

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

Influência de Quimiotipos, Íons e da Temperatura na
Estrutura e Dinâmica de Bicamadas de Lipídio A de
Pseudomonas aeruginosa e *Escherichia coli*.

Aluno: Frederico José de Santana Pontes

Orientador: Roberto D. Lins

Recife, Dezembro 2013

Frederico José de Santana Pontes

Influência de Quimiotipos, Íons e da Temperatura na
Estrutura e Dinâmica de Bicamadas de Lipídio A de
Pseudomonas aeruginosa e *Escherichia coli*.

Tese apresentada como parte
dos requisitos para a obtenção
do título de Doutor em
Química pelo Programa de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de
Pernambuco.

Orientador: Roberto Dias Lins Neto

Recife, 2013

Catálogo na fonte
Bibliotecário Jefferson Luiz Alves Nazareno, CRB 4-1758

Pontes, Frederico José de Santana.

Influência de quimiotipos, íons e da temperatura na estrutura e dinâmica de bicamadas de lipídio A de pseudomonas aeruginosa e escherichia coli. / Frederico José de Santana Pontes. – Recife: O Autor, 2013.

110f.: fig.

Orientador: Roberto Dias Lins.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química fundamental , 2013.

Inclui referências, apêndice e anexo.

1. Lipídios. 2. Endotoxidade. 3. Simulação computacional. 4 Estrutura supramolecular. I.Lins, Roberto Dias. (orientador). II. Título.

547 (22. ed.)

FQ 2014-10

Tese submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

Aprovada:

Roberto Dias Lins Neto (Orientador)
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Ricardo Luiz Longo
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Jorge Luiz Neves
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Claudio Gabriel Rodrigues
Departamento de Biofísica e Radiobiologia
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Werner Treptow
Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília

“Influência de quimiótipos, íons e temperatura na estrutura e dinâmica de bicamadas de lipídio A de Pseudomonas aeruginosa e Escherichia coli”

Por

Frederico José de Santana Pontes

Departamento de Química Fundamental
Centro de ciências exatas e da natureza
Universidade Federal de Pernambuco
Recife-PE- Brasil
19 de Dezembro de 2013

Agradecimentos

As realizações e conquistas, até as mais íntimas pessoais, não são possíveis, em sua grande maioria sem o apoio e a colaboração de pessoas e/ou instituições. Nessa página, tentarei descrever em palavras a gratidão pelo apoio recebido para a conclusão dessa etapa. Inicialmente gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof.º Roberto Lins, pela oportunidade e condições oferecidas a mim de desenvolver esse trabalho de tese e, associado a isso, a um novo horizonte de pesquisas antes não enxergada por mim. Do ponto de vista do fomento intelectual, ainda devo agradecer fortemente aos Professores Thereza Soares, Ricardo Longo e Jorge Neves. *In memoriam* o meu agradecimento aos saudosos Professores Benício de Barros Neto e Ricardo Ferreira, ambos de grande legado científico e influência, que me brindaram com orgulhos que posso estampar no currículo.

Difícil seria concluir essa etapa sem agradecer o apoio, companhia e valiosas trocas de informações provenientes das pessoas queridas, poderia repetir os nomes do primeiro parágrafo, mas resolvi citar novas pessoas: Viviane, pelo amor e contemplação das minhas estranhezas, aos amigos e companheiros de grupo BIOMAT (Victor, Gabriel, Roberta Dias, Janilson, Bruna, Agrinaldo, Keila, Vanessa, Denys, Daniela, Rafael, Laércio, Richard, Marcos Paula e Isabelle) pela boa convivência, risos, camaradagem, scripts, artigos e arquivos compartilhados nos últimos anos. Isso pode ser igualmente aplicado aos amigos e companheiros do LQTC, especialmente a Diego, Carol Pacheco, Carlos Henrique, Paulo, Miguel, Júlio, Albano, Renaldo, Eduardo Aguiar, Juliana Angeiras e Carol Roma. Numa esfera de coordenação menos teórica e computacional, devo citar os nomes de bons amigos como: Tiago Rodrigues, Mario Ramos, Kleber Clementino, Juliana, Cândida, Sidney, Lizandra, Rodrigo Cordeiro, Flávia Borba, Vitor Deichmann, Robson Barros e Rafael Queiroz.

Sem financiamento esse trabalho não seria possível de ser desenvolvido, por isso agradeço a INAMI/INAMI pela bolsa concedida durante grande parte do tempo de doutoramento (especialmente ao Prof.º Oscar Malta e ao secretário Gustavo), ao CNPq pela bolsa concedida durante um ano. Agradecer as agências que possibilitaram a infra-estrutura e participação em eventos, como: FACEPE, STINT e EMSL. Agradecer a todos os funcionários do DQF, especialmente a Maurílio Sebastião e a Patrícia Rosa por me tratarem pacientemente durante o doutoramento.

Eu não posso esquecer o agradecimento especial e fraterno ao meu núcleo familiar (Isnar, Ivaldo, Carla, Emerson, Gabriel e Heitor). Além de agradecer ao café pela disposição extra e por me permitir sonhar acordado (já que o mesmo reduziu as minhas horas diárias de sono).

Não importa o que você fez
Há sempre uma próxima vez
Não se perca, não pare
Escolha o menor dos males
Faça o que quer fazer
Aconteça o que acontecer
Tanto faz como se chama
Entregue-se ao que você ama

Titãs (O Fácil é o Certo)

Resumo

Aspectos estruturais, dinâmicos e de mudanças no estado físico e forma de agregação de bicamadas de Lipídio A foram investigadas utilizando a técnica de simulação computacional por dinâmica molecular com um campo de força atomístico. Sistemáticamente diferentes cátions (Na^+ e Mg^{2+}), em diferentes temperaturas (278K, 300 K e 328 K) e variações fenotípicas (lipídios hexa-, penta- e tetracilados) foram testadas em bicamadas de Lipídio A de duas diferentes bactérias (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*). Dessa maneira, conseguimos caracterizar fases distintas de bicamadas de Lipídio A de *P. aeruginosa*, além de obter resultados consistentes com as temperaturas de transição de fase para as membranas das duas espécies de bactéria Gram-negativas. As simulações apontaram também que íons monovalentes induzem um rearranjo na membrana da fase lamelar para uma fase não-lamelar. O estado de agregação das bicamadas de Lipídio A mostrou-se uma combinação importante de dois fatores: a conformação adotada pelo lipídio (se tem um formato mais cônico ou cilíndrico) e a habilidade do contraíon presente em realizar pontes entre os grupos fosfatos de unidades lipídicas distintas. A correlação entre o ângulo de inclinação entre os anéis de glucosamina e o plano da membrana – proposição experimental utilizada para explicar a endotoxicidade e forma de agregação do Lipídio A – não foi observada de maneira quantitativa em nossos cálculos.

Palavras-chave: Lipídios. Endotoxicidade. Simulação Computacional. Estrutura Supramolecular

Abstract

Structure, dynamics, phase transition and general assembly of Lipid A bilayers were investigated in this work through atomistic molecular dynamics simulations. A range of temperature (278K, 300K e 328K), cations (mono- and bivalentes: Mg^{2+} and Na^{+}) and phenotypes of Lipid A (hexa-, penta- and tetraacilated) of two different Gram-negative bacterias (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*) have been tested in order to characterize the membranes and its properties. Validation for model systems included the appropriate description of area per lipid, order parameter, spatial chemical group distribution and membrane solvation and structure as a function of temperature variation. Moreover, our findings show that Lipid A bilayers undergo from a lamellar to non-lamellar arrangement in the presence of monovalent ions. This is due to the inability of these ions to crosslink phosphate groups from neighboring Lipid A units. Our findings support two dominant aspects governing Lipid A bilayer membrane assembly: the shape of Lipid A units (conical vs cylindrical) and the ability of the counter ion to crosslink between different phosphate groups. Analysis of simulated trajectories do not support quantitatively the experimental proposition that correlates the tilt angle between the glucosamines rings of Lipid A and the membrane plane with acyl chain phenotypical variation.

Keywords: Lipids. Endotoxicity. Computer Simulation. Supramolecular Structure.

Lista de Figuras

Título	Página
Figura 1.1: Representação de bastões de um Lipídio A com as suas regiões hidrofóbicas (cadeias aciladas), semipolar (grupos alcoóis, amino e ésteres) e polares (açúcares e grupos fosfato) indicadas. Átomos de hidrogênio representados na cor branca, de oxigênio em vermelho; de fósforo em bronze; carbono em verde e nitrogênio em azul, respectivamente.	15
Figura 1.2: Estrutura geral de um glicerofosfolipídio e seus substituintes mais comuns e carga total em pH = 7 (Nelson e Cox, 2008).	16
Figura 1.3: Figura ilustrativa do modelo de mosaico fluido demonstrando a complexa composição de uma membrana lipídica [Nelson e Cox, 2008].	17
Figura 1.4: Movimentos individuais de lipídios em bicamadas. (a) Difusão lateral da ordem de $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$. (b) Movimento de flip-flop em bicamadas com duração de dias (forma não-catalizada) [Nelson e Cox, 2008].	19
Figura 1.5: Relação entre o formato do lipídio (de comprimento de cadeias alquiladas (L) e área da cabeça (A)) e as diferentes formas de agregação possível: (a) agregado esférico; (b) agregado cilíndrico e (c) agregado planar. A estimativa do valor de parâmetro de empacotamento está indicada na última coluna.	20
Figura 1.6: Representação de três possíveis formas de agregação de membranas lipídicas em solução aquosa e sua relação com a estrutura primária do lipídio formador da macroestrutura (a) vesículas (b) bicamadas e (c) vesículas. [Nelson e Cox, 2008].	21
Figura 1.7: Mudança de fase em membranas lipídicas sobre influência da temperatura. No topo da imagem membrana em estado paracristalino e na parte inferior membrana em fase fluida [Nelson e Cox, 2008].	22
Figura 1.8: Esquema da disposição dos lipídios em membranas em diferentes fases. Da esquerda para a direita: L_{β} (fase gel ordenada), $L_{\beta'}$ (fase gel inclinada), $P_{\beta'}$ (fase <i>ripple</i>) e L_{α} (fase líquido-cristalina) [Lipowsky e Sackmann, 1995].	23
Figura 1.9: (Topo) Caracterização da transição de fase em membranas lipídicas através de medidas de absorção de calor. Período de pré-transição fase indicado no gráfico. Estrutura da membrana em estado paracristalino (azul) e conformação <i>trans</i> das ligações carbono - carbono indicadas. Estrutura da membrana em estado fluido (rosa) e conformações <i>gauches</i> adotadas nas ligações carbono – carbono.	24
Figura 1.10: Esquema geral de uma molécula de LPS. Os grupos básicos da estrutura estão identificados na parte de baixo da figura. As diferentes regiões também estão indicadas na figura: Lipídio A, Núcleo Oligossacarídico (interno e externo) e Antígeno O. Na parte de cima, está a classificação do LPS de acordo com a presença de cada subunidade também está destacada: R (rugoso), SR (semirugoso) e L (liso). (Adaptado de Pupo e Hardy, 2009).	26
Figura 1.11: Estrutura dos quimiotipos de Lipídios A mais comuns de cada bactéria Gram-negativa. Os números na parte de inferior em cada quadro indicam o	29

comprimento das cadeias lipídicas. A atividade endotóxica de cada lipídio está indicada, de maneira qualitativa, pelo sinal de positivo [Erridge <i>et al</i> , 2002].	
Figura 3.1: a) Condições periódicas de fronteira 2D: as partículas que se movem fora da caixa de simulação são substituídas por uma equivalente proveniente de uma imagem da caixa. 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, dentro da própria caixa ou nas caixas vizinhas [Allen, 2004].	35
Figura 3.2: Representação dos termos ligados compõem a função de energia potencial em mecânica molecular. Os átomos em amarelo é um exemplo do termo de ligação, os átomos em verde representam o ângulo de ligação e os átomos em vermelho o tempo de ângulo diedro na molécula.	38
Figura 4.1: Estrutura química da molécula de Lipídio A (a) hexa- (b) penta- e (c) tetraacilado.	44
Figura 4.2: Representação de uma caixa de simulação de uma bicamada de Lipídio A de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pentaacilado tendo o Mg^{2+} como contraíon. Os íons estão representados por esferas de cor roxa, as moléculas de água por esferas de <i>van der Waals</i> e os lipídios por bastões. O instantâneo da imagem é do primeiro nanosegundo de simulação.	45
Figura 4.3: Representação bidimensional do raio r e Δr para o cálculo de $g_{ij}(r)$ para a partícula central i em relação às partículas j (fonte: [http://www.compsoc.man.ac.uk/~lucky/Democritus/Theory/rdf.html]).	50
Figura 4.4: (b) Relação entre cada esfera de coordenação do gráfico bidimensional com os picos do gráfico para um fluido monoatômico (fonte: [Ziman, 1979]).	50
Figura 4.5: Principais definições envolvidas no cálculo do parâmetro de ordem S_{CD} em cadeias alifáticas de lipídios (fonte: [Petrache <i>et al</i> , 1999]).	52
Figura 5.1.1: Energia potencial (kJ/mol) das bicamadas de Lipídio A penta- e hexaaciladas tendo o Na^+ e o Mg^{2+} como contraíons.	55
Figura 5.1.2: Área por cabeça de Lipídio A (nm^2) das membranas hexa- e pentaaciladas tendo Na^+ e Mg^{2+} como contraíons	56
Figura 5.1.3: Estrutura final das membranas de Lipídio A hexa- e pentaaciladas contendo Mg^{2+} (superior) e estruturas contendo Na^+ como contraíons (inferior). O instante de tempo da simulação correspondente a estrutura está indicada em cada figura. As membranas contendo o íon Na^+ (nahex_300 e napent_300) foram representadas por cortes na região da membrana e apenas a região contendo os lipídios foi reproduzida.	57
Figura 5.1.4: Ângulo de inclinação dos anéis de glucosamina do Lipídio A hexa- e pentacilado tendo o Mg^{2+} como contraíon em relação ao plano da membrana. O ângulo foi medido durante os últimos 50 ns de trajetória equilibrada.	59
Figura 5.1.5: Frequência normalizada dos ângulos de inclinação entre as glucosaminas e o plano da membrana nas bicamadas de Lipídio A hexa- e pentaaciladas contendo o íon Mg^{2+} .	59
Figura 5.1.6: Razão entre o raio de giro dos grupos terminais das cadeias aciladas (CH_3) e dos anéis de glucosaminas de Lipídio A hexa- e pentaacilados tendo o Na^+ e o Mg^{2+} como contraíons. As médias foram feitas sobre todos os lipídios da bicamada e nos últimos 50ns de trajetória equilibrada.	60
Figura 5.1.7: Perfis de densidades parciais de número (nm^{-3}) ao longo do eixo Z de	62

alguns grupos químicos selecionados para as membranas de Lipídio A contendo Na^+ e Mg^{2+} . O cálculo foi realizado nos últimos 50 ns simulados de trajetória equilibrada de cada simulação.	
Figura 5.1.8: Funções de distribuição radial do par Íon – O (H_2O) para as bicamadas de Lipídio A hexa- e pentaaciladas contendo os íons Na^+ e Mg^{2+} . Os gráficos foram feitos para os últimos 50 ns de trajetória equilibrada.	64
Figura 5.1.9: Funções de distribuição radial do par P - Íon para as bicamadas de Lipídio A hexa- e pentaaciladas contendo os íons Na^+ e Mg^{2+} . Os gráficos foram feitos para os últimos 50 ns de trajetória equilibrada.	65
Figura 5.1.10: Indicação das cadeias <i>sn-1</i> , <i>sn-2</i> e <i>sn-3</i> na molécula de Lipídio A. Entre parênteses o número de átomos de carbono incluídos para análise em cada cadeia.	66
Figura 5.1.11: Parâmetro de ordem médio para os átomos das cadeias aciladas do Lipídio A em cada simulação. A propriedade foi calculada para os últimos 50 ns de trajetória equilibrada.	67
Figura 5.1.12: Freqüência não-normalizada dos ângulos de inclinação do Lipídio A hexa- e pentaacilado contendo íons Na^+ e Mg^{2+} em relação ao eixo Z. O ângulo foi medido para os últimos 50 ns de cada simulação	69
Figura 5.2.1: Conformação do Lipídio A e relação com sua endotoxicidade: (A) altamente endotóxico; (B) endotóxico; (C), (D) e (E) são inativos. [Seydel <i>et al</i> , 2000].	71
Figura 5.2.2: Energia potencial (kJ/mol) das membranas de Lipídio A hexa-, penta- e tetraaciladas contendo íons Na^+ e Mg^{2+} ao longo de toda a trajetória.	72
Figura 5.2.3: Área por cabeça (nm^2) para das membranas de Lipídio A hexa-, penta- e tetraaciladas contendo íons Na^+ e Mg^{2+} ao longo de toda a trajetória	73
Figura 5.2.4: Estrutura final das bicamadas de Lipídio A hexa-, penta- e tetraaciladas contendo íons Na^+ e Mg^{2+} . A membrana <i>ecoli_namp300</i> foi representada por um corte no eixo Z onde a maioria dos Lipídios A estavam concentrados. O tempo correspondente a estrutura representada está indicado entre parênteses.	75
Figura 5.2.5: Perfis de densidades parciais (kg/m^3) de massa das membranas Lipídio A hexa-, penta- e tetraaciladas contendo íons Na^+ e Mg^{2+} . O perfil foi calculado nos últimos 70 ns de trajetória equilibrada de cada membrana.	77
Figura 5.2.6: Estrutura final da membrana de Lipídio A tetraacilado contendo íons Mg^{2+} . A linha marrom indica uma posição do eixo Z onde a densidade de moléculas de água (<i>van der Waals</i>) co-existe com a do núcleo hidrofóbico da membrana, sem necessariamente haver uma grande quantidade de moléculas de água dentro desse núcleo como indicado no perfil de densidade da membrana.	78
Figura 5.2.7: Indicação das cadeias <i>sn-1</i> , <i>sn-2</i> , <i>sn-3</i> e <i>sn-4</i> nas variações fenotípicas de Lipídio A. A esquerda temos o hexaacil Lipídio A de <i>E. coli</i> e a direita o tetraacil Lipídio A de <i>P. aeruginosa</i> .	79
Figura 5.2.8: Parâmetros de ordem dos átomos de deutério para as cadeias aciladas das membranas Lipídio A hexa-, penta- e tetraaciladas contendo íons Na^+ e Mg^{2+} . A análise foi realizada nos últimos 70 ns de trajetória equilibrada de cada membrana.	80
Figura 5.2.9: Transição de fase de membranas de Lipídio A de <i>E. coli</i> [Gutsmann <i>et al</i> , 2000]. A faixa de temperatura de transição está indicada em vermelho.	81

Figura 5.2.10: Funções de distribuição radial entre o íon e o átomo de oxigênio da água para as membranas Lipídio A hexa-, penta- e tetraaciladas contendo íons Na^+ e Mg^{2+} . A análise foi realizada nos últimos 70 ns de simulação.	83
Figura 5.2.11: Funções de distribuição radial entre o íon e o átomo de fósforo do grupo fosfato para as membranas Lipídio A hexa-, penta- e tetraaciladas contendo íons Na^+ e Mg^{2+} . A análise foi realizada nos últimos 70 ns de simulação.	85
Figura 5.2.12: Razão entre os raios de giro dos grupos metis terminais das cadeias aciladas e dos anéis de glucosamina das unidades de membranas Lipídio A hexa-, penta- e tetraaciladas contendo íons Na^+ e Mg^{2+} . As médias foram calculadas sobre todas as moléculas de lipídio da bicamada nos últimos 70 ns de simulação.	87
Figura 5.2.13: (a) Ângulo de Inclinação entre os anéis de glucosamina do Lipídio A e o plano da membrana. A propriedade foi medida nos últimos 70 ns de cada simulação. (b) Ângulo de inclinação de algumas espécies de Lipídio A medidos por radiação de infravermelho polarizada [Seydel et al, 2003].	88

Lista de Tabelas

Título	Página
Tabela 1.1: Valores de coeficiente de difusão lateral de lipídios [$\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$] em membranas lipídicas medidas através de espectroscopia de fluorescência [Máchan e Hof, 2010]. A temperatura ($^{\circ}\text{C}$) da medida está indicada entre parênteses. O suporte da bicamada lipídica está indicada pelos superescritos ^(m) mica ou ^(q) quartzo.	18
Tabela 4.1 – Relação das simulações computacionais realizadas neste trabalho com especificação do tipo de contra-íon, estrutura química do Lipídio A na bicamada, temperatura (K), tempo de simulação (ns) e sigla para identificação da simulação.	46
Tabela 5.1.1: Valores médios e desvio-padrão para a razão entre os raios de giro $\text{CH}_3/\text{NAc-Glc}$ para os quimiotipos hexa- e pentacilados contendo íons Mg^{2+} e Na^+ calculados nos últimos 50 ns de simulação.	61
Tabela 5.1.2: Números de coordenação dos pares Ion – P e Ion – O (H_2O) para as membranas de quimiotipos penta- e hexaacilados contendo os íons Mg^{2+} e Na^+ .	66
Tabela 5.2.1: Valor médio com desvio-padrão para a área por cabeça de Lipídio A (nm^2) dos sistemas lamelares simulados nessa etapa do estudo. Os valores foram calculados para os últimos 50 ns da trajetória equilibrada.	74
Tabela 5.2.2: Valores médios com os seus respectivos desvios-padrões para os parâmetros de ordem de deutério das membranas simuladas. Os resultados estão separados por espécie de bactéria.	81
Tabela 5.2.3: Números de coordenação dos pares Ion – P e Ion – O (H_2O) para as membranas de <i>E. coli</i> quimiotipos hexaacilado e mono- e difosforilado, além da membrana de <i>P. aeruginosa</i> tetraacilada.	86
Tabela 5.2.4: Valores médios e desvio-padrão para a razão entre os raios de giro $\text{CH}_3/\text{NAc-Glc}$ para os quimiotipos de <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i> contendo íons Mg^{2+} e Na^+ calculados nos últimos 50 ns de simulação.	88

Lista de Siglas e Abreviaturas

Sigla	Significado
D_{lat}	Difusão Lateral de Lipídios
L_{α}	Fase líquido-cristalino
L_{β}	Fase gel ordenada
$L_{\beta'}$	Fase gel inclinada
P_{β}	Fase <i>ripple</i>
T_m	<i>Transition Melting</i> (Temperatura de Transição de Fase)
LPS	Lipopolissacarídeo
KDO	Ácido 3-Deoxi-D-manno-Oct-2-ulosônico
DM	Dinâmica Molecular
NVT	Sigla para o <i>ensemble</i> canônico
$N_{\mu}T$	Sigla para o <i>ensemble</i> isotérmico-isobárico
PME	<i>Particle Mesh Ewald</i>
FT-IR	<i>Fourier Transformation – Infrared</i> (Infravermelho com Transformada de Fourier)
DLPC	1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfolina
DOPC	1,2-di oleoil-sn-glicero-3-fosfolina
DSPC	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfolina
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina
CMC	Concentração Micelar Crítica
A_{pl}	Área por cabeça de lipídio
S_{CD}	Parâmetro de ordem de deutério

Sumário

	Seção	Página
Resumo		4
Abstract		5
Lista de Figuras		6
Lista de Tabelas		10
Lista de Abreviaturas		11
1. Introdução		14
1.1 Lipídios e Membranas Biológicas		14
1.1.1 Lipídios		14
1.1.2 Membranas Biológicas		17
1.1.3 Formas de Agregação		20
1.1.4 Fases das Membranas		22
1.1.5 Transições de Fase em Membranas Lipídicas		23
1.2 Lipopolissacarídeos		25
1.2.1 Estrutura e Composição		25
1.2.1.1 Antígeno O		26
1.2.1.2 Núcleo de Oligossacarídeos		26
1.2.1.3 Lipídio A		27
1.3 Lipídio A: Endotoxicidade, Estrutura Química e Importância		27
2. Hipótese e Relevância		30
3. Fundamentos Teóricos		31
3.1 Método de Dinâmica Molecular (DM)		32
3.2 Aspectos Importantes Envolvendo Simulações de Dinâmica Molecular		33
3.3 Campos de Força		37
3.3.1 Termo de Estiramento de Ligação		38
3.3.2 Termo de Flexão de Ângulo de Ligação		39
3.3.3 Termos Torsionais		40
3.3.4 Torsões Impróprias e Movimentos de Flexão Fora do Plano		41
3.3.5 Termo de <i>Lennard-Jones</i>		41
3.3.6 Termo de Interação Eletrostática		42
4. Metodologia		43
4.1. Preparação dos Sistemas		43
4.2 Protocolos de minimização de energia e simulação computacional por dinâmica molecular		46
4.3 Análises dos Dados das Simulações		48
4.3.1 Área por cabeça de Lipídio A (A_{pl})		48
4.3.2 Função de Distribuição Radial de Pares		49
4.3.3 Parâmetros de Ordem de Deutério		51
4.3.4 Perfis de Densidade Parcial de Massa		52
4.3.5 Ângulo entre as glucosaminas e o plano da membrana		53

4.3.6. Razão entre o raio de giro das glucosaminas e grupos metil (-CH ₃) terminais.	53
5 Resultados e Discussão	55
5.1 Mudanças na Forma de Agregação	55
5.1.1 Energia Potencial	55
5.1.2 Área por cabeça de Lipídio A	56
5.1.3 Ângulo de Inclinação e Raio de Giro dos Lipídios A na Bicamada.	58
5.1.4 Densidades Parciais	61
5.1.5 Funções de Distribuição Radial	63
5.1.5.1 Função de Distribuição Radial de Pares: Íon – O (H ₂ O).	63
5.1.5.2 Função de Distribuição Radial de Pares: Íon – P.	64
5.1.6 Parâmetros de Ordem do Deutério	66
5.1.7 Orientação das Moléculas de Lipídio A nos Agregados	69
5.2 Efeito do Cátion na Forma de Agregação de Membranas de Lipídio A de <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. coli</i> .	71
5.2.1 Energia Potencial	72
5.2.2 Área por cabeça do Lipídio A	73
5.2.3 Perfil de Densidade	76
5.2.4 Parâmetros de Ordem do Deutério	79
5.2.5 Funções de Distribuição Radial	82
5.2.5.1 Função de Distribuição Radial de Pares: Íon – O (H ₂ O).	82
5.2.5.2 Função de Distribuição Radial de Pares: Íon – P.	84
5.2.6 Ângulo de Inclinação e Raio de Giro dos Lipídios A na Bicamada.	86
7. Apêndice 92	
8. Referências Bibliográficas 97	
9. Atividades de pesquisa desenvolvidas durante o Doutorado. 107	

1. Introdução

1.1) Lipídios e Membranas Biológicas

1.1.1) Lipídios

Os lipídios, juntamente com as proteínas, os ácidos nucleicos e os açúcares, formam uma das quatro classes básicas para construção das moléculas biológicas [Nelson e Cox, 2008]. Existem cerca de 30000 estruturas químicas (incluindo isômeros), classificadas como lipídios, ocorrendo naturalmente. Os lipídios possuem papéis como armazenador de energia, sinalizador de processos químicos e integrantes de membranas celulares [Fahy *et al*, 2009]. Podemos citar como exemplo de lipídios as gorduras, óleos, algumas vitaminas e hormônios e componentes de proteínas de membranas [Voet e Voet, 2011].

Em geral, os lipídios são moléculas anfifílicas compostas de um domínio hidrofóbico, uma estrutura semipolar e uma cabeça polar como podem ser visto na Figura 1.1 [Nelson e Cox, 2008]. O domínio hidrofóbico é normalmente composto por cadeias de ácidos graxos de extensão variável, essas cadeias são ligadas a uma estrutura semipolar, mais comumente moléculas de esterol ou glicerol. As hidroxilas desses dois grupos tendem a interagir mais fortemente com a cabeça do lipídio ou outros grupos polares. A cabeça do lipídio normalmente é formada por um grupo polar e ligada quimicamente a esse grupamento semipolar.

Pela grande quantidade de lipídios existentes, com uma grande variedade de grupos químicos funcionais e funções no organismo, existem diversas formas de classificar os lipídios [Fahy *et al*, 2009b]. A forma mais adotada nos livros textos de bioquímica é classificá-los pelas funções exercidas nos organismos vivos. Nesse caso, temos lipídios desenvolvendo funções de armazenamento de energia, constituinte de membranas, co-fatores e até pigmentos [Nelson e Cox, 2008; Voet e Voet, 2011].

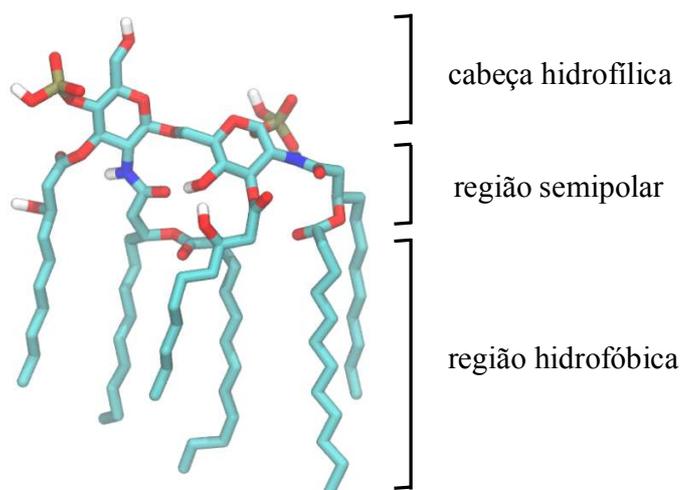
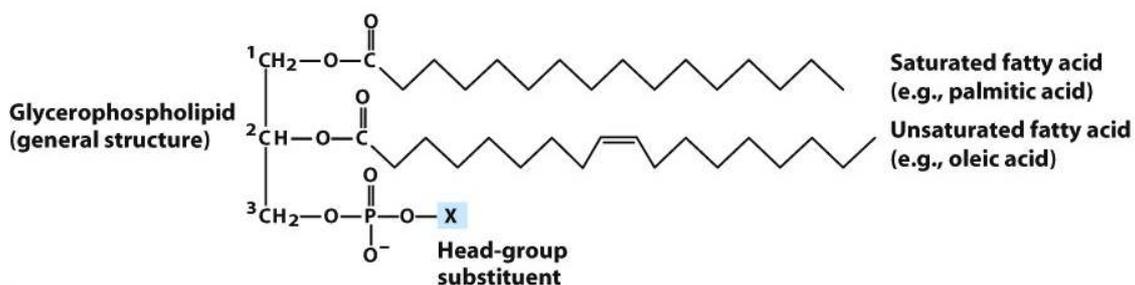


Figura 1.1: Representação de bastões de um Lipídio A com as suas regiões hidrofóbicas (cadeias aciladas), semipolar (grupos alcoóis, amino e ésteres) e polares (açúcares e grupos fosfato) indicadas. Átomos de hidrogênio representados na cor branca, de oxigênio em vermelho; de fósforo em bronze; carbono em verde e nitrogênio em azul, respectivamente.

Enumerando brevemente alguns lipídios em cada um dos seus papéis citados, podemos citar os ácidos graxos e triacilgliceróis como armazenadores de energia localizados em grande quantidade nos seres vivos; as vitaminas A, E, D e K estão presentes no metabolismo de animais; as prostaglandinas são hormônios potentes; além de lipídios contendo ligações duplas conjugadas que são encontrados como pigmentos em flores e frutas [Nelson e Cox, 2008, Voet e Voet, 2011].

Em se tratando do papel estrutural desenvolvido por lipídios, eles são desempenhados por lipídios com cabeças polares e cadeias não-polares arranjados de maneiras diversas (ver seção a seguir) na forma de membranas. Os mais abundantes são os glicerofosfolipídios (lipídios com a região hidrofóbica formada por cadeias de ácidos graxos ligadas a gliceróis e cabeça contendo grupos fosfato), galactolipídios e sulfolipídios (de estrutura semelhante aos glicerofosfolipídios, mas sem a presença de fosfatos), archeatetraéteres lipídios (com cadeias de ácidos graxos apresentam grupos gliceróis no seu final), esfingolipídios (uma cadeia de ácidos graxos é ligada a uma amina), esfingosina e esteróis (sistemas com quatro anéis hidrocarbonetos fundidos) [Nelson e Cox, 2008].

Os lipídios que constituem as membranas podem ter unidades de açúcar ligadas a eles, são os chamados glicolipídios. Na figura a seguir, vemos as estruturas básicas de alguns lipídios que formam membranas:



Name of glycerophospholipid	Name of X	Formula of X	Net charge (at pH 7)
Phosphatidic acid	—	— H	- 1
Phosphatidylethanolamine	Ethanolamine	— CH ₂ —CH ₂ —NH ₃ ⁺	0
Phosphatidylcholine	Choline	— CH ₂ —CH ₂ —N ⁺ (CH ₃) ₃	0
Phosphatidylserine	Serine	— CH ₂ —CH—NH ₃ ⁺ COO ⁻	- 1
Phosphatidylglycerol	Glycerol	— CH ₂ —CH—CH ₂ —OH OH	- 1
Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate	<i>myo</i> -Inositol 4,5-bisphosphate		- 4
Cardiolipin	Phosphatidyl-glycerol	— CH ₂ CHOH CH ₂ —O—P(=O)(O ⁻)—O—CH ₂ CH—O—C(=O)—R ¹ CH ₂ —O—C(=O)—R ²	- 2

Figura 1.2: Estrutura geral de um glicerofosfolípido e seus substituintes mais comuns e carga total em pH = 7 (Nelson e Cox, 2008).

