

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

DENYS EWERTON DA SILVA SANTOS

Simulações Atomísticas da Polimixina B em Membrana Externas de Bactérias Gram-
Negativas Susceptíveis ou Resistentes: Primeiros Estágios do Mecanismo de Ação

Recife

2017

DENYS EWERTON DA SILVA SANTOS

Simulações Atomísticas da Polimixina B em Membrana Externas de Bactérias Gram-Negativas Susceptíveis ou Resistentes: Primeiros Estágios do Mecanismo de Ação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Thereza Amélia Soares

Recife

2017

Catálogo na fonte
Bibliotecária Leonice Maria Cavalcante CRB 4-P1714

- S231s Santos, Denys Ewerton da Silva.
Simulações atomísticas da polimixina B em membrana externas de bactérias gram-negativas susceptíveis ou resistentes: primeiros estágios do mecanismo de ação/ Denys Ewerton da Silva Santos – 2017.
147 f.: fig.; tab.
- Orientador: Thereza Amélia Soares.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Física. Recife, 2017.
Inclui referências e apêndices.
1. Parede celular bacteriana. 2. Indução de curvatura positiva. I. Soares, Thereza Amélia. (Orientador). II. Título.

547.7 CDD (22. ed.)

UFPE-FQ2017-53

DENYS EWERTON DA SILVA SANTOS

*SIMULAÇÕES ATOMÍSTICAS DA POLIMIXINA B EM MEMBRANAS EXTERNAS DE
BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS SUSCEPTÍVEIS OU RESISTENTES: PRIMEIROS
ESTÁGIOS DO MECANISMO DE AÇÃO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovado em : 02/08/2017.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Thereza Amélia Soares da Silva (orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Química Fundamental

Prof. Ricardo Luiz Longo

Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Química Fundamental

Profa. Kaline Rabelo Coutinho

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Dr. Frederico José de Santana Pontes

Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Química Fundamental

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente como sempre, aos meus pais. Sem seu apoio e dedicação muito do que consegui seriam apenas sonhos. Estar com vocês sempre foi uma inspiração e um norte para o caminho que deveria seguir.

A minha companheira que está comigo em tantas batalhas e projetos. Ao apoio incondicional, carinho, doçura e respeito que sempre demonstrou.

Ao meu querido amigo, que embora não esteja mais alegrando meus dias, trouxe em uma década de companheirismo, parceria e amor, assim como muito da força que tenho hoje, mostrando como ser corajoso para enfrentar os piores problemas sem recuar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha orientadora que demonstrou incrível apoio e parceria para caminhar com cada projeto desenvolvido ao longo desses anos de colaboração.

A todos os membros do Laboratório de Modelagem de Biomateriais que direta ou indiretamente contribuíram no meu treinamento e desenvolvimento do trabalho. Em especial, aos meus queridos amigos Laércio e Fred que contribuíram com os ensaios dos diferentes quimiotipos de bicamada lipopolissacarídicas possibilitando a identificação das variações nas interações das mesmas com os antimicrobianos e o estudo do mecanismo de ação desses antimicrobianos sobre essas bicamadas.

Ao Prof. Dr. Roberto Dias Lins pelo auxílio no desenvolvimento das simulações utilizando metodologias de amostragem melhorada.

À Profa. Dra. Kaline Coutinho pelo auxílio no desenvolvimento das análises sem as quais parte dos resultados não seria possível.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que me forneceu a bolsa e os demais subsídios necessários ao desenvolvimento desse trabalho.

*Só o riso, o amor e o prazer
merecem revanche. O resto é
mais que perda de tempo.....
é perda de vida! (Chico Xavier)*

RESUMO

Pseudomona aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa com ampla distribuição em ambientes abióticos, e bióticos onde atuam com patógenos oportunistas causadores de morbidade e mortalidade. Sua ação infecciosa ocorre especialmente quando o hospedeiro exibe alguma deficiência imunológica. *P. aeruginosa* exibe resistência à um amplo espectro de antibióticos, e portanto a busca de novas drogas que preferencialmente minimizem ou impeçam o desenvolvimento de resistência bacteriana é uma necessidade imediata. As polimixinas são polipeptídios antimicrobianos catiônicos (CAP) sintetizados por várias cepas de bactérias gram-positivas da *Bacillus polymyxa* utilizados em casos de multirresistência por parte de microrganismos infecciosos. Embora as polimixinas sejam muito eficientes, estes compostos possuem efeitos colaterais severos associados a nefrotoxicidade e neurotoxicidade que limitam a sua aplicação no âmbito hospitalar. Nesta dissertação foi investigado o mecanismo molecular de ação do peptídio antimicrobiano Polimixina B em cepas susceptíveis ou resistentes de *P. aeruginosa*. Simulações de dinâmica molecular (DM) com modelos atomísticos foram realizadas para diferentes concentrações da molécula de Polimixina B em presença de diferentes quimiotipos da membrana externa da bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa*. Os quimiotipos simulados foram lipídeo A, lipídeo A modificado pela adição do grupo 4-amino-4-deoxy-l-arabinose aos grupos fosfatos, e LPS Re nas formas penta- e hexa-aciladas. Os modelos moleculares para os lipopolissacarídeos constituintes da membrana externa em bactérias Gram-negativas foram parametrizados e validados previamente no Grupo de Modelagem de BioMateriais. Devido a inexistência de uma estrutura tridimensional para a Polimixina B, diferentes protocolos de simulação foram comparados, e selecionados de acordo com capacidade de reproduzir os valores de acoplamento vicinal $^3J_{\text{HN,H}}$ obtidos experimentalmente em solução por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Os diferentes protocolos foram comparados em função do conjunto de parâmetros atômicos (GROMOS 54A7 versus GROMOS 53A6), tratamento eletrostático de longa distância (campo de reação versus particle-mesh Ewald), e método de amostragem (DM convencional versus DM acoplada à técnica de *simulated annealing* DM/SA). O protocolo combinando os parâmetros atômicos do GROMOS 54A7, campo de reação e amostragem via DM/SA resultou em valores de constante de acoplamento calculados com um RMSD médio de 0,86 Hz comparado aos valores experimentais. Este protocolo foi usado para as simulações de DM dos quimiotipos de LPS em presença da Polimixina B. Nos quimiotipos sem a adição de 4-amino-4-deoxy-l-arabinose foram observadas modificações estruturais nas bicamadas

