do que para os outros dois oxigênios.

Um possível motivo para essa diferença deve-se ao tamanho do cátion Na^+ . Por ser um cátion maior que o alumínio, o sódio tem dificuldade de ocupar o espaço disponível entre os oxigênios OP2 e OP3 e interage com o oxigênio mais exposto ao solvente. Há um segundo pico menos intenso e mais largo próximo de 0,5 nm e, após essa distância, a distribuição assume o valor de 1. Apesar disso, a interação ainda deve ser muito pequena entre o sódio e os oxigênios do grupo fosfato, pois as intensidades dos picos são menores do que os picos entre $\text{Na}^+ - \text{O}_{(\text{H}_2\text{O})}$. O cálculo de RDF também foi realizado para os grupos cátion (Al^{3+} ou Na^+)-Cl e Cl- $\text{O}_{(\text{H}_2\text{O})}$ para investigar o efeito do íons cloretos nos sistemas. Os gráficos encontram-se no apêndice E. De forma geral, observa-

se que seis moléculas de água determinam a primeira esfera de hidratação de Cl^- com uma distância de $\text{Cl}^- - \text{O}_{(\text{H}_2\text{O})}$ de $\sim 0,35$ nm. Esta medida está de acordo com estudos experimentais, bem como simulações prévias de dinâmica molecular. No trabalho (MANCINELLI et al., 2007) determinou-se o ângulo de $\text{Cl}-\text{O}-\text{H}$ menor que 12,1 graus. Com um ângulo quase linear de $\text{Cl}-\text{O}-\text{H}$, Cl^- podem se encaixar na rede das moléculas de água sem nenhuma reestruturação significativa das ligações de hidrogênio das moléculas de água circundantes. Portanto, os efeitos dos cátions são mais significativos do que o efeito de Cl^- no solvente.

Os números de coordenação NC dos pares analisados estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Números de coordenação do pares cátion - $\text{O}_{(\text{H}_2\text{O})}$, cátion - Cl^- e cátion - $\text{O}_{(\text{fosfato})}$. Para este último par estamos avaliando os cátions com os oxigênios (denominados OP2, OP3 e OP4) dos grupos fosfatos dos lipídios. A análise foi realizada para a primeira esfera de coordenação.

Pares	mph-0mM	mph- AlCl_3	mph- NaCl		dph-0mM	dph- AlCl_3	dph- NaCl	
	Al^{3+}	Al^{3+}	Al^{3+}	Na^+	Al^{3+}	Al^{3+}	Al^{3+}	Na^+
cátion - $\text{O}_{(\text{H}_2\text{O})}$	4,6	4,7	4,7	4,8	4,5	4,6	4,7	4,8
cátion- $\text{O}_{(\text{fosfato})}$	1,4	1,2	1,2	0,1	1,6	1,4	1,3	0,2
cátion - Cl^-	-	0,1	0,1	0,2	-	0,1	0,1	0,2

Fonte: A autora, 2019.

A partir do NC verificamos que o cátion Al^{3+} é hexacoordenado em todos os sistemas. Esse valor de coordenação é o esperado para a primeira esfera de coordenação do cátion Al^{3+} . (KANNO, 1988) Os dados mostram que o alumínio se coordena a 4 ou 5 moléculas de água e a aproximadamente 1,5 lipídios. Essa coordenação alumínio-lipídio é menor para os sistemas na presença do sal AlCl_3 e isso pode ser devido ao fato de que os números de coordenação são obtidos pela média de todos os íons no sistema, independentemente da sua posição na bicamada lipídica. Assim para os sistemas na presença de mais alumínio, muitos desses cátions estão em solução (ver Figura 27) diminuindo o valor do NC entre o grupo Al^{3+} -fosfato e aumentando o NC para o grupo Al^{3+} - $\text{O}_{(\text{H}_2\text{O})}$. Como o cátion Al^{3+} é bastante carregado pode haver repulsão entre os íons próximos aos grupos fosfatos e parte dos íons adicionados em forma de sal AlCl_3 permanecem em solução ou mais distantes da cabeça do lipídio. O cátion Na^+ se coordena a 5 moléculas, assim como

visto em simulações de dinâmica molecular de *Pseudomonas aeruginosa*. (PONTES et al., 2012) Nos sistemas apresentados os cátions Na^+ estão praticamente coordenados apenas por moléculas de águas e apenas uma pequena fração dos cátions tem alguma coordenação com os oxigênios do grupo fosfato dos lipídios, mostrando a preferência do grupo fosfato ao se coordenar aos cátions Al^{3+} . Como dito anteriormente, os valores obtidos são uma média de todos os íons no sistema. Diante disto foi calculado o número de cátions ligados aos lipídios da bicamada de cada sistema. Foi escolhido um valor de distância r de 0,45 que corresponde a distância até a segunda esfera de coordenação do Al^{3+} , já que estudos mostram que o alumínio forma uma primeira e segunda esfera de coordenação estável e altamente ordenada. (WALUYO et al., 2011) Um cátion com uma distância, abaixo ou igual a r , de qualquer um dos três oxigênios do grupo fosfato (OP2, OP3, OP4) foi considerado um cátion ligado. Os resultados estão listados na Tabela 15.

Tabela 15 – Média do número de ligações cátion-lipídio. A análise foi realizada levando em consideração as últimas 100 configurações (frames) do sistema, calculando quantos lipídios estão interagindo aos cátions em uma distância de até $r = 0,45\text{nm}$.

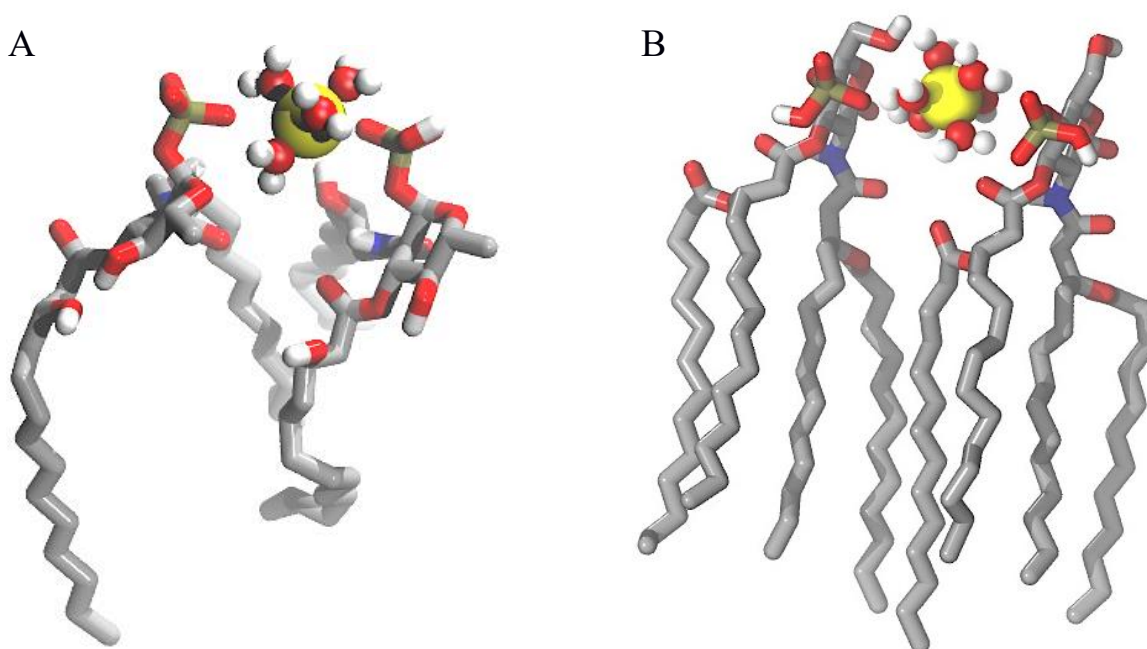
Sistema (nº de cátions presentes)	Al^{3+} - lipídio	Na^+ - lipídio
mph-0mM ($\text{Al}^{3+} = 54$)	53,5	-
mph- AlCl_3 ($\text{Al}^{3+} = 156$)	92,6	-
mph-NaCl ($\text{Al}^{3+} = 54$, $\text{Na}^+ = 102$)	50,1	31, 9
dph-0mM ($\text{Al}^{3+} = 108$)	104,7	-
dph- AlCl_3 ($\text{Al}^{3+} = 219$)	166,3	-
dph-NaCl ($\text{Al}^{3+} = 108$, $\text{Na}^+ = 111$)	101,5	40,6

Fonte: A autora, 2019.

Foi observado que para os sistemas sem concentração salina, praticamente todos os cátions Al^{3+} presentes nos sistemas, estão interagindo com os lipídios das bicamadas. O aumento da concentração de cátions Al^{3+} com AlCl_3 aumenta a quantidade de cátions ligados a bicamada, mas muitos cátions ainda permanecem em solução. A adição de sal NaCl tem pouco efeito sobre a quantidade de cátions Al^{3+} ligados a bicamada, porém alguns dos cátions Na^+ presentes conseguem interagir com a bicamada a uma distância de até 0,45 nm.

Foi avaliado qualitativamente as interações dos alumínio as distâncias de coordenação. A intenção foi de comparar as médias obtidas a partir da função de distribuição radial com a estrutura dos sistemas na fase equilibrada. Dois modos diferentes de ligação foram majoritariamente observados para a coordenação dos íons Al^{3+} (Figura 34).

Figura 34 – Snapshot que representam os dois modos de interação observados entre o alumínio e os Lipídios A. Sendo em A) o alumínio coordenado a quatro moléculas de água e dois lipídios na primeira esfera de coordenação e em B) o segundo modo sendo o alumínio coordenado a seis moléculas de água na primeira esfera e logo em seguida a dois lipídios.



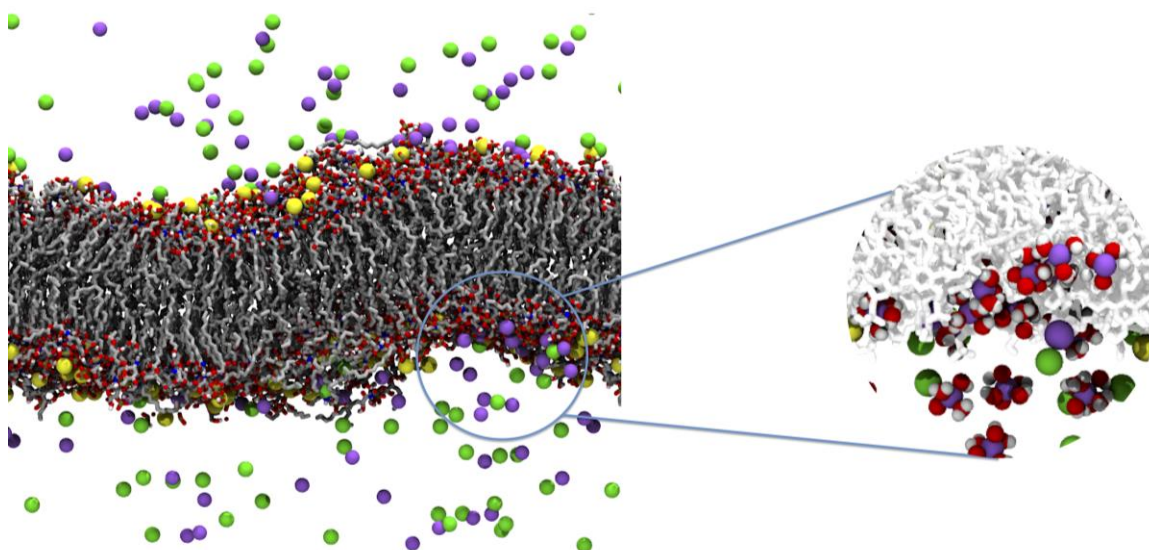
Fonte: A autora, 2020.

Na Figura 34-A observa-se dois lipídios que se coordenam dentro da primeira esfera de coordenação do alumínio. Os locais restantes de coordenação para o alumínio no complexo são ocupados por moléculas de água. O complexo octaédrico é arranjado de modo a maximizar a separação entre os dois lipídios. Neste modo de interação, os cátions Al^{3+} se encontram na interface água-lipídio e estão diretamente ligados ao grupo fosfato dos lipídios. A Figura 34-B demonstra a coordenação novamente com dois Lipídios A, porém eles apenas se coordenam no interior da segunda esfera de solvatação do alumínio. O primeiro modo de interação é menos frequente do que o primeiro, mostrando que os cátions Al^{3+} estão, em sua maioria, hexahidratados na sua primeira esfera de coordenação e assim permanecem durante todo o tempo de simulação.

Esta estequiometria de 1/2 alumínio/lipídio é descrita em estudos utilizando espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{27}Al e ^{31}P para diferentes fosfolipídios relatando a forte interação dos cátions Al^{3+} ao grupo fosfato presente. (MACKINNON et al., 2004; MORTLOCK; BELL; RADKE, 2005)

É notório que a presença de cátions Na^+ nas membranas diminui o efeito causado pelos cátions Al^{3+} aumentando a fluidez e desordem dos lipídios. Para entender a possível causa desse comportamento, foi também avaliado a vizinhança dos cátions Na^+ próximos a interface lipídio-água (Figura 35). Pelos dados da tabela 15, conclui-se que alguns cátions Na^+ estão próximos a bicamada interagindo com os lipídios, porém na Figura 35 é possível perceber que os cátions Na^+ encontram-se dentro da membrana rodeados por moléculas de água.