1.1.2) Membranas Biológicas

Membranas biológicas, compostas majoritariamente por lipídios, são estruturas essenciais para os organismos vivos devido ao papel de compartimentalização e regulação do transporte entre o interior e o exterior da célula e organelas. As membranas biológicas são estruturas complexas que abrangem uma grande escala de tamanhos e de movimentos em unidades bastante variáveis de magnitude e tempo. O modelo mais adotado para estudar o comportamento de membranas biológicas é o chamado de modelo de mosaico fluido [Singer e Nicolson, 1972]. Esse modelo considera as membranas biológicas como um líquido bidimensional onde proteínas e lipídios difundem de maneira e velocidade variada. As proteínas só não difundem nessa estrutura, caso estejam associadas com outros componentes celulares. Esse modelo emergiu a partir de medidas experimentais de fusão de células (Frye e Edidin, 1970) e consegue descrever também as principais características das membranas biológicas como a permeabilidade seletiva para moléculas, seu papel estrutural de compartimentalização celular e sua composição complexa de lipídios, peptídeos e proteínas.

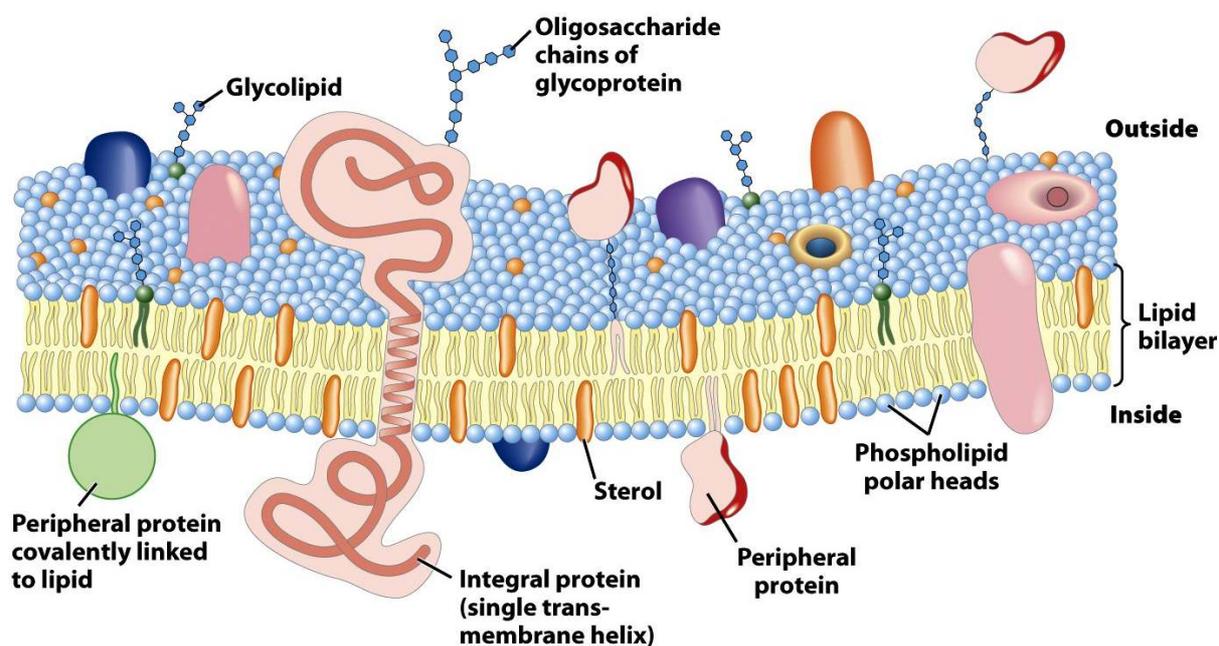


Figura 1.3: Figura ilustrativa do modelo de mosaico fluido demonstrando a complexa composição de uma membrana lipídica [Nelson e Cox, 2008].

No modelo, a bicamada lipídica tem um papel duplo: é o solvente para as proteínas de membrana e ainda uma barreira de permeabilidade. Proteínas de membrana são livres para difundir lateralmente na matriz lipídica, exceto se estiverem ancoradas na membrana por alguma

interação especial. Os lipídios também podem se difundir no plano da membrana, num movimento chamado de difusão lateral. Alguns valores típicos de difusão lateral de lipídios estão indicados na Tabela 1.1 a seguir [Máchan e Hof, 2010]. A propriedade mostra-se dependente não somente da forma de agregação da membrana, composição e temperatura da medida.

Tabela 1.1: Valores de coeficiente de difusão lateral de lipídios [$\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$] em membranas lipídicas medidas através de espectroscopia de fluorescência [Máchan e Hof, 2010]. A temperatura ($^{\circ}\text{C}$) da medida está indicada entre parênteses. O suporte da bicamada lipídica está indicada pelos superescritos ^(m) mica ou ^(q) quartzo.

Composição da Membrana	D_{lat} [$\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$]
Vesículas Gigantes Unilamelares	
DLPC (23)	4.4 ± 0.9 [Schwille <i>et al</i> , 1999]
DOPC/SM/Colesterol 2/2/1 (20)	6.1 ± 0.5 [Kahya e Schwille, 2006]
DOPC/DSPC 1/1 (20)	6.5 ± 0.4 [Scherfeld <i>et al</i> , 2003]
DLPC/DPPC 3/2 (25)	5.1 ± 0.4 [Scherfeld <i>et al</i> , 2003]
POPC (25)	7 ± 3 [Gielen <i>et al</i> , 2009]
Bicamadas Lipídicas em Suportes	
^(m) DOPC (25)	4 ± 0.4 [Benda <i>et al</i> , 2003]
^(m) DOPC/Colesterol 7/3 (25)	1.1 ± 0.2 [Benda <i>et al</i> , 2003]
^(q) DLPC (23)	2.6 ± 0.2 [Zhang e Granick, 2005]

O movimento de difusão lateral de lipídios não-catalizado ocorre nas escalas de velocidade indicadas na Tabela 1.1 e é sensivelmente mais rápido que o movimento de *flip-flop* (Figura 1.4). Onde um lipídio se move de uma camada para outra da membrana. Esse movimento de *flip-flop* ocorre na ordem de diversas horas. Essa grande diferença de tempo associado a cada movimento é um importante fator para garantia da preservação da assimetria da membrana [Tresset, 2009].

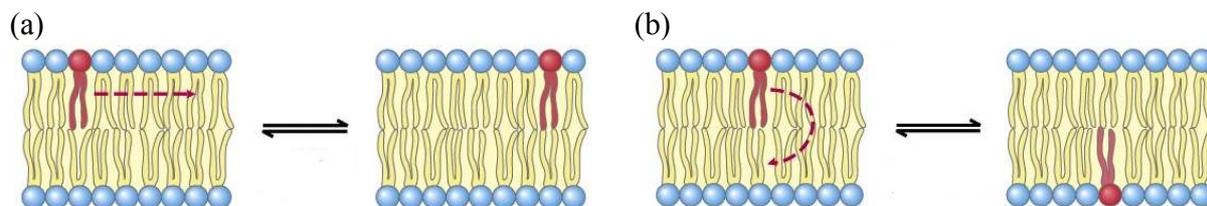


Figura 1.4: Movimentos individuais de lipídios em bicamadas. (a) Difusão lateral da ordem de $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$. (b) Movimento de flip-flop em bicamadas com duração de dias (forma não-catalizada) [Nelson e Cox, 2008].

Observando a Figura 1.3 nota-se, mesmo de maneira qualitativa, que a composição variável de uma membrana biológica frequentemente as tornam bastante complexas para estudos físicos. Apesar disso, o esqueleto principal de uma membrana é composto por lipídios que servem como uma matriz fluida para a inclusão e agregação de outras moléculas. Então, a natureza ordenada de bicamadas lipídicas é um sistema modelo ideal para estudar a estrutura e dinâmica das membranas. Apesar das membranas biológicas serem sistemas dinâmicos, além de compostas de vários tipos de lipídios, é possível aproximar, muitas vezes de maneira precisa, o estudo de membranas como sistemas de bicamadas de um único tipo de lipídio e algumas moléculas ancoradas nela. Basicamente esse é o arranjo adotado em muitas simulações computacionais e arranjos experimentais.

De acordo com o livro texto *Biochemistry* por Lubert Stryer [Stryer, 2009], as diversas membranas biológicas apresentam as seguintes características:

- 1) As membranas consistem basicamente de lipídios e proteínas numa razão de massas que varia de 1:4 até 4:1. Algumas membranas contêm também carboidratos que são ligados as proteínas e lipídios. A espessura das membranas lipídicas variam de 6 até 10 nm.
- 2) Os lipídios das membranas são moléculas relativamente pequenas com porções hidrofóbicas e hidrofílicas que se arranjam espontaneamente formando agregados que são barreiras para o fluxo de moléculas polares.
- 3) As proteínas que se ligam as membranas, conferem as mesmas funções específicas como bombas, canais, receptores e enzimas. Proteínas de membranas são normalmente embutidas em bicamadas lipídicas.
- 4) Membranas são estruturas não-covalentes. Os constituintes das membranas, proteínas e lipídios, são mantidos juntos por muitas interações não-covalentes e de maneira cooperativa.
- 5) Membranas são estruturas fluidas e assimétricas. A fluidez se deve a difusão de lipídios no plano da membrana.

1.1.3) Formas de Agregação

As membranas lipídicas podem se agregar numa grande variedade de estruturas em formatos esféricos, de poliedros e vesículas. O processo de organização molecular é governado por um complexo balanço entre interações atrativas e repulsivas entre as moléculas de lipídios numa monocamada [Frolov *et al*, 2011]. Monocamadas lipídicas, devido a sua natureza anfifílica, assumem uma curvatura tendo como base a geometria do lipídio. A influência do formato do lipídio na forma de agregação da membrana é determinante e pode ser estimada através de um parâmetro de empacotamento P (Israelachvili *et al*, 1976). Apenas considerações geométricas são necessárias para se estabelecer as relações entre um lipídio de área de cabeça (A), cadeias alquiladas de tamanho (L) e volume (V) e a estrutura do macroagregado.

Em agregados esféricos (Figura 1.5a) formados a partir da organização de N lipídios, a razão entre o volume do agregado ($(4/3)\pi R^3 = NV$) e a área de superfície ($4\pi R^2 = NA$) podemos estimar que o valor do raio do agregado, deve ser: $R = 3V/A$. Se o tamanho das cadeias alquiladas for maior ou igual o tamanho do raio do agregado ($L \geq R$), chega-se numa fórmula para o parâmetro de empacotamento ($P : V/LA$) com valor menor que $1/3$ característico para agregados esféricos.

Repetindo-se esse raciocínio para agregados cilíndricos (Figura 1.5b) chega-se a uma fórmula para o parâmetro de ordem de P : $V/LA \leq 1/2$. Considerando os limites para o parâmetro de empacotamento imposto para agregados esféricos, tem-se que para agregados cilíndricos: $1/3 \leq P \leq 1/2$. De maneira semelhante, estima-se que o valor de P para agregados planares situa-se entre $1/2$ e 1 . Essas conclusões estão resumidas na Figura 1.5 a seguir.



Figura 1.5: Relação entre o formato do lipídio (de comprimento de cadeias alquiladas (L) e área da cabeça (A)) e as diferentes formas de agregação possível: (a) agregado esférico; (b) agregado cilíndrico e (c) agregado planar. A estimativa do valor de parâmetro de empacotamento está indicada na última coluna.

Do ponto de vista experimental, soluções aquosas de moléculas anfifílicas formam micelas (Figura 1.6a) num processo cooperativo, pelo qual o contato entre as cadeias hidrofóbicas e a água é minimizado, enquanto ocorre uma maior solvatação das cabeças polares dos lipídios. Como um grupo pequeno de moléculas anfifílicas não consegue minimizar o contato entre as cadeias hidrofóbicas e a água, a formação de micelas ocorre apenas se a concentração for superior a denominada concentração micelar crítica (CMC). Para moléculas de cadeias hidrofóbicas curtas, como o dodecil sulfato de sódio o valor de CMC é da ordem de 1 mM. Para lipídios biológicos, com mais de uma longa cadeia hidrofóbica, o CMC é geralmente da ordem de 10^{-6} M [Voet e Voet, 2011].

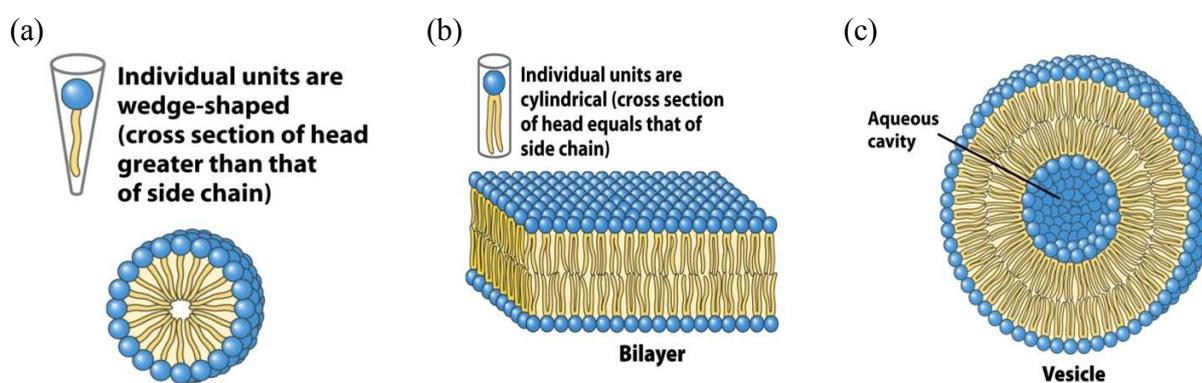


Figura 1.6: Representação de três possíveis formas de agregação de membranas lipídicas em solução aquosa e sua relação com a estrutura primária do lipídio formador da macroestrutura (a) vesículas (b) bicamadas e (c) vesículas. [Nelson e Cox, 2008].

Através da Figura 1.6 a é sugerido como de maneira qualitativa o formato do lipídio está relacionado ao tipo de agregado formado em solução aquosa. Lipídios com formato cilíndrico e seções de corte semelhantes para as cabeças polares e área das cadeias hidrofóbicas tendem a formar bicamadas (Figura 1.6 b) onde as regiões hidrofóbicas das moléculas formam uma região de contato entre cada camada e as cabeças polares estão em contato com as moléculas de água do exterior. Fosfolipídios formam rapidamente bicamadas estáveis ao serem adicionadas a soluções aquosas [Garret e Grisham, 1999].

A estrutura das bicamadas expõe as suas extremidades em contato com as moléculas do solvente originando interações desfavoráveis que são eliminadas através da reorganização da bicamada formando uma vesícula (Figura 1.6 c) [Nelson e Cox, 2008]. As vesículas possuem uma cavidade aquosa em seu interior. A natureza dessas vesículas é variável e dependente da composição do lipídio. Fosfolipídios podem formar vesículas unilamelares (uma única bicamada lipídica) chamada de lipossomas ou até vesículas multilamelares.

Influenciando o formato individual dos lipídios, especialmente os carregados, existem a temperatura, tipos e concentração dos íons, pH e quantidade de água [Hafez e Cullis, 2001; Fuller *et al*, 2003; Zimmerberg *et al*, 2006]. O aumento da temperatura provoca uma elevação na desordem das cadeias lipídicas, fazendo que as últimas ocupem assim um volume maior. O aumento do grau de hidratação na parte polar dos lipídios amplifica as repulsões laterais entre as cabeças dos lipídios, provocando assim um aumento na área por cabeça.

1.1.4) Fases das Membranas

Apesar da estrutura de uma bicamada lipídica ser estável, os lipídios que a constituem tem vários graus de liberdade para se movimentar. A estrutura e flexibilidade da membrana dependem dos tipos de lipídios presentes e muda com a temperatura (Figura 6.7). Abaixo das temperaturas fisiológicas, os lipídios das bicamadas estão num estado semi-sólido denominado de paracristalino. Acima das temperaturas fisiológicas as cadeias alquílicas adotam um maior movimento proveniente das rotações nas ligações carbono-carbono e as membranas são ditas em estado fluido. As diferenças de estado são facilmente observadas em lipossomas compostos de um único tipo de lipídio. Em membranas biológicas contendo vários tipos de lipídios e cadeias alquílicas a mudança de estado nas membranas ocorre de maneira gradual e numa certa faixa de temperatura [Nelson e Cox, 2008].

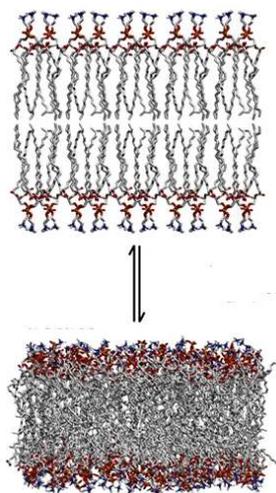


Figura 1.7: Mudança de fase em membranas lipídicas sobre influência da temperatura. No topo da imagem membrana em estado paracristalino e na parte inferior membrana em fase fluida [Nelson e Cox, 2008].

O estado paracristalino é denominado de fase gel. Nessa fase, as cadeias hidrofóbicas podem estar alinhadas ao eixo normal ao plano da membrana (L_{β}) ou inclinadas ($L_{\beta'}$) [MacKintosh, 2001]. Em algumas membranas a transição entre os estados paracristalino e fluido ocorre com a formação de uma fase transitória denominada de fase *ripple* ($P_{\beta'}$) [Carlson e Sethna, 1987; Rheinst *et al*, 2006]. O estado paracristalino é denominado de fase líquido-cristalino (L_{α}). A representação esquemática das cadeias hidrofóbicas para cada fase citada está indicada na Figura 6.8 a seguir.

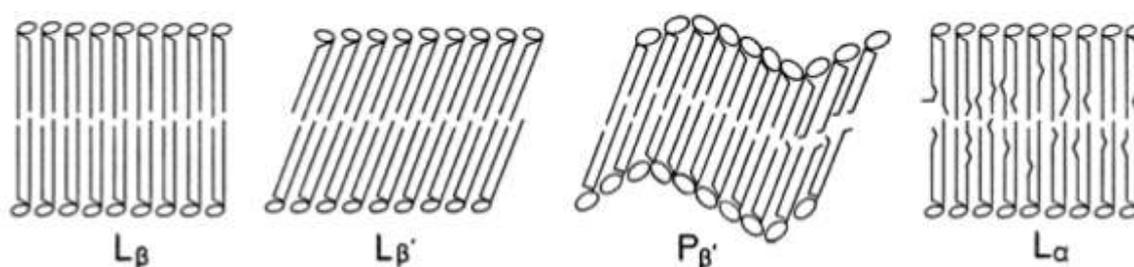


Figura 1.8: Esquema da disposição dos lipídios em membranas em diferentes fases. Da esquerda para a direita: L_{β} (fase gel ordenada), $L_{\beta'}$ (fase gel inclinada), $P_{\beta'}$ (fase *ripple*) e L_{α} (fase líquido-cristalina) [Lipowsky e Sackmann, 1995].

As membranas lipídicas tem suas estruturas bem caracterizadas por técnicas de espalhamento de raios-X e de nêutrons [Kucerka *et al*, 2005; Nagle e Tristam-Nagle, 2000]. Além dos movimentos moleculares individuais dos lipídios na membrana, as membranas podem apresentar movimentos coletivos também que podem variar entre ondulações de longo alcance ou flutuações [Bayerl, 2000]. Estes movimentos coletivos de lipídios são governados por movimentos térmicos e cobrem escalas de comprimento de \AA até μm . Esses movimentos coletivos podem influenciar as propriedades das membranas como permeabilidade e elasticidade [Paula *et al*, 1996].

1.1.5) Transições de Fase em Membranas Lipídicas

As mudanças no estado físico de membranas lipídicas ocorrem em intervalos limitados de temperatura, cujos valores são característicos para cada tipo de membrana. Essas mudanças no estado físico são transições de fase e os intervalos de temperatura em que essas transformações ocorrem são denominadas temperaturas de transição de fase (T_m – do inglês *transition melting*). As transições ocorrem com mudanças grandes na organização e movimento das cadeias hidrofóbicas.

No estado paracristalino, as ligações carbono – carbonos na cadeia lipídica adotam a conformação anti. As cadeias estão completamente estendidas e a área de superfície por lipídio é mínima e a largura da bicamada é máxima. Acima da temperatura de transição de fase (T_m), as cadeias lipídicas apresentam mobilidades intermediárias entre a fase sólida e líquida de alcanos [Garret e Grisham, 1999]. Nessa fase, as ligações carbono – carbono adotam conformações gauche. Por conta disso, a área de superfície por lipídio aumenta e a largura da bicamada diminui.

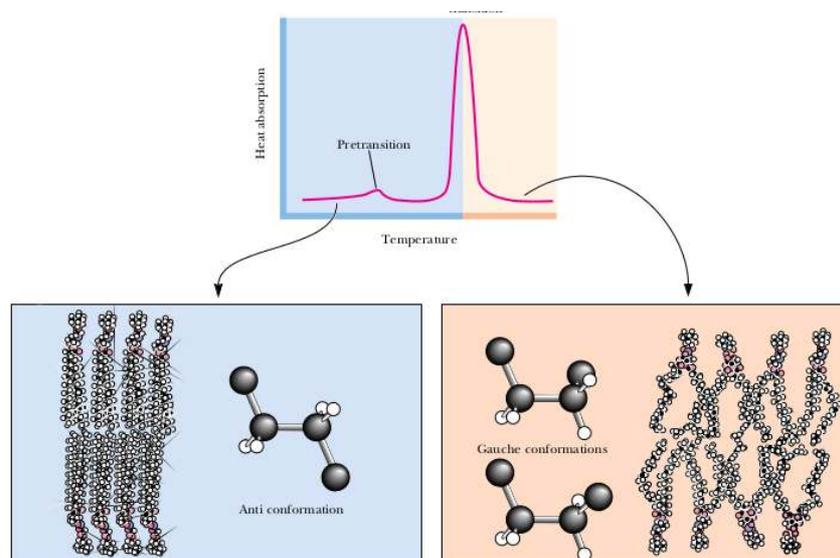


Figura 1.9: (Topo) Caracterização da transição de fase em membranas lipídicas através de medidas de absorção de calor. Período de pré-transição fase indicado no gráfico. Estrutura da membrana em estado paracristalino (azul) e conformação *trans* das ligações carbono - carbono indicadas. Estrutura da membrana em estado fluido (rosa) e conformações *gauches* adotadas nas ligações carbono – carbono.

As transições de fase em membranas lipídicas podem ser acompanhadas com medidas diretas por calorimetria e espectroscopia de infravermelho [Brandenburg e Seydel, 1990]. A transição de fase em membranas lipídicas é um fenômeno cooperativo, ou seja, os movimentos de alguns lipídios afetam os seus lipídios vizinhos e as moléculas todas começam a se comportar de forma concertada.

Entre as principais características de mudanças de fase em lipídios podemos citar [Garret e Grisham, 1999]:

1) As transições de fase são sempre endotérmicas, isto é, ocorrem com absorção de calor e aumento da temperatura.

- 2) Fosfolipídios apresentam temperaturas de transição características. T_m aumenta com o tamanho da cadeia do lipídio, diminui com o número de insaturações e é influenciado também pela natureza química do grupo de cabeça.
- 3) Para bicamadas puras de fosfolipídios a transição ocorre num intervalo de temperatura estreito.
- 4) Para bicamadas de membranas biológicas a transição de fases ocorre num intervalo de temperatura mais amplo do que para membranas puras. O intervalo de temperatura é dependente da composição da membrana.
- 5) Em algumas bicamadas lipídicas, a mudança nas conformações das cadeias lipídicas ocorre antes em temperaturas de 5° a 10° C abaixo da temperatura de transição de fase. Esse período é denominado de pré-transição de fase.
- 6) Mudanças de volume também estão associados a mudanças no estado físico das membranas lipídicas.
- 7) Transições de fase em membranas lipídicas são sensíveis a presença de outros solutos presentes na composição das membranas, como: cátions multivalentes, agentes solubilizadores de lipídios, proteínas e peptídeos.

1.2) Lipopolissacarídeos

A membrana externa de bactérias Gram-negativas é formada por uma complexa estrutura denominada de lipopolissacarídeos (LPS). Essa estrutura é composta de um lipídio (Lipídio A) ligado a um polissacarídeo constituído de longas cadeias de diferentes e repetidos açúcares característicos. Os açúcares das cadeias de polissacarídeos determinam como a bactéria reconhece substâncias estranhas e produz anticorpos contra eles. A região do LPS responsável por esse reconhecimento é denominado Antígeno O [Caroff e Karibian, 2003]. Ligando o Lipídio A e o Antígeno O existe um núcleo de oligossacarídeos. Por serem negativamente carregados, LPS conseguem estabilizar a presença de cátions na estrutura geral da membrana.

1.2.1) Estrutura e Composição

LPS são formados de três partes: Antígeno O, Núcleo de Oligossacarídeo e Lipídio A. A estrutura completa do LPS está esquematizada na figura a seguir (Figura 1.10).

1.2.1.1) Antígeno O

Essa parte do LPS é composta por polímero de açúcares. A região do Antígeno O é ligado ao núcleo de oligossacarídeos e é a parte mais externa do domínio do LPS. A composição do antígeno O varia para cada cepa. Por exemplo, para *E. coli* existem cerca de 160 estruturas diferentes de antígeno O [Raetz e Whitfield, 2002]. No entanto, para uma espécie como a *P. aeruginosa* é comum encontrar N-acil derivados de vários aminoaçúcares na composição do antígeno O, como: 6-deoxihexoaminas, 2-amino-2-deoxihexaurônico, 2,3-diamino-2,3-dideoxihexurônico, etc. A presença ou ausência do antígeno O determina se o LPS é considerado rugoso ou liso, respectivamente [Knirel *et al*, 2006].

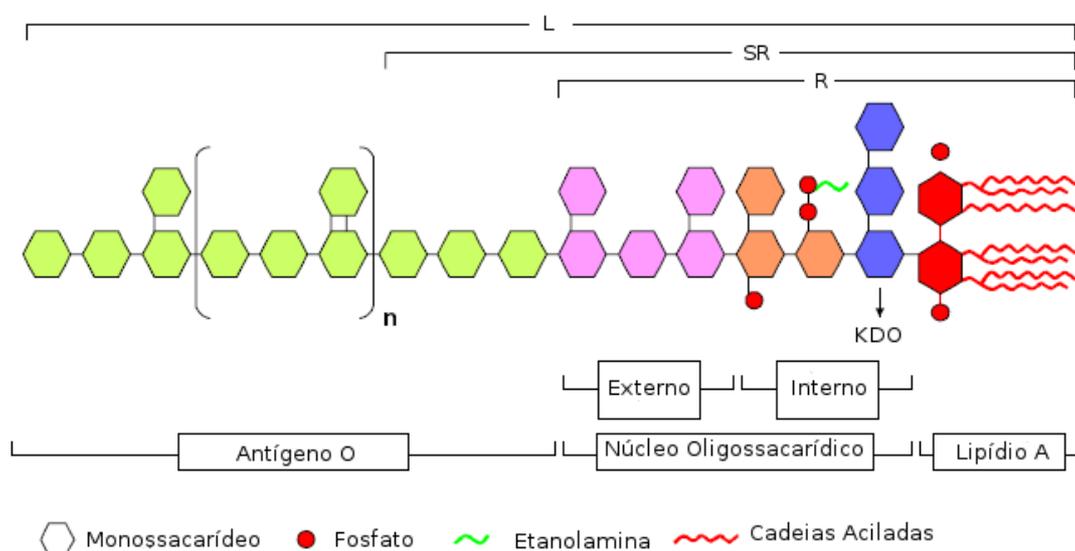


Figura 1.10: Esquema geral de uma molécula de LPS. Os grupos básicos da estrutura estão identificados na parte de baixo da figura. As diferentes regiões também estão indicadas na figura: Lipídio A, Núcleo Oligossacarídico (interno e externo) e Antígeno O. Na parte de cima, está a classificação do LPS de acordo com a presença de cada subunidade também está destacada: R (rugoso), SR (semirugoso) e L (liso). (Adaptado de Pupo e Hardy, 2009).

1.2.1.2) Núcleo de Oligossacarídeos

O núcleo de oligossacarídeos do LPS é uma cadeia curta de resíduos de açúcar. A sua composição é bem diversa. O núcleo de oligossacarídeos é ligado ao Lipídio A e, normalmente, é formado por açúcares como heptoses e o ácido 3-deoxi-D-mano-octulosônico (KDO). Em algumas bactérias esse núcleo apresenta grupamentos fosfatos, aminoácidos e etanolaminas. O

núcleo de oligossacarídeos 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. A partir, dos resíduos de KDO normalmente têm-se dois ou três resíduos de heptoses fosforiladas. O núcleo externo é feito basicamente de resíduos de hexoses, sendo as mais comuns: D-glicose, D-manose, D-galactose, etc.

1.2.1.3) Lipídio A

O lipídio é uma diglucosamina fosforilada com número variável de cadeias aciladas e de tamanho variável. Devido a sua importância neste trabalho, as suas principais características serão tratadas neste capítulo numa seção completamente dedicada a esta molécula.

1.3) Lipídio A: Endotoxicidade, Estrutura Química e Importância

O Lipídio A é a região do LPS que interage com o sistema imune do hospedeiro e provoca a resposta do organismo. Sendo a porção responsável do componente endotóxico do LPS, o Lipídio A provoca uma massiva inflamação e choque séptico levando até a morte em infecções causadas por bactérias Gram-negativas. O reconhecimento do Lipídio A pelo organismo se dá através de uma família de proteínas transmembrana chamada de *Toll-like receptors* [Underhill e Ozinsky, 2002]. Enquanto que as variações estruturais nas outras partes do LPS alteram o reconhecimento das bactérias por anticorpos do hospedeiro, modificações estruturais afetam a bioatividade do LPS. O LPS interage com um complexo receptor chamado CD14/TLR4/MD2 das células do hospedeiro, especialmente, macrófagos, células da pele e músculos, e promove a secreção de citosinas pró-inflamatórias, espécies reativas e peptídeos mediadores como o fator α de necrose de tumor [Rietschel *et al*, 1994]. Esses mediadores são capazes de atuar sozinhos ou de maneira sinérgica e provocar também efeitos semelhantes ao provocado pelas endotoxinas [Underhill e Ozinsky, 2002; Sigalov, 2012].

O Lipídio A é um dissacarídeo fosforilado com anéis de β -D-glucosamina-(1 \rightarrow 6)- α -N-glucosamina e com um número variável de cadeias aciladas. Sendo as últimas de tamanho variável de acordo com a cepa [Raetz *et al*, 2007]. A atividade biológica do Lipídio A é bastante dependente de seu número de cadeias aciladas, carga total e estrutura agregada supramolecular [Brandenburg *et al*, 2004].

Diferentes formas de agregação são assumidas pelo Lipídio A em função de condições ambientais, tais como nível de hidratação, temperatura, tipo e concentração dos cátions [Brandenburg e Wiese, 2004]. Acima da concentração micelar crítica o Lipídio A pode adotar diferentes estruturas como: lamelar, hexagonal (H_I e H_{II}) e cúbica (Q). Podendo ocorrer, inclusive, transições entre essas fases, através de variações da concentração e tipos de contraíons e dos valores de temperatura. Apesar de a fase lamelar ser a mais ativa biologicamente, as outras formas de agregação não são impossíveis de ocorrer. A fase lamelar é preferida em membranas com conteúdo de água de aproximadamente 60%. As fases não-lamelares ocorrem em concentrações de água superior a 60% da membrana e abaixo da temperatura de transição de fase, por exemplo. Assim como cátions divalentes suprimem a formação de estruturas não-lamelares nas condições de alta hidratação e temperatura abaixo da temperatura de transição de fase [Brandenburg e Wiese, 2004]. Na fase lamelar, ocorrem transições de fase entre a fase gel (L_β) e fase líquido-cristalina (L_α). A transição induzida pela temperatura entre essas duas fases exibe uma clara influência do número de cadeias aciladas do Lipídio A, da natureza do contraíon e da conformação adotada pelo Lipídio A [Brandenburg e Wiese, 2004; Brandenburg, 1993; Brandenburg e Seydel, 1990; Schromm *et al*, 2008; Erridge *et al*, 2002].

O Lipídio A possui uma estrutura química complexa e a relação de cada grupamento químico com a atividade endotóxica foi investigada extensivamente nos últimos anos [Ulmer *et al*, 1992; Flad *et al*, 1993]. Diferentes preparações foram testadas: a omissão de um grupo fosfato reduz a endotoxicidade por um fator de 10^3 ; a abstração de uma cadeia lipídica (Lipídio A pentaacilado) reduz a endotoxicidade por um fator de 10^2 ; a abstração de duas cadeias lipídicas (resultando na espécie tetraacilada) resulta na redução da endotoxicidade por um fator de 10^7 . Na figura 1.11 a seguir, estão resumidas esquematicamente as estruturas dos Lipídios A mais comum de cada bactéria Gram-negativa indicada.