Figura 35 – Snapshot da configuração final de um sistema contendo o sal NaCl. É evidenciado a primeira esfera de coordenação dos cátions Na^+ próximos a interface lipídio-água.



Fonte: A autora, 2019.

Sabe-se que alguns íons têm a capacidade de aumentar ou diminuir a estruturação das moléculas de água circundantes. (MARCUS, 2009) Como mencionado anteriormente o cátion Na^+ enfraquece as ligações de hidrogênio das moléculas de água nas proximidades e a fraca esfera de hidratação em torno do cátion permite que as moléculas de água troquem com as que estão fora da primeira esfera de coordenação em uma escala de tempo comparável à quebra da ligação de hidrogênio, enquanto cátions como o Al^{3+} causam a formação de ligações de hidrogênio curtas e fortes entre

as moléculas de água circundantes. Medidas de espectroscopia de espalhamento Raman de soluções contendo NaCl, mostraram que o enfraquecimento das ligações de hidrogênio devido a presença de Na^+ e a maior troca entre as moléculas de água na primeira esfera de coordenação do cátion tem o efeito semelhante ao efeito do aumento da temperatura(WALUYO et al., 2011). Nas membranas lipídicas, íons capazes de desestruturar as moléculas de água ao seu redor enfraquecem as interações hidrofóbicas dos lipídios e conseguem hidratar significativamente a membrana. Essa maior hidratação provoca um efeito de inchaço da membrana já visto experimentalmente, induzindo mudanças estruturais na bicamada.(ALSOP; MARIA SCHOBER; RHEINSTÄDTER, 2016) Neste efeito o íon pode carregar moléculas de água diretamente para a interface lipídica, causando regiões locais de alta densidade de água aumentando a hidratação da membrana.(BINDER; ZSCHÖRNIG, 2002) Foi demonstrado que íons monovalentes aumentam a hidratação de membranas multilamelares, enfraquecendo as interações entre as membranas.(PETRACHE et al., 2006) Esse efeito pode ser uma explicação para a maior fluidez observada nas bicamadas simuladas nesta dissertação contendo cloreto de sódio, diminuindo o efeito provocado pelos cátions Al^{3+} .

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho avaliamos diferentes aspectos metodológicos envolvidos na construção e equilíbrio de bicamadas lipídicas. Na primeira etapa, avaliamos o impacto do protocolo de equilíbrio nas simulações de nossos sistemas. A equilíbrio do sistema é um dos estágios mais críticos de uma simulação e muda de acordo com o sistema de interesse. Porém em muitos casos, recebe a menor atenção. Por isso deve ser realizado um estudo para a validação da equilíbrio utilizada. Para mais informações sobre procedimentos de equilíbrio, consultar (BRAUN et al., 2019; SMITH; KLAUDA; SODT, 2019). Acreditamos que a maior sensibilidade de nossos sistemas ao protocolo de equilíbrio deve-se ao número maior de cargas em nossas bicamadas. Foi demonstrado que o protocolo adotado se mostrou mais importante que o tratamento eletrostático de longo alcance adotado (PME ou Reaction-Field). Uma equilíbrio cuidadosa utilizando uma etapa NVT anterior a etapa NPT mostrou-se de grande importância para equilibrar a densidade do sistema e obter bons valores de energia cinética na etapa de equilíbrio.

A influência da configuração inicial e forma de construção das bicamadas também foi investigada e mostrou-se que independente da forma de construção dos lipídios, as simulações sempre convergem estruturalmente para a mesma região do espaço de fase de acordo com o protocolo adotado. Energeticamente, percebeu-se uma energia ligeiramente maior nos sistemas preparados com lipídios arranjados de maneira randômica. A explicação para isso deve-se, provavelmente, a interações estéricas não minimizadas geradas pela configuração randômica dos lipídios dentro da caixa.

O estudo da influência do cátion Al^{3+} revelou aspectos bastante instigantes do sistema. Como notado ainda na seção onde estudou-se a influência do cátion em diferentes configurações, observou-se que o alumínio consegue estruturar o sistema e rigidificar as cadeias mesmo elas estando numa configuração bastante desordenada. Em geral, o cátion Al^{3+} provoca uma rigidificação nas cadeias aciladas do Lipídio A com valores de parâmetros de ordem típicos de sistema em fase gel. A presença de íons Al^{3+} favorece a planaridade das bicamadas lipídicas. O alumínio apresenta uma estrutura hexacoordenada, bastante hidratado e estruturador da água e grupo fosfato. Devido ao seu pequeno tamanho consegue, mesmo hidratado, ter papel estrutural entre os grupos fosfatos do Lipídio A tanto na primeira quanto na segunda esfera de coordenação. Observou-se dois modos de ligação do íon com os lipídios e água no sistema semelhante ao observado em outros trabalhos. O íon Na^+ tem papel desestruturador nas bicamadas. Isso é o

reflexo de seu grau de hidratação e pouca estruturação da água ao seu redor. Devido ao seu tamanho, interage pouco com o grupo fosfato e apenas de maneira a induzir um inchaço dentro da membrana num papel quase que oposto ao desempenhado pelo íon Al^{3+} .

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, M. J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, Sep. 2015.
- ABRAHAM, T. et al. Neutron Diffraction Study of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide Bilayers. p. 2477–2483, 2007.
- ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 782–787, 17 Aug. 2000.
- ALLEN, M.P.; TILDESLEY, D. . **Computer Simulation of Liquids**. New York: Oxford University Press, 1987.
- ALLEN, M. P. Introduction to Molecular Dynamics Simulation. In: **Computational Soft Matter: From Synthetic Polymers to Proteins**. Gustav-Stresemann-Institut, Bonn, Germany: Lecture Notes, 2004. v. 23p. 1–28.
- ALLISON, N. .; ROLAND, F. Molecular Modeling of Biomembranes: A How-To Approach. **Handbook of Modern Biophysics**, v. 3, p. 119–136, 2010.
- ALSOP, R. J.; MARIA SCHOBBER, R.; RHEINSTÄDTER, M. C. Swelling of phospholipid membranes by divalent metal ions depends on the location of the ions in the bilayers. **Soft Matter**, v. 12, n. 32, p. 6737–6748, 2016.
- ANÉZO, C. et al. Methodological Issues in Lipid Bilayer Simulations. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 35, p. 9424–9433, Sep. 2003.
- APOL, E. et al. GROMACS User Manual version 2016. 2016.
- BAGHERI, M.; KELLER, S.; DATHE, M. Interaction of W-substituted analogs of cyclo-RRRWFW with bacterial lipopolysaccharides: The role of the aromatic cluster in antimicrobial activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 788–797, Feb. 2011.
- BAYLOR, N. W.; EGAN, W.; RICHMAN, P. Aluminum salts in vaccines — US perspective &. v. 20, n. September 2001, p. 18–23, 2002.
- BERENDSEN, H. J. C. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 8, p. 3684–3690, 15 Oct. 1984.
- BINDER, H.; ZSCHÖRNIG, O. The effect of metal cations on the phase behavior and hydration

characteristics of phospholipid membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 115, n. 1–2, p. 39–61, May 2002.

BOL, W.; WELZEN, T. The interpretation of X-ray diffraction by aqueous solutions of aluminum(III) nitrate and chromium(III) nitrate. **Chemical Physics Letters**, v. 49, n. 1, p. 189–192, Jul. 1977.

BRANDENBURG, K. et al. Influence of the supramolecular structure of free lipid A on its biological activity. **European Journal of Biochemistry**, v. 218, n. 2, p. 555–563, 1993.

BRANDENBURG, K. et al. Physicochemical properties of bacterial glycopolymers in relation to bioactivity. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 23, p. 2477–2489, 2003.

BRANDENBURG, K.; SEYDEL, U. Physical aspects of structure and function of membranes made from lipopolysaccharides and free lipid A. **BBA - Biomembranes**, v. 775, n. 2, p. 225–238, 1984.

BRANDENBURG, K.; SEYDEL, U. Investigation into the fluidity of lipopolysaccharide and free lipid A membrane systems by Fourier-transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. **European Journal of Biochemistry**, v. 191, n. 1, p. 229–236, 1990.

BRANDENBURG, K.; WIESE, A. Endotoxins: Relationships between Structure, Function, and Activity. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 11, p. 1127–1146, 1 Jul. 2004.

BRAUN, E. et al. Best Practices for Foundations in Molecular Simulations [Article v1.0]. **Living Journal of Computational Molecular Science**, v. 1, n. 1, p. 1–10, 2019.

BROOKS, B. R. et al. CHARMM A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations, Journal of Computational Chemistry Volume 4, Issue 2. **J Comput Chem**, v. 4, n. 2, p. 187–217, 1983.

CASELLA, C. R.; MITCHELL, T. C. Putting endotoxin to work for us: Monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 20, p. 3231–3240, 2008.

CENTRAL MICHIGAN UNIVERSITY. **Model Box Periodic Boundary Conditions - P.B.C.** Disponível em: <<http://isaacs.sourceforge.net/phys/pbc.html>>. Acesso em: 5 sep. 2019.

CHANDRASEKHAR, I. et al. A consistent potential energy parameter set for lipids: dipalmitoylphosphatidylcholine as a benchmark of the GROMOS96 45A3 force field. **European Biophysics Journal**, v. 32, n. 1, p. 67–77, 21 Mar. 2003.

CISNEROS, G. A. et al. Classical Electrostatics for Biomolecular Simulations. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 1, p. 779–814, 8 Jan. 2014.

CORNELL, W. D. et al. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 19, p. 5179–5197, May 1995.

COSTERTON, J. W. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 21 May 1999.

DAHORA, G. C. A. et al. Membrane negative curvature induced by a hybrid peptide from pediocin PA-1 and plantaricin 149 as revealed by atomistic molecular dynamics simulations. **Soft Matter**, v. 12, n. 43, p. 8884–8898, 2016.

DAMODARAN, K. V.; MERZ, K. M.; GABER, B. P. Structure and dynamics of the dilauroylphosphatidylethanolamine lipid bilayer. **Biochemistry**, v. 31, n. 33, p. 7656–7664, 25 Aug. 1992.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089–10092, 15 Jun. 1993.

DAVID, L. NELSON, MICHAEL, M. C. **Principles of Biochemistry**. 5ed. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2008.

DELEERS, M.; SERVAIS, J.; WÜLFERT, E. Neurotoxic cations induce membrane rigidification and membrane fusion at micromolar concentrations. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 855, n. 2, p. 271–276, Feb. 1986.

DEVIREDDY, R. V. Statistical thermodynamics of biomembranes. **Cryobiology**, v. 60, n. 1, p. 80–90, 2010.

DIAS, R. P. et al. Outer membrane remodeling: The structural dynamics and electrostatics of rough lipopolysaccharide chemotypes. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 10, n. 6, p. 2488–2497, 2014.

DIDIERLAURENT, A. M. et al. AS04, an Aluminum Salt- and TLR4 Agonist-Based Adjuvant System, Induces a Transient Localized Innate Immune Response Leading to Enhanced Adaptive Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 10, p. 6186–6197, 15 Nov. 2009.

DOULIEZ, J.; LEONARD, A.; DUFOURC, E. J. Restatement of Order Parameters in Biomembranes: Calculation of C-C Bond Order Parameters from C-D Quadrupolar Splittings. **Biophysical Journal**, v. 68, n. May, p. 1727–1739, 1995.

ESSEX, J. W. The Application of the Reaction-Field Method to the Calculation of Dielectric Constants. **Molecular Simulation**, v. 20, n. 3, p. 159–178, Feb. 1998.

FARO, T. M. C.; THIM, G. P.; SKAF, M. S. A Lennard-Jones plus Coulomb potential for Al^{3+} ions in aqueous solutions. **The Journal of Chemical Physics**, v. 132, n. 11, p. 114509, 21 Mar. 2010.

FLAD, H. D. et al. Agonists and antagonists for lipopolysaccharide-induced cytokines. **Immunobiology**, v. 187, n. 3–5, p. 303–316, 1993.

FRENKEL, D.; SMIT, B. **Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications**. 2nd ed ed. [s.l.] Academic Press, 2001.

GARIDEL, P. et al. Divalent cations affect chain mobility and aggregate structure of lipopolysaccharide from *Salmonella minnesota* reflected in a decrease of its biological activity. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1715, n. 2, p. 122–131, 2005.

GARRETT, R. H.; GRISHAM, C. M. **Biochemistry**. 4.ed ed. [s.l.: s.n.].

GLÄTTLI, A.; DAURA, X.; VAN GUNSTEREN, W. F. Derivation of an improved simple point charge model for liquid water: SPC/A and SPC/L. **The Journal of Chemical Physics**, v. 116, n. 22, p. 9811–9828, 8 Jun. 2002.

GROMACS. <https://redmine.gromacs.org/issues/1400>.

GUTSMANN, T. et al. Lipopolysaccharide-binding protein-mediated interaction of lipid A from different origin with phospholipid membranes: Invited lecture. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 2, n. 20, p. 4521–4528, 2000.

HAFEZ, I. M.; CULLIS, P. R. Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 2–3, p. 139–148, 2001.

HELLER, H.; SCHAEFER, M.; SCHULTEN, K. Molecular dynamics simulation of a bilayer of 200 lipids in the gel and in the liquid crystal phase. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 97, n. 31, p. 8343–8360, 8 Aug. 1993.

HESS, B. et al. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463–1472, Sep. 1997.

HESS, B. P-LINCS: A Parallel Linear Constraint Solver for Molecular Simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 1, p. 116–122, Jan. 2008.

HONG, C.; TIELEMAN, D. P.; WANG, Y. Microsecond Molecular Dynamics Simulations of Lipid Mixing. **Langmuir**, v. 30, n. 40, p. 11993–12001, 2014.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. **VMD: Visual molecular dynamics** *Journal of Molecular Graphics*, 1996.

HÜNENBERGER, P. H. **Thermostat algorithms for molecular dynamics simulations** *Advances in Polymer Science*, 2005.

JORGENSEN, W. L.; TIRADO-RIVES, J. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 6, p. 1657–1666, Mar. 1988.

KANNO, H. Hydrations of metal ions in aqueous electrolyte solutions: a Raman study. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 92, n. 14, p. 4232–4236, Jul. 1988.

KLEPEIS, J. L. et al. Long-timescale molecular dynamics simulations of protein structure and function. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 19, n. 2, p. 120–127, Apr. 2009.

LEACH, A. **Molecular Modelling: Principles and Applications**. 2nd. ed. [s.l.] England: Prentice Hall, 2001.

LIMA, M. et al. Compatibility of GROMOS-Derived Atomic Parameters for Lipopolysaccharide Membranes with the SPC/E Water Model and Alternative Long-Range Electrostatic Treatments Using Single Nonbonded Cutoff and Atom-Based Charge Schemes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 10, p. 1–12, 2019.

LINDBLAD, E. B. et al. Adjuvant modulation of immune responses to tuberculosis subunit vaccines. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 2, p. 623–629, 1997.

LINS, R. D. et al. Computer Simulation of Uranyl Uptake by the Rough Lipopolysaccharide Membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 1, p. 29–35, Jan. 2008.

LINS, R. D.; HÜNENBERGER, P. H. A new GROMOS force field for hexopyranose-based carbohydrates. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 13, p. 1400–1412, Oct. 2005.

LINS, R. D.; RÖTHLISBERGER, U. Influence of Long-Range Electrostatic Treatments on the Folding of the N-Terminal H4 Histone Tail Peptide. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 2, n. 2, p. 246–250, Mar. 2006.

LINS, R. D.; STRAATSMA, T. P. Computer simulation of the rough lipopolysaccharide membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 2, p. 1037–1046, 2001.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. . **Molecular Cell Biology**. 4th. ed. New York: W. H. Freeman, 2000.

MACKINNON, N. et al. Aluminum binding to phosphatidylcholine lipid bilayer membranes: ²⁷Al and ³¹P NMR spectroscopic studies. v. 132, p. 23–36, 2004.

MADEIRA, L.; VITIELLO, S. A função radial de distribuição de pares para sistemas Lennard-Jones bidimensionais. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 34, p. 7, 2012.

MANCINELLI, R. et al. Hydration of Sodium, Potassium, and Chloride Ions in Solution and the Concept of Structure Maker/Breaker. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 48, p. 13570–13577, Dec. 2007.

MARCUS, Y. Effect of Ions on the Structure of Water: Structure Making and Breaking. **Chem. Soc. Rev.**, v. 109, p. 1346–1370, 19 Jun. 2009.

MCCAMMON, J.A.; GELIN, B. R. . K. M. Dynamics of folded proteins. **Nature**, n. 267, p. 585–590, 1977.

MONTICELLI, L.; KATSARAS, J. The molecular structure of a phosphatidylserine bilayer determined by scattering and molecular dynamics simulations The molecular structure of a phosphatidylserine bilayer determined by scattering and molecular. n. June, 2014.

MONTICELLI, L.; TIELEMAN, D. P. Force Fields for Classical Molecular Dynamics. In: [s.l: s.n.]. v. 924p. 197–213.

MOREIN, S. et al. Wild-type Escherichia coli Cells regulate the membrane lipid composition in a “window” between gel and non-lamellar structures. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 6801–6809, 1996.

MORGON, NELSON H; COUTINHO, K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. [s.l.] Editora Livraria da Física, 2007.

MORTLOCK, R. F.; BELL, A. T.; RADKE, C. J. Phosphorus-31 and aluminum-27 NMR investigations of highly acidic, aqueous solutions containing aluminum and phosphorus. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 97, n. 3, p. 767–774, 2005.

NAGLE, J. F.; TRISTRAM-NAGLE, S. Structure of lipid bilayers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes**, v. 1469, n. 3, p. 159–195, Nov. 2000.

NASCIMENTO, A. et al. Hydration, ionic valence and cross-linking propensities of cations determine the stability of lipopolysaccharide (LPS) membranes. **Chemical Communications**, v. 50, n. 2, p. 231–233, 2014.

OOSTENBRINK, C. et al. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1656–1676, Oct. 2004.

OOSTENBRINK, C. et al. Validation of the 53A6 GROMOS force field. **European Biophysics Journal**, v. 34, n. 4, p. 273–284, 1 Jun. 2005.

PARK, B. S. et al. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1191–1195, 2009.

PASCHINA, G.; PICCALUGA, G.; MAGINI, M. X-ray diffraction study of Na⁺ ions coordination in sodium borate glasses. **The Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 12, p. 6201–6206, 20 Dec. 1984.

PENG, L. et al. Study on biological effect of La³⁺ on Escherichia coli by atomic force microscopy. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, n. 1, p. 68–72, 2004.

PETRACHE, H. I. et al. Swelling of phospholipids by monovalent salt. **Journal of Lipid Research**, v. 47, n. 2, p. 302–309, Feb. 2006.

PIGGOT, T. J. et al. On the Calculation of Acyl Chain Order Parameters from Lipid Simulations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 13, n. 11, p. 5683–5696, 14 Nov. 2017.

POGER, D.; MARK, A. E. Lipid Bilayers: The Effect of Force Field on Ordering and Dynamics. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 8, n. 11, p. 4807–4817, 13 Nov. 2012.

PONTES, F. J. S. et al. The effect of temperature, cations, and number of Acyl chains on the lamellar to non-lamellar transition in Lipid-A membranes: A microscopic view. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 8, n. 10, p. 3830–3838, 2012.

PONTES, F. J. S. **Influência de Quimiotipos, Íons e da Temperatura na Estrutura e Dinâmica de Bicamadas de Lipídio A de Pseudomonas aeruginosa e Escherichia coli.** [s.l.] UFPE, 2013.

RAETZ, C. R. H. et al. Lipid A Modification Systems in Gram-Negative Bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 76, n. 1, p. 295–329, 7 Jun. 2007.

RAETZ, C. R. H.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide Endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, n. 1, p. 635–700, Jun. 2002.

REISSER, S. et al. Real Cost of Speed: The Effect of a Time-Saving Multiple-Time-Stepping Algorithm on the Accuracy of Molecular Dynamics Simulations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 13, n. 6, p. 2367–2372, 13 Jun. 2017.

ROSENFELD, Y.; SHAI, Y. Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: Role in bacterial resistance and prevention of sepsis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1758, n. 9, p. 1513–1522, Sep. 2006.

SAGOO, P.; LOMBARDI, G.; LECHLER, R. I. Relevance of regulatory T cell promotion of donor-specific tolerance in solid organ transplantation. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JUL, 2012.

SAGUI, C.; DARDEN, T. A. MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS OF BIOMOLECULES: Long-Range Electrostatic Effects. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 28, n. 1, p. 155–179, Jun. 1999.

SANTOS, D. E. DA S. et al. SuAVE: A Tool for Analyzing Curvature-Dependent Properties in Chemical Interfaces. **Journal of Chemical Information and Modeling**, p. acs.jcim.9b00569, 11 Sep. 2019.

SANTOS, D. E. S. et al. Polymyxin Binding to the Bacterial Outer Membrane Reveals Cation Displacement and Increasing Membrane Curvature in Susceptible but Not in Resistant Lipopolysaccharide Chemotypes. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 57, n. 9, p. 2181–2193, 25 Sep. 2017.

SCHIJNS, V. Mechanisms of vaccine adjuvant activity: initiation and regulation of immune responses by vaccine adjuvants. **Vaccine**, v. 21, n. 9–10, p. 829–831, Feb. 2003.

SCHLETTER, J. et al. Molecular mechanisms of endotoxin activity. **Archives of Microbiology**, v. 164, n. 6, p. 383–389, Dec. 1995.

SHEPHARD, J. J. et al. Salt Modulates Bacterial Hydrophobicity and Charge Properties Influencing Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* (PA01) in Aqueous Suspensions. **Langmuir**, v. 26, n. 11, p. 8659–8665, Jun. 2010.

SHROLL, R. M.; STRAATSMA, T. P. Molecular structure of the outer bacterial membrane of *Pseudomonas aeruginosa* via classical simulation. **Biopolymers**, v. 65, n. 6, p. 395–407, 15 Dec. 2002.

SILVA, A. M. DA. **Polimorfismo de Bicamadas de Lipídio A de Escherichia coli sob Influência do Íon Alumínio, concentração salina e grupos fosfatos**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2017.

SMIRNOV, P. R.; TROSTIN, V. N. Structural Parameters of the Close Environment of Group III Metal Ions in Aqueous Solutions of Their Salts. v. 83, n. 1, p. 18–28, 2013.

SMITH, D. J.; KLAUDA, J. B.; SODT, A. J. Simulation Best Practices for Lipid Membranes [Article v1.0]. **Living Journal of Computational Molecular Science**, v. 1, n. 1, p. 1–31, 2019.

SNYDER, S.; KIM, D.; MCINTOSH, T. J. Lipopolysaccharide Bilayer Structure: Effect of Chemotype, Core Mutations, Divalent Cations, and Temperature †. **Biochemistry**, v. 38, n. 33, p. 10758–10767, Aug. 1999.

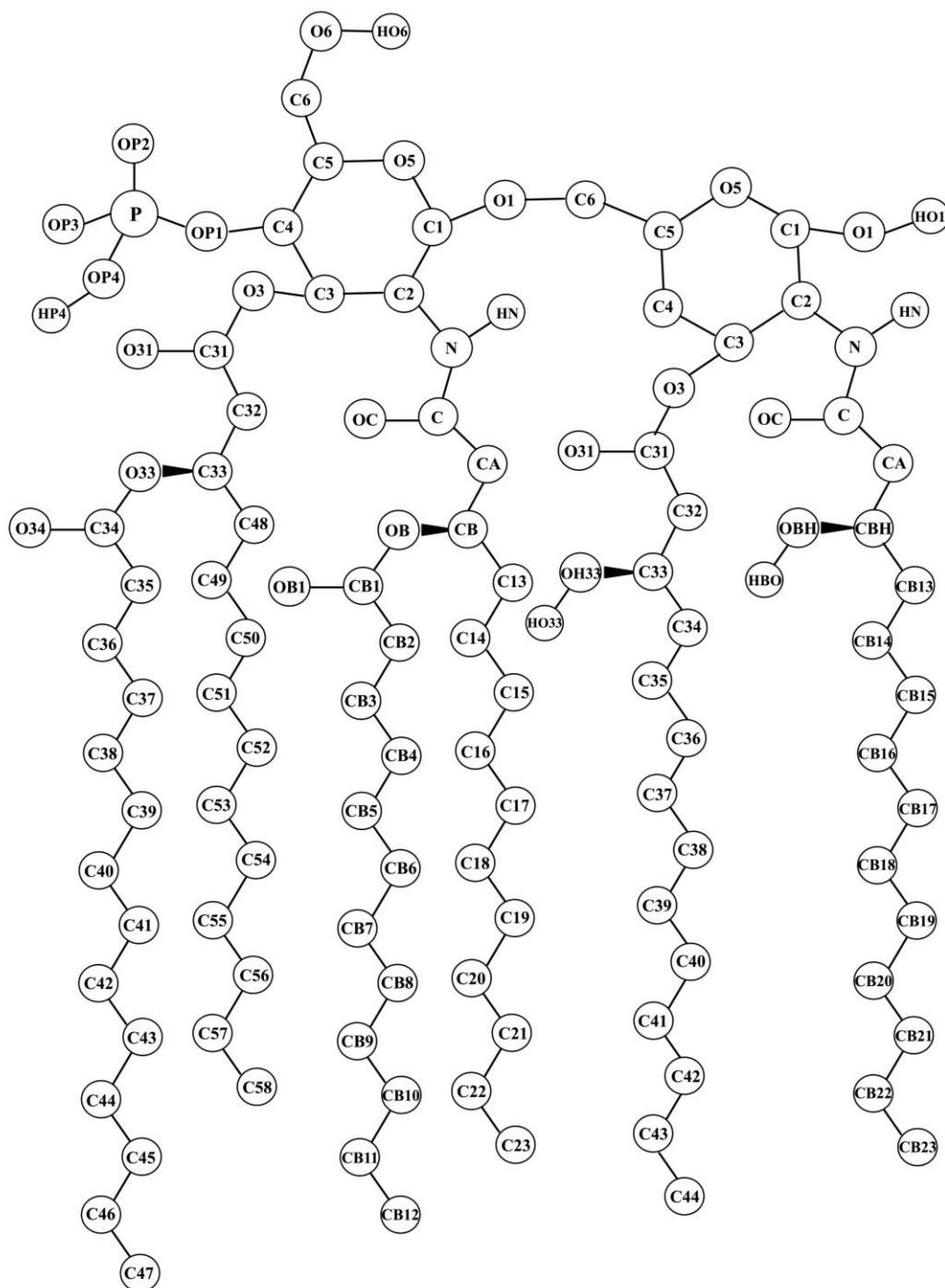
SOARES, T. A.; STRAATSMA, T. P. Assessment of the convergence of molecular dynamics simulations of lipopolysaccharide membranes. **Molecular Simulation**, v. 34, n. 3, p. 295–307, Mar. 2008.