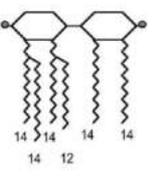
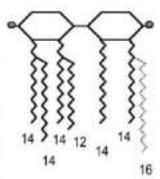
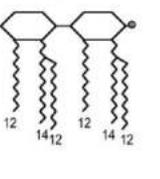
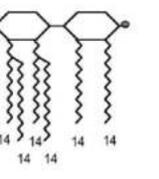
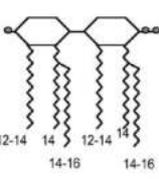
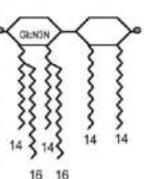
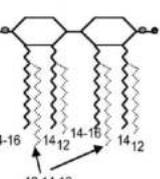
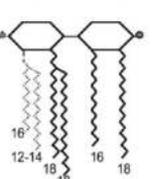
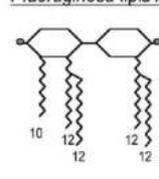
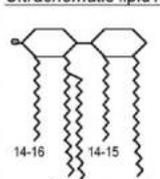
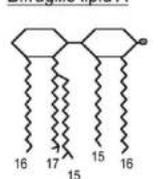
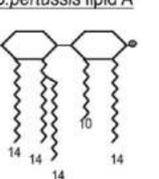
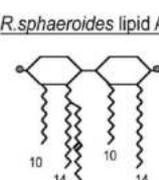
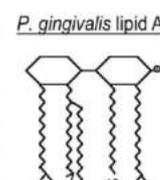
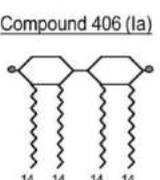
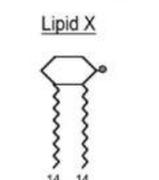
<i>E. coli</i> lipid A 	<i>S. minnesota</i> lipid A 	<i>N. meningitidis</i> lipid A 	<i>H. influenzae</i> lipid A 
Endotoxic Activity: +++	Endotoxic Activity: +++	Endotoxic Activity: +++	Endotoxic Activity: +++
<i>K. pneumoniae</i> lipid A 	<i>C. jejuni</i> lipid A 	<i>Y. pestis</i> lipid A 	<i>H. pylori</i> lipid A 
Endotoxic Activity: +++	Endotoxic Activity: ++	Endotoxic Activity: ++(?)	Endotoxic Activity: ++
<i>P. aeruginosa</i> lipid A 	<i>C. trachomatis</i> lipid A 	<i>B. fragilis</i> lipid A 	<i>B. pertussis</i> lipid A 
Endotoxic Activity: +	Endotoxic Activity: +	Endotoxic Activity: +	Endotoxic Activity: + (?)
<i>R. sphaeroides</i> lipid A 	<i>P. gingivalis</i> lipid A 	Compound 406 (Ia) 	Lipid X 
Endotoxic Activity: - (LPS antagonist)	Endotoxic Activity: + (TLR-2 agonist)	Endotoxic Activity: - (LPS antagonist)	Endotoxic Activity: - (Very weak antagonist)

Figura 1.11: Estrutura dos quimiotipos de Lipídios A mais comuns de cada bactéria Gram-negativa. Os números na parte de inferior em cada quadro indicam o comprimento das cadeias lipídicas. A atividade endotóxica de cada lipídio está indicada, de maneira qualitativa, pelo sinal de positivo [Erridge *et al*, 2002].

2. Hipótese e Relevância

Verificar a existência e caracterizar a correlação da estrutura microscópica (agregação e ordenamento) de membranas de Lipídio A em função da temperatura, variação fenotípica (quimiotipos) e tipos de contraíons.

Este trabalho tem como objetivo descrever as propriedades dinâmicas e estruturais de bicamadas lipídicas de Lipídio A de diferentes quimiotipos e sob efeito das variáveis citadas no parágrafo anterior. O interesse por essas membranas lipídicas deve-se ao importante papel que esse tipo de Lipídio desempenha como integrante estrutural da membrana externa de bactérias Gram-negativas e sua relevância nos processos de atividade endotóxica desenvolvidos por essa classe de bactérias.

3. Fundamentos Teóricos

A simulação computacional de um sistema químico ou biológico exige a inclusão de um número grande de átomos e/ou moléculas para uma boa correlação com o sistema macroscópico. Nesse cenário a utilização de mecânica molecular ou método de campo de força se mostra de grande utilidade [Allinger, 1976; Brooks *et al*, 1973]. Nesse método os elétrons do sistema são tratados como variáveis implícitas de uma função de energia potencial. Sendo que a energia potencial que descreve a interação entre os átomos do sistema deve ser estimada empiricamente.

Os métodos de simulação computacional permitem estudar sistemas de grande dimensão e prever suas propriedades através da amostragem suficiente de configurações do sistema microscópico, cujas propriedades médias sejam representativas do sistema macroscópico. Independente do método de amostragem utilizado é importante entender como essas médias calculadas ao longo do tempo de uma simulação podem ser comparadas com as medidas experimentais. Para isso, faz-se uso de dois conceitos importantes em mecânica estatística: o conceito de *ensemble* e o princípio ergódico.

Ensemble é uma coleção de configurações capaz de representar bem o espaço de fase de uma dada propriedade. As duas técnicas mais utilizadas para gerar um ensemble são as de Dinâmica Molecular e Monte Carlo [Allen, 2004]. O número de configurações deve ser suficientemente grande para garantir a amostragem completa do espaço de fase, para poder utilizar teoremas matemáticos de grandes números. O princípio ergódico estabelece que a média temporal de uma propriedade num longo intervalo de tempo é proporcional a média da propriedade num *ensemble*.

A idéia inicial é expressar o valor de determinada propriedade A [Leach, 2001] num instante de tempo em função das posições e momentos das partículas: $A(\mathbf{p}^N(t), \mathbf{r}^N(t))$, em que $\mathbf{p}^N(t)$ e $\mathbf{r}^N(t)$ representam o momento e posição de N partículas no tempo t . O valor médio de A durante de um tempo relativamente longo de observação pode ser estimado como:

$$A_{m\u00e9dio} = \lim_{\tau \rightarrow \infty} \frac{1}{\tau} \int_{t=0}^{\tau} A(\mathbf{p}^N(t), \mathbf{r}^N(t)) dt \quad 3.1$$

Para calcular o valor médio da propriedade seria necessária a simulação do sistema de interesse. A tarefa é possível de ser realizada calculando as forças sobre cada átomo (utilizando um modelo apropriado de função potencial para as interações inter- e intramoleculares dos átomos) a partir de diferenciação da função de energia potencial. A partir da força, pode-se calcular a aceleração utilizando a segunda lei de Newton. As integrações das equações de

movimento produzirão as trajetórias, que descrevem como as posições, velocidades e aceleração das partículas variam com o tempo e a equação 3.1 pode ser utilizada para calcular valores médios de propriedades. No entanto, para um número grande de átomos (da ordem de 10^{23}) não é factível determinar a configuração inicial do sistema, integrar equações de movimento e calcular as trajetórias das partículas. Diante desse problema, a estratégia é, ao invés de considerar um único sistema evoluindo temporalmente, tratar um grande número de réplicas do sistema que são tratados simultaneamente (*ensemble*). A média temporal é então substituída por uma média sobre o *ensemble*:

$$\langle A \rangle = \iint dp^N dr^N A(p^N, r^N) \rho(p^N, r^N). \quad 3.2$$

Os colchetes $\langle \ \rangle$ indicam a média sobre o *ensemble*, ou valor esperado, ou seja, o valor esperado para a propriedade A levando em consideração todas as réplicas do *ensemble* gerado para a simulação. A equação 3.2 é escrita na forma de integral dupla por conveniência, mas forma correta seria escrever $6N$ sinais de integral para as $6N$ posições e momentos das partículas. O símbolo $\rho(p^N, r^N)$ é a densidade de probabilidade do *ensemble*, isto é, a probabilidade de encontrar uma configuração com momento p^N e posição r^N . O valor médio da propriedade A no *ensemble* é determinada integrando sobre todas as possíveis configurações do sistema, a média sobre o *ensemble* é igual a média temporal.

3.1) Método de Dinâmica Molecular (DM)

O método DM é uma técnica de simulação dependente do tempo. A energia do sistema é calculada através de funções de energia potencial de parâmetros e equações provenientes da mecânica molecular. A expressão de energia é usada para computar as forças dos átomos para qualquer configuração. Os passos para a realização de uma simulação de DM são os seguintes [Young, 2001]:

1. Determinar a posição inicial dos átomos do sistema e o tamanho da caixa de simulação.
2. Definir as velocidades atômicas no início da simulação. Normalmente uma distribuição de Maxwell-Boltzmann é adotada para algum valor de temperatura. Então, normalizada para que o momento líquido do sistema seja zero.
3. O momento de cada átomo do sistema é calculado.

4. As forças (f_i) sobre cada átomo é calculada a partir da derivada parcial de energia potencial do sistema $V(r)$ (campo de força) em relação a posição das partículas do sistema (r_i):

$$f_i = -\frac{\partial}{\partial r_i} V(r) \quad 3.3$$

5. Após um intervalo de tempo (tempo de integração) as posições dos átomos são novamente calculadas. A evolução temporal é realizada com o uso da integração numérica das equações de Newton usando a(s) informação(ões) obtida(s) no(s) passo(s) anterior(es).

6. As velocidades e acelerações dos átomos na nova posição são calculadas.

7. Os passos 3 até 6 deste procedimento são repetidos.

8. Essas interações são repetidas para o sistema até ele atingir o equilíbrio. Nesse caso, o equilíbrio não é a menor configuração de energia, mas a configuração que é mais razoável para o sistema para uma dada quantidade de energia.

9. Depois de atingido o equilíbrio, as coordenadas atômicas podem ser salvas em intervalos regulares de tempo gerando a trajetória da simulação.

10. A simulação continua até se atingir tempo suficiente para se obter resultados com a precisão desejada.

11. Com a simulação finalizada, as trajetórias devem ser analisadas de modo a se obter informações sobre o sistema. As propriedades podem ser estruturais, dinâmicas, energéticas, termodinâmicas, etc. dependendo da informação a ser extraída.

As propriedades calculadas através de uma simulação de DM devem apresentar uma distribuição normal (gaussiana) em torno de um valor médio. Se isso não ocorrer, deve estar acontecendo um erro sistemático no cálculo [Young, 2001].

3.2 Aspectos Importantes Envolvendo Simulações de Dinâmica Molecular

O sucesso da simulação de DM é dependente da escolha correta de parâmetros e algoritmos a serem utilizados durante todo o processo. Inicialmente é necessário escolher um campo de força que descreva as interações inter- e intramoleculares dos átomos do sistema. A formulação básica presentes nos campos de força será discutida posteriormente nesse texto.

A escolha do algoritmo para a integração das equações de Newton também é outra escolha a ser decidida. O algoritmo de Verlet [Verlet, 1967] é o mais utilizado pela pequena quantidade de memória e CPU requerida para o seu funcionamento. Para o seu funcionamento, ele necessita das posições e acelerações dos átomos no tempo atual e as posições dos mesmos no passo anterior. Então, ele determina as novas posições das partículas. O algoritmo de *velocity Verlet* utiliza as posições, velocidades e acelerações no tempo atual da simulação. Os resultados são mais precisos que os produzidos pelo algoritmo de Verlet original [Verlet, 1967]. Ambos necessitam de um passo para re-escalar as velocidades para minimizar os erros de integração. O algoritmo *leap-frog* [Hockney *et al*, 1974] padrão no programa GROMACS v.4.x [Hess *et al*, 2008] necessita da velocidade das partículas no instante anterior ao tempo inicial da simulação. As equações básicas do algoritmo são:

$$r(t + \delta t) = r(t) + \delta t v\left(t + \frac{1}{2} \delta t\right) \quad 3.4$$

$$v\left(t + \frac{1}{2} \delta t\right) = v\left(t - \frac{1}{2} \delta t\right) + \delta t a(t) \quad 3.5$$

Em que r é a posição, t é o instante de tempo, a é a aceleração e v a velocidade de cada partícula do sistema. As velocidades $v\left(t + \frac{1}{2} \delta t\right)$ são calculadas a partir das velocidades no tempo $t - \frac{1}{2} \delta t$ e acelerações no tempo t . As posições $r(t + \delta t)$ são deduzidas das velocidades calculadas com as posições no tempo $r(t)$ usando a equação para a evolução temporal de r . As velocidades no tempo t podem ser calculadas a partir de:

$$v(t) = \frac{1}{2} \left[v\left(t + \frac{1}{2} \delta t\right) + v\left(t - \frac{1}{2} \delta t\right) \right] \quad 3.6$$

As velocidades obtidas num dado instante são obtidas a partir das velocidades num instante de tempo mais adiantado. As grandes vantagens desse algoritmo sobre o algoritmo de Verlet [Verlet, 1967] são as velocidades calculadas explicitamente e sem a necessidade de diferenças entre grandes números. No entanto, as velocidades e posições dessincronizadas não permitem calcular a contribuição da energia cinética a energia total no mesmo tempo em que as posições são definidas.

O intervalo de tempo utilizado para a integração das equações de movimento é denominado passo de integração. Esse passo não pode ser muito grande, para não simular deficientemente a trajetória com átomos tendo grandes deslocamentos. No entanto, não pode ser tão pequeno de maneira a calcular mais interações e consumir mais tempo computacional para

cumprir um dado tempo de simulação. Uma regra geral utilizada é que o valor do passo de integração seja uma ordem de magnitude menor que a escala de tempo do movimento mais curto do sistema (seja movimento vibracional ou tempo de choque entre as colisões dos átomos). Observa-se um passo de integração de dezenas de femtosegundo para a simulação de moléculas não-rígidas e com graus de liberdade de vibração.

A demanda computacional de uma simulação de DM pode ser reduzida com o uso de restrições a certos movimentos dos átomos, por exemplo, as frequências de vibração entre os átomos (especialmente aquelas envolvendo átomos de hidrogênio) são altas o bastante para serem calculadas utilizando o tempo de integração mais comum em simulações. Utilizando-se de um formalismo Lagrangeano as distâncias são mantidas fixas. O algoritmo para restrição de movimentos utilizada em nossas simulações foi o LINCS [Hess *et al*, 1997; Hess, 2008]. Esse algoritmo é bastante estável, evita flutuações, reversível no tempo e três a quatro vezes mais rápido que os primeiros algoritmos utilizados para restrição de movimento em DM.

Um obstáculo enfrentado em simulações de DM são os efeitos de superfície que as partículas simuladas sofrem ao ficarem próximas as faces da caixa de simulação. Se uma caixa de simulação contiver 1000 átomos arranjados num cubo $10 \times 10 \times 10$, aproximadamente metade dos átomos estarão nas faces externas e isso afetará bastante o cálculo das propriedades do sistema. Uma maneira de resolver esse problema é rodear a caixa de simulação com réplicas de si mesma. Associando essa solução a convenção de imagem mínima que estabelece que cada átomo interaja com o átomo mais próximo ou imagem no arranjo periódico (Figura 3.1 a). Esse artifício mostra-se bastante útil, mas requer atenção ao lidarmos com interações de longo alcance, como o potencial eletrostático.

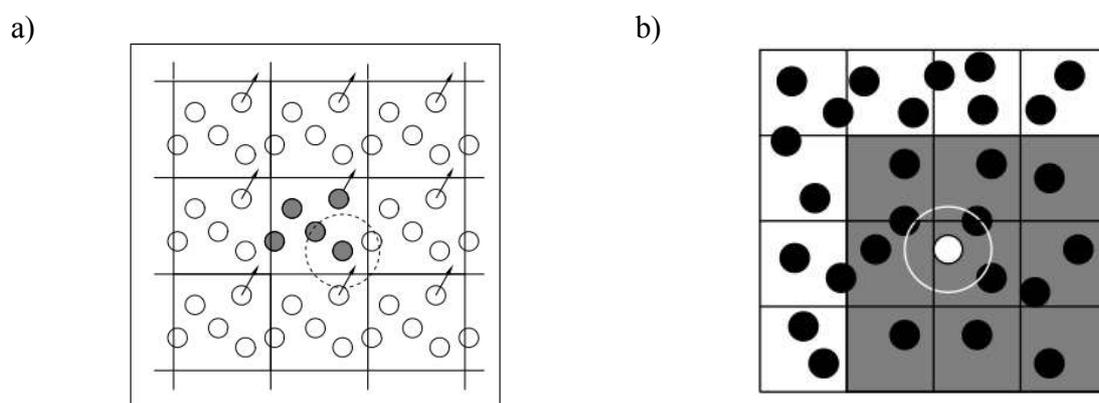


Figura 3.1: a) Condições periódicas de fronteira 2D: as partículas que se movem fora da caixa de simulação são substituídas por uma equivalente proveniente de uma imagem da caixa. b) Estrutura de funcionamento da busca por vizinhos onde as interações não-ligadas são calculadas, se os átomos estão situados num dado raio de corte, dentro da própria caixa ou nas caixas vizinhas [Allen, 2004].

Além da convenção de imagem mínima, existem outras formas de limitar ou truncar a atuação de um potencial com o uso de um raio de corte, podemos citar: a truncagem simples; a truncagem seguida de deslocamento; e a truncagem com deslocamento do potencial e da força.

As interações consideradas de longo alcance são aquelas cujo decaimento 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. Várias metodologias foram desenvolvidas para o tratamento das interações de longo alcance [Leach, 2001] como: soma de Ewald, campo de reação e campo de reação generalizado.

No método de *Particle Mesh Ewald* (PME) [Darden *et al*, 1993] uma partícula interage com todas as partículas na caixa de simulação e com as suas imagens num arranjo periódico infinito de células. Para uma mais rápida convergência das interações cada partícula carregada, após certo raio de corte, é considerada rodeada por uma distribuição de carga de sinal oposto capaz de neutralizar a carga inicial. Isso transforma um somatório de cargas pontuais como uma soma de cargas mais distribuições neutralizantes de carga [Allen, 2004]. O método de Ewald, apesar de ser o método mais formal e com menos aproximações para o cálculo de interações eletrostáticas, induz certos artifícios na distribuição de carga é computacionalmente caro.

O alto custo computacional do método de PME motivou o desenvolvimento de outras formas de calcular a interação eletrostática. Um desses métodos é o de campo de reação [Barker e Watts, 1973]. Nesse método, uma esfera com determinado raio de corte é traçado ao redor de uma molécula. As interações entre as partículas dentro desse raio de corte são calculadas explicitamente. Além do raio de corte, a interação eletrostática é modelada como um meio homogêneo de constante dielétrica (ϵ). O método é eficiente, mas apresenta problemas quando o número de partículas dentro do raio de corte de determinada partícula muda ao longo da simulação. Isso leva a descontinuidades no valor da energia calculada e implica em problemas na conservação da propriedade durante a simulação [Allen, 2004]. Um aprimoramento dessa aproximação é o método de campo de reação generalizado [Tironi, 1995]. Nesse método o meio possui uma constante dielétrica (ϵ) e uma força iônica além do valor de raio de corte, além de serem adicionadas correções às interações eletrostáticas entre pares.

Existem diferentes quantidades macroscópicas que podem ser utilizadas em mecânica estatística para descrever os sistemas tipicamente estudados pela termodinâmica. Devido às diferenças entre essas grandezas macroscópicas, diferentes tipos de *ensemble* foram definidos [McQuarrie, 1976]. O ensemble utilizado nesse trabalho é denominado de NpT . A sigla refere-se as quantidades mantidas constantes durante a simulação: N (número de partículas), p (pressão) e T (temperatura). Sendo que as duas últimas merecem esquemas especiais de acoplamento para garantir um valor fixo durante a simulação.

O controle da temperatura em nossa simulação foi realizado com o algoritmo de reescalonamento da velocidade [Bussi *et al*, 2007]. Esse método é fortemente influenciado pelo termostato de Berendsen [Berendsen *et al*, 1984] com a adição de um termo estocástico que garante uma correta distribuição de energia cinética para o sistema. O termostato de Berendsen foi um dos primeiros termostatos criados e se apresenta como um banho térmico acoplado fracamente ao sistema. A temperatura desejada é mantida através de contato com um banho térmico obedecendo a uma cinética de primeira ordem. A frequência do acoplamento é definida pelo usuário. A correção adicionada ao método de reescalonamento de velocidades deve-se ao fato que o termostato de Berendsen suprimir as variações de energia cinética das partículas resultando numa distribuição incorreta da energia cinética do sistema.

A idéia de acoplamento do sistema a um banho térmico pode ser estendida a um banho de pressão para o controle da pressão do sistema. Adotamos o esquema de Berendsen para o controle da pressão em nossos sistemas [Berendsen *et al*, 1984]. O algoritmo de Berendsen para o controle da pressão reescalona as coordenadas das partículas e as dimensões da caixa na frequência que é adotado. Novamente, a pressão desejada na simulação é mantida através do contato com esse banho de pressão e o processo é governado por uma cinética de primeira ordem. O reescalonamento das coordenadas é dependente da compressibilidade isotérmica do sistema.

3.3) Campos de Força

Em sistemas contendo um grande número de átomos a utilização de métodos de química quântica é computacionalmente inviável. Os métodos baseados em campos de força ignoram os movimentos eletrônicos e calculam a energia do sistema como uma função das posições nucleares apenas. Os métodos baseados em campos de força têm sua confiabilidade suportada nos seguintes itens: validade da aproximação de Born-Oppenheimer; utilização de modelos simples para descrever interações como estiramento, rotações e abertura e fechamento de ângulos entre três átomos; além da transferibilidade, que vem a ser o atributo do campo de força que permite que os parâmetros, testados num pequeno número de casos, sejam aplicados num conjunto muito maior de moléculas [Leach, 2001].

A função que determina a energia potencial de um modelo molecular é normalmente construída como a soma das contribuições de energia consideradas no sistema: distância de ligação ($E_{lig.}$), ângulo de ligação ($E_{ang.}$), ângulos torsionais ($E_{diedros}$), potencial de *Lennard-Jones* (E_{LJ}) para repulsão a curtas e atração a longas distâncias e potencial eletrostático entre cargas ($E_{coul.}$):

$$E = E_{lig} + E_{ang.} + E_{diedros} + E_{LJ} + E_{coul} \quad 3.7$$

O conjunto de equações e parâmetros das funções matemáticas é propriamente denominado de campo de força.

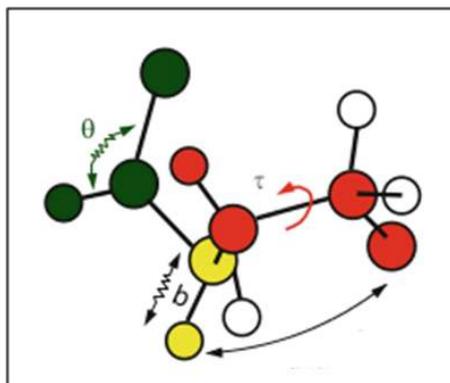


Figura 3.2: Representação dos termos ligados compõem a função de energia potencial em mecânica molecular. Os átomos em amarelo é um exemplo do termo de ligação, os átomos em verde representam o ângulo de ligação e os átomos em vermelho o tempo de ângulo diedro na molécula.

3.3.1) Termo de Estiramento de Ligação

Os potenciais de ligação são descritos por um modelo clássico de vibração harmônica (lei de Hooke) e expressam o quão distorcido está uma ligação química em relação a um dado valor de referência. Esse valor de referência costuma ser obtido a partir de estruturas de raios-X ou cálculos de química quântica. De acordo com a lei de Hooke a força é proporcional ao deslocamento e a aceleração:

$$F(x) = -kx = m \frac{d^2x}{dt^2}, k = m\omega^2 > 0. \quad 3.8$$

Em que a frequência angular do sistema é ω , a constante de vibração é k e m a massa do sistema. A energia potencial equivalente a essa força é:

$$E(x) = \frac{k}{2}x^2, \quad 3.9$$

ou expressa em termos de um valor de referência (x^0) como:

$$E_{lig.}(x) = \frac{k}{2}(x - x^0)^2 \quad 3.10$$

Usando algumas relações entre a frequência angular e a constante de vibração ($\omega = \sqrt{k/m}$) e a massa reduzida de um par de átomos heteronucleares (m_1 e m_2) as constantes de força podem ser expressas como:

$$k = \mu\omega^2, \quad 3.11$$

em que μ é a massa reduzida definida como:

$$\mu = m_1 m_2 / (m_1 + m_2). \quad 3.12$$

O potencial harmônico é uma aproximação válida para pequenos desvios do comprimento de ligação em relação ao valor de referência. Normalmente distorções situadas um nível acima do estado fundamental ou deformações de ordem de 0,1 Å de comprimento. Para o potencial descrever distorções maiores do que essa seria necessária a utilização de outros termos para ligação como o potencial de Morse com a adição de polinômios cúbicos e/ou quárticos [Schlick, 2010].

3.3.2) Termo de Flexão de Ângulo de Ligação

O arranjo dos átomos em determinado ângulo de ligação é governado pela natureza da ligação química. Essa informação é importante no momento da parametrização dos diferentes tipos de ângulos de ligação entre átomos num campo de força. Além disso, mesmo átomos numa hibridização bem determinada, podem apresentar ângulos de distorção com valores ligeiramente diferentes dos esperados para aquela geometria molecular. Por exemplo, moléculas contendo orbitais sp^3 têm ângulos diferentes daqueles apresentados por um tetraedro perfeito (109,47°). O propano tem ângulo C-C-C de valor de cerca 112,5° e o H-C-H de valor 107,5°. Moléculas cíclicas também apresentam desvios grandes nos valores de seus ângulos.

Apesar da maior diversidade de valores típicos de ângulos de ligação a aproximação mais comum de descrever seu potencial é a harmônica. Novamente, deve-se fazer a ressalva que a validade do potencial é restrita a pequenos desvios de ângulo em relação ao seu valor de referência (θ^0):

$$E_{ang.}(\theta) = \frac{k}{2}(\theta - \theta^0)^2 \quad 3.13$$

É bastante comum em campos de força que são parametrizados para sistemas moleculares pequenos (MM3 e MM4) o uso de potenciais cruzados de ligação e ângulo. Esses termos, apesar de genuínos e originários de movimentos de vibração e a torção que ocorrem de maneira acoplada, nem sempre são incluídos em outros campos de força e servem como correções aos valores dos termos de vibração e torção angular.

3.3.3) Termos Torsionais

A existência de barreiras rotacionais em ligações químicas é fundamental para entender propriedades estruturais e conformacionais de moléculas. A maioria dos campos de força para moléculas orgânicas usa potenciais torsionais explícitos com contribuições de quatro átomos ligados (A-B-C-D) do sistema [Leach, 2001]. Os potenciais torsionais são quase sempre expressos como uma expansão em série de funções cosseno:

$$E_{\text{diédros}}^{\tau}(\tau) = \sum_n \frac{V_n}{2} [1 \pm \cos n\tau], \quad 3.14$$

em que n é um inteiro que denota a periodicidade da barreira rotacional descrita pelo ângulo de torção τ e V_n é associado a altura da barreira. O valor de n depende da sequência de átomos e parametrização do campo de força. Alguns valores típicos de n são 1, 2 e 3. De maneira ser sistemático com as expressões derivadas anteriormente, podemos escrever a expressão acima em relação a um ângulo torsional de referência (τ^0). Então, teremos:

$$E_{\text{diédros}}^{\tau}(\tau) = \sum_n \frac{V_n}{2} [1 + \cos (n\tau - \tau^0)]. \quad 3.15$$

O tamanho das barreiras rotacionais e a periodicidade de cada uma podem ser estimadas a partir de dados espectroscópicos (RMN, Infravermelho, Raman e Microondas). No entanto, esses dados não estão disponíveis na literatura para todas as classes de compostos. Uma alternativa é utilizar estimativas de compostos análogos aos parametrizados no campo de força ou obtê-los através de cálculos de energia e geometria realizados com métodos de mecânica quântica *ab initio*. Esse procedimento normalmente gera mais de um termo na série de Fourier do potencial. Normalmente combinam-se potenciais de dois e três picos para reproduzir as diferenças de energia entre conformeros.

3.3.4) Torsões Impróprias e Movimentos de Flexão Fora do Plano

Um tipo de potencial torsional existente é o chamado torsional impróprio, também conhecido como torsão fora do plano, e são utilizados para melhorar as estimativas de energia e geometria dos termos acima. Basicamente, eles garantem que certos grupos se mantenham planos e/ou quirais. O potencial tem a forma:

$$v(\omega) = k(1 - \cos 2\omega) \quad 3.16$$

em que ω é o ângulo impróprio de Wilson. Esse ângulo é definido por quatro átomos i, j, k, l . O átomo central j é ligado a i, l e k e forma um ângulo entre a ligação $j-l$ e o plano $i-j-k$.

3.3.5) Termo de *Lennard-Jones*

As interações de *van der Waals* entre átomos não ligados e separados por uma distância r_{ij} é normalmente descrito pelo potencial 6/12 de Lennard-Jones em campos de força para macromoléculas:

$$E_{LJ}(r_{ij}) = \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \quad 3.17$$

Os termos de Lennard-Jones (A_{ij}/r^6 para atração e B_{ij}/r^{12} para repulsão a curtas distâncias) são comuns em expressões para a energia potencial de macromoléculas por conta de uma conveniência matemática: ele é semelhante ao potencial de *Buckingham*, com exceção do termo de repulsão em forma exponencial $Bexp(-B'r)$. [Lifson e Warshel, 1968] e tem uma forma semelhante ao potencial de interação obtido a partir de cálculos de estrutura eletrônica para pares de átomos, sendo assim um ótimo potencial para descrever esse tipo de interação [Allinger, 1989].

Apesar da eficiência e menor demanda computacional do potencial de Lennard-Jones, existem outros potenciais que descrevem melhor as interações de *van der Waals*. A natureza repulsiva das interações de van der Waals é explicada pela interação entre as nuvens eletrônicas dos átomos situadas a uma curta distância. Enquanto que interação fraca atrativa é descrita pelas forças de dispersão de *London* (em linguagem de mecânica quântica correspondem as contribuições provenientes da correlação eletrônica). Como para distâncias grandes ($r \rightarrow \infty$) o potencial decai para zero rapidamente ($E_{LJ} \rightarrow 0$) a interação de van der Waals é considerada de curto alcance e é computada numericamente com o uso de raios de corte.

3.3.6) Termo de Interação Eletrostática

As interações entre sítios carregados total ou parcialmente são descritos pela lei de Coulomb entre cada par de cargas (q_i, q_j) considerado:

$$E_{coul.} = \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \quad 3.18$$

em que ϵ é a constante dielétrica. Diferentemente das interações de van der Waals, as interações eletrostáticas decaem lentamente com a distância. Isso realmente ocorre na natureza, pois as interações eletrostáticas são importantes para estabilizar conformações biomoleculares. Como já descrito na seção 3.2, um modelo de campo de reação foi utilizado no tratamento das interações eletrostáticas.

4. Metodologia

Os primeiros modelos atomísticos de membranas de LPS e Lipídio A para uso em simulações de DM surgiram no início da década passada [Lins e Straatsma, 2001] e combinavam cargas determinadas por métodos *ab initio* com parâmetros provenientes dos campos de força AMBER95 [Cornell *et al*, 1995] e GLYCAM_93 [Woods *et al*, 1995]. Esse campo de força foi utilizado em estudos de estrutura e dinâmica de membranas de LPS [Shroll e Straatsma, 2002; Lins *et al*, 2008; Soares *et al*, 2008; Soares e Straatsma, 2008], de proteínas de membranas embutidas em LPS [Straatsma e Soares, 2009], além de estudos de interação de LPS com superfícies minerais [Shroll e Straatsma, 2003]. Recentemente outros modelos atomísticos para a simulação de LPS e Lipídio A tornaram-se disponíveis na literatura. Esses modelos foram desenvolvidos a partir de extensões de campos de força existentes, como campo de força GLYCAM06 [Kirschner *et al*, 2012], ou combinações de parâmetros do campo de força CHARMM36 [Wu *et al*, 2013; Garate e Oostenbrink, 2012], além do campo de força GROMOS 53A6 [Piggot *et al*, 2011].

Nas nossas simulações utilizamos modelos atomísticos desenvolvidos a partir de parâmetros derivados de uma extensão do campo de força GROMOS 45A4 para carboidratos [Lins e Hunenberger, 2005], além de parâmetros do campo de força GROMOS 53A6 [Oostenbrink *et al*, 2004]. As topologias construídas para os diferentes quimiotipos de Lipídio A estão disponíveis no seguinte endereço: <http://dqfnet.ufpe.br/biomat/Software.html>. As cadeias lipídicas são compostas por representação de átomos unidos.

4.1. Preparação dos Sistemas

As caixas de simulação são compostas de bicamadas de Lipídio A em que cada uma das camadas contém 64 ou 72 unidades lipídicas distribuídas num arranjo quadrado (8x8) ou retangular (8x9), respectivamente. A escolha de uma caixa de simulação composta de uma bicamada de Lipídio A deve-se a intenção de simular um sistema de configuração parecida ao arranjo experimental mais comumente adotado em estudos de propriedades físico-químicas e biológicas desta molécula [Schromm *et al*, 2000]. As estruturas químicas do Lipídio A de *P. aeruginosa* hexaacilado e do Lipídio A de *E. coli* também hexaacilado com os contraíons na sua vizinhança, foram construída no programa Spartan¹⁰ [Shao *et al*, 2006], e salvas em formato de

arquivo *pdb*. As espécies pentaacilada, tetraacilada e monofosforilada foram posteriormente geradas a partir das membranas hexaaciladas equilibradas (como descrito abaixo) As estruturas químicas das espécies estão apresentadas na Figura 4.1 a seguir:

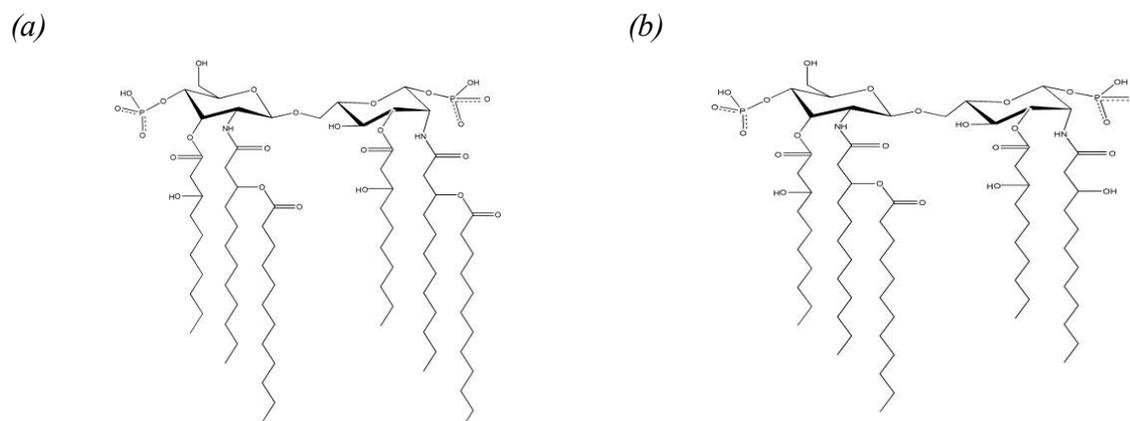


Figura 1.4: Estrutura química da molécula de Lipídio A (a) hexa- (b) pentaacilado.