STRAATSMA, T. P.; SOARES, T. A. Characterization of the outer membrane protein OprF of *Pseudomonas aeruginosa* in a lipopolysaccharide membrane by computer simulation. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 74, n. 2, p. 475–488, 1 Feb. 2009.

- TIRONI, I. G. et al. A generalized reaction field method for molecular dynamics simulations. **The Journal of Chemical Physics**, v. 102, n. 13, p. 5451–5459, Apr. 1995.
- ULMER, A. J. et al. Modulation of endotoxin-induced monokine release in human monocytes by lipid A partial structures that inhibit binding of 125I-Lipopolysaccharide. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 12, p. 5145–5152, 1992.
- UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, n. 1, p. 103–110, Feb. 2002.
- VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. **Groningen Molecular Simulation (GROMOS)**. [s.l.] Library Manual, 1987.
- VAN GUNSTEREN, W. F.; KARPLUS, M. Protein dynamics in solution and in a crystalline environment: a molecular dynamics study. **Biochemistry**, v. 21, n. 10, p. 2259–2274, May 1982.
- VERLET, L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. **physical review**, v. 1, n. 5, 1967.
- WALUYO, I. et al. The structure of water in the hydration shell of cations from x-ray Raman and small angle x-ray scattering measurements. v. 064513, p. 1–10, 2011.
- WAYMENT-STEEL, H. K. et al. Effects of Al³⁺ on Phosphocholine and Phosphoglycerol Containing Solid Supported Lipid Bilayers. **Langmuir**, v. 32, n. 7, p. 1771–1781, 2016.
- WEINER, S. J. et al. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 106, n. 3, p. 765–784, Feb. 1984.
- WONG-EKKABUT, J.; KARTTUNEN, M. The good, the bad and the user in soft matter simulations. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1858, n. 10, p. 2529–2538, Oct. 2016.
- WOODS, R. J. et al. Molecular Mechanical and Molecular Dynamic Simulations of Glycoproteins and Oligosaccharides. 1. GLYCAM_93 Parameter Development. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 99, n. 11, p. 3832–3846, Mar. 1995.
- ZHANG, X. et al. Dissecting the Innate Immune Recognition of Opioid Inactive Isomer (+)-Naltrexone Derived Toll-like Receptor 4 (TLR4) Antagonists. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 58, n. 4, p. 816–825, 23 Apr. 2018.

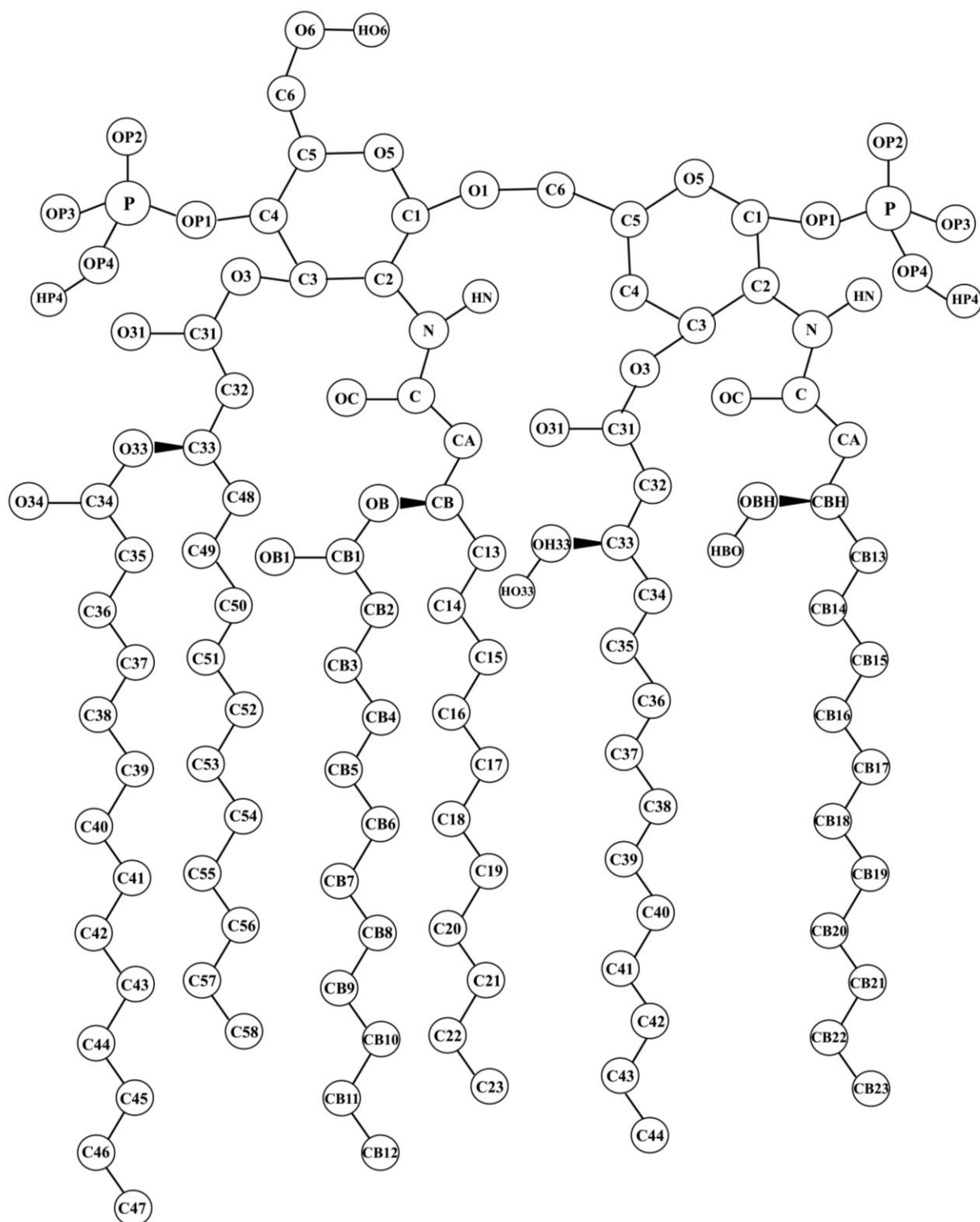
APÊNDICE A – TOPOLOGIA DOS LIPÍDIOS A

Figura 36 – Estrutura do Lipídio A monofosforilado.



Fonte: A autora, 2019.

Figura 37 – Estrutura do Lipídio A difosforilado.



Fonte: A autora, 2019.

A.1.2 – Topologia Lipídio A

Tabela 16 – Parâmetros *atoms* para o resíduo LE1[LE1] – [*atoms*]

AtomName	Type	Charge	C-Group
C4	CH1	0.23200	0
OP1	OA	-0.50700	0
P	P	1.34600	0
OP2	OM	-0.88400	0
OP3	OM	-0.88400	0
OP4	OA	-0.73300	0
HP4	H	0.43000	0
C3	CH1	0.16000	1
O3	OE	-0.36000	1
C31	C	0.58000	1
O31	O	-0.38000	1
C32	CH2	0.00000	2
C33	CH1	0.16000	3
O33	OE	-0.36000	3
C34	C	0.58000	3
C35	CH2	0.00000	4
C36	CH2	0.00000	4
C37	CH2	0.00000	5
C38	CH2	0.00000	5
C39	CH2	0.00000	6
C40	CH2	0.00000	6
C41	CH2	0.00000	7
C42	CH2	0.00000	7
C43	CH2	0.00000	8
C44	CH2	0.00000	8
C45	CH2	0.00000	9
C46	CH2	0.00000	9
C47	CH2	0.00000	10
C48	CH2	0.00000	10
C49	CH2	0.00000	11
C50	CH2	0.00000	11
C51	CH2	0.00000	12
C52	CH2	0.00000	12
C53	CH2	0.00000	13
C54	CH2	0.00000	13
C55	CH2	0.00000	14
C56	CH2	0.00000	15

AtomName	Type	Charge	C-Group
C57	CH2	0.00000	15
C58	CH3	0.00000	16
C2	CH1	0.23200	17
N	N	-0.2000	17
HN	H	0.31000	17
C	C	0.10800	17
OC	O	-0.4500	17
CA	CH2	0.00000	17
CB	CH1	0.16000	18
OB	OE	-0.3600	18
CB1	C	0.58000	18
OB1	O	-0.3800	18
CB2	CH2	0.00000	19
CB3	CH2	0.00000	19
CB4	CH3	0.00000	20
CB5	CH2	0.00000	20
CB6	CH2	0.00000	21
CB7	CH2	0.00000	21
CB8	CH2	0.00000	22
CB9	CH2	0.00000	23
CB10	CH2	0.00000	23
CB11	CH2	0.00000	24
CB12	CH2	0.00000	24
CB13	CH2	0.00000	25
CB14	CH2	0.00000	25
CB15	CH2	0.00000	26
CB16	CH2	0.00000	26
CB17	CH2	0.00000	27
CB18	CH2	0.00000	27
CB19	CH2	0.00000	28
CB20	CH2	0.00000	28
CB21	CH2	0.00000	29
CB22	CH2	0.00000	29
CB23	CH2	0.00000	30
C6	CH2	0.23200	31
O6	OA	-0.6420	31
HO6	H	0.41000	31
C5	CH1	0.37600	32
O5	OA	-0.2320	32
C1	CH1	0.23200	32
O1	OA	-0.3600	32

**Tabela 17 – Parâmetros
bonds para o resíduo LE1**

[LE1] – [bonds]								
a_i	a_j	gb	a_i	a_j	gb	a_i	a_j	gb
C4	OP1	gb_18	C45	C46	gb_27	CA	CB	gb_27
OP1	P	gb_28	C46	C47	gb_27	CB	OB	gb_18
OP2	P	gb_24	C33	C48	gb_27	OB	CB1	gb_10
OP3	P	gb_24	C48	C49	gb_27	CB1	OB1	gb_5
OP4	HP4	gb_1	C49	C50	gb_27	CB1	CB2	gb_23
C4	C3	gb_26	C50	C51	gb_27	CB2	CB3	gb_27
C4	C5	gb_26	C51	C52	gb_27	CB3	CB4	gb_27
C3	O3	gb_20	C52	C53	gb_27	CB4	CB5	gb_27
O3	C31	gb_10	C53	C54	gb_27	CB5	CB6	gb_27
C31	O31	gb_5	C55	C56	gb_27	CB6	CB7	gb_27
C31	C32	gb_23	C56	C57	gb_27	CB7	CB8	gb_27
C32	C33	gb_27	C57	C58	gb_27	CB8	CB9	gb_27
C33	O33	gb_18	C3	C2	gb_26	CB9	CB10	gb_27
C34	O34	gb_5	C2	C1	gb_26	CB10	CB11	gb_27
C34	C35	gb_23	C6	O6	gb_20	CB11	CB12	gb_27
C35	C36	gb_27	C6	C5	gb_26	CB	CB13	gb_27
C36	C37	gb_27	O6	HO6	gb_1	CB13	CB14	gb_27
C37	C38	gb_27	C5	O5	gb_20	CB14	CB15	gb_27
C38	C39	gb_27	O5	C1	gb_20	CB15	CB16	gb_27
C39	C40	gb_27	C1	O1	gb_20	CB16	CB17	gb_27
C40	C41	gb_27	O1	+C6	gb_20	CB17	CB18	gb_27
C41	C42	gb_23	C2	N	gb_21	CB18	CB19	gb_27
C42	C43	gb_27	N	HN	gb_2	CB19	CB20	gb_27
C43	C44	gb_27	N	C	gb_10	CB20	CB21	gb_27
C44	C45	gb_27	C	OC	gb_5	CB21	CB22	gb_27
			C	CA	gb_9	CB22	CB23	gb_27