Os Lipídios A de estrutura difosforilada apresentam carga total de $-2e$. Para neutralizar a carga total da molécula, e conseqüentemente a carga total da membrana lipídica, adicionaram-se cátions mono- ou bivalentes a vizinhança de cada lipídio. Os contra-íons foram estrategicamente localizados nas vizinhanças dos grupos fosfato de cada lipídio. Sendo necessário o dobro de íons monovalentes em relação aos bivalentes para neutralizar a molécula. A escolha dos íons deveu-se ao fato de serem os mais comuns presentes em experimentos envolvendo bicamadas de Lipídio A e de possuírem aproximadamente o mesmo raio iônico, mas cargas diferentes. Assim, poderia se avaliar melhor o efeito da carga na estrutura das bicamadas.

A partir do arquivo em formato *pdb* utilizaram-se as ferramentas contidas no programa GROMACS 4.0.7 [Hess *et al*, 2008] para construir as caixas de simulação. Os comandos utilizados na construção das caixas de simulação estão detalhados no apêndice do trabalho. Na Figura 3.2 está a imagem de uma caixa de simulação na sua configuração inicial. Os protocolo de minimização de energia (*em.mdp*) e simulação computacional (*md.mdp*) estão apresentados em sua totalidade no apêndice desta tese, mas alguns detalhes serão discutidos ainda nesse capítulo.

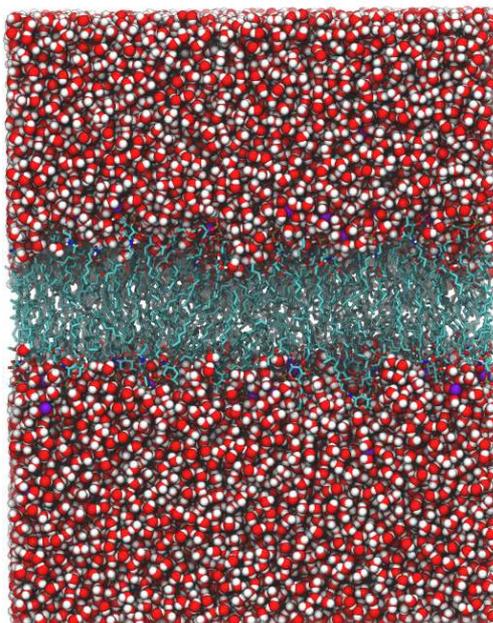


Figura 1.2: Representação de uma caixa de simulação de uma bicamada de Lipídio A de *Pseudomonas aeruginosa* pentaacilado tendo o Mg^{2+} como contraíon. Os íons estão representados por esferas de cor roxa, as moléculas de água por esferas de *van der Waals* e os lipídios por bastões. O instantâneo da imagem é do primeiro nanosegundo de simulação.

Na Tabela 4.1 estão reunidos os detalhes dos sistemas estudados nesse trabalho. As simulações estão divididas em dois grupos. No primeiro grupo, a influência de íons mono- e bivalentes (Na^+ e Mg^{2+} , respectivamente) na forma de agregação de dois diferentes quimiotipos (hexa- e pentaacilado) de Lipídio A de *P. aeruginosa* à temperatura de 300 K. No segundo grupo, utilizamos quimiotipos (di- e monofosforilado) de Lipídio A de *E. coli* a diferentes temperaturas de simulação.

Tabela 4.1 – Relação das simulações computacionais realizadas neste trabalho com especificação do tipo de contra-íon, estrutura química do Lipídio A na bicamada, temperatura (K), tempo de simulação (ns) e sigla para identificação da simulação.

Conjunto 1				
Cátion	Fenótipo	Temperatura da Simulação (K)	Tempo da Simulação (ns)	Abreviação
Mg ²⁺	Hexaacilado	300	217	mghex_300
Mg ²⁺	Pentaacilado	300	207	mgpent_300
Na ⁺	Hexaacilado	300	199	nahex_300
Na ⁺	Pentaacilado	300	207	napent_300
Conjunto 2				
Cátion	Fenótipo	Temperatura da Simulação (K)	Tempo da Simulação (ns)	Abreviação
Mg ²⁺	Hexaacilado	278	187	ecoli_mg278
Mg ²⁺	Hexaacilado	300	185	ecoli_mg300
Mg ²⁺	Hexaacilado	328	188	ecoli_mg328
Na ⁺	Hexaacilado	300	178	ecoli_namp300
Mg ²⁺	Tetraacilado	300	201	paeru_mgtetr300

4.2 Protocolos de minimização de energia e simulação computacional por dinâmica molecular

As caixas de simulação, preparadas de acordo com o esquema da seção anterior, foram submetidas à otimização de geometria e minimização de energia usando o algoritmo *steepest descent* [Press *et al*, 1992] por 10000 passos sem uso de qualquer restrição geométrica. O critério de convergência adotado foi de 10 kJ mol⁻¹ nm⁻¹ e o algoritmo evolui num passo de 0,01. A cada passo de minimização, a lista de vizinhos para as interações eletrostáticas e de van der Waals são atualizados dentro de um raio de corte de 1,0 nm. As condições periódicas de fronteira são

aplicadas nas três dimensões. As interações eletrostáticas são calculadas usando o método PME [Darden *et al*, 1993].

As simulações computacionais de dinâmica molecular foram realizadas seguindo um *ensemble* NPT (número de partículas, pressão e temperatura constantes). O passo de simulação utilizado foi de 1 fs. A listas de vizinhos e remoção do centro de massa realizado a cada passo da simulação. Para manter a pressão constante, o barostato de Berendsen [Berendsen *et al*, 1984] foi escolhido num esquema semi-isotrópico a 1 bar de pressão. O esquema semi-isotrópico é útil em simulações de membranas, pois o esquema de acoplamento de pressão é diferente do plano x-y para o eixo z. A utilização do esquema semi-isotrópico é necessária devido a diferente natureza química do sistema ao longo dos eixos x/y (lipídios) e z (água). A frequência de acoplamento da pressão foi de 1 ps com uma compressibilidade de $4.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ N}^{-1}$. Esse valor de compressibilidade é típico para sistemas simulados tendo água como solvente a pressão de 1 bar.

A integração das equações diferenciais foi feita com o algoritmo *leapfrog* [Hockney, 1970]. Para manter a temperatura constante foi utilizado o esquema de acoplamento fraco com um tempo de acoplamento de 0.4 ps através do algoritmo de *velocity rescale* [Bussi *et al*, 2007]. O raio de corte adotado foi de 1.4 nm, ou seja, até essa distância as interações eletrostáticas entre a partícula no centro do raio e suas vizinhas são calculadas explicitamente. Acima desse valor de 1.4 nm o meio é tratado como um contínuo de permeabilidade valor 66. Esse valor foi adotado, após uma extensa reavaliação das propriedades do modelo de água SPC [Glätti *et al*, 2002], em que após simulações (mais longas e com caixas de simulação maiores) observou-se que o melhor valor da permeabilidade dielétrica do meio para o modelo SPC de água com temperatura próxima e para um raio de corte de 1.4 nm é 66. As condições periódicas de fronteira foram adotadas e nenhuma restrição foi adotada durante a simulação. As simulações foram realizadas com o programa GROMACS v.4.5.3 [Hess *et al*, 2008]. O modelo adotado para a simulação das moléculas de água foi o SPC [Berendsen *et al*, 1981].

1.3 Análises dos Dados das Simulações

Apesar das simulações computacionais possuírem extensões temporais distintas, as simulações foram suficientemente longas para permitir a estabilização (verificada em nosso caso, através da aferição das áreas por cabeça e perfis de energia potencial) de cada sistema. Na fase equilibrada de cada simulação reservaram-se os últimos 50 ns (Conjunto 1) ou 70 ns (Conjunto 2) para realizar análises e cálculos de médias de propriedades sobre todo o sistema. Uma breve descrição de cada análise aplicada ao sistema está descrita logo a seguir.

4.3.1 Área por cabeça de Lipídio A (A_{pl})

Essa propriedade fornece uma medida da área ocupada pelo lipídio no plano da membrana e é uma medida da estabilidade estrutural da membrana e é calculada em nossas simulações através da seguinte fórmula:

$$A_{pl} = \frac{L_x L_y}{n_{LipidA}}. \quad 4.1$$

Em que A_{pl} é área ocupada por cada Lipídio A no plano da membrana; L_x e L_y são as dimensões da caixa de simulação nos eixos x e y , respectivamente e n_{LipidA} o número de lipídios por camada. Nas nossas simulações o número de lipídios por camada é 64 ou 72 (conjunto 1 e 2 de simulações, respectivamente). As dimensões da caixa durante a simulação foram salvas a cada picosegundo. A simulação, realizada com pressão e temperatura constantes, permite a variação no volume da caixa de simulação e isso é evidenciado nessa análise. As dimensões da caixa de simulação, temperatura, pressão e energias são armazenadas em arquivos do tipo *.edr* e podem ser extraídos e computados com o uso da rotina *g_energy* codificada no GROMACS.

4.3.2 Função de Distribuição Radial de Pares

Uma das ferramentas mais úteis para investigar a estrutura da matéria (especialmente líquidos) na forma como é organizada é a chamada função de distribuição radial [Leach, 2001]. A função de distribuição radial descreve como uma partícula se distribui em função da distância de outra partícula de referência. Numericamente essa propriedade pode ser descrita através da equação

$$g_{ij}(r) = \frac{N_{ij}(r, r + \Delta r)}{4\pi r^2 \Delta r \rho_j} \quad 4.2$$

em que 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. Experimentalmente pode-se determinar indiretamente a função de distribuição radial de pares através de fatores de estrutura obtidos via experimentos de difração de nêutrons e espalhamento de raios-X. Dependendo da natureza da matéria o gráfico da função de distribuição radial tem um aspecto característico: em cristais apresenta um número infinito de picos (onde a separação e altura denunciam a estrutura do cristal), enquanto em líquidos poucos picos com um decaimento até um valor constante indica a maior desorganização do material em relação ao primeiro. A figura 3.3 apresenta um esquema bidimensional de como é calculada a função de distribuição radial. Enquanto que a Figura 4.4 indica como os picos do gráfico se relacionam com a distribuição radial de uma partícula em relação a outra.

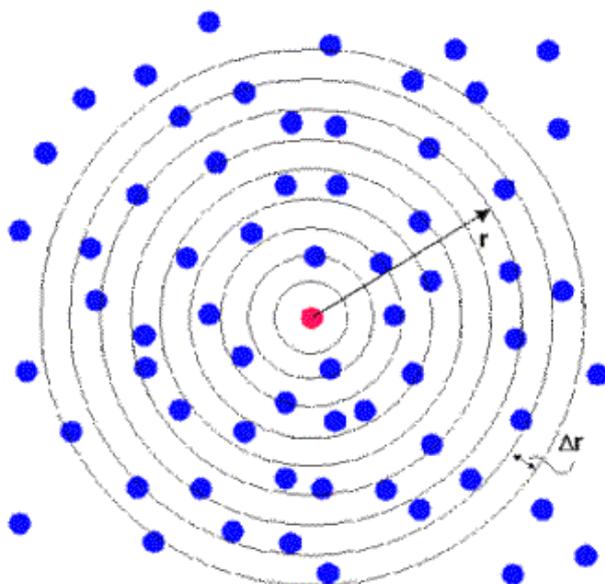


Figura 1.3: Representação bidimensional do raio r e Δr para o cálculo de $g_{ij}(r)$ para a partícula central i em relação às partículas j (fonte: [<http://www.compsoc.man.ac.uk/~lucky/Democritus/Theory/rdf.html>]).

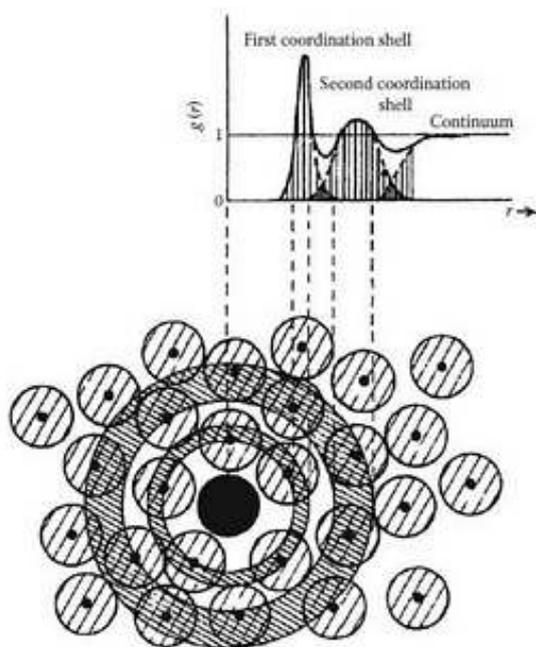


Figura 4.4: (b) Relação entre cada esfera de coordenação do gráfico bidimensional com os picos do gráfico para um fluido monoatômico (fonte: [Ziman, 1979]).

A implementação computacional dessa equação, e aplicação em simulações computacionais, exige algumas adaptações. A distância máxima para o cálculo da densidade entre os pares não pode ser superior a metade do comprimento da caixa, para não haver problemas em relação às condições periódicas de contorno. Quanto mais uniforme a densidade, fará que o decaimento final do gráfico tenda a uma unidade. Indicando a uniformidade da distribuição. A densidade é calculada como a média das densidades entre os dois átomos i e j dentro de uma distância r . Sendo essa densidade a média temporal calculada a cada passo da simulação. Essa informação é armazenada num histograma e depois normalizada para o número de partículas total envolvidas no cálculo. As funções de distribuição radial foram calculadas para três pares (i): átomos de fósforo e átomos de oxigênio da água; (ii) átomos de fósforo e cátions e (iii) cátions e átomos de oxigênio da água. Essa propriedade foi calculada com a rotina *g_rdf*.

1.3.3 Parâmetros de Ordem de Deutério

O parâmetro de ordem é uma medida do grau de anisotropia da ligação C-H em relação ao vetor normal a membrana. É calculado sobre todas as cadeias lipídicas do *ensemble*. Através de considerações de simetria pode-se calcular o parâmetro de ordem de uma ligação, S_{CD} , para uma cadeia lipídica marcada com deutério como:

$$S_{CD} = \frac{3\langle \cos^2 \theta_i \rangle - 1}{2} \quad 4.3$$

Em que θ é o ângulo entre a ligação química C – D e o vetor normal a bicamada. O eixo molecular i é o definido para a n -ésima unidade CH_2 e o vetor dos átomos de carbono ($n-1$) e ($n+1$) como indicado na Figura 4.5.

Se as cadeias lipídicas estiverem perfeitamente ordenadas na membrana, o ângulo entre as ligações C-H da cadeia e a normal da bicamada serão de 90° e o parâmetro de ordem terá valor de -0.5 . Quando a orientação das ligações C-H é em torno de 0° ou randômica o valor do

parâmetro de ordem será de 0.0. Como em membranas, as cadeias lipídicas estão em média alinhadas com o vetor normal a bicamada, os valores de parâmetro de ordem variam entre 0.0 e -0.5, onde o último valor indica o máximo de ordem para as cadeias.

O S_{CD} é obtido para um carbono da cadeia lipídica a partir da média de todos os parâmetros de ordem do mesmo tipo de carbono ao longo da trajetória analisada da simulação [Douliez *et al.*, 1985; Chau e Hardwick, 1988]. Os parâmetros de ordem foram calculados com a rotina *g_order*. Os parâmetros de ordem calculados podem ser comparados com dados experimentais provenientes da espectroscopia de 2H ou ^{13}C -RMN de cadeias marcadas ou FTIR como é o caso do LPS e do Lipídio A [Brandenburg e Seydel, 1988].

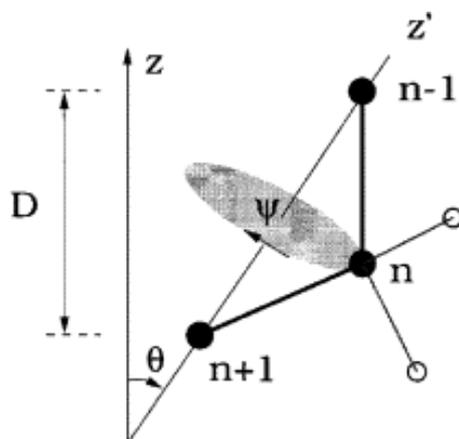


Figura 4.5: Principais definições envolvidas no cálculo do parâmetro de ordem S_{CD} em cadeias alifáticas de lipídios (fonte: [Petrache *et al.*, 1999]).

4.3.4 Perfis de Densidade Parcial de Massa

Os perfis de densidade parcial de massa é uma propriedade que pode ser diretamente comparada com medidas de difração de nêutrons e difração de raios-X. Calculando os perfis de densidade de diferentes grupos químicos do lipídio ao longo da membrana, pode-se ter uma idéia da distribuição dos grupos ao longo da bicamada, além de indicar outras propriedades estruturais importantes da membrana lipídica como a forma de agregação, espessura da membrana,

permeabilidade a água, etc. Os perfis de densidades parciais de massa foram calculados em relação ao oxigênio da água, átomo de fósforo do grupo fosfato, cátions e cadeias lipídicas ao longo do eixo z da caixa de simulação, isto é, normal ao eixo da bicamada. A rotina do GROMACS utilizada para esta tarefa foi o *g_density*.

4.3.5 Ângulo entre as glucosaminas e o plano da membrana

É importante relacionar o formato individual dos lipídios e a sua orientação com a maneira de agregação da membrana [Froloy *et al*, 2011]. Baseado nisso, calculamos o ângulo entre os resíduos de glucosamina do Lipídio A, assim como a sua orientação em relação ao plano da membrana (eixo z). O programa utilizado para esse cálculo (*g_tilt*) separa os grupos de átomos que se deseja medir os ângulos entre si e projeta o ângulo em relação a um eixo normal a conexão entre eles. Repetindo esse cálculo por toda a trajetória e por todos os resíduos. O ângulo de orientação do Lipídio A foi calculado como o ângulo entre o eixo z e o vetor que conecta o centro de massa das cadeias lipídicas e o centro de massa dos anéis de glucosamina para cada molécula de Lipídio A. A rotina *g_tilt* não faz parte do programa GROMACS e foi desenvolvido em nosso grupo [<http://dqfnet.ufpe.br/biomat/Software.html>].

4.3.6 Razão entre o raio de giro dos resíduos de glucosamina e grupos metil (-CH₃) terminais.

A determinação do formato do lipídio numa membrana é uma grandeza indireta que impele os arranjos na forma de agregação das membranas biológicas [Froloy *et al*, 2011].

O raio de giro de uma molécula é uma medida do tamanho da molécula ou de volume ocupado por ela durante a simulação. Estimamos a razão entre o raio de giro dos anéis de glucosamina do Lipídio A e dos grupos metila terminais das cadeias alifáticas com o intuito de averiguar o formato da molécula, se cônico ou cilíndrico, e tentar correlacionar com o formato de

agregação da membrana. A razão entre os raios de giro foi calculada para cada uma das 128 (ou 144) moléculas da membrana com o uso da rotina *g_gyrate* do programa GROMACS. A fórmula para o cálculo do raio de giro de um grupo é dado pela fórmula:

$$R_g = \left(\frac{\sum_i m_i (r_i - r_{cm})^2}{\sum_i m_i} \right)^{1/2} \quad 4.4$$

Em que m_i é a massa do átomo i e a diferença $r_i - r_{cm}$ é a posição do átomo em relação ao centro de massa da molécula.

5) Resultados e Discussão

A investigação dos efeitos da temperatura, variação fenotípica e natureza do contraíon na fase e forma de agregação das membranas de Lipídio A foram divididas em dois grupos de simulações, de maneira a melhor compreender qual a influência de cada um dos fatores descritos na natureza atomística das distintas membranas. No primeiro grupo de simulações, a temperatura foi mantida constante (300 K) em todos os sistemas, e foram incluídos íons mono- e bivalentes, Na^+ e Mg^{2+} respectivamente, para neutralizar a carga total do sistema. O segundo grupo é constituído de simulações contendo os íons Na^+ e Mg^{2+} em novos quimiotipos de Lipídio A de *E. coli* e *P. aeruginosa*. O efeito dos íons na forma de agregação das membranas é investigado de maneira mais detalhada.

5.1) Mudanças na Forma de Agregação

A primeira parte das simulações foi realizada utilizando-se íons mono- e bivalentes em bicamadas de Lipídio A de quimiotipos hexa- e pentacilados. Os íons escolhidos foram o Na^+ e o Mg^{2+} . A razão da escolha deve-se a grande quantidade de trabalhos envolvendo esses dois íons de carga diferente, mas de tamanho similar. Todas as simulações foram realizadas a temperatura de 300 K que produziram trajetórias com tempo superior a 200 ns. O primeiro passo é verificar se os sistemas estão equilibrados, através de checagem da energia potencial de cada sistema e da área por cabeça de Lipídio A de cada bicamada.

5.1.1) Energia Potencial

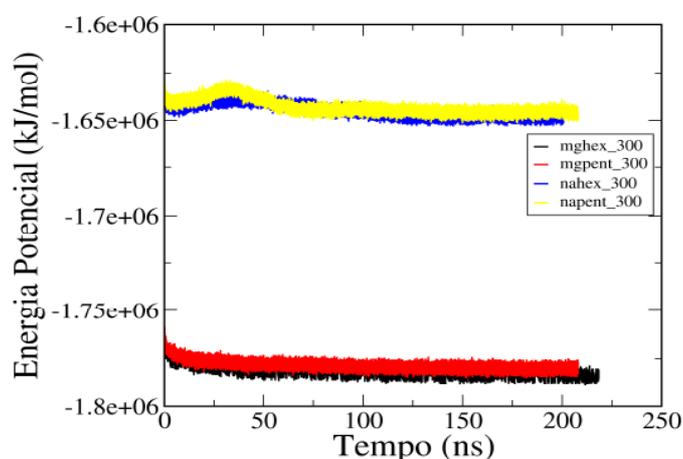


Figura 5.1.1: Energia potencial (kJ/mol) das bicamadas de Lipídio A penta- e hexaaciladas tendo o Na^+ e o Mg^{2+} como contraíons.

Os sistemas contendo Mg^{2+} (mghex_300 e mgpent_300) como contraíon atingem a convergência em torno de 50 ns. Ao contrário dos sistemas contendo Na^+ (nahex_300 e napent_300) onde a energia potencial assume um perfil pouco comum: a curva apresenta um leve aumento no seu valor, para posteriormente diminuir e estabilizar somente por volta de 80 ns. Esse perfil de energia potencial pouco comum pode estar associado a um rearranjo da membrana. A energia potencial de todos os sistemas permanece estável certificando a convergência em termos energéticos da simulação computacional. O próximo passo é necessário verificar se as simulações estão equilibradas do ponto de vista estrutural. Para isso, analisaremos a área por cabeça de Lipídio A de cada membrana.

5.1.2) Área por cabeça de Lipídio A

A área por cabeça foi calculada como descrito no capítulo de metodologia e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.1.2 a seguir.

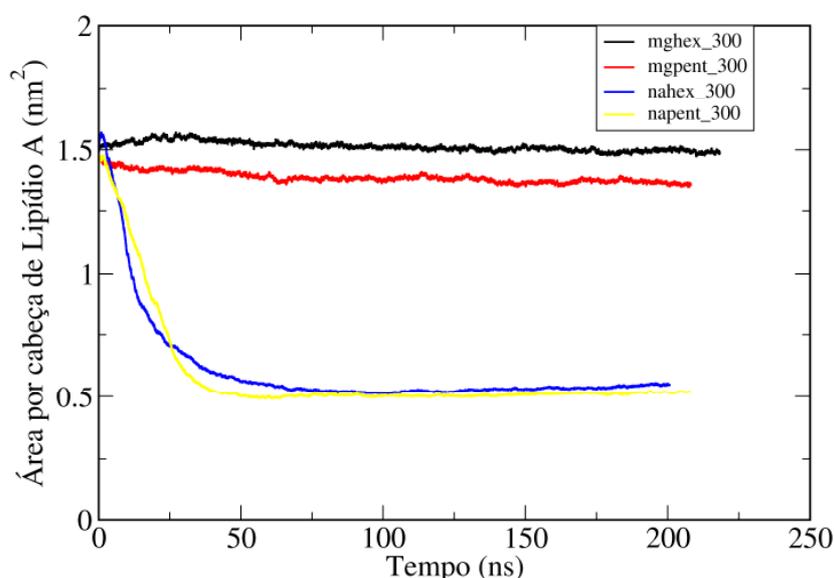


Figura 5.1.2: Área por cabeça de Lipídio A (nm^2) das membranas hexa- e pentaaciladas tendo Na^+ e Mg^{2+} como contraíons.

Os valores da área por cabeça de Lipídio A para os sistemas contendo Mg^{2+} como contraíon estão dentro de um intervalo compatível com medidas prévias de área por cabeça de membranas de Lipídio A e LPS [Snyder *et al*, 1999]. O sistema hexacilado possui uma área por cabeça de Lipídio A de $1,494 \pm 0,007 nm^2$ e para o sistema pentaacilado o valor é de $1,372 \pm$

0,008 nm². Esses valores foram obtidos a partir da análise dos últimos 50ns de cada trajetória. Os resultados da estimativa de área por cabeça de Lipídio A para membranas contendo o íon Na⁺ apresentaram valores bastante baixos, o que é um indício de formação de uma estrutura não-lamelar na membrana. A confirmação dessa suposição pode ser comprovada com as estruturas finais de cada simulação apresentadas na Figura 5.1.3.

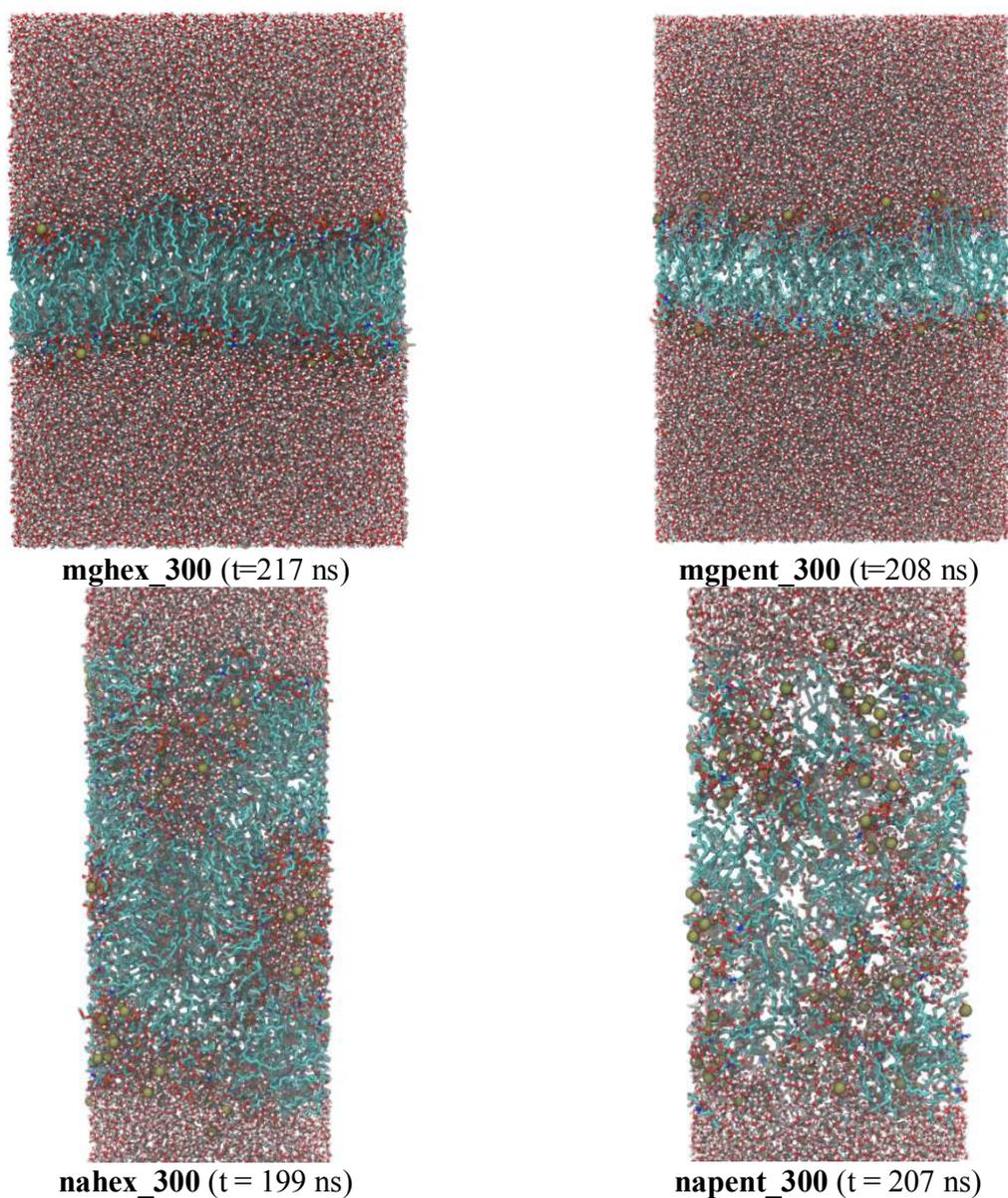


Figura 5.1.3: Estrutura final das membranas de Lipídio A hexa- e pentaaciladas contendo Mg²⁺ (superior) e estruturas contendo Na⁺ como contraíons (inferior). O instante de tempo da simulação correspondente a estrutura está indicada em cada figura. As membranas contendo o íon Na⁺ (nahex_300 e napent_300) foram representadas por cortes na região da membrana e apenas a região contendo os lipídios foi reproduzida.

Observando as estruturas finais das simulações, verifica-se a manutenção da forma lamelar nas membranas de Lipídio A contendo Mg^{2+} . As cadeias lipídicas de cada camada estão entrelaçadas indicando certa desorganização da membrana. As bicamadas contendo íons Na^+ sofreram um forte rearranjo estrutural e toda a estrutura da membrana foi desfeita. A diferença de arranjo inicial em relação as bicamadas contendo o íon Mg^{2+} nos leva a crer que a presença do íon foi determinante para a mudança estrutural apresentada.

5.1.3) Ângulo de Inclinação e Raio de Giro dos Lipídios A na Bicamada.

O formato molecular do Lipídio A e sua forma de agregação supramolecular são requisitos importantes na determinação de sua endotoxicidade [Brandenburg *et al*, 1997; Brandenburg e Seydel, 1988; Brandenburg *et al*, 1993; Seydel *et al*, 2000]. Isso permite supor que a mudança na forma de agregação observada nas membranas contendo Na^+ , esteja relacionada a mudanças no formato dos lipídios que formam as bicamadas. Além disso, poderíamos correlacionar o efeito do íon na estrutura da membrana.

O primeiro passo na investigação sobre a conformação molecular mais adotada pelas moléculas de Lipídio A foi calculando o ângulo de inclinação adotado entre os anéis de glucosamina e o plano formado pela superfície da bicamada. As médias foram calculadas para cada lipídio da bicamada ao longo dos últimos 50 ns finais de simulação. Os resultados estão apresentados nas figuras a seguir (Figura 5.1.4 e 5.1.5). Esta análise não foi realizada nas membranas contendo o íon Na^+ pois a estrutura da membrana não se manteve em estrutura lamelar.

O ângulo de inclinação medido para as membranas contendo Mg^{2+} praticamente não sofreram variação em relação à mudança de quimiotipo do Lipídio A. Os valores médios do ângulo de inclinação são de $15,289 \pm 0,599$ (mg_{hex_300}) e $15,863 \pm 0,635$ (mg_{penta300}). Os últimos 20 ns de análise indicam um leve afastamento entre os valores medidos para cada membrana, com a membrana pentaacilada apresentando valores médios superiores aos da membrana com quimiotipo hexaacilado.

O gráfico de frequência dos ângulos calculados (Figura 5.1.5) indica que a maioria dos ângulos medidos para os dois quimiotipos possui valores de até 40° . A frequência decai com o aumento do valor do ângulo.

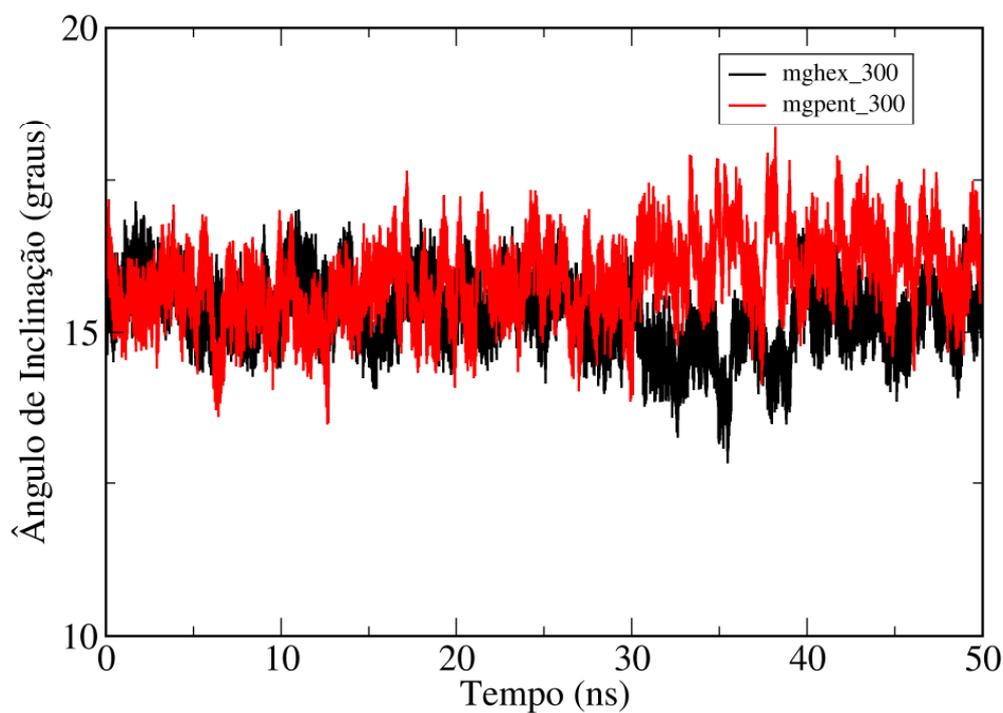


Figura 5.1.4: Ângulo de inclinação dos anéis de glucosamina do Lipídio A hexa- e pentacilado tendo o Mg^{2+} como contraíon em relação ao plano da membrana. O ângulo foi medido durante os últimos 50 ns de trajetória equilibrada.