**Tabela 18 – Parâmetros
angles para o resíduo LE1**

[LE1] – [angles]											
a_i	a_j	a_k	ga	a_i	a_j	a_k	ga	a_i	a_j	a_k	ga
OP1	P	OP4	ga_5	C32	C33	C48	ga_15	C	CA	CB	ga_15
OP1	P	OP2	ga_14	C33	C48	C49	ga_15	CA	CB	OB	ga_13
OP1	P	OP3	ga_14	C48	C49	C50	ga_15	CB	OB	CB1	ga_22
OP2	P	OP3	ga_29	C49	C50	C51	ga_15	OB	CB1	OB1	ga_31
OP2	P	OP4	ga_14	C50	C51	C52	ga_15	OB1	CB1	CB2	ga_35
OP3	P	OP4	ga_14	C51	C52	C53	ga_15	OB	CB1	CB2	ga_16
P	OP4	HP4	ga_12	C52	C53	C54	ga_15	CB1	CB2	CB3	ga_15
C4	OP1	P	ga_26	C53	C54	C55	ga_15	CB2	CB3	CB4	ga_15
C3	C4	OP1	ga_9	C54	C55	C56	ga_15	CB3	CB4	CB5	ga_15
C5	C4	OP1	ga_9	C55	C56	C57	ga_15	CB4	CB5	CB6	ga_15
C3	C4	C5	ga_8	C56	C57	C58	ga_15	CB5	CB6	CB7	ga_15
C4	C3	O3	ga_9	C4	C3	C2	ga_8	CB6	CB7	CB8	ga_15
C3	O3	C31	ga_22	O3	C3	C2	ga_9	CB7	CB8	CB9	ga_15
O3	C31	O31	ga_31	C3	C2	N	ga_13	CB8	CB9	CB10	ga_15
O3	C31	C32	ga_16	C3	C2	C1	ga_8	CB9	CB10	CB11	ga_15
O31	C31	C32	ga_30	N	C2	C1	ga_13	CB10	CB11	CB12	ga_15
C31	C32	C33	ga_15	O6	C6	C5	ga_9	CA	CB	CB13	ga_15
C32	C33	O33	ga_13	C6	O6	HO6	ga_12	OB	CB	CB13	ga_13
C33	O33	C34	ga_22	C4	C5	C6	ga_8	CB	CB13	CB14	ga_15
O33	C34	O34	ga_31	C4	C5	O5	ga_9	CB13	CB14	CB15	ga_15
O33	C34	C35	ga_16	C6	C5	O5	ga_9	CB14	CB15	CB16	ga_15
O34	C34	C35	ga_35	C5	O5	C1	ga_10	CB15	CB16	CB17	ga_15
C34	C35	C36	ga_15	C2	C1	O5	ga_9	CB16	CB17	CB18	ga_15
C35	C36	C37	ga_15	C2	C1	O5	ga_9	CB17	CB18	CB19	ga_15
C36	C37	C38	ga_15	O5	C1	O1	ga_9				
C37	C38	C39	ga_15	C1	O1	+C6	ga_10				
C38	C39	C40	ga_15	O1	C6	+C5	ga_9				
C39	C40	C41	ga_15	C	N	HN	ga_32				
C40	C41	C42	ga_15	C2	N	C	ga_31				
C41	C42	C43	ga_15	N	C	OC	ga_33				
C42	C43	C44	ga_15								
C43	C44	C45	ga_15								
C44	C45	C46	ga_15								
C45	C46	C47	ga_15								
O33	C33	C48	ga_13								

Tabela 19 – Parâmetros *dihedrals* para o resíduo LE1

[LE1] – [*dihedrals*]

a_i	a_j	a_k	a_l	gd
P	OP1	C4	C3	gd_29
C4	OP1	P	OP4	gd_19
C4	OP1	P	OP4	gd_22
OP1	P	OP4	HP4	gd_22
OP1	P	OP4	HP4	gd_22
OP1	C4	C3	O3	gd_18
C5	C4	C3	O3	gd_17
C5	C4	C3	C2	gd_34
OP1	C4	C5	C6	gd_17
C3	C4	C5	O5	gd_17
C2	C3	O3	C31	gd_30
C3	O3	C31	C32	gd_13
O3	C31	C32	C33	gd_40
C31	C32	C33	O33	gd_34
C32	C33	O33	C34	gd_29
C33	O33	C34	C35	gd_13
O33	C34	C35	C36	gd_40
C34	C35	C36	C37	gd_34
C35	C36	C37	C38	gd_34
C36	C37	C38	C39	gd_34
C37	C38	C39	C40	gd_34
C38	C39	C40	C41	gd_34
C39	C40	C41	C42	gd_34
C40	C41	C42	C43	gd_34
C41	C42	C43	C44	gd_34
C42	C43	C44	C45	gd_34
C43	C44	C45	C46	gd_34
C44	C45	C46	C47	gd_34
C32	C33	C48	C49	gd_34
C33	C48	C49	C50	gd_34
C48	C49	C50	C51	gd_34
C49	C50	C51	C52	gd_34
C50	C51	C52	C53	gd_34
C51	C52	C53	C54	gd_34
C52	C53	C54	C55	gd_34
C53	C54	C55	C56	gd_34
C54	C55	C56	C57	gd_34
C55	C56	C57	C58	gd_34
C4	C3	C2	N	gd_17

a_i	a_j	a_k	a_l	gd
C4	C3	C2	C1	gd_34
O3	C3	C2	N	gd_18
C1	C2	N	C	gd_30
C2	N	C	CA	gd_14
N	C	CA	CB	gd_40
C	CA	CB	OB	gd_34
CA	CB	OB	CB1	gd_29
CB	OB	CB1	CB2	gd_13
OB	CB1	CB2	CB3	gd_40
CB1	CB2	CB3	CB4	gd_34
CB2	CB3	CB4	CB5	gd_34
CB3	CB4	CB5	CB6	gd_34
CB4	CB5	CB6	CB7	gd_34
CB5	CB6	CB7	CB8	gd_34
CB6	CB7	CB8	CB9	gd_34
CB7	CB8	CB9	CB10	gd_34
CB8	CB9	CB10	CB11	gd_34
CB9	CB10	CB11	CB12	gd_34
CA	CB	CB13	CB14	gd_34
CB	CB13	CB14	CB15	gd_34
CB13	CB14	CB15	CB16	gd_34
CB14	CB15	CB16	CB17	gd_34
CB15	CB16	CB17	CB18	gd_34
CB16	CB17	CB18	CB19	gd_34
CB17	CB18	CB19	CB20	gd_34
CB18	CB19	CB20	CB21	gd_34
CB19	CB20	CB21	CB22	gd_34
CB20	CB21	CB22	CB23	gd_34
C3	C2	C1	O5	gd_17
C3	C2	C1	O1	gd_17
N	C2	C1	O1	gd_18
C5	C6	O6	HO6	gd_30
O6	C6	C5	O5	gd_5
O6	C6	C5	O5	gd_37
C4	C5	O5	C1	gd_29
C5	O5	C1	C2	gd_29
O5	C1	O1	+C6	gd_2
O5	C1	O1	+C6	gd_32
C1	O1	+C6	+C5	gd_30

A.1.3 – Topologia Lipídio A

monofosforilado LE2

Tabela 20 – Parâmetros atoms para o resíduo LE2

[LE2] – [atoms]							
AtomName	Type	Charge	C-Group	AtomName	Type	Charge	C-Group
C6	CH2	0.23200	0	CB13	CH2	0.0000	13
C4	CH1	0.23200	1	CB14	CH2	0.0000	13
O4	OA	-0.6420	1	CB15	CH2	0.0000	14
HO4	H	0.41000	1	CB16	CH2	0.0000	14
C3	CH1	0.16000	2	CB17	CH2	0.00000	15
O3	OE	-0.3600	2	CB18	CH2	0.00000	15
C31	C	0.58000	2	CB19	CH2	0.00000	16
O31	O	-0.3800	2	CB20	CH2	0.00000	16
C32	CH2	0.00000	3	CB21	CH2	0.00000	17
C33	CH2	0.23200	4	CB22	CH2	0.00000	17
OH33	OA	-0.6420	4	CB23	CH3	0.00000	18
HO33	H	0.41000	4	C5	CH1	0.37600	19
C34	CH2	0.00000	5	O5	OA	-0.4800	19
C35	CH2	0.00000	5	C1	CH1	0.33600	19
C36	CH2	0.00000	6	OP1	OA	-0.5070	19
C37	CH2	0.00000	6	P	P	1.34600	19
C38	CH2	0.00000	7	OP2	OM	-0.8840	19
C39	CH2	0.00000	7	OP3	OM	-0.8840	19
C40	CH2	0.00000	8	OP4	OA	-0.7330	19
C41	CH2	0.00000	8	HP4	H	0.43000	19
C42	CH2	0.00000	9				
C43	CH2	0.00000	9				
C44	CH3	0.00000	10				
C2	CH1	0.23200	11				
N	N	-0.2000	11				
HN	H	0.31000	11				
C	C	0.10800	11				
OC	O	-0.4500	11				
CA	CH2	0.00000	11				
CBH	CH2	0.23200	12				
OBH	OA	-0.6420	12				
HBO	H	0.41000	12				

Tabela 21 – Parâmetros *bonds* para o resíduo LE2

[LE2] – [*bonds*]

a_i	a_j	gb
C4	O4	gb_20
O4	HO4	gb_1
C4	C3	gb_26
C4	C5	gb_26
C3	O3	gb_20
O3	C31	gb_10
C31	O31	gb_5
C31	C32	gb_23
C32	C33	gb_27
C33	OH33	gb_18
OH33	HO33	gb_1
C33	C34	gb_27
C34	C35	gb_27
C35	C36	gb_27
C36	C37	gb_27
C37	C38	gb_27
C38	C39	gb_27
C39	C40	gb_27
C40	C41	gb_27
C41	C42	gb_27
C42	C43	gb_27
C43	C44	gb_27
C3	C2	gb_26
C2	C1	gb_26
C6	O1	gb_20
C6	C5	gb_20
C1	OP1	gb_18
OP1	P	gb_28
OP2	P	gb_24
OP3	P	gb_24
OP4	P	gb_28
C2	N	gb_21
N	HN	gb_2
N	C	gb_10

a_i	a_j	gb
C	OC	gb_5
CA	CBH	gb_27
CBH	OBH	gb_18
OBH	HBO	gb_1
CBH	CB13	gb_27
CB13	CB14	gb_27
CB14	CB15	gb_27
CB15	CB16	gb_27
CB16	CB17	gb_27
CB17	CB18	gb_27
CB18	CB19	gb_27
CB19	CB20	gb_27
CB20	CB21	gb_27
CB21	CB22	gb_27
CB22	CB23	gb_27

Tabela 22 – Parâmetros *angles* para o resíduo LE2

[LE2] – [*angles*]

a_i	a_j	a_k	ga
OP1	P	OP4	ga_5
OP1	P	OP2	ga_14
OP1	P	OP3	ga_14
OP2	P	OP3	ga_29
OP2	P	OP4	ga_14
OP3	P	OP4	ga_14
P	OP4	HP4	ga_12
C1	OP1	P	ga_26
C2	C1	OP1	ga_9
O5	C1	OP1	ga_9
C3	C4	C5	ga_8
C4	C3	O3	ga_9
O4	C4	C3	ga_9
O4	C4	C5	ga_9
C4	O4	HO4	ga_12
C3	O3	C31	ga_22
O3	C31	O31	ga_31
O3	C31	C32	ga_16
O31	C31	C32	ga_31
C31	C32	C33	ga_15
C32	C33	OH33	ga_13
C33	OH33	HO33	ga_12
C34	C35	C36	ga_15
C35	C36	C37	ga_15
C36	C37	C38	ga_15
C37	C38	C39	ga_15
C38	C39	C40	ga_15
C39	C40	C41	ga_15
C40	C41	C42	ga_15
C41	C42	C43	ga_15
C42	C43	C44	ga_15
C4	C3	C2	ga_8
O3	C3	C2	ga_8
C3	C2	N	ga_13

a_i	a_j	a_k	ga
C3	C2	C1	ga_8
N	C2	C1	ga_13
O1	C6	C5	ga_9
C6	O1	C1	ga_10
C4	C5	C6	ga_8
C4	C5	O5	ga_9
C6	C5	O5	ga_9
C5	O5	C1	ga_10
C2	C1	O5	ga_9
C2	C1	OP1	ga_9
O5	C1	OP1	ga_9
C	N	HN	ga_32
C2	N	C	ga_31
N	C	OC	ga_33
C2	N	HN	ga_18
N	C	CA	ga_19
OC	C	CA	ga_30
C	CA	CBH	ga_15
CA	CBH	OBH	ga_13
CBH	OBH	HBO	ga_12
CA	CBH	CB13	ga_15
OBH	CBH	CB13	ga_13
CBH	CB13	CB14	ga_15
CB13	CB14	CB15	ga_15
CB14	CB15	CB16	ga_15
CB15	CB16	CB17	ga_15
CB16	CB17	CB18	ga_15
CB17	CB18	CB19	ga_15
CB18	CB19	CB20	ga_15
CB19	CB20	CB21	ga_15
CB20	CB21	CB22	ga_15
CB21	CB22	CB23	ga_15

Tabela 23 – Parâmetros *dihedrals* para o resíduo LE2

[LE2] – [<i>dihedrals</i>]									
a_i	a_j	a_k	a_l	gd	a_i	a_j	a_k	a_l	gd
C1	OP1	P	OP4	gd_19	CA	CBH	OBH	HBO	gd_30
C1	OP1	P	OP4	gd_22	CA	CBH	CB13	CB14	gd_34
OP1	P	OP4	HP4	gd_22	CBH	CB13	CB14	CB15	gd_34
OP1	P	OP4	HP4	gd_19	CB13	CB14	CB15	CB16	gd_34
O5	C1	OP1	P	gd_6	CB14	CB15	CB16	CB17	gd_34
O5	C1	OP1	P	gd_28	CB15	CB16	CB17	CB18	gd_34
C5	C4	C3	O3	gd_17	CB16	CB17	CB18	CB19	gd_34
C5	C4	C3	C2	gd_34	CB17	CB18	CB19	CB20	gd_34
O4	C4	C5	C6	gd_17	CB18	CB19	CB20	CB21	gd_34
C3	C4	O4	HO4	gd_30	CB19	CB20	CB21	CB22	gd_34
C3	C4	C5	O5	gd_17	CB20	CB21	CB22	CB23	gd_34
O3	C3	C4	O4	gd_18	C3	C2	C1	O5	gd_17
C2	C3	C4	O4	gd_17	C3	C2	C1	OP1	gd_17
C2	C3	O3	C31	gd_30	N	C2	C1	OP1	gd_18
C3	O3	C31	C32	gd_13	O1	C6	C5	O5	gd_5
O3	C31	C32	C33	gd_40	O1	C6	C5	O5	gd_37
C31	C32	C33	C34	gd_34	C4	C5	O5	C1	gd_29
C32	C33	OH33	HO33	gd_30	C5	O5	C1	C2	gd_29
C32	C33	C34	C35	gd_34					
C33	C34	C35	C36	gd_34					
C34	C35	C36	C37	gd_34					
C35	C36	C37	C38	gd_34					
C36	C37	C38	C39	gd_34					
C37	C38	C39	C40	gd_34					
C38	C39	C40	C41	gd_34					
C41	C42	C43	C44	gd_34					
C4	C3	C2	N	gd_17					
C4	C3	C2	C1	gd_34					
O3	C3	C2	N	gd_18					
O3	C3	C2	C1	gd_17					
C1	C2	N	C	gd_30					
C2	N	C	CA	gd_14					
N	C	CA	CBH	gd_40					
C	CA	CBH	OBH	gd_34					

APÊNDICE B – ADICIONANDO O CÁTION Al^{3+} AO CAMPO DE FORÇA

Para adicionar um novo resíduo em um campo de força já existente no software GROMACS, existem alguns arquivos que é preciso modificar. No manual do GROMACS2016v.4 (APOL et al., 2016), utilizado neste trabalho, há uma explicação detalhada sobre os arquivos e descrição do formato necessário. Neste apêndice é relato apenas os cálculos realizados para a introdução do íon nos arquivos de `ffnonbonded.itp`. Neste arquivo temos os parâmetros não-ligados dos resíduos. Os parâmetros não-ligados consistem nos parâmetros de van der Waals C^6 e C^{12} , discutidos na seção 2-3. Inicialmente é necessário realizar o cálculo dos parâmetros C^6 e C^{12} para o cátion Al^{3+} que depende da regra de combinação utilizada. Os parâmetros retirados da ref(FARO; THIM; SKAF, 2010) para o alumínio são os valores de ϵ (poço potencial) = 0,9053 kJ.mol⁻¹ e σ (distância interatômica) = 0,14472nm.

A regra de combinação utilizada foi: $C^6 = 4\epsilon\sigma^6$ [kJ.mol⁻¹.nm⁶] e $C^{12} = 4\epsilon\sigma^{12}$ [kJ.mol⁻¹.nm¹²]

Assim, para o alumínio, $C^6 = 3,2678\text{e}^{-5}$ kJ.mol⁻¹.nm⁶ e $C^{12} = 3,05629\text{e}^{-10}$ kJ.mol⁻¹.nm¹²

Para calcular o valor dos parâmetros C^6 e C^{12} entre o átomo i e o átomo j é utilizado a regra de combinação: $C_{ij}^6 = (C_i^6.C_j^6)^{1/2}$ e $C_{ij}^{12} = (C_i^{12}.C_j^{12})^{1/2}$

Na tabela 24 encontramos os valores de C^6 e C^{12} calculados entre o Al^{3+} e os átomos relevante neste estudo.

Tabela 24 – Valores de C^6 e C^{12} calculados entre o Al^{3+} e os átomos relevantes neste estudo.

i	j	C_{ij}^6	C_{ij}^{12}
Al^{3+}	O	0,0002718752	1,748225e ⁻⁸
Al^{3+}	OM	0,0002718752	1,505396e ⁻⁸
Al^{3+}	OA	0,0002718752	2,145071e ⁻⁸
Al^{3+}	OE	0,0002718752	1,923047e ⁻⁸
Al^{3+}	C	0,0002765627	3,884555e ⁻⁸
Al^{3+}	N	0,0002821648	2,662546e ⁻⁸
Al^{3+}	CH1	0,0004453128	1,722001e ⁻⁷
Al^{3+}	CH2	0,0000494017	1,018865e ⁻⁷
Al^{3+}	CH3	0.0005604996	9,024336e ⁻⁸
Al^{3+}	H	0	0
Al^{3+}	P	0,0006939791	8,235887e ⁻⁸

Fonte: A autora, 2019.

APÊNDICE C – ARQUIVOS *.MDP*

Abaixo segue o arquivo *.mdp* para simulação de bicamada de Lipídio A a 300K para a etapa de equilibração em NpT no protocolo p1.

```
integrador      = md      ; MD integrator
dt              = 0.002
nsteps          = 50000 ; 10 ns
nstxout         = 1000
nstvout         = 1000
nstlog          = 1000
nstenergy       = 1000
nstxtcout       = 1000
comm-mode       = Linear
nstcomm         = 1
nstcalcenergy   = 1
comm-grps       = lpa solv ion
xtc_grps        = lpa solv ion
energygrps      = lpa solv ion
nstlist         = 5
nstcalclr       = 1
rlist           = 1.4
coulombtype     = Reaction-Field
epsilon_rf      = 66.0
ns_type         = grid
rcoulomb        = 1.4
cutoff-scheme   = Verlet
rvdw            = 1.4
pbc             = xyz
tcoupl          = berendsen
tc-grps         = lpa solv ion
tau_t           = 0.4 0.4 0.4
ref_t           = 300 300 300
Pcoupl          = semi-isotropic
tau_p           = 0.4
compressibility = 4.5e-5 4.5e-5
ref_p           = 1.0 1.0
gen_vel         = yes
continuation     = no
gen_temp        = 10
gen_seed        = 178296
constraint_algorithm = lincs
```

Abaixo segue o arquivo .mdp para simulação de bicamada de Lipídio A a 300K para a etapa de equilíbrio em NVT (esquerda) e NpT (direita) para o protocolo p2.

```
integrador      = md      ; MD integrator
dt              = 0.002
nsteps          = 50000 ; 100 ps
nstxout         = 100
nstvout         = 100
nstlog          = 100
nstenergy       = 100
nstxtcout       = 100
comm-mode       = Linear
nstcomm         = 1
nstcalcenergy   = 1
comm-grps       = lpa solv ion
xtc_grps        = lpa solv ion
energygrps      = lpa solv ion
nstlist         = 5
nstcalclr       = 1
rlist           = 1.4
coulombtype     = Reaction-Field
epsilon_rf      = 66.0
ns_type         = grid
rcoulomb        = 1.4
cutoff-scheme   = Verlet
rvdw            = 1.4
pbc             = xyz
tcoupl          = berendsen
tc-grps         = lpa solv ion
tau_t           = 0.4 0.4 0.4
ref_t           = 300 300 300
Pcoupl          = no
gen_vel         = yes
gen_temp        = 10
gen_seed        = 178296
constraint_algorithm = lines
```

```
integrador      = md      ; MD integrator
dt              = 0.002
nsteps          = 50000 ; 10 ns
nstxout         = 1000
nstvout         = 1000
nstlog          = 1000
nstenergy       = 1000
nstxtcout       = 1000
comm-mode       = Linear
nstcomm         = 1
nstcalcenergy   = 1
comm-grps       = lpa solv ion
xtc_grps        = lpa solv ion
energygrps      = lpa solv ion
nstlist         = 5
nstcalclr       = 1
rlist           = 1.4
coulombtype     = Reaction-Field
epsilon_rf      = 66.0
ns_type         = grid
rcoulomb        = 1.4
cutoff-scheme   = Verlet
rvdw            = 1.4
pbc             = xyz
tcoupl          = berendsen
tc-grps         = lpa solv ion
tau_t           = 0.4 0.4 0.4
ref_t           = 300 300 300
Pcoupl          = semi-isotropic
tau_p           = 0.4
compressibility  = 4.5e-5 4.5e-5
ref_p           = 1.0 1.0
gen_vel         = no
continuation     = yes
gen_temp        = 300
gen_seed        = 178296
constraint_algorithm = lines
```

Abaixo segue o arquivo .mdp para a etapa de produção das bicamadas de Lipídio A a 300K utilizando o TELA *Reaction Field* (esquerda) ou *Particle Mesh Ewald* (direita).

```
integrador      = md      ; MD integrator
dt              = 0.002
nsteps          = 100000000 ; 200 ns
nstxout         = 1000
nstvout         = 1000
nstlog          = 1000
nstenergy       = 1000
nstxtcout       = 1000
comm-mode       = Linear
nstcomm         = 1
nstcalcenergy   = 1
comm-grps       = lpa solv ion
xtc_grps        = System
energygrps      = lpa solv ion
nstlist         = 5
nstcalclr       = 1
rlist           = 1.4
coulombtype     = Reaction-Field
epsilon_rf      = 66.0
ns_type         = grid
rcoulomb        = 1.4
cutoff-scheme   = Verlet
rvdw            = 1.4
pbc             = xyz
tcoupl          = berendsen
tc-grps         = lpa solv ion
tau_t           = 0.4 0.4 0.4
ref_t           = 300 300 300
Pcoupl          = semi-isotropic
tau_p           = 1.0
compressibility = 4.5e-5 4.5e-5
ref_p           = 1.0 1.0
continuation    = yes
gen_temp        = 300
gen_seed        = 178296
constraint      = h-bonds
```

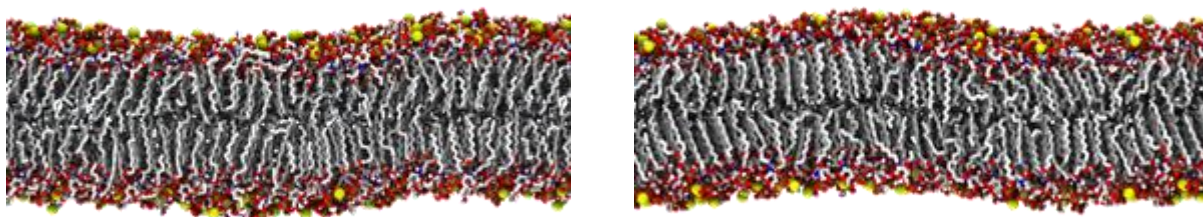
```
integrador      = md      ; MD integrator
dt              = 0.002
nsteps          = 100000000 ; 200 ns
nstxout         = 1000
nstvout         = 1000
nstlog          = 1000
nstenergy       = 1000
nstxtcout       = 1000
comm-mode       = Linear
nstcomm         = 1
nstcalcenergy   = 1
comm-grps       = lpa solv ion
xtc_grps        = System
energygrps      = lpa solv ion
nstlist         = 5
nstcalclr       = 1
cutoff-scheme   = Verlet
rlist           = 1.4
coulombtype     = PME
ns_type         = grid
rcoulomb        = 1.4
rvdw            = 1.4
fourierspacing  = 0.16
pme_order       = 4
ewald_rtol      = 1e-5
optimize_fft    = yes
pbc             = xyz
tcoupl          = berendsen
tc-grps         = lpa solv ion
tau_t           = 0.4 0.4 0.4
ref_t           = 300 300 300
Pcoupl          = semi-isotropic
tau_p           = 1.0
compressibility = 4.5e-5 4.5e-5
ref_p           = 1.0 1.0
continuation    = yes
gen_temp        = 300
gen_seed        = 178296
constraint      = h-bonds
```

APÊNDICE D – ANÁLISES *REACTION FIELD* X *PARTICLE MESH EWALD*

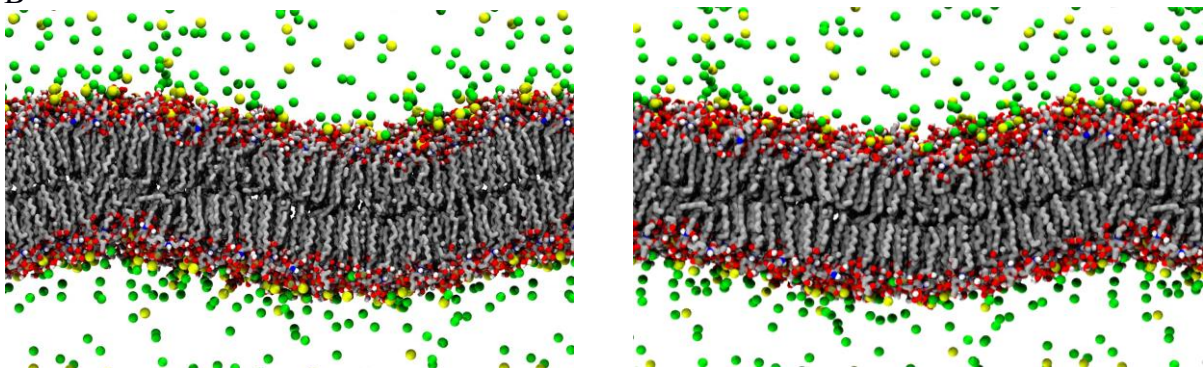
Na Figura 38 são observadas as configurações finais para os sistemas simulados (Al-p2, AlCl₃-p2, NaCl-p2) utilizando *reaction field* (à esquerda) e *particle mesh Ewald* (à direita).