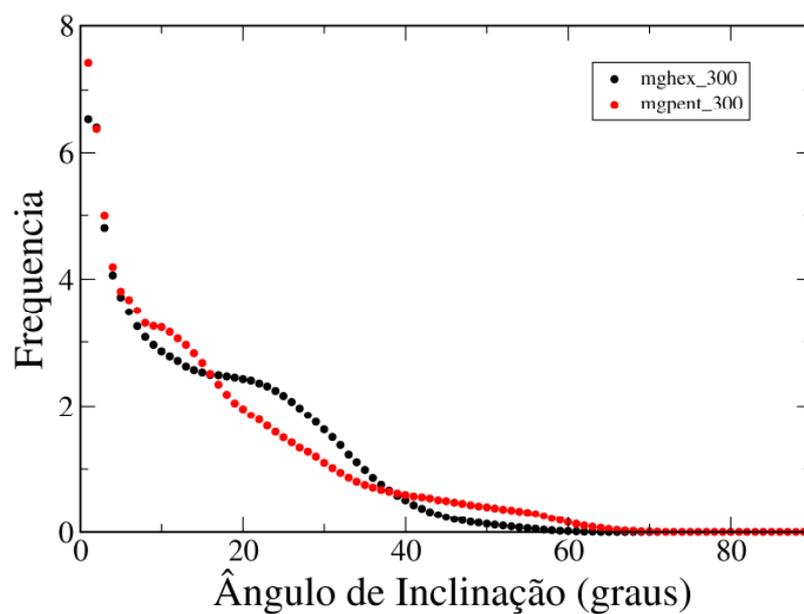


Figura 5.1.5: Frequência normalizada dos ângulos de inclinação entre as glucosaminas e o plano da membrana nas bicamadas de Lipídio A hexa- e pentaaciladas contendo o íon Mg^{2+} .

Outro aspecto importante a ser conhecido sobre a conformação dos Lipídios A em cada bicamada é saber o seu formato adotado. Como já foi mencionado em outras partes do texto, arranjos lamelares nas bicamadas de Lipídio A são adotados preferencialmente quando o lipídio tem um formato cilíndrico. Quando a molécula tem um formato mais cônico, maior é a chance de um arranjo não-lamelar ser formado [Mueller *et al*, 2004; Brandenburg *et al*, 1997; Brandenburg *et al*, 1993]. Como temos arranjos não-lamelares para as membranas contendo íons Na^+ podemos testar a validade dessa hipótese através da razão entre os raios de giro dos terminais das cadeias aciladas ($-\text{CH}_3$) e dos anéis de glucosaminas de cada Lipídio A (Figura 5.1.6).

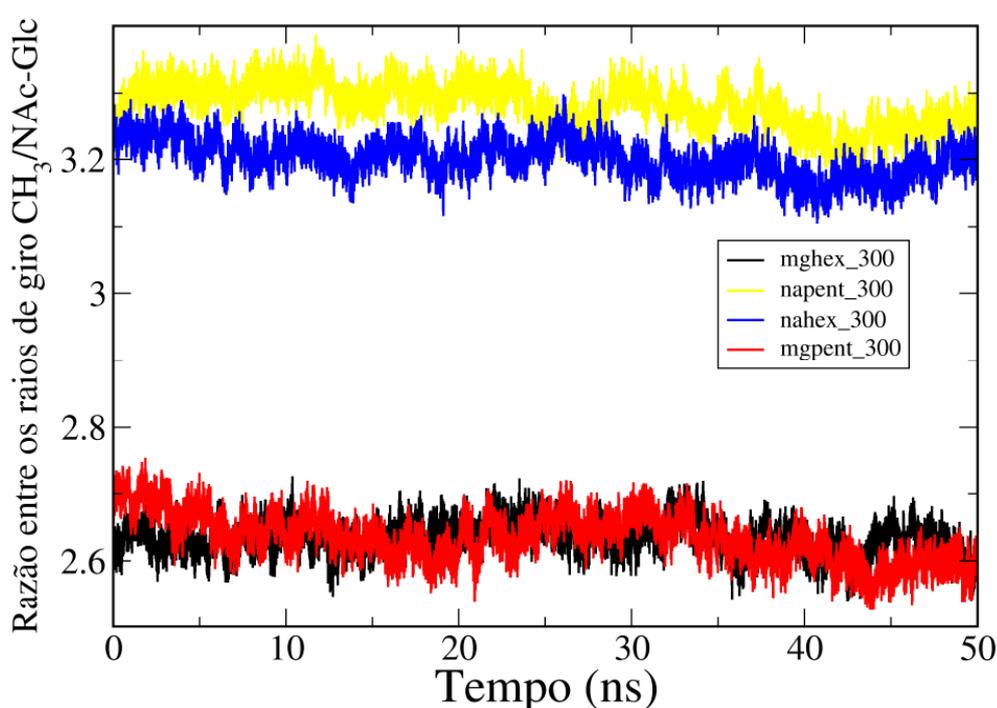


Figura 5.1.6: Razão entre o raio de giro dos grupos terminais das cadeias aciladas (CH_3) e dos anéis de glucosaminas de Lipídio A hexa- e pentaacilados tendo o Na^+ e o Mg^{2+} como contraíons. As médias foram feitas sobre todos os lipídios da bicamada e nos últimos 50ns de trajetória equilibrada.

A razão entre os raios de giro observados nos Lipídios contendo íons Na^+ são cerca de 20% maiores que a razão obtida entre os raios de giro das membranas contendo íons Mg^{2+} como pode ser observado na Tabela 5.1.1. Entre as membranas contendo Mg^{2+} o quimiotipo hexaacilado apresenta um valor para a razão entre os raios de giro maior que o quimiotipo pentaacilado. Esperava-se que, por possuir um número menor de cadeias lipídicas e uma maior área livre no plano da membrana, o valor da razão fosse maior para a membrana pentaacilada. Possivelmente, devido ao entrelaçamento das cadeias de cada camada, observado na Figura 5.1.3, o movimento seja mais restrito que o esperado.

Para as membranas contendo Na^+ o quimiotipo pentaacilado possui razão maior que a do quimiotipo hexaacilado. As membranas contendo Na^+ possuem razão entre os raios de giro maiores que as membranas contendo Mg^{2+} indicando que o Lipídio A na presença de íons monovalentes tem um formato mais cônico do que na presença de íons bivalentes. Esse resultado suporta a hipótese da influência do formato do Lipídio na forma do agregado e evidencia a diferente influência do íon sobre o lipídio.

Tabela 5.1.1: Valores médios e desvio-padrão para a razão entre os raios de giro $\text{CH}_3/\text{NAC-Glc}$ para os quimiotipos hexa- e pentaacilados contendo íons Mg^{2+} e Na^+ calculados nos últimos 50 ns de simulação.

Simulação		Simulação	
mghex 300	$2,726 \pm 0,025$	nahex 300	$3,202 \pm 0,027$
mgpent 300	$2,633 \pm 0,037$	napent 300	$3,281 \pm 0,033$

A maior conicidade dos Lipídios tendo o Na^+ como contraíon é consistente com as estruturas não-lamelares observadas para essas membranas. Interessante notar que para as membranas de arranjo lamelar o valor da razão entre os raios de giro é praticamente o mesmo e não sofre efeito da estrutura química do Lipídio A. Uma informação importante é que a maior parte das caracterizações estruturais da conformação de Lipídio A foi realizada utilizando o Mg^{2+} como contraíon [Schromm *et al*, 2000; Gutschmann *et al*, 2000; Brandenburg *et al*, 1997; Brandenburg *et al*, 1993; Seydel *et al*, 2000; Brandenburg *et al*, 2002] e com o sistema apresentando baixa endotoxicidade e maior ordenamento.

5.1.4) Densidades Parciais

Analizamos estruturalmente as membranas contendo Mg^{2+} e Na^+ através do uso de perfis de densidade de alguns grupos químicos da estrutura do Lipídio A. Os grupos foram os mesmos escolhidos na análise de perfil de densidade das membranas contendo Ca^{2+} : os átomos de oxigênio das moléculas de água, os átomos de fósforo do grupo fosfato, os grupos metilenos das cadeias aciladas dos Lipídios A e os íons que compõem a bicamada (Mg^{2+} ou Na^+). A análise foi realizada de acordo com a posição ocupada por cada grupo em relação ao eixo Z da caixa de simulação. Os gráficos estão apresentados na Figura 5.1.7.

A diferença entre os perfis de densidade das membranas contendo Mg^{2+} e daquelas contendo Na^+ é notória: as bicamadas contendo o íon bivalente possuem um perfil simétrico, típico de membranas lamelares; enquanto que as membranas de Lipídio A contendo o íon

monovalente são completamente desordenadas, em mais uma prova da estrutura não-lamelar formada.

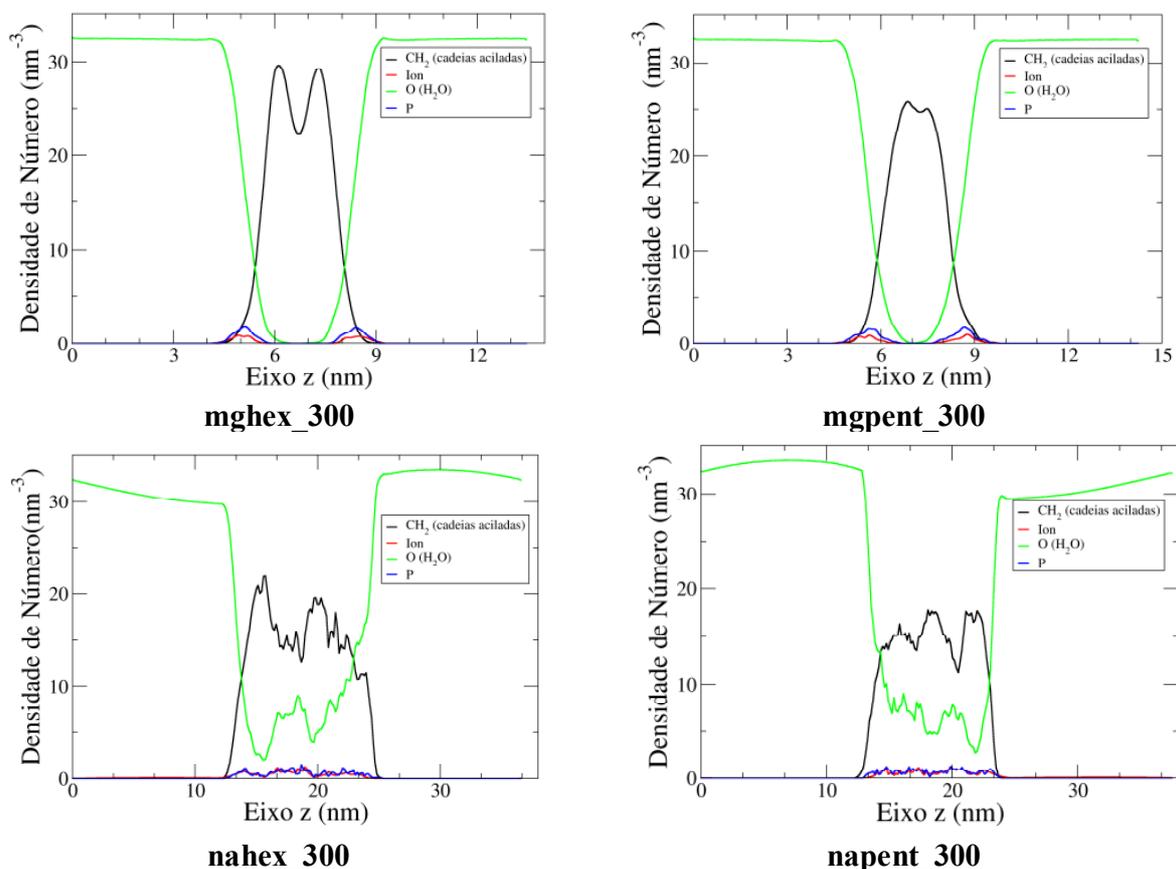


Figura 5.1.7: Perfis de densidades parciais de número (nm^{-3}) ao longo do eixo Z de alguns grupos químicos selecionados para as membranas de Lipídio A contendo Na^+ e Mg^{2+} . O cálculo foi realizado nos últimos 50 ns simulados de trajetória equilibrada de cada simulação.

Analisando as membranas de Lipídio A lamelares percebe-se que o perfil de densidade é bastante semelhante nos dois casos. A membrana de quimiotipo pentaacilado é levemente mais alongada que a de quimiotipo hexaacilado. As áreas de intersecção entre os grupos O (H_2O) e das cadeias aciladas é também maior na membrana de quimiotipo pentaacilado do que na membrana de quimiotipo hexaacilado. Esse resultado indica à maior permeabilidade a água da membrana de quimiotipo pentaacilado em relação ao outro quimiotipo. Essa informação está de acordo com medidas prévias de difração de nêutrons realizadas em membranas de LPS para *P. aeruginosa* [Abraham *et al*, 2007; Kucerka *et al*, 2008]. A localização dos íons e átomos de P, do grupo fosfato, na mesma região do eixo Z, indica uma coordenação dos íons com esse grupo na trajetória analisada. Analisando os perfis de densidade para a membrana contendo os íons monovalentes observa-se uma situação bastante distinta. Os grupos químicos que tiveram seu

perfil de densidade analisados estão completamente distribuídos pela caixa de simulação com quase nenhum padrão ou regularidade.

5.1.5) Funções de Distribuição Radial

A mudança no formato de agregação da membrana provocada pela mudança de contração na membrana sugere que o processo é iniciado pela substituição de íons Mg^{2+} por Na^+ nas vizinhanças da cabeça do Lipídio A. Por conta disso, calculamos as funções de distribuição radial para alguns pares de átomos selecionados e verificamos o seu comportamento sob efeito dos íons mono- e bivalentes. Escolhemos os seguintes pares de átomos para analisar: cátions (Mg^{2+} ou Na^+) em relação aos átomos de oxigênio da água; cátions (Mg^{2+} ou Na^+) em relação ao átomo de fósforo dos grupos.

5.1.5.1) Função de Distribuição Radial de Pares: Íon – O (H_2O).

As distribuições radiais de pares entre o íon (Mg^{2+} ou Na^+) e o átomo de oxigênio da água apresentam um perfil geral parecido para os quatro casos analisados. Um pico mais intenso e definido por volta de 0,25 nm e outro, bem mais largo e menos intenso um pouco antes de 0,5 nm. Depois disso a distribuição assume o valor de uma unidade, como esperado. As membranas contendo Mg^{2+} têm um perfil quase idêntico, a principal diferença é na intensidade do primeiro pico: na membrana de quimiotipo hexaacilado o pico é mais intenso. Comparativamente, percebe-se o mesmo padrão entre os quimiotipos nas membranas contendo Na^+ . Analisando o efeito do íon sob o mesmo quimiotipo, os íons Na^+ provocam uma diminuição de intensidade no primeiro pico da distribuição e a deixam com caráter mais amorfo. A intensidade máxima também se desloca um pouco. Os resultados estão apresentados na Figura 5.1.8 a seguir.

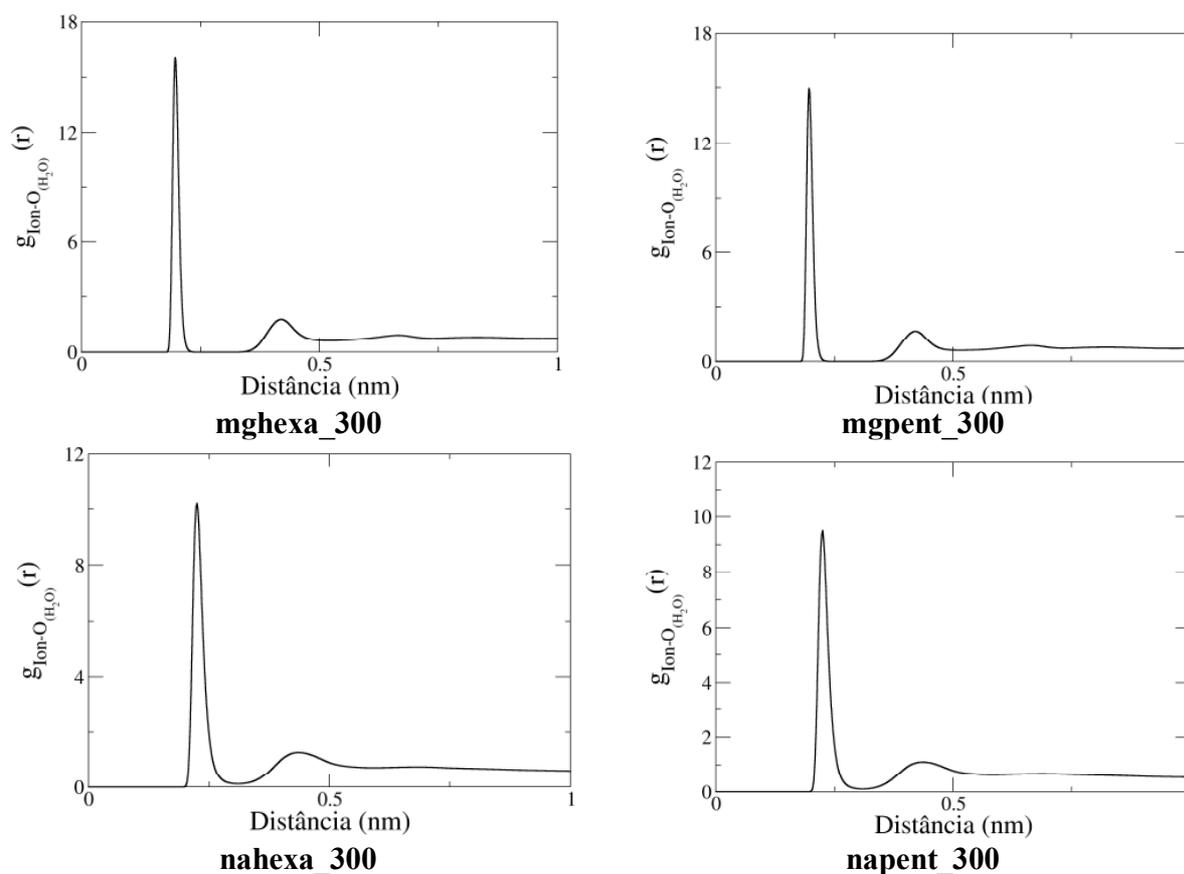


Figura 5.1.8: Funções de distribuição radial do par Íon – O (H_2O) para as bicamadas de Lipídio A hexa- e pentaaciladas contendo os íons Na^+ e Mg^{2+} . Os gráficos foram feitos para os últimos 50 ns de trajetória equilibrada.

5.1.5.2) Função de Distribuição Radial de Pares: Íon – P.

As funções de distribuição de pares para o par P – Íon (Mg^{2+} ou Na^+) não apresentam diferenças entre os dois fenótipos em se tratando do mesmo íon, mas as diferenças entre os gráficos para íons de natureza química diferente é bastante grande.

Inicialmente analisaremos as membranas contendo o Mg^{2+} como íon. O primeiro pico acontece pouco depois de 0,25 e é bem intenso e definido, sendo logo em seguida acompanhado pelo segundo pico (quase da mesma intensidade em se tratando da membrana hexaacilada, mas de menor intensidade na espécie pentaacilada). A curta distância separando os dois picos é um indício de que se trata do mesmo átomo de Mg^{2+} coordenando com átomos de fósforo de dois lipídios diferentes (Figura 5.1.9). Por volta de 0,5 nm aparece um segundo pico, mas bastante largo e quase sem intensidade. A distribuição assume valor de 1 após essa distância.

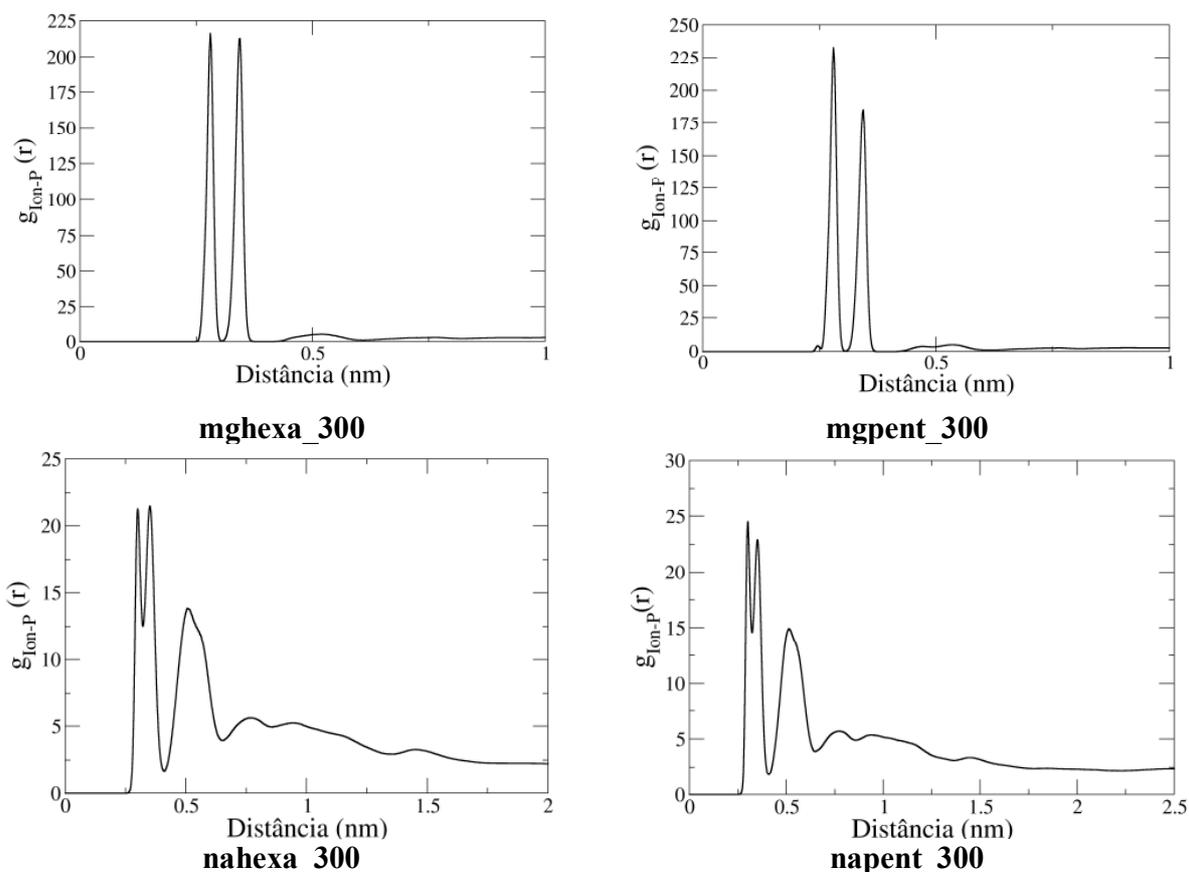


Figura 5.1.9: Funções de distribuição radial do par P - Íon para as bicamadas de Lipídio A hexa e pentaaciladas contendo os íons Na^+ e Mg^{2+} . Os gráficos foram feitos para os últimos 50 ns de trajetória equilibrada.

Analisando os gráficos da distribuição radial de pares das membranas contendo o íon Na^+ observamos que a intensidade dos picos é bem menor e eles são bem mais largos, indicando o caráter menos estruturado da membrana. Os dois picos com a mesma base em comum apontam para a conclusão de que existe dois pares Íon – Na^+ bastante próximos. O que nos leva a crer no arranjo estrutural de um íon coordenando com apenas um átomo de fósforo e sem desempenhar o papel de ponte entre átomos de fósforo de unidades lipídicas distintas. O segundo pico já é bastante largo e deve estar relacionado com o íon Na^+ e um átomo de não-vizinho de fósforo do mesmo lipídio. A distribuição de pares não assume o valor de 1 a distâncias de até 2,5 nm.

Os números de coordenação dos pares analisados estão apresentados na Tabela 5.1.2. O número de coordenação total dos íons é próximo de cinco. Nas membranas contendo Mg^{2+} a função de distribuição radial indica que o cátion está cercado por dois átomos de fósforo. Isso reforça a hipótese que o cátion bivalente exerce o papel de ponte entre grupos fosfatos de unidades lipídicas diferentes. A quantidade de moléculas de água é estimada como sendo em torno de 3.

Tabela 5.1.2: Números de coordenação dos pares Ion – P e Ion – O (H₂O) para as membranas de quimiotipos penta- e hexaacilados contendo os íons Mg²⁺ e Na⁺.

Par	mghexa 300	mgpenta 300	nahexa 300	napenta 300
Íon – O (H ₂ O)	3,1	3,0	4,50	4,33
Íon – P	2,0	2,0	0,46	0,52

As membranas contendo íons Na⁺ a quantidade de moléculas de água é bastante alta. Uma inspeção visual na membrana mostra que muitos cátions estão completamente rodeados de moléculas de água. O número de coordenação dos íons em relação ao fosfato é de aproximadamente 0,5, ou seja, aproximadamente um cátion por molécula de Lipídio A. Isso evidencia a ausência da ponte entre grupos fosfatos de lipídios diferentes e pode-se atribuir a essa evidência a perda de estrutura lamelar da membrana contendo Na⁺.

5.1.6) Parâmetros de Ordem do Deutério

Os parâmetros de ordem de deutério S_{CD} para as cadeias aciladas *sn-1*, *sn-2* e *sn-3* (ver Figura 5.1.10) foram calculados para as cadeias aciladas de Lipídio A nas membranas contendo Mg²⁺ e Na⁺ como contraíons. Nesta análise consideramos apenas os átomos de carbono (CH₂) das cadeias. Os resultados estão apresentados na Figura 5.1.11.

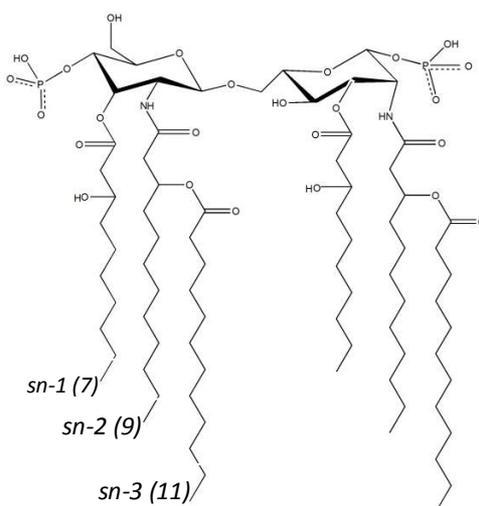


Figura 5.1.10: Indicação das cadeias *sn-1*, *sn-2* e *sn-3* na molécula de Lipídio A. Entre parênteses o número de átomos de carbono incluídos para análise em cada cadeia.

Como explicado no capítulo introdutório, 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 $n-1$. Desse modo, os átomos iniciais e finais da cadeia servem apenas como referência e não tem os seus respectivos parâmetros de ordem calculados. Então, para cada cadeia, o número de átomos indicados no gráfico de parâmetro de ordem é menor em duas unidades ao indicado na Figura 5.1.10.

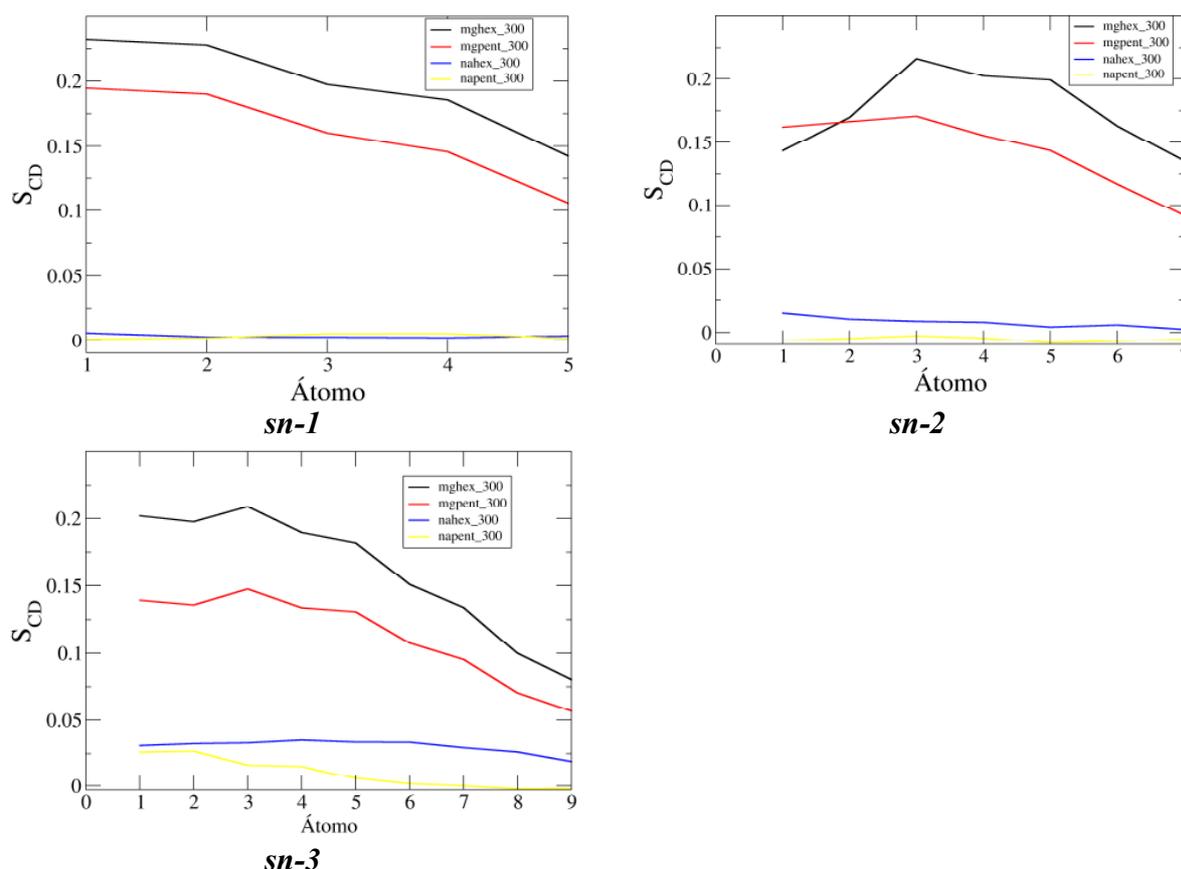


Figura 5.1.11: Parâmetro de ordem médio para os átomos das cadeias aciladas do Lipídio A em cada simulação. A propriedade foi calculada para os últimos 50 ns de trajetória equilibrada.

Os valores calculados para as cadeias lipídicas das membranas contendo Na^+ são bastante baixos e próximos de zero. No entanto, pelo completo grau de desordem desses sistemas e a arbitrariedade em se definir o plano da membrana, não discutiremos a fundo os resultados para esses sistemas e concentraremos a discussão nas membranas contendo Mg^{2+} como contraion.

O comportamento esperado para o gráfico de parâmetro de ordem de cadeias lipídicas é um gráfico onde o valor do parâmetro decai gradativamente para os átomos de carbono de maior índice no sentido proximidade da cabeça do lipídio para a região hidrofóbica. A explicação para

esse comportamento é simples: à medida que se aproxima do terminal da cadeia lipídica, menos restritos são os graus de liberdade dos grupos terminais. Esses grupos apresentam uma maior desordem e um menor valor do parâmetro de ordem. Esse comportamento é observado apenas para a cadeia denominada *sn-1* (Figura 5.1.11). Essa cadeia tem como principal característica ser uma cadeia linear e não ramificada. Os gráficos para as cadeias *sn-2* e *sn-3* apresentam comportamento imprevisto para os parâmetros de ordem dos primeiros átomos da cadeia. Uma possível explicação para isso seria a interação atrativa entre os primeiros átomos de carbono da cadeia *sn-3* e *sn-2* com átomos de oxigênio do grupo ceto-éster da cadeia *sn-3*. Essa interação atrativa limitaria o movimento dos átomos e conferiria aos átomos de carbono mais de rigidez, refletindo assim, no formato dos gráficos de parâmetro de ordem dessas cadeias. É interessante notar que o gráfico de parâmetro de ordem da cadeia *sn-2* do quimiotipo pentaacilado (Figura 5.1.11) tem os valores praticamente idênticos para os primeiros átomos de carbono da cadeia. A diferença entre os quimiotipos reside justamente numa cadeia *sn-3* inexistente em um dos açúcares. A membrana hexaacilada apresenta valores maiores para os parâmetros de ordem para o deutério, indicando uma maior organização das cadeias lipídicas em relação aquelas da membrana pentaacilada. O maior espaço para as cadeias lipídicas se movimentarem no quimiotipo pentaacilado contribuem para o menor grau de organização constatado através da análise de parâmetro de ordem.

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 *et al*, 1995], a orientação das cadeias aciladas de membranas lipopolissacarídicas e de Lipídio A as medidas são feitas utilizando refletância total atenuada acoplada com espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e aplicando. A técnica mede as mudanças que ocorrem nas refletâncias internas do feixe, após ter contato com a amostra. O resultado é tratado com a técnica de transformada de Fourier e um espectro de absorvância é obtido. Os picos têm suas posições determinados, assim como a sua intensidade. Os coeficientes de absorção são então ajustados ao parâmetro de ordem das cadeias [Brandenburg e Seydel, 1986]. O parâmetro de ordem obtido por esse procedimento é um valor para toda a membrana e não valores individuais para os átomos de carbono da cadeia.

Dessa maneira, estimamos o valor médio dos parâmetros de ordem calculados para as membranas e comparamos com medidas disponíveis na literatura [Brandenburg *et al*, 2003]. Os valores que obtivemos para os parâmetros de ordem médio foram de $0,174 \pm 0,041$ e $0,134 \pm 0,037$ para as membranas de quimiotipo hexa e pentaacilado, respectivamente. Os valores não apresentam confiabilidade estatística para se mostrarem distintos, indicando ser necessário analisar um tempo maior de trajetória equilibrada. No entanto, as medidas experimentais apontam as membranas hexaaciladas como sendo mais organizadas que as pentaaciladas [Brandenburg *et al*, 2003].

5.1.7) Orientação das Moléculas de Lipídio A nos Agregados

A formação de agregados não lamelares de Lipídio A pode ocorrer de mais de uma forma (Q_I , H_I , H_{II}) dependendo de uma variedade de fatores [Brandenburg, 1993; Seydel *et al*, 1989; Brandenburg *et al*, 1990]. A investigação da posição do Lipídio A na bicamada durante a transição e mudança de forma de agregação. Para calcular o ângulo de inclinação do Lipídio A na bicamada medimos o ângulo entre um vetor definido ao longo do maior eixo do Lipídio A e o plano da membrana (definido a partir da configuração inicial de cada sistema).

Os ângulos medidos variam entre 0° (os Lipídios estão paralelos ao eixo Z da membrana) e 90° (as moléculas estão perpendiculares ao eixo Z). Em membranas completamente ordenadas o ângulo de inclinação de todos os lipídios seria 0° . No entanto, é sempre esperado que os ângulos de algumas moléculas apresentem inclinação diferente de zero. Num caso de um sistema micelar ideal espera-se uma distribuição de ângulos cobrindo todos os valores possíveis de 0° a 90° com igual frequência. Os resultados para as nossas membranas estão apresentados na Figura 5.1.12.

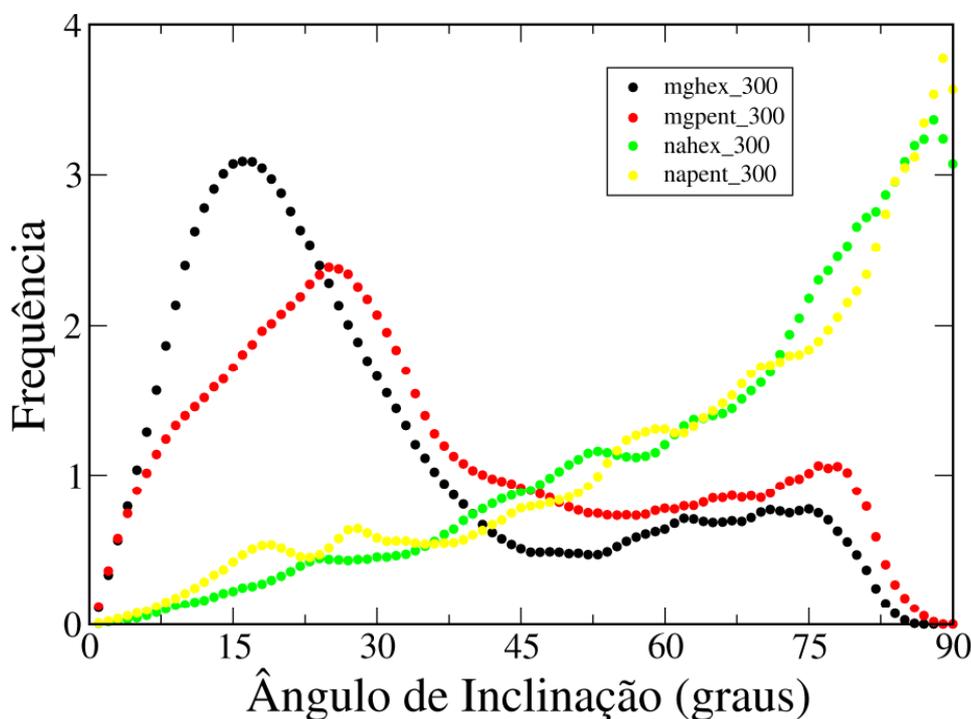


Figura 5.1.12: Frequência não-normalizada dos ângulos de inclinação do Lipídio A hexa- e pentaacilado contendo íons Na^+ e Mg^{2+} em relação ao eixo Z. O ângulo foi medido para os últimos 50 ns de cada simulação.

Os resultados demonstram coerência com as conclusões já obtidas através de outras análises sobre a organização das membranas. Os arranjos lamelares contendo o íon Mg^{2+} apresentam uma maior frequência de moléculas de Lipídio A com um baixo ângulo de inclinação. Para a membrana hexaacilada (mais ordenada) o valor mais comum é de 15° , enquanto que a membrana pentaacilada esse valor é próximo de 30° . Para as membranas contendo o Na^+ como contraíon o comportamento observado foi o oposto. A frequência dos valores observados cresce linearmente com o aumento do ângulo medido. Sendo o valor de 90° o ângulo mais observado nas duas espécies de Lipídio A utilizados em cada membrana. Esse resultado reforça o aspecto desordenado dessas membranas.

5.2) Efeito do Cátion na Forma de Agregação de Membranas de Lipídio A de *P. aeruginosa* e *E. coli*.

As medidas de refletância total atenuada usada em conjunto com a técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (seção 5.1.6) permitem relacionar a absorvância de radiação com o ordenamento (parâmetros de ordem) das cadeias lipídicas, como também com o ângulo de inclinação entre as cadeias lipídicas e o plano das membranas. Algumas estimativas foram feitas e encontram-se resumidas na Figura 5.2.1. As espécies com maior ângulo de inclinação entre os anéis de glucosamina e o plano da membrana são mais endotoxicamente ativas, ao contrário das espécies de formato mais cilíndrico.

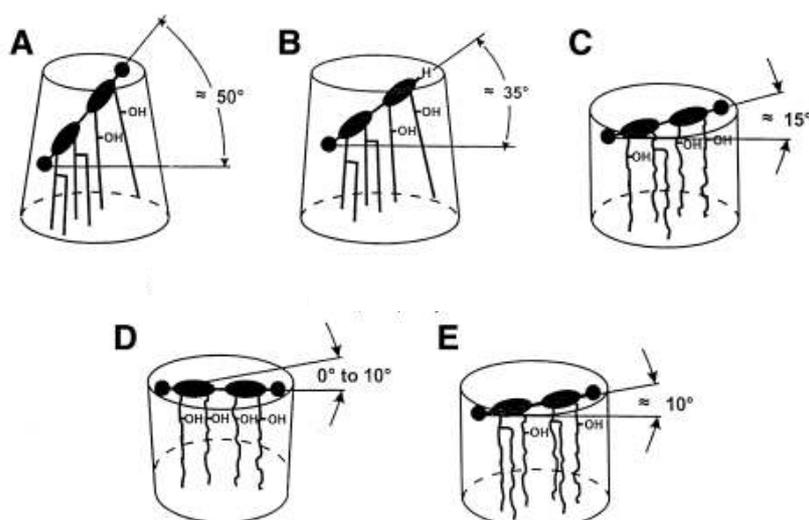


Figura 5.2.1: Conformação do Lipídio A e relação com sua endotoxicidade: (A) altamente endotóxico; (B) endotóxico; (C), (D) e (E) são inativos. [Seydel *et al*, 2000].

Até esse ponto estávamos sempre trabalhando com duas variações fenotípicas do Lipídio A de *P. aeruginosa*: o hexa- e o pentacilado, representados respectivamente por C e E na Figura 5.2.1. Resolvemos então construir topologias para novas espécies de Lipídio A, a saber, construímos a espécie hexacilada di- e monofosforilada do lipídio A para *E. coli* correspondentes as estruturas A e B da Figura 5.2.1. Essas espécies hexaaciladas possuem uma distribuição assimétrica das cadeias aciladas em comparação a espécie hexaacilada da *P. aeruginosa* (estrutura E). As estruturas diferem também no tamanho das cadeias lipídicas. Além disso, construímos a topologia da estrutura tetraacilada para a *P. aeruginosa* (estrutura D).

A membrana de quimiotipo monofosforilado de Lipídio A (carga total de $1e$ por lipídio) foi neutralizada com íons Na^+ . Enquanto os outros quimiotipos tiveram o Mg^{2+} como contraíon escolhido para neutralizar a carga total da membrana. Além do efeito do contraíon novamente

sendo testado nessas membranas, testamos também o efeito da temperatura sobre a membrana de *E. coli* de quimiotipo hexaacilado e difosforilado. Realizamos simulações nesse sistema a três diferentes temperaturas: 278 K, 300 K e 328 K.

5.2.1) Energia Potencial

A primeira etapa para a análise dos resultados foi determinando a fase equilibrada dessas simulações. A e para isso avaliamos a energia potencial dos sistemas simulados (Figura 5.2.2).

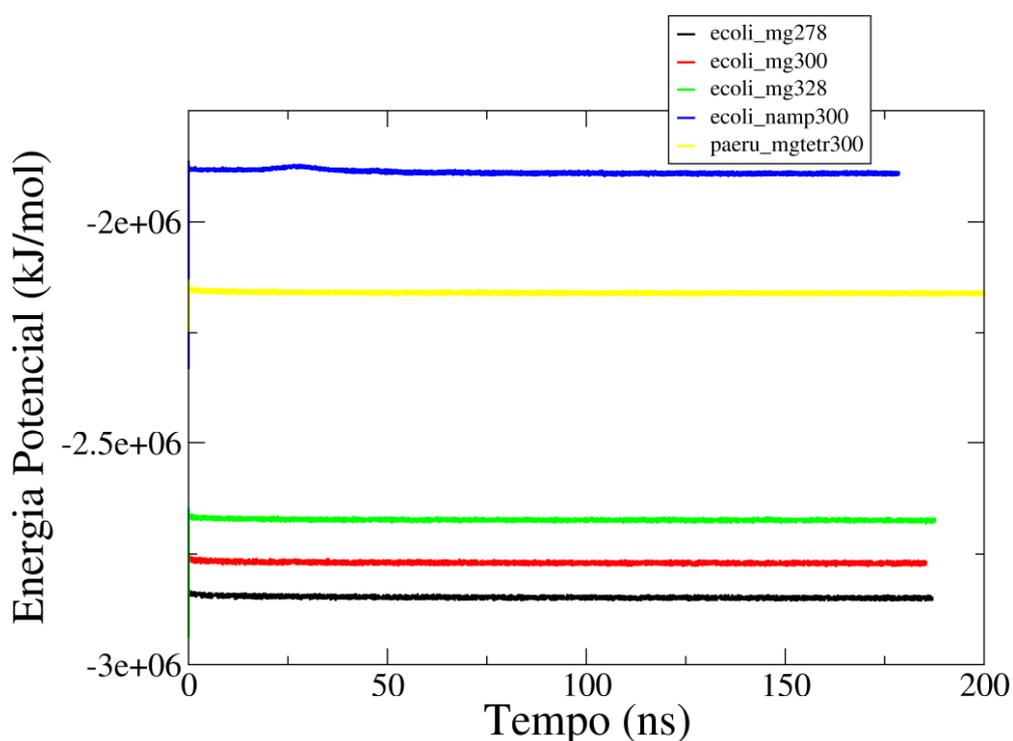


Figura 5.2.2: Energia potencial (kJ/mol) das membranas de Lipídio A hexa-, penta- e tetraaciladas contendo íons Na^+ e Mg^{2+} ao longo de toda a trajetória.

O gráfico contendo a energia potencial das membranas apresenta sistemas com energia potenciais estáveis e de perfil bem comportado. Exceto para o (ecoli_namp300) onde a energia potencial sofre uma elevação no seu valor, para posterior estabilização. Apesar disso, a energia potencial de todos os sistemas apresenta-se estáveis após os 50 ns de simulação. Conferida a estabilização em termos energéticos do sistema, é necessário verificar o comportamento estrutural das membranas através do cálculo da área por cabeça do lipídio A.

5.2.2) Área por cabeça do Lipídio A

Calculamos a área por cabeça de Lipídio A e os resultados estão apresentados em forma de gráfico a seguir (Figura 5.2.3).

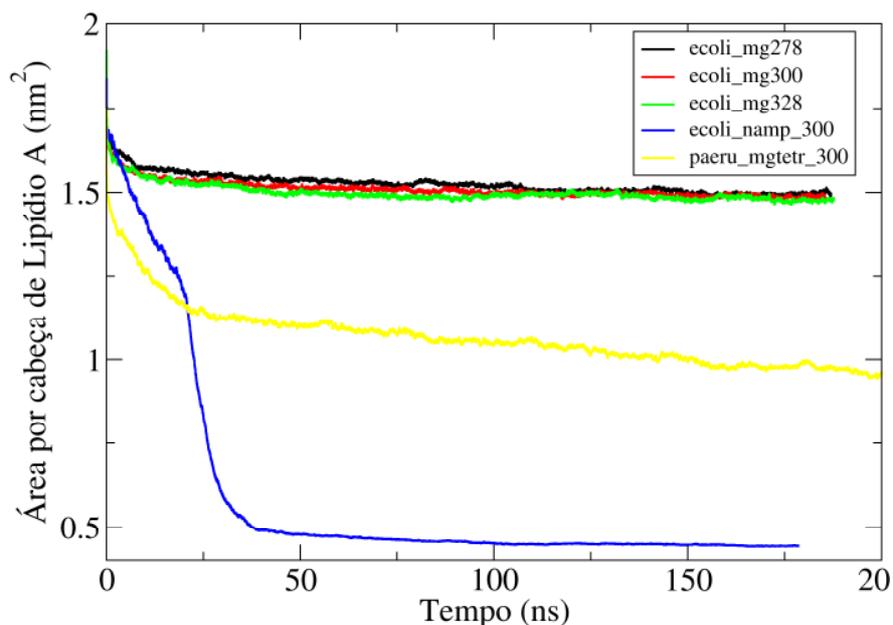


Figura 5.2.3: Área por cabeça (nm^2) para das membranas de Lipídio A hexa-, penta- e tetraaciladas contendo íons Na^+ e Mg^{2+} ao longo de toda a trajetória

As membranas hexaaciladas e difosforiladas simuladas em diferentes temperaturas (ecoli_mg278, ecoli_mg300, ecoli_mg328) praticamente não apresentaram modificação no valor da área por cabeça ao longo do tempo. Indicando quase que nenhuma variação estrutural na membrana sob efeito da temperatura. O valor da área por cabeça destas espécies (Tabela 5.2.1) está também em boa concordância experimental com estimativas anteriores de área por cabeça de lipídio A de *Salmonella* hexaacilado em LPS no valor de 1.56 nm^2 [Snyder *et al*, 1999].

As outras duas membranas simuladas apresentam uma variação bastante significativa do valor da área por cabeça ao longo da simulação. Sendo isso um indicativo de mudanças na forma de agregação das mesmas. A espécie tetraacilada (paeru_mgtetr300) apresenta uma queda acentuada no valor da propriedade nos primeiros 25 ns de simulações, para logo em seguida apresentar um lento decaimento, mas sem parecer ter atingido um valor estável. Esse comportamento pode ser um indicativo da lenta convergência e equilíbrio do sistema, como pode estar sendo influenciado pelo formato adotado pela membrana durante a dinâmica. Infelizmente não encontramos valores de área por cabeça de Lipídio A, disponíveis para espécies

tetraaciladas para fins comparativos. A estimativa da área por cabeça do Lipídio A para a espécie monofosforilada e contendo o íon Na^+ como contraíon apresenta um perfil semelhante ao de outros sistemas de bicamadas de Lipídio tendo o íon monovalente na sua composição: o baixo valor da propriedade indica a formação de um sistema não-lamelar.

Tabela 5.2.1: Valor médio com desvio-padrão para a área por cabeça de Lipídio A (nm^2) dos sistemas lamelares simulados nessa etapa do estudo. Os valores foram calculados para os últimos 50 ns da trajetória equilibrada.

Espécie	Área por cabeça de Lipídio A (nm^2)	Espécie	Área por cabeça de Lipídio A (nm^2)
ecoli_mg278	$1,526 \pm 0.030$	ecoli_mg328	$1,500 \pm 0.026$
ecoli_mg300	$1,511 \pm 0.025$	paeru_mgtetr300	$1,066 \pm 0.094$

A estrutura final das membranas simuladas demonstra a similaridade entre as estruturas lamelares para as membranas ecoli_mg278, ecoli_mg300 e ecoli_mg328. O sistema ecoli_namp300 formou uma estrutura não-lamelar e bastante desordenada. É interessante notar como na sua estrutura final os íons Na^+ não estão próximos aos lipídios da região hidrofóbica e sim rodeados por moléculas de água. O sistema tetraacilado manteve a estrutura lamelar, mas formando uma fase *ripple* e devido a grande ondulação formada e a dinâmica do sistema, acreditamos ser essa a razão da não convergência da área por cabeça desse sistema. As estruturas finais das membranas reforçando as discussões sobre as suas formas de agregação estão apresentadas na Figura 5.2.4 a seguir.

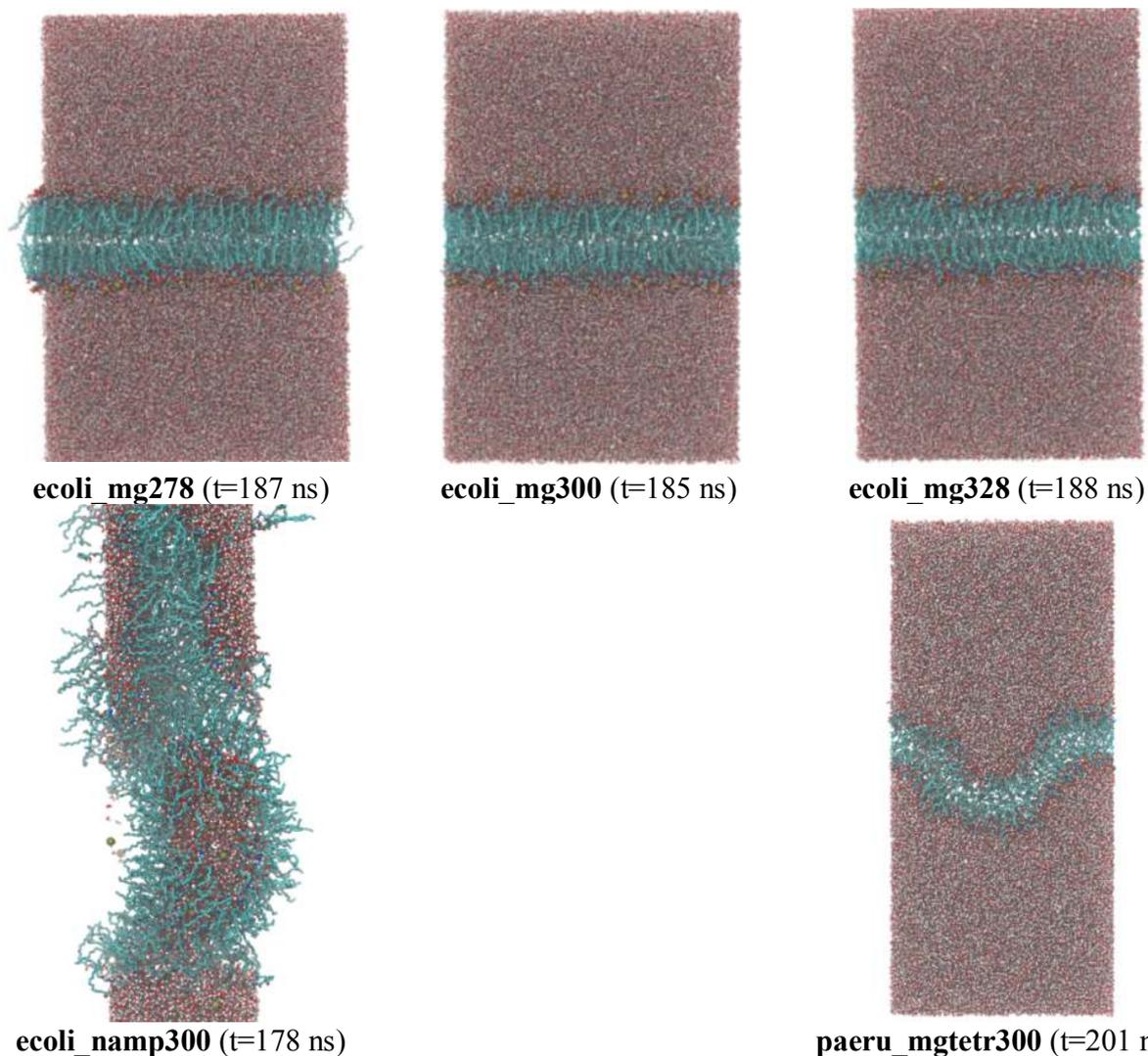


Figura 5.2.4: Estrutura final das bicamadas de Lipídio A hexa-, penta- e tetraaciladas contendo íons Na^+ e Mg^{2+} . A membrana *ecoli_namp300* foi representada por um corte no eixo Z onde a maioria dos Lipídios A estavam concentrados. O tempo correspondente a estrutura representada está indicado entre parênteses.

5.2.3) Perfil de Densidade

Os perfis de densidade de alguns grupos químicos selecionados (cadeias aciladas, átomo de fósforo do grupo fosfato, oxigênio da água e íons) ao longo do eixo Z da caixa de simulação foram calculados (Figura 5.2.5).

As membranas hexaaciladas e difosforiladas apresentam um padrão simétrico e quase idêntico entre si. Esse arranjo é típico de sistemas lamelares. Nessas membranas percebe-se que os íons estão localizados na mesma região dos íons fosfatos indicando a coordenação entre essas espécies químicas. O grau de hidratação das membranas também é o mesmo com certa penetração de água, mas não no núcleo hidrofóbico da membrana. De maneira geral, o aumento da temperatura não provoca alteração na distribuição de massa dos grupos analisados nas membranas desse fenótipo do Lipídio A. As conclusões obtidas a partir dos perfis de densidades dessas membranas estão de acordo com medidas experimentais de difração de nêutrons de membranas de LPS de *P. aeruginosa* [Kucerka *et al*, 2008]. A presença do íon Na^+ (ecoli_namp300) altera significativamente, em relação às membranas anteriores, o perfil de densidade dos grupos analisados ao longo do eixo Z. A distribuição dos grupos está disposta ao longo de toda a caixa de simulação corroborando com a imagem da estrutura final da membrana apresentada na Figura 5.2.4.

O caso mais conflitante entre a análise dos perfis de densidade e a estrutura da membrana encontra-se na membrana tetraacilada (paeru_mgtetr300). A membrana apresenta uma grande ondulação (fase *ripple*) na sua estrutura. A análise de perfil de densidade indica pouca estruturação e uma larga distribuição dos grupos químicos em relação ao eixo z da membrana, inclusive com uma larga penetração de água na região hidrofóbica da membrana. Tal contraste pode ser elucidado através de inspeção visual da estrutura final da membrana e podem ser explicadas pelo fato da ferramenta *g_density* analisar a distribuição dos grupos em relação a uma dada posição do eixo z, mas não levar em consideração a ondulação da membrana. Dessa forma, a análise indica equivocadamente grupos químicos na mesma coordenada, mas sem que eles estejam realmente coexistindo naquela região (Figura 5.2.6).

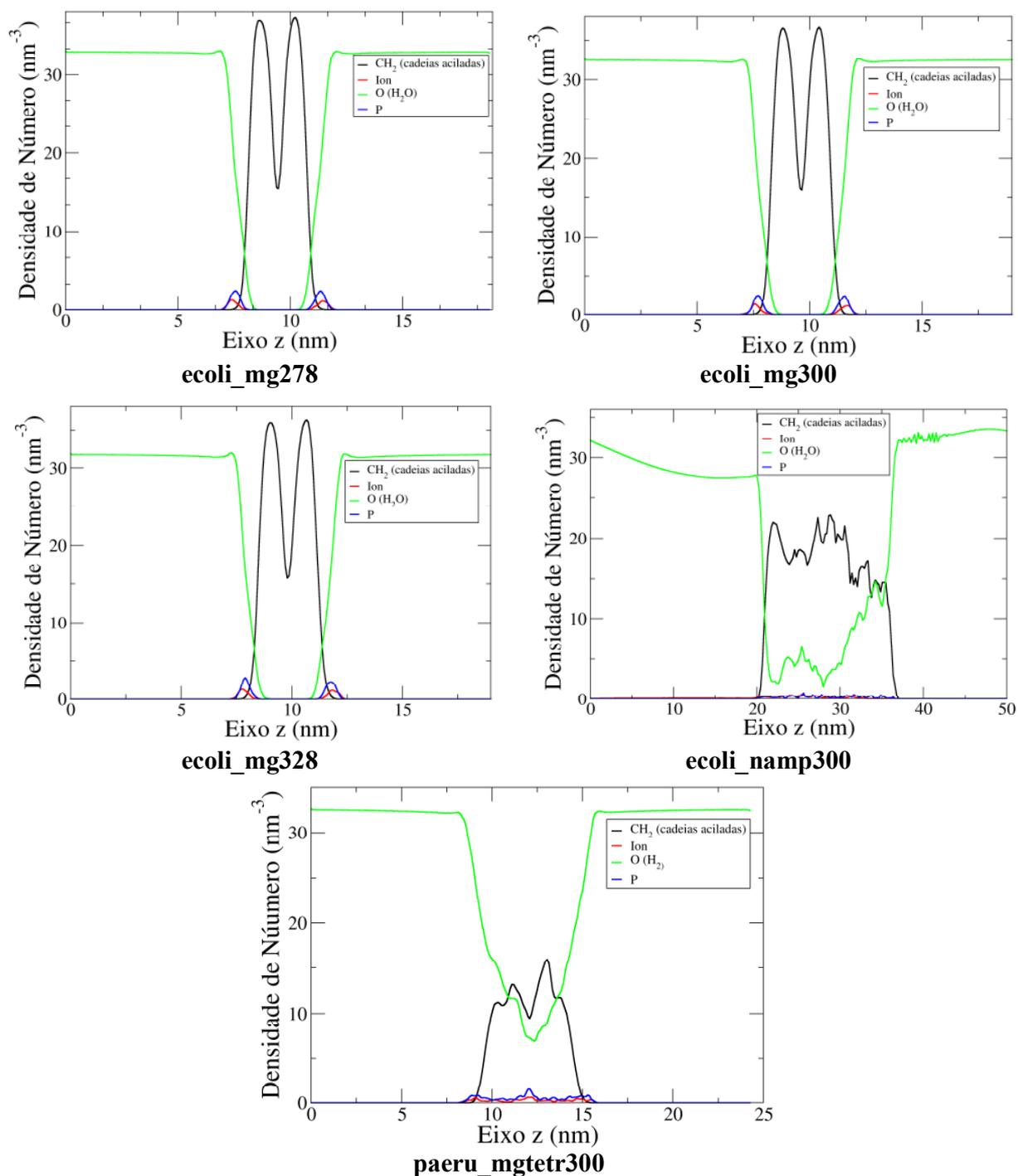


Figura 5.2.5: Perfis de densidades parciais (kg/m^3) de massa das membranas Lipídio A hexa-, penta- e tetraaciladas contendo íons Na^+ e Mg^{2+} . O perfil foi calculado nos últimos 70 ns de trajetória equilibrada de cada membrana.

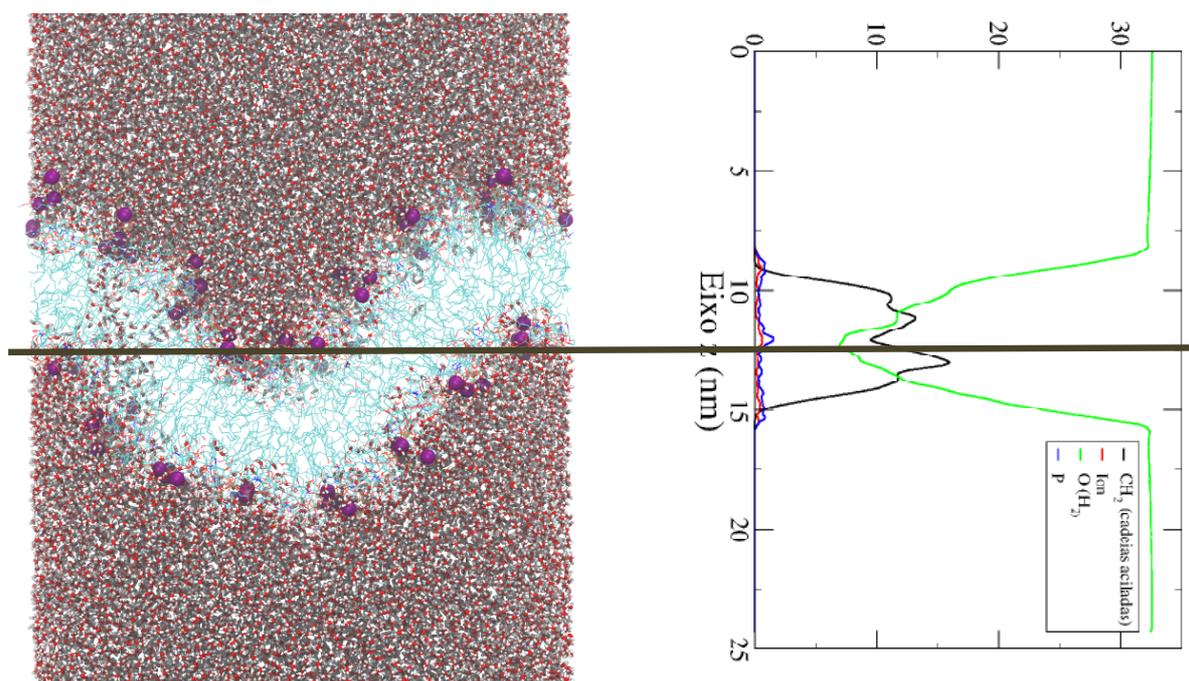


Figura 5.2.6: Estrutura final da membrana de Lipídio A tetraacilado contendo íons Mg^{2+} . A linha marrom indica uma posição do eixo Z onde a densidade de moléculas de água (*van der Waals*) co-existe com a do núcleo hidrofóbico da membrana, sem necessariamente haver uma grande quantidade de moléculas de água dentro desse núcleo como indicado no perfil de densidade da membrana.

5.2.4) Parâmetros de Ordem do Deutério

Os parâmetros de ordem do deutério das cadeias aciladas dos lipídios foram calculados para as bicamadas. Com a mudança fenotípica dos lipídios necessitamos de redefinir a nomenclatura das cadeias, como clarificado na Figura 5.2.7.

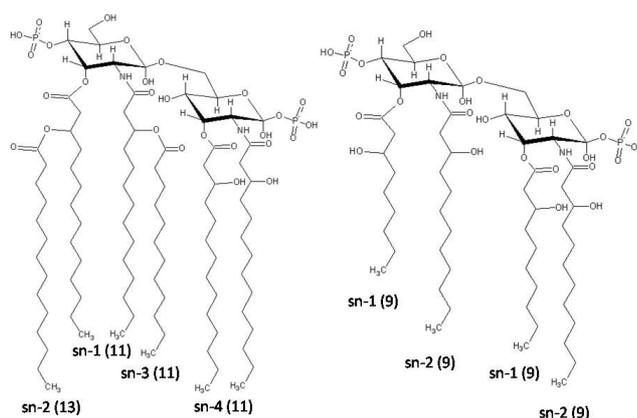


Figura 5.2.7: Indicação das cadeias *sn-1*, *sn-2*, *sn-3* e *sn-4* nas variações fenotípicas de Lipídio A. A esquerda temos o hexaacil Lipídio A de *E. coli* e a direita o tetraacil Lipídio A de *P. aeruginosa*.

As medidas de parâmetro de ordem para os átomos de cada cadeia para todos os lipídios componentes das membranas estão apresentados na Figura 5.2.8. Percebe-se nos gráficos a presença de três (*sn-1* e *sn-2*) ou dois conjuntos (*sn-3* e *sn-4*) de curvas. O comportamento esperado para os pontos, quanto mais próximos da parte hidrofílica, maior o valor do parâmetro de ordem e, maior organização, não é observada nas membranas hexaaciladas. Novamente, se pode utilizar aqui o mesmo argumento utilizado na explicação desse resultado para as membranas hexaaciladas de *P. aeruginosa*: a presença de grupos cetos-ésteres provoca o aparecimento de interações atrativas entre os átomos de oxigênios e átomos de carbono das cadeias lipídicas. Isso restringe o movimento de certos átomos da cadeia causando divergências entre os valores calculados e os esperados.

Os sistemas hexaacilados e contendo dois grupos fosfato na estrutura do Lipídio A apresentam valores de parâmetros de ordem bastante semelhantes indicando o mesmo grau de ordenamento nesses sistemas. O perfil das curvas, onde a desordem aumenta a medida que os átomos de carbono das cadeias aciladas aproximam-se do núcleo hidrofóbico. A partir dessa análise, podemos concluir que as membranas estão numa mesma fase de agregação. Esse resultado é condizente com medidas experimentais para a transição de fase de membranas de Lipídio A hexaacilado de *E. coli* [Gutsmann *et al.*, 2000]. Segundo a Figura 5.2.9, a transição de

fase de gel para líquido-cristalino para esta membrana inicia-se por volta de 35°C e continua até quase 50°C. A faixa de temperatura coberta por nossas simulações se estende até 55°C. O que implica, considerando certo grau de imprecisão de nossas simulações, que estamos cobrindo somente a região da membrana na fase gel.