Figura 38 – Conformação final das bicamadas de Lipídio A difosforilado simuladas. Na sequência estão A) Bicamadas sem concentração salina, (Al-p2_{RF} e Al-p2_{PME}), B) com 150mM de AlCl₃ (AlCl₃-p2_{RF} e AlCl₃-p2_{PME}) e C) com 150mM de NaCl, (NaCl-p2_{RF} e NaCl-p2_{PME}).

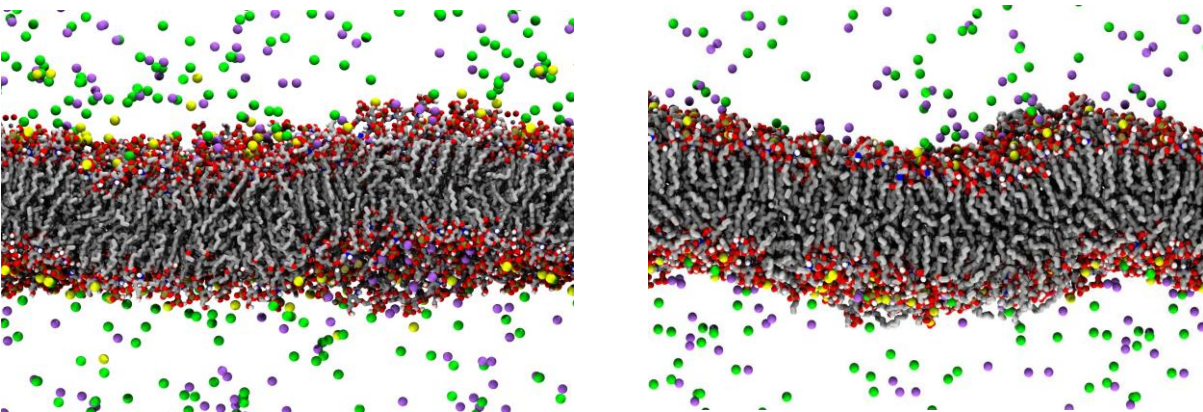
A



B



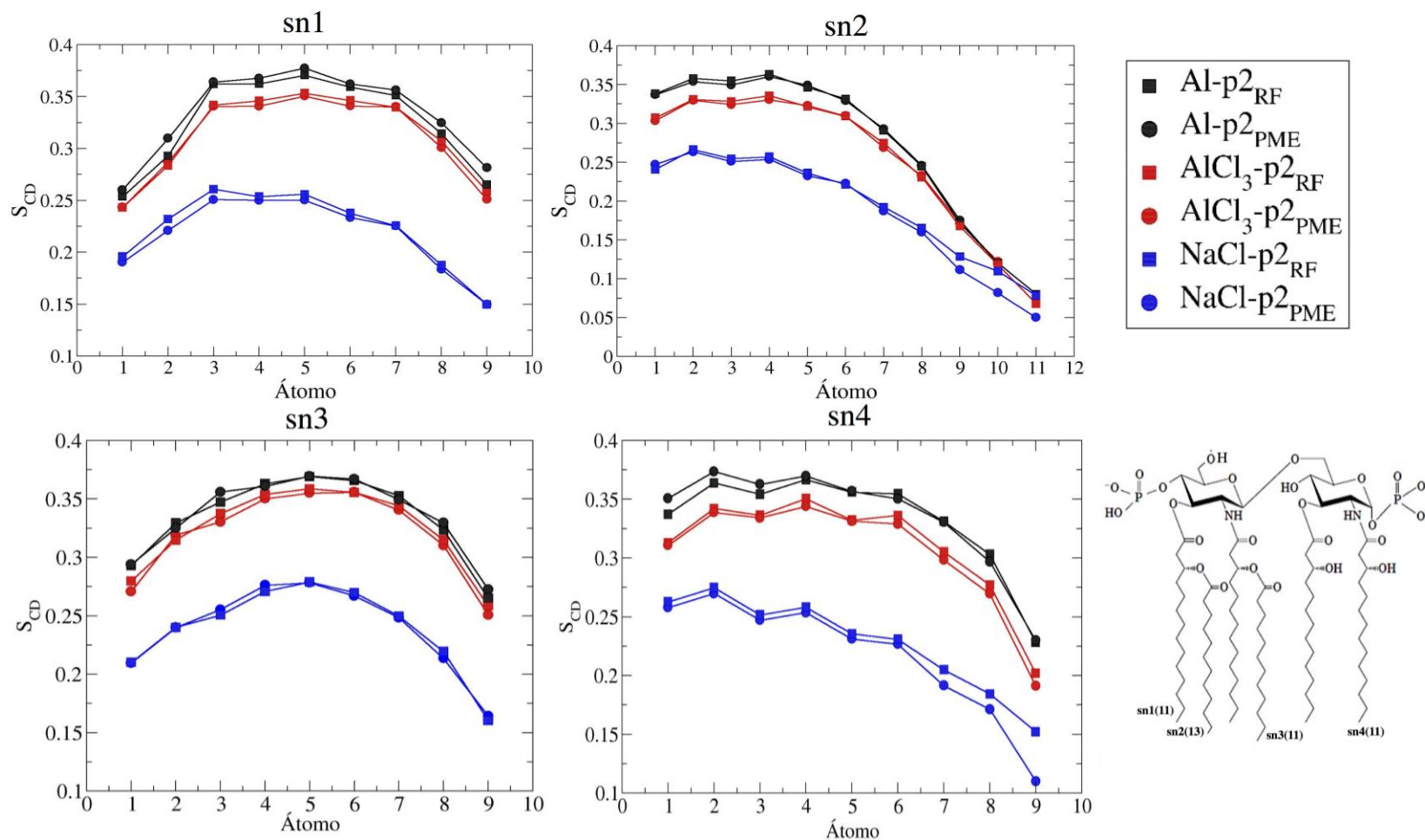
C



Fonte: A autora, 2019.

Na Figura 39 estão apresentados os parâmetros de ordem das cadeias aciladas sn1, sn2, sn3 e sn4 dos Lipídios A mono- e difosforilado

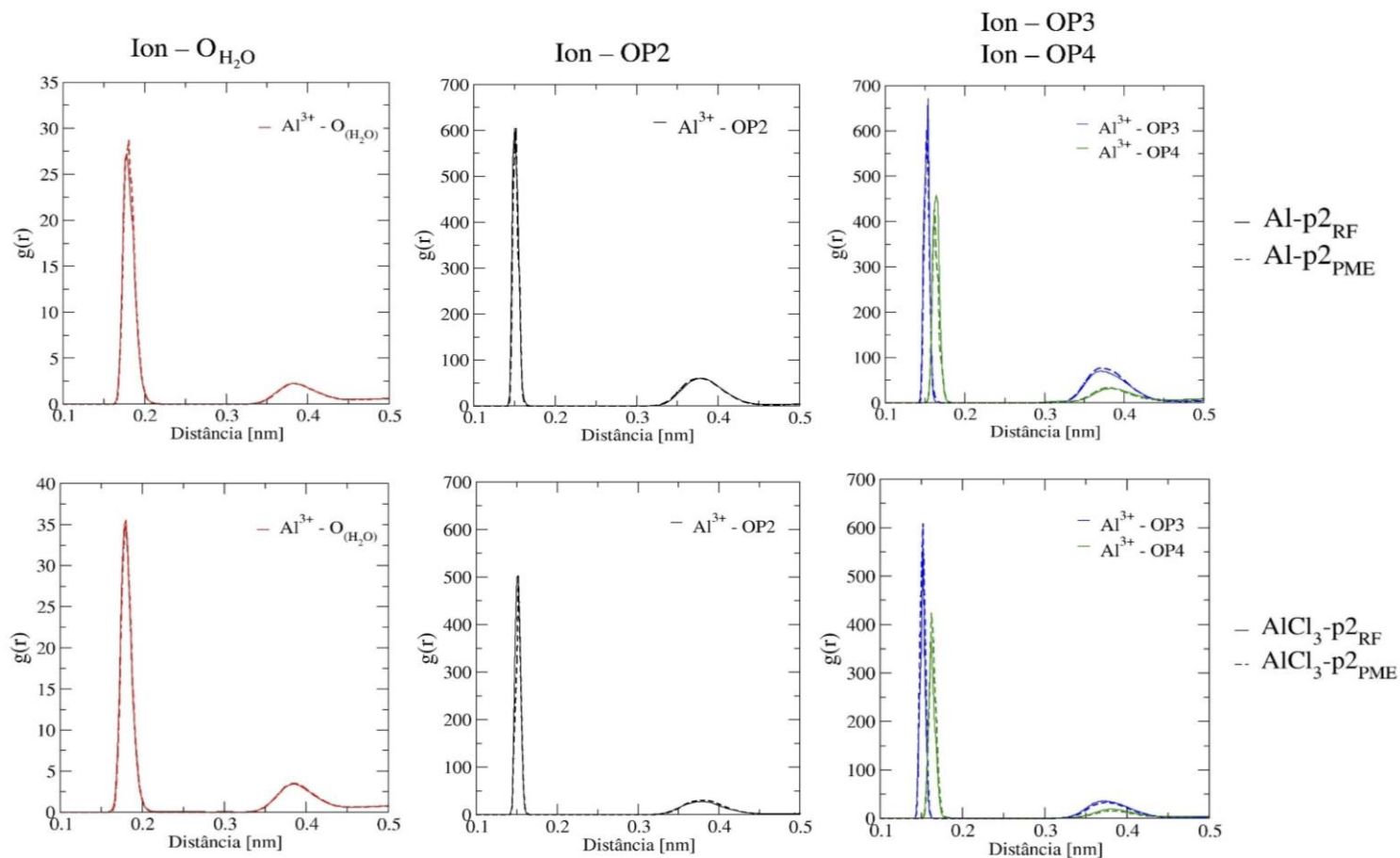
Figura 39 – Parâmetro de ordem para os átomos das cadeias aciladas do Lipídio A em cada simulação comparando os diferentes tratamentos eletrostáticos de longo alcance. As análises foram realizadas para os últimos 100 ns de trajetória.



Fonte: A autora, 2019.