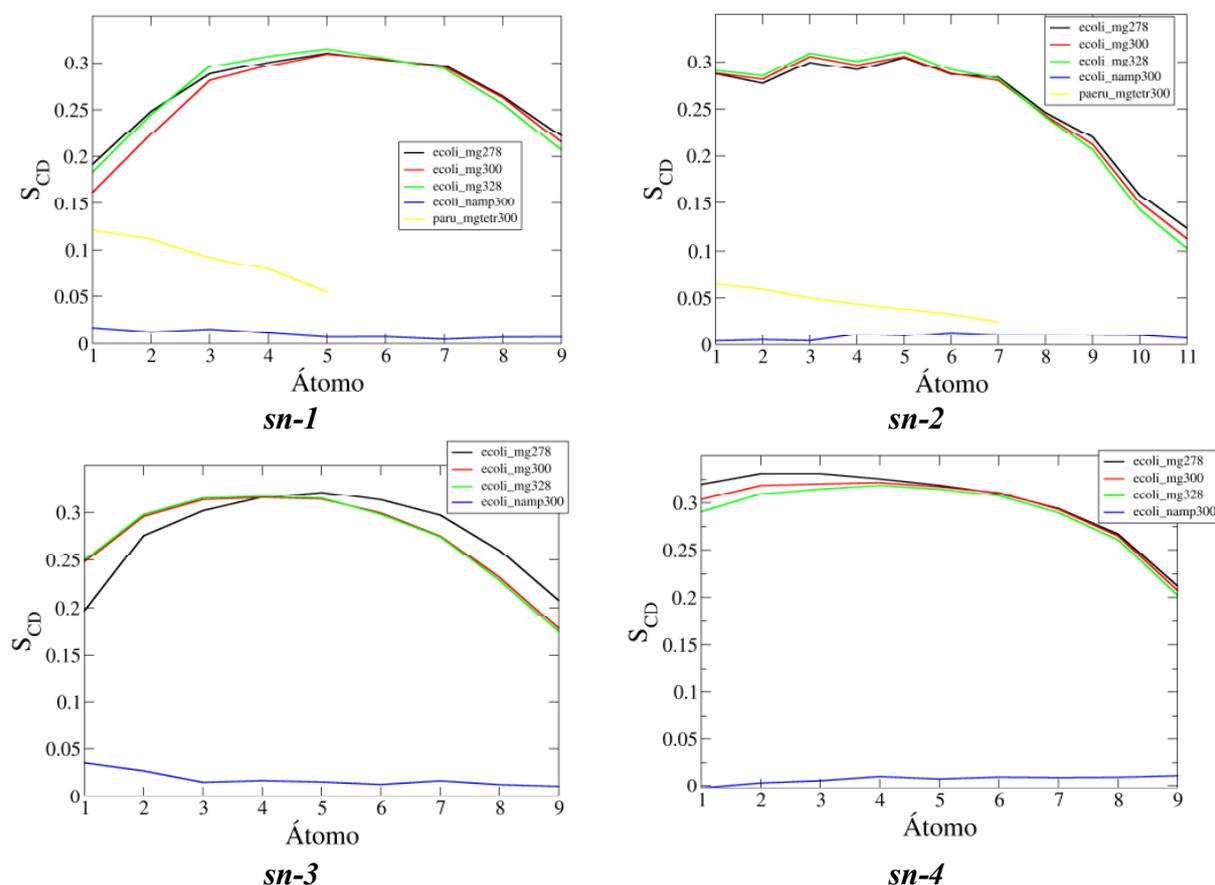


Figura 5.2.8: Parâmetros de ordem dos átomos de deutério para as cadeias aciladas das membranas Lipídio A hexa-, penta- e tetraaciladas contendo íons Na^+ e Mg^{2+} . A análise foi realizada nos últimos 70 ns de trajetória equilibrada de cada membrana.

Os valores dos parâmetros de ordem para a espécie de Lipídio A tetraacilado (*paeru_mgtetr300*) e hexaacilado monofosforilado (*ecoli_namp300*) são bastante baixos e característicos de sistemas com certo grau de desorganização.

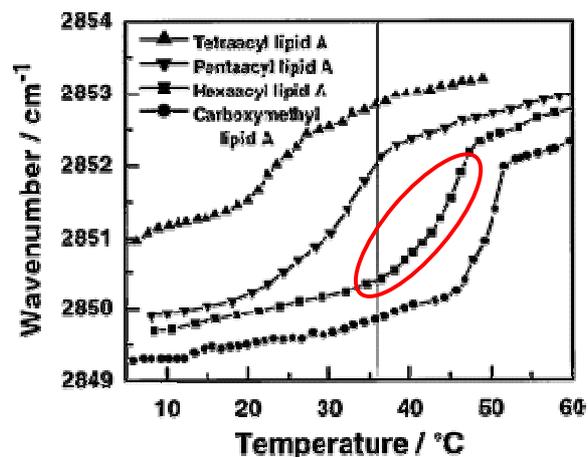


Figura 5.2.9: Transição de fase de membranas de Lipídio A de *E. coli* [Gutsmann *et al*, 2000]. A faixa de temperatura de transição está indicada em vermelho.

Como já discutido na primeira seção de resultados, as medidas de parâmetro de ordem de deutério para membranas de lipopolissacarídeos e Lipídio A não estão disponíveis para cada átomo da cadeia lipídica. Particularmente, as medidas de refletância total atenuada produzem um valor relacionado ao ordenamento das cadeias dos lipídios e esse valor é então relacionado ao parâmetro de ordem de todas as cadeias [Brandenburg *et al*, 2003]. Por isso, resolvemos calcular o valor médio do parâmetro de ordem do deutério para as nossas membranas e observar a tendência nos valores. Os resultados estão reunidos na tabela a seguir.

Tabela 5.2.2: Valores médios com os seus respectivos desvios-padrões para os parâmetros de ordem de deutério das membranas simuladas. Os resultados estão separados por espécie de bactéria.

<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
ecoli_mg278	$0,274 \pm 0,050$	mghex_300	$0,174 \pm 0,041$
ecoli_mg300	$0,270 \pm 0,053$	mgpent_300	$0,134 \pm 0,037$
ecoli_mg328	$0,270 \pm 0,054$	paeru_mgtetr300	$0,065 \pm 0,031$
ecoli_namp300	$0,011 \pm 0,007$		

Analisando os resultados da Tabela 5.2.2 o grau de ordenamento das membranas de *E. coli* (quimiotipo hexaacilado e com dois grupos fosfatos) mantém-se praticamente inalterado sob efeito do aumento de temperatura, reforçando a idéia de que todas as membranas encontram-se na mesma fase. A membrana monofosforilada tem um valor de parâmetro de ordem muito baixo, mas que é condizente com a estrutura não-lamelar adotada pela membrana.

No caso das membranas da espécie *P. aeruginosa* ocorre uma diminuição gradual da ordem e aumento da fluidez do sistema, com a diminuição do número de cadeias aciladas que formam o Lipídio A. O que é natural, pois diminuindo o número de cadeias hidrofóbicas, diminui a repulsão entre as que restam no lipídio, permitindo uma maior flexibilidade e movimentação das mesmas. Além disso, a penetração de água na membrana é facilitada pela diminuição do núcleo hidrofóbico das mesmas. No entanto, os valores têm significância estatística apenas para diferenciar o valor médio do parâmetro de ordem da membrana tetraacilada dos demais quimiotipos de *P. aeruginosa*.

5.2.5) Funções de Distribuição Radial

A diferença de comportamento das membranas na presença de íons mono- e bivalentes incentiva o estudo do comportamento estrutural das bicamadas simuladas. Uma das maneiras mais eficientes de realizar esse tipo de investigação é através das funções de distribuição radial da pares. Escolhemos para analisar três pares de átomos: íon e o átomo de fósforo do fosfato, íon e o átomo de oxigênio da água e o átomo de fósforo do fosfato e o de oxigênio da água.

5.2.5.1) Função de Distribuição Radial de Pares: Íon – O (H₂O).

As funções de distribuição radial de pares para os íons e átomos de oxigênio da água para os sistemas simulados estão apresentadas na Figura 5.2.10. Os sistemas contendo Mg²⁺ como contraíon apresentam o seu primeiro pico de intensidade média e bem definido numa distância um pouco inferior a 0,25 nm. A intensidade do pico parece aumentar levemente nas membranas de *E. coli* a medida que a temperatura aumenta. Sendo que a membrana tetraacilada é a que apresenta o pico mais intenso.

A membrana que tem Na⁺ apresenta valor da intensidade é menor justamente para a membrana com estrutura não-lamelar indicando uma leve perda de estruturação para o par nesse sistema, além do pico estar localizado num valor mais próximo de 0,25 nm. O segundo pico dos sistemas ocorre por volta de 0,40 nm e é bem menos intenso e menos definido em todos os gráficos (especialmente para a membrana contendo Na⁺ como contraíon). Após o segundo pico as funções de distribuição de pares tem seu valor igual um.

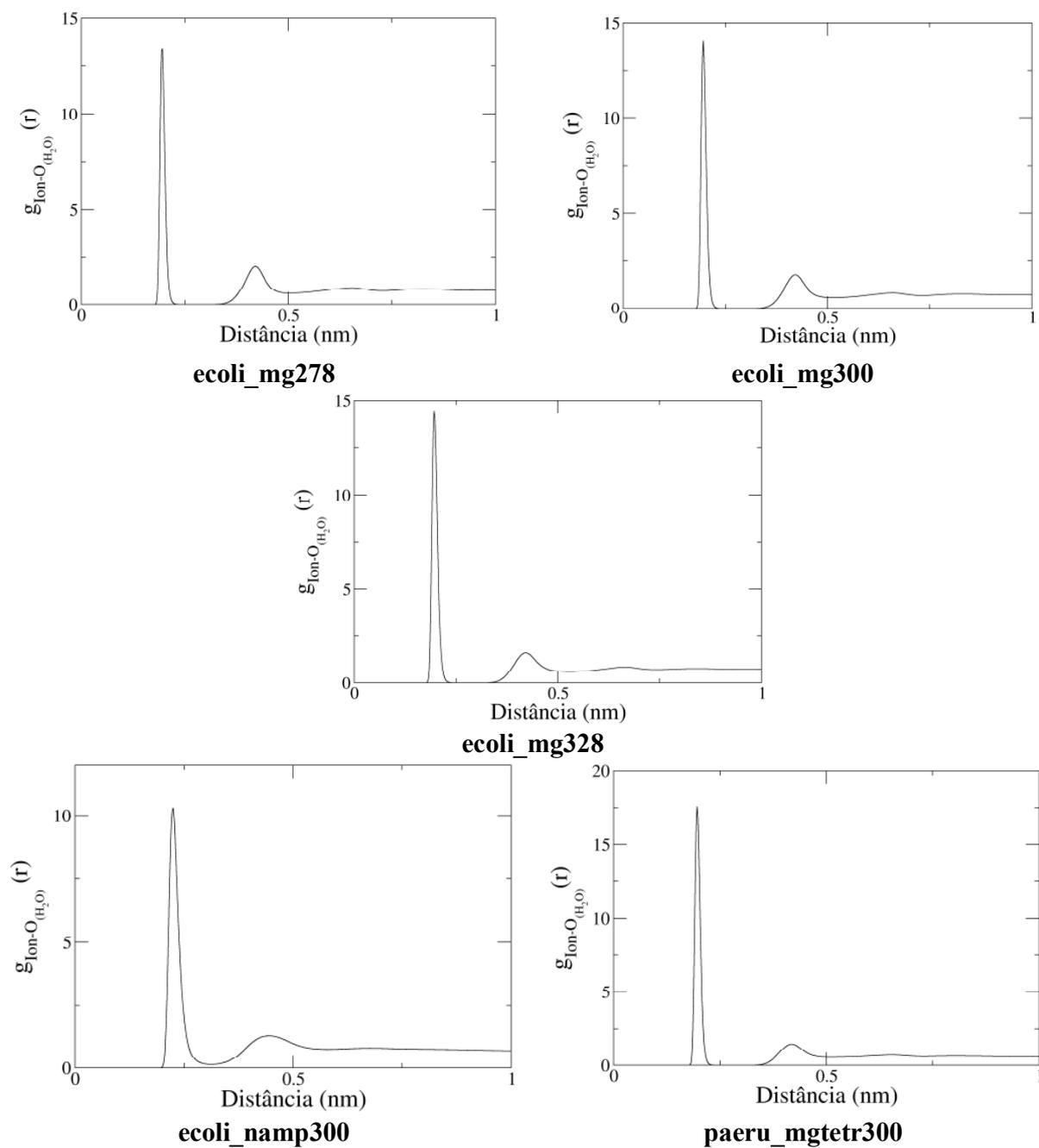


Figura 5.2.10: Funções de distribuição radial entre o íon e o átomo de oxigênio da água para as membranas Lipídio A hexa-, penta- e tetraaciladas contendo íons Na^+ e Mg^{2+} . A análise foi realizada nos últimos 70 ns de simulação.

5.2.5.2) Função de Distribuição Radial de Pares: Íon – P.

O segundo par analisado foi o par íon (Na^+ ou Mg^{2+}) e átomo de fósforo do grupo fosfato. Pode-se dizer que o mesmo padrão observado para as funções de distribuição radial do par Íon – O (H_2O) foi observado no par Íon- P. As membranas contendo Mg^{2+} com um padrão similar entre si e diferindo bastante do padrão apresentado pela membrana contendo Na^+ .

Analisando os gráficos das membranas contendo íons bivalentes: o primeiro pico aparece após 0,25 nm. É bem intenso, fino e definido. Este primeiro pico é seguido por um segundo pico de intensidade menor e quase sem separação entre ambos. A intensidade do primeiro pico diminui à medida que a temperatura aumenta e para o quimiotipo de *P. aeruginosa* a intensidade é a menor do grupo. O comportamento inverso é observado no segundo pico, com aumento gradual de sua intensidade com o aumento da temperatura. A distribuição assume o valor de 1 para todos os casos após 0,75 nm de distância entre o par. A curta distância entre os dois picos indica que as ligações entre o íon Mg^{2+} e o átomo de fósforo deve ocorrer entre um íon e dois grupos fosfatos de lipídios distintos.

Na membrana formada pelo Lipídio A monofosforilado a intensidade do primeiro pico da densidade do par é bastante menor do que para a espécie difosforilada. A menor organização estrutural para a membrana de agregação não-lamelar é refletida no gráfico. O segundo pico é por volta de 0.5 nm e tem quase metade da intensidade do primeiro, mas muito mais largo indicando uma menor organização estrutural na membrana. O primeiro pico, mais intenso e a curta distância, do par Na^+ - P é um indicativo que o íon deve se coordenar com apenas um átomo de fósforo e de uma unidade de Lipídio A apenas, não desempenhando o papel de ponte entre unidades de Lipídio A semelhante ao íon bivalente.

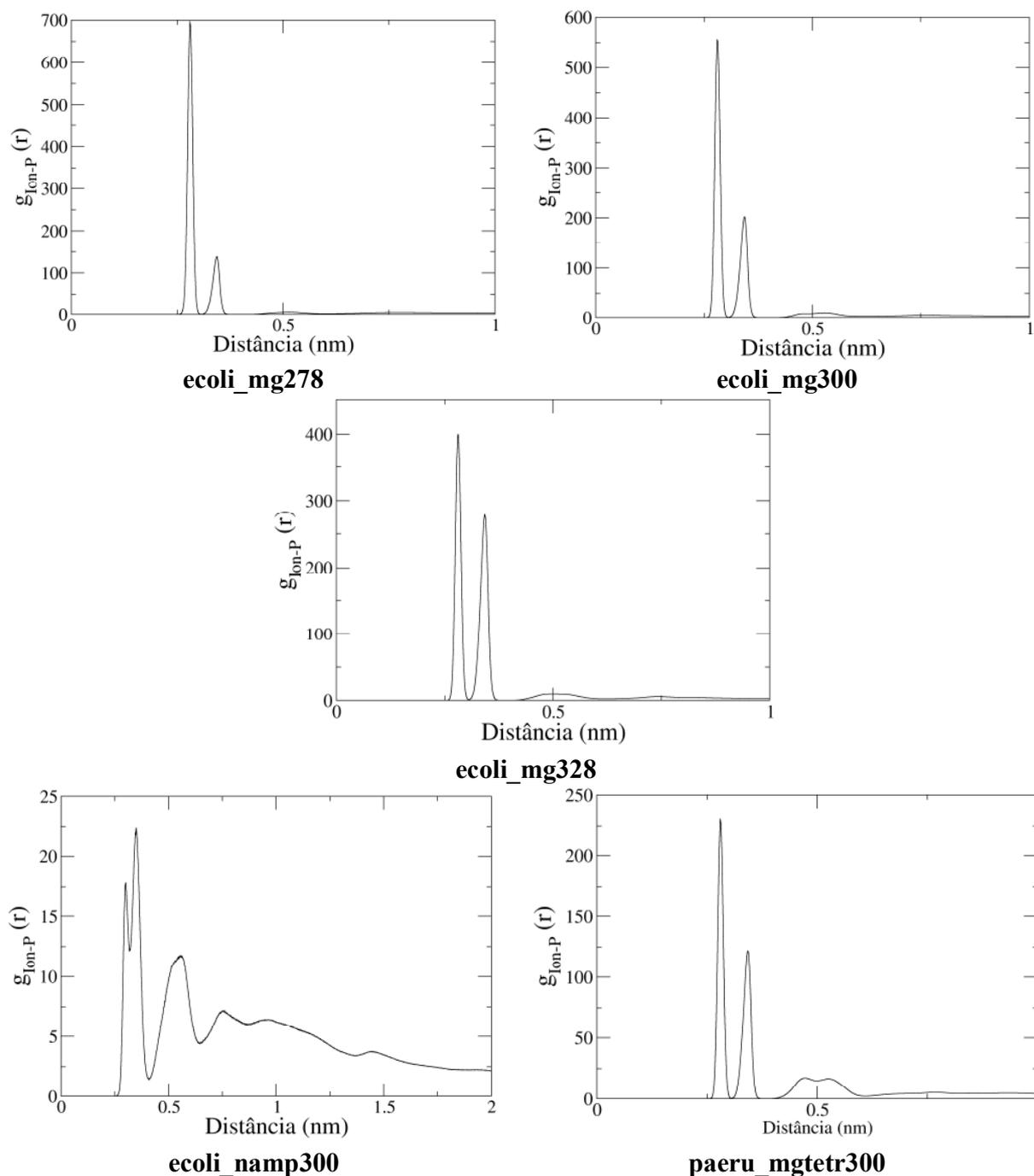


Figura 5.2.11: Funções de distribuição radial entre o íon e o átomo de fósforo do grupo fosfato para as membranas Lipídio A hexa-, penta- e tetraaciladas contendo íons Na^+ e Mg^{2+} . A análise foi realizada nos últimos 70 ns de simulação.

A diferença na vizinhança de cada íon pode ser mais bem visualizada a partir do cálculo de número de coordenação de cada grupo analisado ao redor do íon. Estes resultados estão apresentados na Tabela 5.2.3 a seguir. O aumento da temperatura provoca um aumento da

vizinhança de água em torno do íon Mg^{2+} para as membranas de *E. coli*, mas a manutenção do número de íons fosfato ao redor do átomo. Podemos concluir que o grau de hidratação da membrana está aumentando, mas o papel estrutural desempenhado pelo Mg^{2+} se mantém inalterado.

Tabela 5.2.3: Números de coordenação dos pares Ion – P e Ion – O (H_2O) para as membranas de *E. coli* quimiotipos hexaacilado e mono- e difosforilado, além da membrana de *P. aeruginosa* tetraacilada.

Par	ecoli_mg278	ecoli_mg300	ecoli_mg328	ecoli_namp300	paeru_mgtetr300
Íon – O (H_2O)	2,5	2,8	3,0	4,70	3,67
Íon – P	2,0	2,0	2,0	0,10	1,25

Na membrana de *E. coli* contendo Na^+ a vizinhança em torno do cátion é basicamente formada por moléculas de água, indicando a sua localização na região hidrofílica da caixa de simulação. A presença quase nula de átomos de fósforo ao redor de íons Na^+ é um indicativo que esse cátion não desempenha papel estrutural junto ao Lipídio A. Podendo residir aí, a desestabilização da forma lamelar de bicamadas de Lipídio A contendo Na^+ como contraion.

5.2.6) Ângulo de Inclinação e Raio de Giro dos Lipídios A na Bicamada.

Existem várias relações estabelecidas que correlacionam a conformação e estrutura química primária do Lipídio A com sua atividade endotóxica e forma de agregação. As unidades de Lipídio A de formato mais cilíndrico costumam ser mais endotoxicamente mais inativas e formar agregados lamelares. Por conta disso, estimamos a razão entre os raios de giro dos grupos metis terminais de cadeia e os anéis de glucosamina da parte hidrofílica do Lipídio A. Essa medida nos dará uma estimativa do formato médio das unidades de Lipídio A que formam a bicamada. A variação fenotípica composta pelo Lipídio A de *E. coli* hexaacilado e difosforilado apresenta uma razão entre os raios de giro um pouco superior a dois (Figura 9.3.12). A temperatura praticamente não altera o valor da razão e indica um formato levemente cônico para os lipídios componentes desse sistema. O valor da razão entre os raios de giro dos lipídios da variedade fenotípica monofosforilada é ligeiramente superior a três. O lipídio A neste fenótipo possui a mesma quantidade de cadeias aciladas, mas o efeito do contraion provoca um formato mais cônico para os lipídios dessa membrana. O formato mais cônico dos lipídios na membrana ecoli_namp300 em comparação com os lipídios provenientes dos fenótipos difosforilados corrobora a hipótese que afirma que lipídios de formato mais cônico tendem a formar estruturas agregadas não-lamelares.

O resultado aparentemente mais surpreendente é o valor da razão entre os raios de giros para os lipídios componentes da membrana paeru_mgtetr300. O valor obtido é quase duas vezes maior que o obtido para a membrana ecoli_namp300, só que ao contrário desta última, a espécie tetraacilada mantém a forma lamelar na sua forma de agregação. O alto valor da razão pode ser facilmente explicado: com um menor número de cadeias aciladas, menor a repulsão entre as cadeias restantes e, por isso, maior liberdade para se movimentarem na região hidrofóbica da membrana. As análises dos parâmetros de ordem de deutério já haviam demonstrado a grande fluidez dessa membrana. Por essas razões o espaço ocupado pelos grupos terminais da cadeia é grande, o formato das unidades lipídicas cônicas e a razão entre os raios de giro alto.

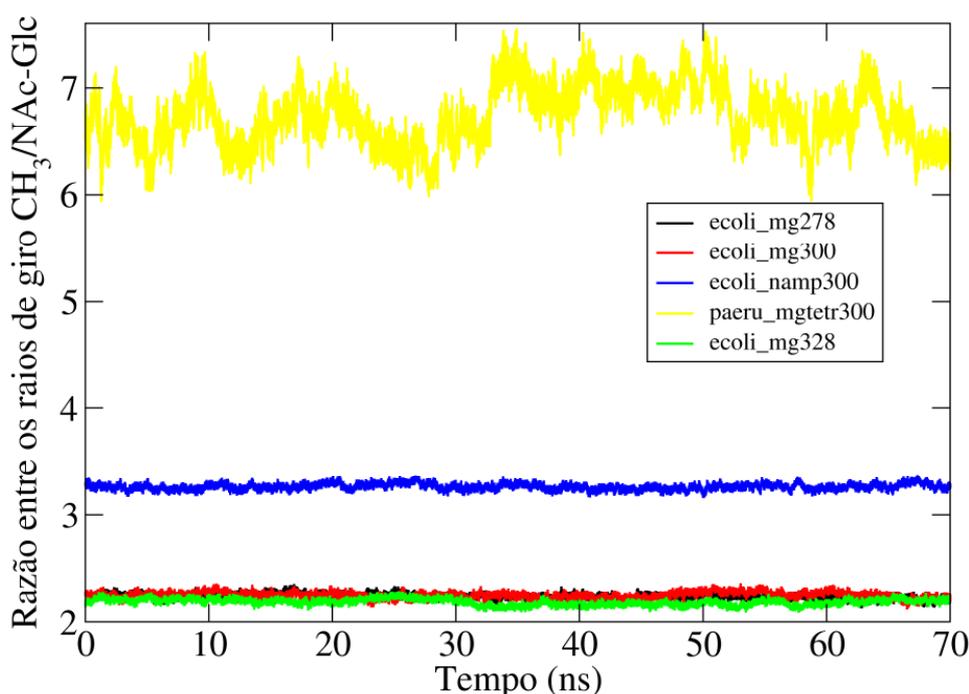


Figura 5.2.42: Razão entre os raios de giro dos grupos metis terminais das cadeias aciladas e dos anéis de glucosamina das unidades de membranas Lipídio A hexa-, penta- e tetraaciladas contendo íons Na^+ e Mg^{2+} . As médias foram calculadas sobre todas as moléculas de lipídio da bicamada nos últimos 70 ns de simulação.

No entanto, como explicar a manutenção da estrutura lamelar da membrana tetraacilada? A resposta para esse questionamento pode ser encontrado no formato em fase *ripple* da membrana. As ondulações dessa forma de agregação permitem um melhor arranjo do Lipídio A mesmo com essa forma cônica e mantendo a estrutura lamelar. Pode-se atribuir também a retenção da estrutura lamelar dessa membrana ao papel desempenhado pelos íons Mg^{2+} atuando como ponte entre dois fosfatos de lipídios diferentes. Os valores médios da razão entre os raios de giros das membranas estão apresentados na Tabela 5.2.4 e ratificam a discussão realizada previamente, onde uma pequena diferença observada para as membranas de *E. coli* difosforilada. A membrana tetraacilada apresenta o maior valor da razão entre os raios de giro.

Tabela 5.2.4: Valores médios e desvio-padrão para a razão entre os raios de giro $\text{CH}_3/\text{NAc-Glc}$ para os quimiotipos de *E. coli* e *P. aeruginosa* contendo íons Mg^{2+} e Na^+ calculados nos últimos 50 ns de simulação.

Simulação		Simulação	
ecoli_mg278	$2,238 \pm 0,028$	paeru_mgtetr300	$6,735 \pm 0,270$
ecoli_mg300	$2,245 \pm 0,031$	ecoli_namp300	$3,265 \pm 0,028$
ecoli_mg328	$2,184 \pm 0,029$		

Outra análise realizada que permitiu correlacionar a estrutura primária dos lipídios com sua forma de agregação foi medir o ângulo de inclinação entre os anéis de açúcar e o plano da membrana. Os resultados apresentados na Figura 5.2.13 mostram-se ligeiramente diferentes dos estimados anteriormente [Seydel *et al*, 2003]. A espécie de Lipídio A hexaacilado e assimétrico (correspondente as membranas ecoli_mg278, ecoli_mg300 e ecoli_mg328) teve o maior ângulo de inclinação medido e é a membrana de maior atividade endotóxica. Seu formato mais côncavo deveria favorecer a formação de estruturas não lamelares. As nossas simulações apontaram membranas lamelares e com ângulo de inclinação menor que o estimado.

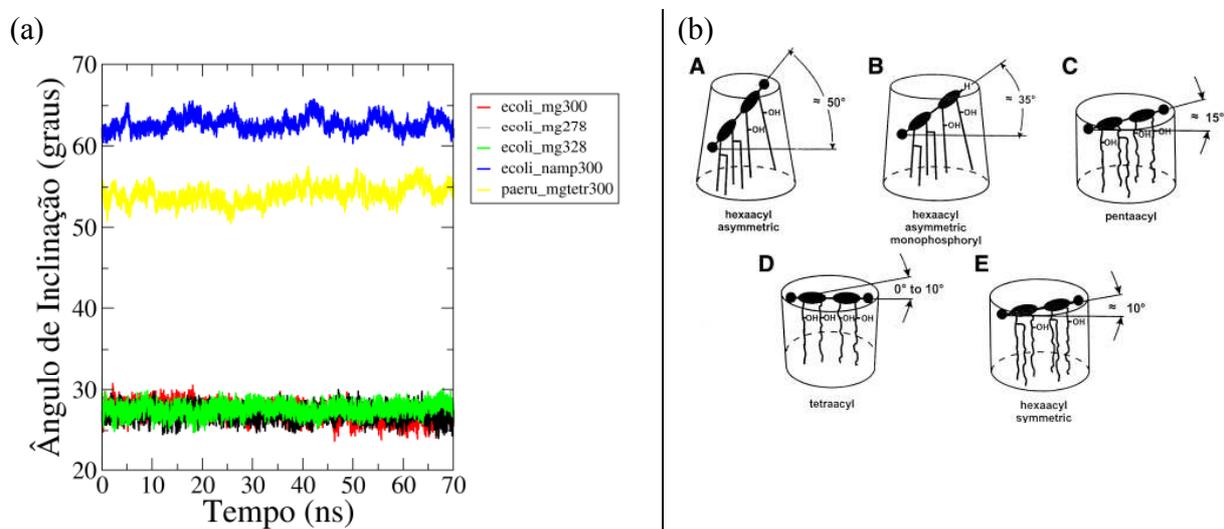


Figura 5.2.13: (a) Ângulo de Inclinação entre os anéis de glucosamina do Lipídio A e o plano da membrana. A propriedade foi medida nos últimos 70 ns de cada simulação. (b) Ângulo de inclinação de algumas espécies de Lipídio A medidos por radiação de infravermelho polarizada [Seydel *et al*, 2003].

A espécie hexaacilada monofosforilada, prevista experimentalmente como endotóxica e com ângulo de inclinação por volta de 35° , foi prevista como não-lamelar e com ângulo em torno

55°, a partir de nossas simulações. O efeito do contraíon pode ter exercido um impacto importante nos resultados de nossas simulações que pode não ter sido testado experimentalmente. A concordância com o ângulo de inclinação em relação ao plano da membrana foi bastante discrepante também em relação a membrana tetraacilada.

As medidas experimentais de atividade biológica e ângulo de inclinação, além de indiretas, apresentam incertezas associadas a ela e dependência de fatores como o conteúdo de água na membrana, a forma de preparação da membrana e a espécie de bactéria. Estudos de diagramas de fase indicam que o lipídio A adota estrutura lamelar quando o conteúdo de água em seu interior é menor que 60% e sofre transições para estruturas não-lamelares cúbicas quando o conteúdo de água é alto [Brandenburg *et al*, 2003]. O papel do íon Mg^{2+} na razão molar de 1:1 com o Lipídio A é de favorecer estruturas lamelares em temperaturas abaixo da temperatura de transição [Seydel *et al*, 1993]. No entanto, o efeito do íon Na^+ (monovalente) ainda não é tão bem estudado e documentado. Alguns estudos indicam que o comportamento de membranas de Lipídio A, tendo o Na^+ como contraíon, é semelhante ao de membranas de Lipídio A deionizadas [Fauce *et al*, 2005].

6. Conclusões e Perspectivas

Através da utilização de simulações clássicas de dinâmica molecular associada a um campo de força atomístico com parâmetros desenvolvidos de acordo com a filosofia GROMOS, fomos capazes de descrever a dinâmica, estrutura e forma de agregação em membranas de Lipídio A. As simulações realizadas mostraram-se capazes de reproduzir dados estruturais de bicamadas de Lipídio A de *P. aeruginosa* e *E. coli* como, tais como área por cabeça de Lipídio A, perfis de densidade, parâmetros de ordem e hidratação relativa.

Adicionalmente, caracterizamos o papel desempenhado pelos contraíons (mono- e bivalentes) nas formas de agregação dessas membranas. Embora Lipídios A em estruturas não-lamelares tendam a ter uma maior conicidade, verificamos que apenas o formato (cônico ou cilíndrico) do lipídio A não é suficiente para determinar o arranjo do agregado que ele formará. A capacidade de um íon em formar pontes (*crosslink*) entre grupos fosfatos de lipídios vizinhos assegura a manutenção de estruturas lamelares em membranas formadas por lipídios de formato cônico. Íons monovalentes resultam em lipídios com formato mais cônicos e em estruturas menos ordenadas (baixos valores de parâmetros de ordem, alto ângulo de inclinação e estruturas não-lamelares), enquanto que íons divalentes tendem a estabilizar estruturas lamelares. Exemplo importante desse papel estrutural importante é a membrana tetraacilada de *P. aeruginosa*. Apesar de formato bastante cônico adotado pelo Lipídio A nessa membrana, mais pronunciado que o caracterizado em lipídios de agregados contendo íons monovalentes, a estrutura lamelar é preservada numa fase *ripple* para a bicamada.

Comparando os diferentes quimiotipos de Lipídio A de *P. aeruginosa* sob efeito do mesmo contraíon (Mg^{2+}), conclui-se que quanto menor o número de cadeias aciladas do lipídio, maior a permeabilidade da membrana à água e conicidade dos lipídios que compõem a bicamada. A estruturação e ordenamento da membrana também decai com a diminuição do número de cadeias aciladas do lipídio A.

Como perspectivas para esse trabalho citamos:

i) A caracterização de diferentes fases lamelares de bicamadas de Lipídio A de *P. aeruginosa* através de simulações de dinâmica molecular. Assim como a adequação e desenvolvimento de novas ferramentas de análise que levem em consideração a morfologia da membrana e suas curvaturas.

ii. O estudo da forma de agregação de bicamadas de Lipídio A tendo contraíons trivalentes em sua composição seria de grande importância para entender a natureza desses sistemas. Os íons trivalentes poderiam indicar, se esses íons seriam capazes de organizar a membrana em formas não-lamelares mais complexas e qual a implicação biológica dessas mudanças estruturais.

iii. A investigação da interação desses agregados com peptídeos antimicrobianos e receptores celulares. Devido a influência do contração na forma de agregação de membranas de Lipídio A, esta proposta motiva e se retroalimenta em futuros estudos *in vitro*. O papel desempenhado pelos íons em bicamadas de Lipídio A, levando a perda ou manutenção da estrutura lamelar, pode ser utilizado em estudos para o esclarecimento sobre a unidade básica de Lipídio A ativa biologicamente, se em formato de agregados ou de moléculas isoladas.