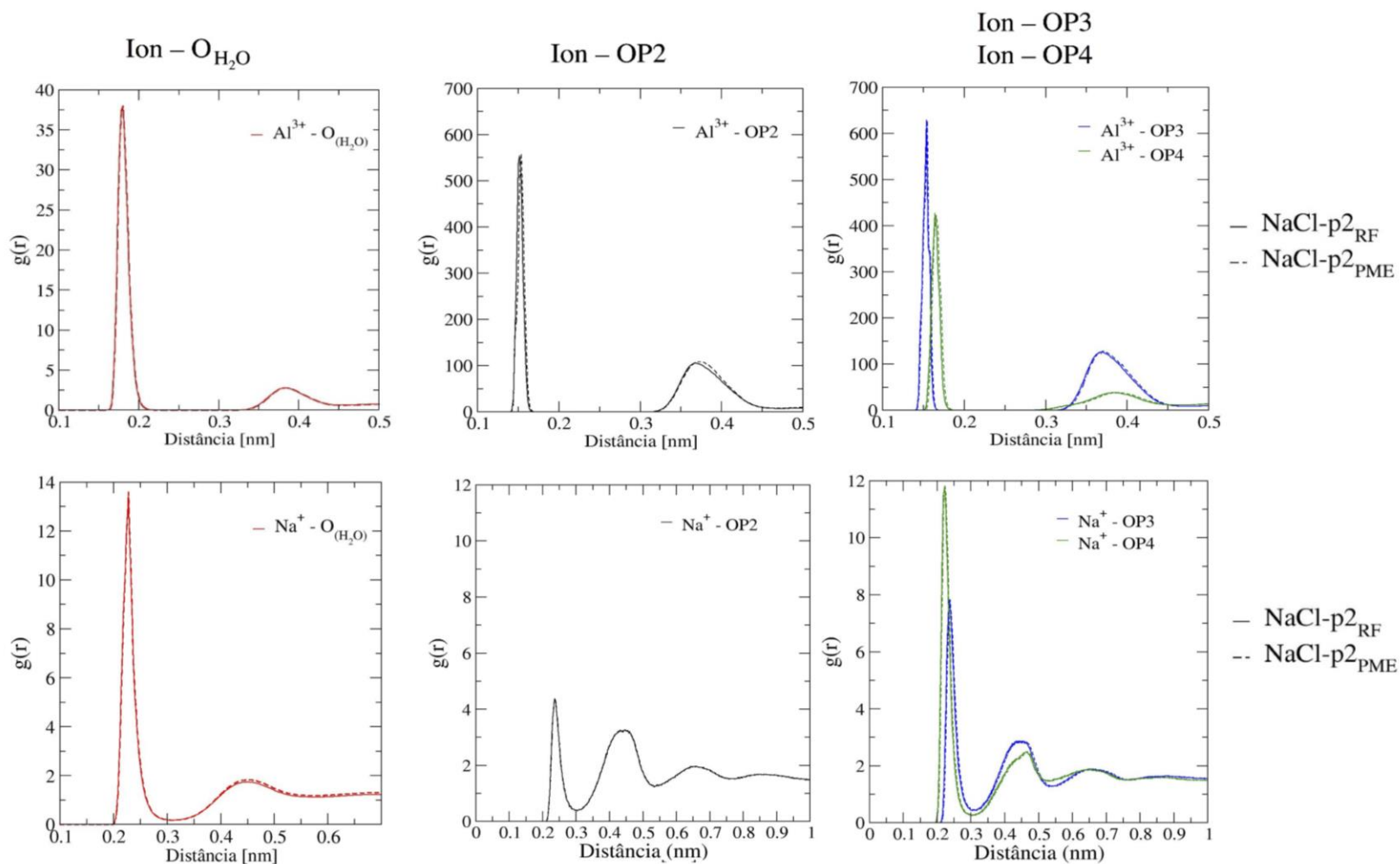
Nas Figuras 40 e 41 estão apresentadas as análises de função de distribuição radial. Os grupos selecionados para as análises foram: cátion (Al^{3+} ou Na^+)–oxigênio das moléculas de água e cátion(Al^{3+} ou Na^+)–oxigênio dos grupos fosfatos(OP2, OP3 e OP4).

Figura 40 – Função de distribuição radial $g(r)$ para os sistemas indicados. As linhas grossas indicam os sistemas simulados utilizando *reaction field* e as linhas tracejadas o uso de *particle mesh Ewald* como tratamento eletrostático de longo alcance. A análise foi realizada para os últimos 100 ns de simulação.



Fonte: A autora, 2019.

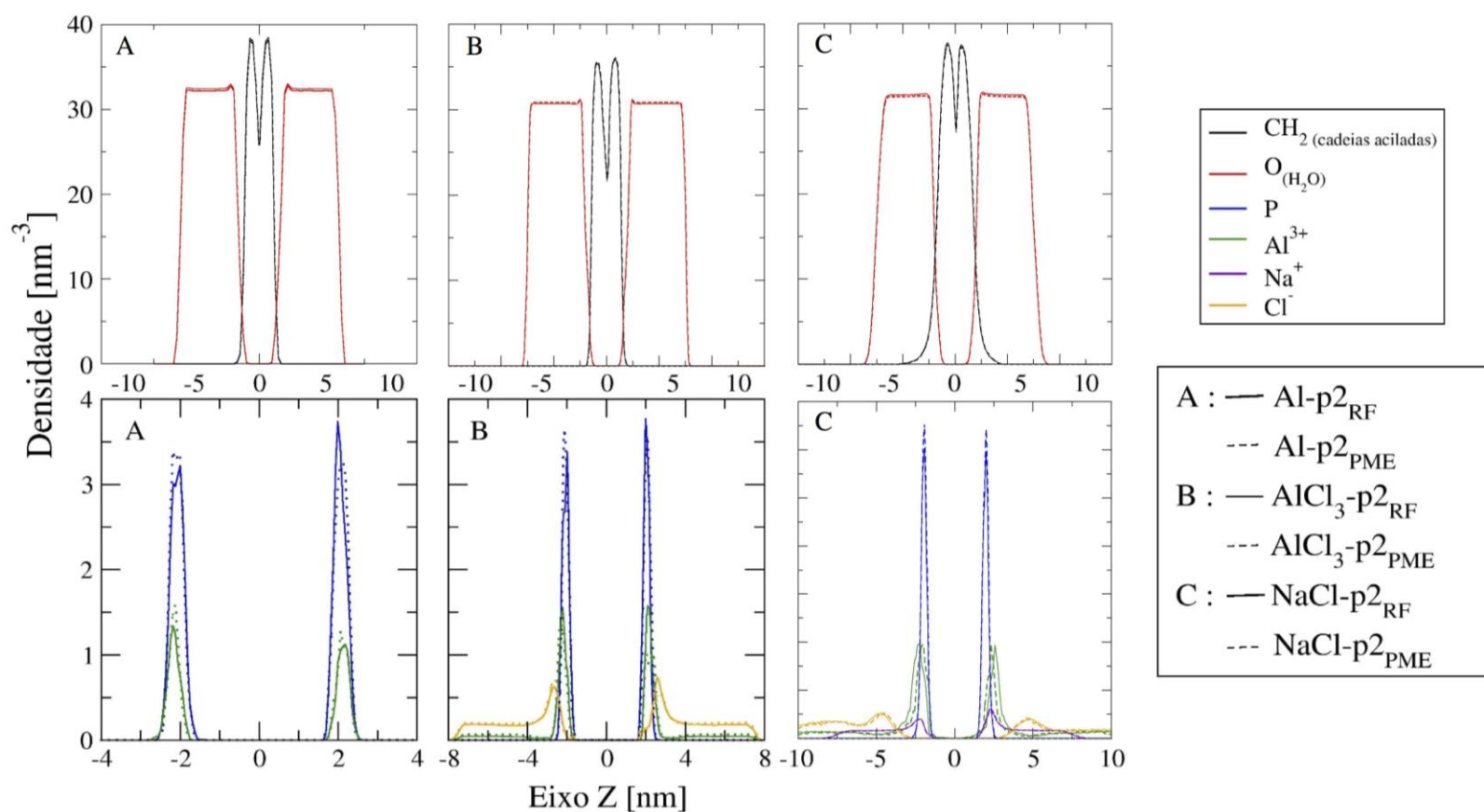
Figura 41 – Função de distribuição radial $g(r)$ para os sistemas indicados. As linhas grossas indicam os sistemas utilizando reaction field e as linhas tracejadas o uso de particle mesh Ewald. A análise foi realizada para os últimos 100 ns de simulação.



Fonte: A autora, 2019.

Na Figura 42 estão os perfis de densidade de alguns grupos químicos da estrutura do Lipídio A. Os grupos: átomos de oxigênio das moléculas de água, átomos de fósforo do grupo fosfato, os grupos metilenos das cadeias aciladas dos Lipídios A e os íons Al^{3+} , Na^+ e Cl^-

Figura 42 – Perfis de densidades parciais (nm^{-3}) ao longo do eixo z para os grupos químicos selecionados. As linhas grossas indicam os sistemas utilizando *reaction field* e as linhas tracejadas o uso de *particle mesh Ewald*.

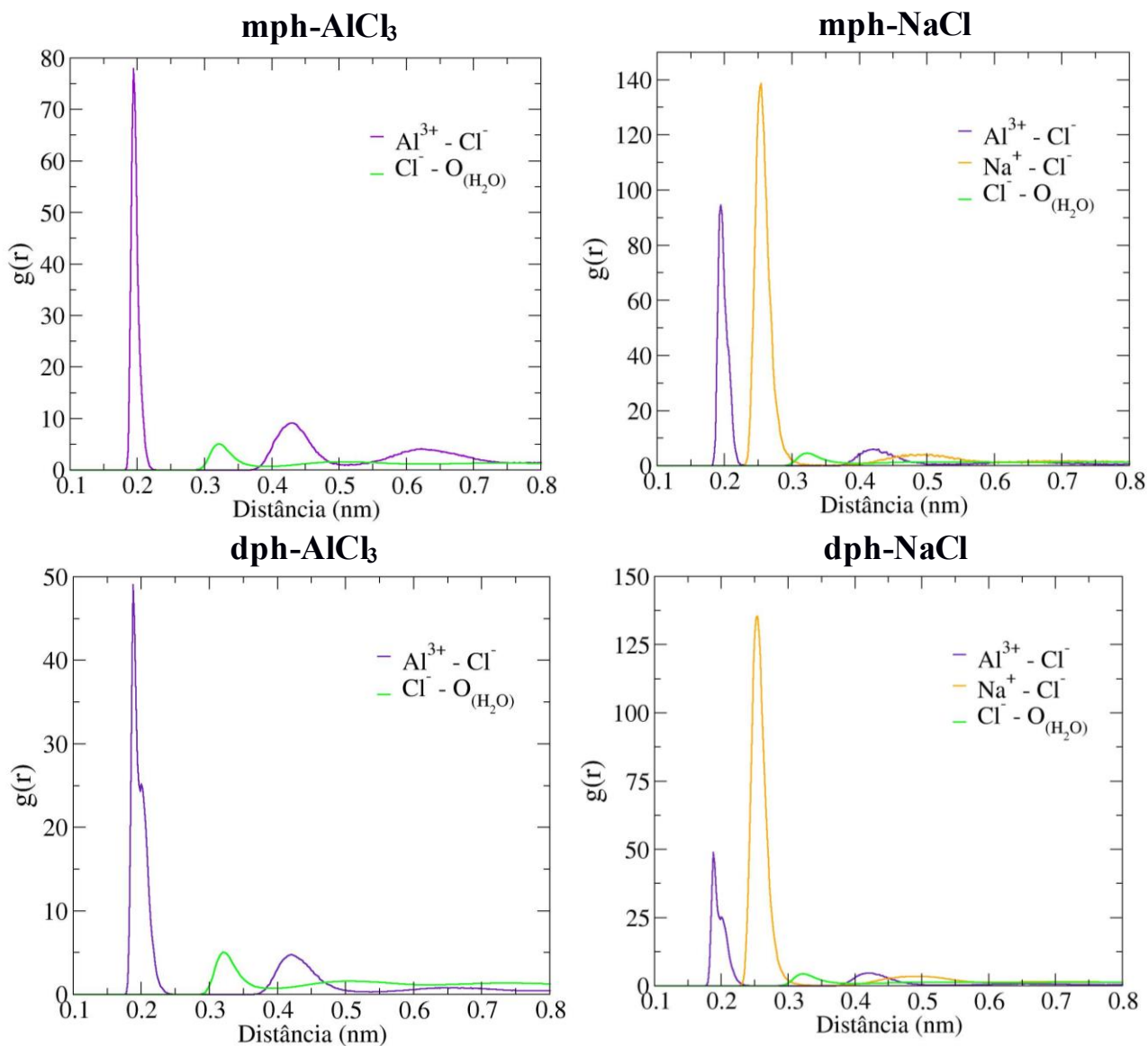


Fonte: A autora, 2019.

APÊNDICE E – FUNÇÕES DE DISTRIBUIÇÃO RADIAL (SEÇÃO 5.3)

Na Figura 43 estão apresentados os gráficos de função de distribuição radial.

Figura 43 – Função de distribuição radial $g(r)$ dos para os grupos: $(\text{Al}^{3+}$ ou $\text{Na}^+)$ – Cl^- e Cl^- – $\text{O}_{(\text{H}_2\text{O})}$ para os sistemas: mph- AlCl_3 , mph- NaCl , dph- AlCl_3 e dph- NaCl . E na tabela está apresentado os NC para o grupo Cl^- – $\text{O}_{(\text{H}_2\text{O})}$.



Fonte: A autora, 2019.

Tabela 25 – Número de coordenação (NC) para a interação entre os íons cloretos (Cl^-) e os oxigênios das moléculas de água ($\text{O}_{(\text{H}_2\text{O})}$) para os sistemas descritos.

Sistemas	mph- AlCl_3	mph- NaCl	dph- AlCl_3	dph- NaCl
NC	6.1	6.0	6.1	6.1

Fonte: A autora, 2019.

APÊNDICE F – Q-R CODES

Neste apêndice encontram-se os Q-r Codes para serem visualizados os vídeos da trajetória dos sistemas descritos abaixo. Os vídeos são do tempo $t=0$ ns até $t=200$ ns, que foi o tempo de simulação necessário para que estes sistemas convergissem. Por gentileza, instale o app QRCode Reader e leia os seguintes códigos com o seu smartphone. A senha de acesso é: biomat2019.

mph-F_A



mph-F_F



mph-rand



dph-F_F



dph-rand



APÊNDICE G – PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS

I) XLIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biofísica. Effects of Ions, Salt Concentrations and Equilibration Protocols on Molecular Dynamics Simulations of Lipid A Bilayers. 2019.

II) V BioFísica - Polimorfismo De Bicamadas De Lipídio A sob Influência do Íon Al^{3+} , Concentração Salina E Grupos Fosfato. 2018

III) XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Biofísica. Polymorphism of Mono and Diphosphorylated Lipid A Bilayers in Presence of Different Concentrations of NaCl and $AlCl_3$ salts. 2018.