7. Apêndice

Nesta seção descreveremos os comandos utilizados para a construção das caixas de simulação.

`editconf -f lipida.pdb -o lipida.gro -d 0 -princ`

Neste comando a molécula foi alinhada aos eixos principais do sistema, convertido ao formato de arquivo padrão do GROMACS e as dimensões da célula unitária são definidas como a maior distância entre os átomos da estrutura em cada eixo tridimensional.

`editconf -f lipida.gro -o lipida2.gro -rotate 0 0 180`

Neste comando a molécula de Lipídio A foi rotacionada em 180° graus no eixo Z. A partir dos dois arquivos gerados através do comando *editconf* construiremos a nossa bicamada.

`cat lipida.gro lipida2.gro > lpastacked.gro`

As duas moléculas foram concatenadas no mesmo arquivo de estrutura com um plano de simetria passando entre o final das cadeias alquila de cada lipídio. No entanto, ainda não temos uma bicamada de Lipídio A.

`genconf -f lpastacked.gro -o lpabl.gro -nbox 8 8 1 -dist 0 0 0`

Utilizando o comando *genconf* o binário de Lipídio A foi replicado para formar bicamadas contendo 64 (72) lipídios em cada camada. Para caixas de maior dimensão a opção *nbox* foi seguida pelos argumentos 8 9 1. Os números após a opção *nbox* indicam a quantidade

de réplicas criadas em cada respectiva dimensão da nova caixa de simulação. A distância entre cada réplica foi colocada como zero.

editconf -f lpabl.gro -o lpablbox.gro -box 10 10 14

As dimensões da caixa foram alteradas com o comando *editconf* para conter as moléculas de água que servirão para compor o sistema. Todas as nossas caixas de simulação têm aproximadamente as dimensões de 10 x 10 x 14 nm.

genbox -cp lpablbox.gro -cs spc216.gro -o lpablwtr.gro

O comando *genbox* promoveu a adição de moléculas de água no restante do espaço disponível na caixa de simulação. As razões para adoção do modelo SPC para as moléculas de água serão discutidas adiante na seção 8.2. O raio de *van der Waals* dos átomos de carbono da cadeia alquila foi alterado para o valor de 0.5 nm para evitar a oclusão de moléculas de água nos interstícios hidrofóbicos da membrana. Após esses comandos, temos a nossa caixa de simulação pronta. No entanto, ainda é necessário criar um arquivo de topologia com os parâmetros do campo de força para as moléculas a serem simuladas. Essa etapa é realizada com o comando a seguir.

pdb2gmx -f lpablwtr.gro -p lpablwtr.top

O procedimento descrito acima foi adotado para a preparação das caixas de simulação contendo o Lipídio A hexaacilado contendo contra-íons mono- e bivalentes. As caixas de simulação das espécies tetra- e pentaaciladas de Lipídio A foram construídas a partir de configurações equilibradas (comprovadas através de medidas da área por cabeça do lipídio e energia potencial) da espécie hexaacilada. Neste processo de alteração da estrutura fenotípica do lipídio não se alterou a natureza do contra-íon presente na bicamada lipídica, como também não se alterou a temperatura da simulação. Isso significa que a espécie pentaacilada de Lipídio A contendo íons Ca^{2+} a temperatura de 300 K foi gerada a partir de uma configuração da espécie

hexaacilada contendo o mesmo íon e temperatura. As caixas de simulação das espécies tetra- e pentaaciladas tiveram suas energias minimizadas e só em seguida submetidas a simulações de dinâmica molecular.

Antes de realizar uma simulação de dinâmica molecular ou uma minimização de energia é necessário reunir todas as informações que o programa GROMACS necessita (estruturas iniciais, topologias, parâmetros de simulação e/ou minimização) num arquivo binário para ser executado pela rotina *mdrun*. Essa tarefa é realizada com a rotina *grompp*.

```
grompp -f em.mdp -c lpablwtr.gro -p lpablwtr.top -o lpabl_em.tpr
```

Depois de obtido o arquivo *tpr*, realizamos a minimização de energia do sistema. A estrutura minimizada obtida é submetida novamente ao comando *grompp* para gerar um novo arquivo binário *tpr*, agora com os parâmetros da simulação, para, só então, realizarmos a simulação de dinâmica molecular propriamente dita. Essas etapas estão representadas pelos comandos listados abaixo:

```
mdrun -d -s lpabl_em.tpr -v -deffnm lpabl_em.tpr
```

```
grompp -f md.mdp -c lpabl_em.tpr.gro -p lpablwtr.top -o lpabl_md.tpr
```

```
mdrun -d -s lpabl_md.tpr -v -deffnm lpabl_md.tpr
```

Protocolo de minimização de Energia (em.mdp):

```
integrator      = steep
emtol          = 1.0
emstep         = 0.01
nsteps         = 10000
nstlist        = 1
ns_type        = grid
rlist          = 1.0
coulombtype    = PME
rcoulomb       = 1.0
rvdw           = 1.0
pbc            = xyz
```

Protocolo de simulação de dinâmica molecular (md.mdp)

```
integrator      = md
dt              = 0.001
nsteps         = 200000000
ns_type        = Grid
nstlist        = 1
nstcomm        = 1
comm_mode      = Linear
comm-grps      = lpa solv ion
nstlog         = 1000
nstxout        = 1000
nstvout        = 1000
nstfout        = 1000
nstenergy      = 1000
nstxtcout      = 1000
tcoupl         = v-rescale
pcoupl         = berendsen
tau-p          = 1
ref-p          = 1.0
compressibility = 4.5e-05
rlist          = 1.2
coulombtype    = Reaction-Field

rcoulomb       = 1.2
vdwtype        = Cut-off
rvdw           = 1.2
epsilon_r       = 1
epsilon_rf      = 66
constraint-algorithm = lincs
constraints     = h-bonds
lincs_order     = 4
lincs_warnangle = 30
lincs_iter      = 1
ld_seed         = 1993
tc_grps        = lpa solv ion
ref_t =        300    300    300
tau_t =        0.1    0.1    0.1
```

8. Referências Bibliográficas

Allinger, N.L., (1976). Calculation of molecular structure and energy by force-field methods. *Adv. Phys. Org. Chem.* *13*, 1–85.

Allinger, N.L., Yuh, Y. H., & Lii, J.-H., (1989). Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 1. *J. Amer. Chem. Soc.* *111*, 8551–8566.

Anézo, C., de Vries, A., Hans-Dieter, H., Tieleman, P., & Marrink, S.-J., (2003). Methodological Issues in Lipid Bilayer Simulations. *Journal of Physical Chemistry B*, *107*, 9424–9433.

Barjer, J. A., & Watts, R. O., (1973). Monte Carlo studies of the dielectric properties of water-like models. *Molecular Physics* *26*(3), 789-792.

Bayerl, T., (2000). Collective membrane motions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* *5*, 232–236.

Bedoux, G., Vallee-Rehel, K., Kooistra, O., Zahringer, U., & Haras, D., (2004). Lipid A components from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (serotype O5) and mutant strains investigated by electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* *39*, 505-513.

Benda, A., Benes, M., Mareck, V., Lhotsky, A., Hermens, W.T., & Hof, M., (2003). How to determine diffusion coefficients in planar phospholipid systems by confocal fluorescence correlation spectroscopy. *Langmuir* *19*, 4120-4126.

Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., van Gunsteren, W.F., & Hermans, J., (1981). Interaction models for water in relation to protein hydration. In: *Intermolecular Forces*. Pullman, B.ed. D. Reidel Publishing Company Dordrecht, 331-342.

Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., DiNola, A., & Haak, J.R., (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* *81*, 3684-3690.

Berendsen, H.J.C., Grigera, J.R., & Straatsma, T.P., (1987). The missing term in effective pair potentials. *Journal of Physical Chemistry* *91*, 6269-6271.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., (2002). *Stryer – Biochemistry International Edition*. 5th Edition. (New York: W. H. Freeman and Company).

Boue, S., & Cole, R., (2000). Confirmation of the structure of lipid A from *Enterobacter agglomerans* by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry* *35*(3), 361–8.

Brandenburg, K., Mayer, H., Koch, M. H., Weckesser, J., Rietschel, E. T., & Seydel, U., (1993). Influence of the supramolecular structure of free lipid A on its biological activity. *European journal of biochemistry / FEBS*, 218(2), 555–63.

Brandenburg, K., & Seydel, U., (1988). Orientation measurements on membrane systems made from lipopolysaccharides and free lipid A by FT-IR spectroscopy. *European biophysics journal* 16(2), 83–94.

Brandenburg, K., (1993). Fourier transform infrared spectroscopy characterization of the lamellar and nonlamellar structures of free lipid A and Re lipopolysaccharides from *Salmonella minnesota* and *Escherichia coli*. *Biophysical journal*, 64, 1215.

Brandenburg, K., & Seydel, U., (1990). 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 / FEBS*, 191, 229–236.

Brandenburg, K.; Koch, M. H., & Seydel, U.J., (1990). Phase diagram of lipid A from *Salmonella minnesota* and *Escherichia coli* rough mutant lipopolysaccharide. *Struct. Biol.* 105, 11-21.

Brandenburg, K., Kusumoto, S. & Seydel, U., (1997). Conformational studies of synthetic lipid A analogues and partial structures by infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1329, 183-201.

Brandenburg, K., Funari, S. S., Koch, M. H., & Seydel, U., (1999). Investigation into the Acyl Chain Packing of Endotoxins and Phospholipids under Near Physiological Conditions by WAXS and FTIR Spectroscopy. *J. Struct. Biol.* 128, 175-186.

Brandenburg, K., Matsuura, M., Heine, H., Muller, M., Kiso, M., Ishida, H., Koch, M. H., & Seydel, U., (2002). Biophysical Characterization of Triacyl Monosaccharide Lipid A Partial Structures in Relation to Bioactivity. *Biophys. J.* 83, 322-333.

Brandenburg, K., Andra, J., Muller, M., Koch, M. H., & Garidel, P., (2003). Physicochemical properties of bacterial glycopolymers in relation to bioactivity. *Carb. Res.* 338, 2477-2489.

Brandenburg, K., & Wiese, A., (2004) Endotoxins: Relationships between Structure, Function and Activity. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 4, 1127-1146.

Brooks, B.R., Bruccoleri, R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S., & Karplus. M., (1983) CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.*, 4, 187–217.

Bussi, G., Donadio, D., & Parrinello, M. (2007). Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* 126, 014101-014109.

Caroff, M., & Karibian, D., (2003) Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carb. Res.* 338,

2431-2447.

Chau, P.L., & Hardwick, A., (1988). A new order parameter for tetrahedral configurations J. Molecular Physics 93, 511-518.

Cornell, W., Cieplak, P., Bayly, C., Gould, I., Merz, K., Ferguson, D., Spellmeyer, D., Fox, T., Caldwell, J., & Kollman P., (1995) J. Am.Chem. Soc. 117, 5179–5197.

Darden, T., York, D., & Pedersen, L., (1993) Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. J. Chem. Phys. 98, 10089–10092.

de Vries, A.H., Chandrasekhar, I, van Gunsteren, W. F. & Hunenberger, P.H., (2005) Molecular Dynamics Simulations of Phospholipid Bilayers: Influence of Artificial Periodicity, System Size, and Simulation Time. J. Phys. Chem. B 109, 11643-11652.

Douliez, J.P., Leonard, A., & Dufourc, E., (1995). Restatement of order parameters in biomembranes: calculation of C-C bond order parameters from C-D quadrupolar splitting. J. Biophysical Journal. 68, 1727-1739.

Erridge, C., Bennett-Guerrero, E., & Poxton, I.R., (2002) Structure and function of lipopolysaccharides. Microbes and Infection 4, 837-851.

Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. E., Glass, C. K., Merrill, Jr., A. H., Murphy, R.C., Raetz, C.R.H., Russell, D.W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., VanNieuwenhze, M. S., White, S.H., Witztum, J.L., & Dennis, E.A. (2005). A comprehensive classification system for lipids. Journal of Lipid Research 46, 839-861.

Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R.C., Nishijima, M., Raetz, C.R.H., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., Wakelam, M.J.O., & Dennis, E.A., (2009) Update of the lipid maps comprehensive classification system for lipids. Journal of Lipid Research. 50, S9–S14.

Faunce, C.A., Reichelt, H., Paradies, H.H., Quitschau, P., & Zimmermann, K.J., (2005). The liquid-like ordering of lipid A-diphosphate colloidal crystals: The influence of Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} , and K^{+} on the ordering of colloidal suspensions of lipid A-diphosphate in aqueous solutions J. Chem. Phys. 122, 214727-23.

Feller, S.E., (2000) Molecular dynamics simulations of lipid bilayers. Current Opinion in Colloid & Interface Science 5 217-223.

Flad,H.-D., Loppnow, H., Rietschel, F.Th., & Ulmer, A.J., (1993) Agonists and antagonists for lipopolysaccharide-induced cytokines. Immunobiology 187, 303-31.

Frolov, V., Shinyrova, A., & Zimmerberg, J., (2011). Lipid Polymorphisms and Membrane Shape. Cold Spring Harbor perspectives in biology 3, 1-14.

Frye L.D., & Edidin, M., (1970) The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of

mouse-human heterokaryons. *J. Cell Sci.* 7 319-335.

Fuller, N., Benatti, C.R., & Rand, R. P., (2003). Curvature and bending constants for phosphatidylserine-containing membranes. *Biophys. J.* 85 1667-1674.

Garate, J.A., & Oostenbrink, C., (2012). Lipid A from lipopolysaccharide recognition: Structure, dynamics and cooperativity by molecular dynamics simulations. *Proteins* 81, 658-674.

Garidel, P., Rappolt, M., Schromm, A.B., Howe, J., Lohner, K., Andra, J., Koch, M.H.J., & Brandenburg, K. (2005). Divalent cations affect chain mobility and aggregate structure of lipopolysaccharide from *Salmonella minnesota* reflected in a decrease of its biological activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1715, 122-131.

Garrett, R.H., & Grisham, C.M., (2009) *Biochemistry Fourth Edition*. Cengage Learning, Inc.

Gielen, E., Smisdom, N., van de Ven, M., De Clercq, B., Gratton, E., Digman, M., Rigo, J.M., Hofkens, J., Engelborghs, Y., & Ameloot, M., (2009). Measuring diffusion of lipid-like probes in artificial and natural membranes by raster image correlation spectroscopy (RICS): use of a commercial laser-scanning microscope with analog detection. *Langmuir* 25, 5209–5218.

Glättli, A., Daura, X. & van Gunsteren W. F., (2002). Derivation of an improved simple point charge model for liquid water: SPC/A and SPC/L. *The Journal of Chemical Physics* 116, 9811-9828.

Gutsmann, T., Schromm, A.B., Koch, M.H.J., Kusumoto, S., Fukase, K., Oikawa, M., Seydel, U., & Brandenburg, K., (2000). Lipopolysaccharide-binding protein-mediated interaction of lipid A from different origin with phospholipid membranes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2, 4521-4528.

Hafez I.M. & Cullis, P. R. (2001). Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 47 139-148.

Heller, H., Schaefer, M., & Schulten, K. (1993). Molecular Dynamics Simulation of a bilayer of 200 lipids in the gel and in the liquid-crystal phases. *J. Phys. Chem.* 97, 8343-8360.

Hess, B., Bekker, H.; Berendsen, H.J.C., & Fraaije, J.G.E.M. (1997). LINCS: A Linear constraint solver for Molecular Simulations. *Journal of Computational Chemistry* 18 (12), 1463-1472.

Hess, B., (2008). P-LINCS: A parallel linear constraint solver for molecular simulation. *J. Chem. Theory Comput.* 4(1), 116-122.

Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D., & Lindahl, E. (2008). *J. Chem. Theory Comput.* 4, 435-444.

Hockney, R.W., Goel, S.P., & Eastwood, J. (1974). Quiet High Resolution Computer Models of a Plasma. *J. Comp. Phys.* 14,148–158.

Israelachvili, J.B., Mitchell, D.J., & Ninham, B.W., (1976). Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, 1525-1568.

Kahya, N., & Schwille, P. (2006). How phospholipid–cholesterol interactions modulate lipid lateral diffusion, as revealed by fluorescence correlation spectroscopy, *J. Fluoresc.* *16* 671–678.

Kirschner, K.N., Lins, R.D., Maass, A., & Soares, T.A., (2012). A Glycam-Based Force Field for Simulations of Lipopolysaccharide Membranes: Parametrization and Validation. *Journal Chem. Theory and Comp.* *8*, 4719-4731.

Knirel, Y. A., Bystrova, O. V., Kocharova, N. A., Zahringer, U., & Pier, G. B., (2006). Conserved and variable structural features in the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Endotoxin Research.* *12*, 324-336.

Kucerka, N., Liu, Y., Chu, N., Petrache, H.I., Tristram-Nagle, S. & Nagle, J.F., (2005). Structure of fully hydrated fluid phase DMPC and DLPC lipid bilayers using x-ray scattering from oriented multilamellar arrays and from unilamellar vesicles. *Biophys. J.* *88*, 2626–2637.

Kucerka, N., Papp-Szabo, E., Nieh, M.P., Harroun, T.A., Schooling, S.R., Pencer, J., Nicholson, E.A., Beveridge, T.J., & Katsaras, J., (2008). Effect of Cations on the Structure of Bilayers Formed by Lipopolysaccharides Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Phys. Chem. B* *112*, 8057-8062.

Leach; A.R., (2001). *Molecular Modelling Principles and Applications* 2nd. Edition. (England: Prentice Hall).

Lifson, S., & Warshel, A., (1968). Consistent force field for calculations of conformations, vibrational spectra, and enthalpies of cycloalkane and n-alkane molecules. *J. Chem. Phys.* *49*, 5116–5129.

Lindhal, E., & Edholm, O., (2001). Molecular dynamics simulations of NMR relaxation rates and slow dynamics in lipid bilayers. *Journal of Chemical Physics*, *115*, 4938-4950.

Lins, R.D., & Hunenberger, P.H., (2005). Engineering of a New GROMOS Force Field for Hexopyranoses. *Journal Comp. Chem.*, *26*, 1400-1412.

Lins, R.D., & Straatsma, T.P., (2001) Computer Simulation of the Rough Lipopolysaccharide Membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophysical Journal.* *81*, 1037-1046.

Lins, R.D., Vorpapel, E.R., Guglielmi, M., & Straatsma, T.P., (2008). Computer Simulation of Uranyl Uptake by the Rough Lipopolysaccharide Membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomacromolecules* *9*, 29-35.

Lipowsky, R., & Sackmann, E., (Eds.), *Handbook of Biological Physics*, Vol. 1. Elsevier 1995.

Machán, R., & Hof, M., (2010). Lipid diffusion in planar membranes investigated by

fluorescence correlation spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1798, 1377-1391.

MacKintosh, F.C., (2011). Internal structures in membranes: ripples, hats, saddles, and egg. Lecture Notes.

Madalinski, G., Fournier, F., Wind, F., Afonso, C., & Taber, J., (2006). Gram-negative bacterial lipid A analysis by negative electrospray ion trap mass spectrometry: Stepwise dissociations of deprotonated species under low energy CID conditions. *International Journal of Mass Spectrometry* 249-250, 77-92.

McQuarrie, D.A., (1976). *Statistical Mechanics* (New York: Harper & Row, New York).

Mueller, M., Lindner, B., Kusumoto, S., Fukase, K., Schromm, A.B., & Seydel, U., (2004). Aggregates Are the Biologically Active Units of Endotoxin. *J. Biol. Chem.* 279, 26307-26313.

Nagle, J.F., & Tristram-Nagle, S., (2000). Structure of lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1469, 159–195.

Nelson, D.L., & Cox, M.M., (2008). *Lehninger - Principles of Biochemistry*. 5th Edition. (New York: W.H. Freeman and Company).

Oostenbrink, C., Villa, A., Mark, A. E. & van Gunsteren, W. F., (2004). A Biomolecular Force Field Based on the Free Enthalpy of Hydration and Solvation: The GROMOS Force-Field Parameter Sets 53A5 and 53A6. *J. Comput. Chem.* 25: 1656-1676.

Osborn, M. J., (1963). Studies on the Gram-negative cell wall, I. Evidence for the role of 2-keto-3-deoxyoctonate in the lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 50, 499-506.

Pastor, R.W., & MacKerell, Jr, A. D., (2011). Development of the CHARMM Force Field for Lipids. *J. Phys. Chem. Lett.* 2, 1526-1532.

Paula, S., Volkov, A.G., Van Hoek, A.N., Haines, T.H., & Deamer D.W., (1996). Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness. *Biophys. J.* 70, 339–348.

Petrache, H.I., Kechuan, T., & Nagle, J. F., (1999). Analysis of Simulated NMR Order Parameters for Lipid Bilayer Structure Determination. *Biophys. J.* 76, 2479-2487.

Piggot, T. J., Holdbrook, D. A., & Khalid, S., (2011). Electroporation of the E. coli and S. Aureus Membranes: Molecular Dynamics Simulations of Complex Bacterial Membranes *J. Phys. Chem. B* 115, 13381–13388

Pontes F.J.S., Rusu V.H., Soares T.A., & Lins R.D., (2012). 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 Chem. Theory and Comp.*, 8, p. 3830–3838.

Press, W. H., Flannery, B. P., Teukolsky, S. A., & Vetterling, W. T., (1992) Numerical Recipes in FORTRAN: The Art of Scientific Computing, 2nd ed. Cambridge, England: Cambridge University Press, p. 414, 1992.

Pupo, E., & Hardy, E., (2009). Complexity and solutions to the isolation problem of Gram-negative lipopolysaccharides' bacteria molecular species. *Biotechnologia Aplicada* 26, 9-15.

Raetz, C., & Whitfield, C., (2002). Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 635-700.

Raetz, C., Reynolds, C.M., Trent, M.S., & Bishop, R.E., (2007). Lipid A modification systems in Gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 295-329.

Rheinstädter, M.C., Hussler, W., & Salditt, T., (2006). Dispersion relation of lipid membrane shape fluctuations by neutron spin-echo spectrometry. *Phys. Rev. Lett.*, 97, 048103-048107.

Rietschel E., Kirikae, T., Schade, F., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A. J., Zähringer, U, Seydel, U., Padova, F., Schreier, M., & Brade, H.; (1994) *FASEB J.* 8: 217-225.

Schlick, T (2010). *Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide*. 2nd Edition. (New York: Springer).

Schindler, M., & Osbron, M.J., (1979). Interaction of divalent cations and polymyxin B with lipopolysaccharide. *Biochemistry* 18, 4425-4430.

Schromm, A.B., Brandenburg, K., Loppnow, H., Moran, A.P., Koch, M.H., Rietschel, E.T., & Seydel, U., (2000). Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *Eur. J. Biochem.* 267, 2008-2013.

Scherfeld, D., Kahya, N., & Schwille, P., (2003). Lipid dynamics and domain formation in model membranes composed of ternary mixtures of unsaturated and saturated phosphatidylcholines and cholesterol, *Biophys. J.* 85 3758–3768.

Schwille, P., Korklach, J., & Webb, W.W., (1999). Fluorescence correlation spectroscopy with single-molecule sensitivity on cell and model membranes, *Cytometry* 36, 176–182

Seydel, U., Brandenburg, K., Koch, M. H., & Rietschel, E. T., (1989). Supramolecular structure of lipopolysaccharide and free lipid A under physiological conditions as determined by synchrotron small-angle X-ray diffraction. *Eur. J. Biochem.* 186, 325-332.

Seydel, U., Koch, M.H.J., & Brandenburg, K., (1993). Structural Polymorphisms of Rough Mutant Lipopolysaccharides Rd to Ra from *Salmonella minnesota*. *J. Struct. Biol.* 110, 232-243.

Seydel, U., Oikawa, M., Fukase, K., Kusumoto, S., & Brandenburg, K., (2000). Intrinsic conformation of lipid A is responsible for agonistic and antagonistic activity *Eur. J. Biochem.*

267, 3032-3039.

Shakhnovich, E.I. & Gutin, A.M., (1990). Implications of thermodynamics on protein folding for evolution of primary sequences. *Nature* 346, 773–775.

Shands, Jr J.W., & Chun, P.W., (1980). The dispersion of gram-negative lipopolysaccharide by deoxycholate. Subunit molecular weight. *J. Biol. Chem.* 255, 1221-1226.

Shao, Y., Molnar, L.F., Jung, Y., Kussmann, J., Ochsenfeld, C., Brown, S.T., Gilbert, A.T.B., Slipchenko, L.V., Levchenko, S.V., O'Neill, D.P., DiStasio Jr, R.A., Lochan, R.C., Wang, T., Beran, G.J.O., Besley, N.A., Herbert, J.M., Y.C. Lin, Van Voorhis, T., Hung Chien, S., Sodt, A., Steele, R.P., Rassolov, V.A., Maslen, P.E., Korambath, P.P., Adamson, R.D., Austin, B., Baker, J., Byrd, E.F.C., Dachsel, H., Doerksen, R.J., Dreuw, A., Dunietz, B.D., Dutoi, A.D., Furlani, T.R., Gwaltney, S.R., Heyden, A., Hirata, S., Hsu, C., Kedziora, G., Khalliulin, R.Z., Klunzinger, P., Lee, A.M., Lee, M.S., Liang, W., Lotan, I., Nair, N., Peters, Baron., Proynov, E.I., Pieniazek, P.A., Min Rhee, Y., Ritchie, J. Rosta, Ed., David Sherrill, C., Simmonett, A.C., Subotnik, J.E., Lee Woodcock III, H., Zhang, W., Bell, A. T., Chakraborty, A.K., Chipman, D.M., Keil, F.J., Warshel, A., Hehre, W. J., Schaefer III, H.F., Kong, J., Krylov, A.I., Gill, P.M.W., & Head-Gordon, M., (2006). Advances in methods and algorithms in a modern quantum chemistry program package *Phys. Chem. Chem. Phys.* 8, 3172-3191.

Shroll, R.M., & Straatsma, T.P., (2002). Molecular Structure of the Outer Bacterial Membrane of *Pseudomonas aeruginosa* via Classical Simulation. *Biopolymers* 65, 395-407.

Shroll, R.M., & Straatsma, T.P., (2003) Molecular Basis for Microbial Adhesion to Geochemical Surfaces: Computer Simulation of *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion to Goethite. *Biophysical J.* 84, 1765-1772.

Sigalov, A., (2012)."Monovalent" ligands that trigger TLR-4 and TCR are not necessarily truly monovalent. *Molecular immunology* 51, 356-362.

Singer, S.J., & Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720–731.

Snyder, S., Kim, D., & McIntosh, T. J., (1999). Lipopolysaccharide Bilayer Structure: Effect of Chemotype, Core Mutations, Divalent Cations, and Temperature. *Biochemistry* 38, 10758-10767.

Soares, T.A., Straatsma, T.P., & Lins, R.D., (2008). Influence of the B-band O-antigen chain in the Structure and Electrostatics of the Lipopolysaccharide Membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Braz. Chem. Soc.* 19, 312-320.

Soares, T.A., & Straatsma, T.P., (2008). Assessment of the convergence of molecular dynamics simulations of lipopolysaccharide membranes. *Molecular Simulation - Journal of Experimental Nanoscience.* 34 (3), 295-307.

- Southall, N.T., Dill, K.A., & Haymet, A.D., (2002). A View of the Hydrophobic Effect. *J. Phys. Chem. B* *106*, 521-533.
- Straatsma, T., & Soares, T.A., (2009). Characterization of the outer membrane protein OprF of *Pseudomonas aeruginosa* in a lipopolysaccharide membrane by computer simulation. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* *74*: 475-488.
- Sun, W.J., Suter, R.M., Knewton, M.A., Worthington, C.R., Tristram-Nagle, S., Zhang, R., & Nagle, J.F., (1994). Order and disorder in fully hydrated unoriented bilayers of gel phase DPPC. *Phys. Rev. E* *49*, 4665-4676.
- Tanford, C., (1978). The Hydrophobic Effect and the Organization of Living Matter. *Science* *200*, 1012-1018.
- Tieleman, D.P., Marrink, S.J., & Berendsen, H.J.C., (1997). A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems. *Biochimica et Biophysica Acta* *1331*, 235-270.
- Tironi, I.G., Sperb, R., Smith, P.E., & van Gunsteren, W.F., (1995). A generalized reaction field method for molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.* *102*, 5451-5459.
- Tobias, D.J., Kechuan, T., & Klein, M.L., (1997). Atomic-scale molecular dynamics simulations of lipid membranes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* *2*, 15-26.
- Tresset, G., (2009). The multiple faces of self-assembled lipidic systems. *PMC Biophysics* *2*, 3-25.
- Ulmer, A. J., Feist, W., Heine, H., Kirikae, T., Kirikae, F., Kusumoto, S., Kusama, T., Brade, H., Schade, F.U., Rietschel, E. Th., & Flad, H.-D., (1992). Modulation of endotoxin-induced monokine release in human monocytes by lipid A partial structures inhibiting the binding of 125I-LPS. *Infect. Immun.* *60*, 5145-5152.
- Underhill, D.M., & Ozinsky, A., (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr. Opin. Immunol.* *14*, 103-110.
- Verlet, L., (1967). Computer experiments on classical fluids. i. thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Phys. Rev.* *159*, 98-103.
- Voet, D., & Voet, J. G. (2011). *Biochemistry* 4th Edition. (John Wiley & Sons).
- Woods, R. J., Dwek, R. A., Edge, C. J., & Fraser-Reid, B., (1995). *J. Phys.Chem.* *99*, 3832-3846.
- Wu, E.L., Engstrom, O., Jo, S., Stuhlsatz, D., Yeom, M.S., Klauda, J.B., & Wildmalm, G., (2013). Molecular Dynamics and NMR Spectroscopy Studies of *E. coli* Lipopolysaccharide Structure and Dynamics. *Biophys. J.* *105*, 1444-1455.
-

Young, D. (2001). *Computational Chemistry a practical guide for applying techniques to real-world problems*. (John Wiley & Sons).

Zhang, L.F., & Granick, S., (2005). Slaved diffusion in phospholipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 9118–9121.

Ziman, J.M. (1979). *Models of Disorder. The Theoretical Physics of Homogeneously Disordered Systems*. (Cambridge: Cambridge University Press).

Zimmerberg J., Akimov S.A., & Frolov, V., (2006). Synaptotagmin: Fusogenic role for calcium sensor? *Nature Struct. Mol. Biol.* *13*: 301-303.

8. Atividades de Pesquisa Desenvolvidas Durante o Período

Participações em Eventos

I) I Escola Brasileira de Modelagem Molecular. 17 a 22 de Janeiro de 2011. Universidade Federal do ABC (UFABC), Santo André-SP.

II) Material Research Society Spring Meeting & Exhibit. 25 a 29 de Abril de 2011. San Francisco, California. **Apresentação Oral:** “Structural Properties of Lipid A from *P. aeruginosa* as a function of phenotypical variation”

III) XVI Simpósio Brasileiro de Química Teórica. 20 a 23 de Novembro de 2011. Ouro Preto, MG. **Apresentação Oral:** “Structural Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* Lipid A as a Function of the Number of Acyl Chains.”

IV) 1º Escola de Química Professor Ricardo Ferreira. 13 a 17 de Agosto de 2012. UFPE, Recife-PE.

V) Pan-American Advanced Studies Institute: Molecular-based Multiscale Modeling and Simulation. 2 a 15 de Setembro de 2012. Institute Pasteur de Montevideú, Uruguai.

VI) 2nd STINT Workshop: Understanding Biocompatibility of Polymeric Surface. 6 a 8 de Novembro de 2012. UFPE, Recife-PE. **Apresentação Oral:** “Effect of Temperature, Cations on the Phase and Assembly of Lipid A Membranes”

VII). 3rd STINT Workshop on Cell-Biomaterials Interface. 18 a 21 de Agosto de 2013. Wellcome Trust Conference Centre, Hinxton, UK. **Apresentação Oral:** “The Effect of Antimicrobial Peptide Concentration on Phospholipid Bilayers”

Trabalhos Publicados

I) PONTES, F. J. S. ; Lins, R.D. ; Soares, T. A. . Computational Simulations as a Tool in the Development of Biomolecular Systems with Novel or Enhanced Functionalities. In: Saraiva, A.C.F.; Del Nero, J.; dos Reis, A.L... (Org.). Nanotechnology: Challenges and Perspectives. 1ed.Belém: Editora da ElectroNorte, 2012, v. , p. 39-60.

II) CUNHA, R. A. ; Soares, T. A. ; Rusu, V ; PONTES, F. J. S. ; FRANCA, E. ; Lins, R.D. . The Molecular Structure and Conformational Dynamics of Chitosan Polymers: An Integrated

Perspective from Experiments and Computational Simulations. In: Desiree Nedra Karunaratne. (Org.). *The Molecular Structure and Conformational Dynamics of Chitosan Polymers: An Integrated Perspective from Experiments and Computational Simulations*. 1ed. Nova York: InTech, 2012, v. , p. 229-256.

III) PONTES, F. J. S. ; RUSU, V. H. ; Soares, T. A. ; Lins, R.D. . 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*, 2012, v. 8(10), p. 3830-3838.

IV) NASCIMENTO, A. , PONTES, F. J. S. , Lins, R. D., Soares, T. A. Hydration, ionic valence and cross-linking propensities of cations determine the stability of lipopolysaccharide (LPS) membranes. *Chem. Commun.*, 2014, 50 (2), 231 - 233.