lipopolissacarídicas induzindo um aumento de até 40% na curvatura da membrana, aumento da espessura da bicamada e uma mobilidade dos contra-íons responsáveis pela manutenção da estrutura das mesmas 5 vezes maior que a apresentada pelos mesmos quimiotipos sem presença do antimicrobiano. Essas modificações não foram verificadas nos quimiotipos de LPS adicionados de 4-amino-4-deoxy-l-arabinose.

Palavras-chave: Parede celular bacteriana. Análise conformacional baseado em dados de RMN. Polimixinas B, M e E. Indução de curvatura positiva. Coeficiente de difusão de contra-íons.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative bacterium with wide distribution in abiotic and biotic environments, where they act as opportunistic pathogens causing morbidity and mortality. Their infectious action occurs especially when the host exhibits some immunological deficiency. *P. aeruginosa* exhibits resistance to a broad spectrum of antibiotics, and therefore the search for novel drugs that preferentially minimize or prevent the development of bacterial resistance is an immediate necessity. Polymyxins are cationic antimicrobial polypeptides (CAP) synthesized by several strains of *Bacillus polymyxa* gram-positive bacteria used in cases of multiresistance by infectious microorganisms. Although polymyxins are very efficient, these compounds have severe side effects associated with nephrotoxicity and neurotoxicity that limit their clinical applications. In this dissertation, we investigated the molecular mechanism of action of the antimicrobial peptide Polimixin B in *P. aeruginosa* susceptible or resistant strains. Simulations of molecular dynamics (DM) at the atomic level were performed for different concentrations of the Polymyxin B molecule in the presence of different outer membrane chemotypes of the Gram-negative bacterium *P. aeruginosa*. The simulated chemotypes were lipid A, lipid A modified by the addition of the 4-amino-4-deoxy-1-arabinose group to the phosphate groups, and LPS Re in the penta- and hexa-acylated forms. The molecular models for lipopolysaccharides constituting the outer membrane in Gram-negative bacteria were previously parameterized and validated in the BioMaterials Modeling Group. Due to the lack of a three-dimensional structure for Polymyxin B, different simulation protocols were compared, and selected according to the ability to reproduce the $^3J_{\text{HN,H}}$ vicinal coupling values obtained experimentally in solution by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The different protocols were compared according to the set of atomic parameters (GROMOS 54A7 versus GROMOS 53A6), long-distance electrostatic treatment (reaction field versus particle-mesh Ewald), and sampling method (conventional MD vs. MD coupled to the Simulated Annealing technique MD/SA). The protocol combining the atomic parameters of GROMOS 54A7, reaction field and sampling via MD/SA resulted in coupling constant values calculated with an average RMSD of 0.86 Hz compared to the experimental values. In the chemotypes without the addition of 4-amino-4-deoxy-1-arabinose, structural modifications were observed in the lipopolysaccharide bilayers inducing an increase of up to 40% in the membrane curvature, alongside an increase in the thickness and in the mobility of the counter-ions responsible for maintaining its structure of about 5 times higher than that presented by the same chemotypes without

antimicrobial presence. These modifications were not verified in the LPS chemotypes added with 4-amino-4-deoxy-1-arabinose.

Key words: Bacterial cell wall. Conformational analysis based on NMR data. Polymixins B, M and E. Induction of positive curvature. Counterions diffusion coefficient.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química da molécula de lipopolissacarídeo da bactéria Gram-negativa <i>P. aeruginosa</i> . Podem ser observadas três regiões funcionais: o lipídeo A, cujas cadeias alquílicas formam a parte lipídica da bicamada, e o <i>inner</i> e <i>outer core</i> constituídos por oligossacarídeos.	20
Figura 2	Estrutura química da polimixina B1 em pH neutro ou ácido.	23
Figura 3	Imagem mostrando seção da célula de uma <i>P. aeruginosa</i> . A) bactéria não tratada com antibiótico. B) tratada com Polimixina B. C) tratada com Polimixina E. D) ampliação da imagem B, realçando as estruturas formadas pelo ataque do antimicrobiano à membrana externa da bactéria.	26
Figura 4	Comparação entre diferentes escalas espacial e temporal amostradas pelo método de simulação de dinâmica molecular com tratamento de partículas por mecânica quântica, mecânica clássica atomística e <i>coarse-grained</i> .	29
Figura 5	Exemplo de conexão entre os átomos de uma cadeia.	38
Figura 6	Esquema para visualização de como o algoritmo funciona. A) rotação não restringida de dois átomos, B) definição da projeção da nova orientação sobre a antiga como nula e C) redefinição do comprimento de ligação como o valor antigo.	58
Figura 7	Pequeno intervalo da simulação demonstrando como a temperatura do sistema foi variada durante a utilização do método de amostragem melhorada.	60
Figura 8	Exemplo da configuração inicial das simulações entre polipeptídeo e membranas bacterianas. Em a) pode ser observada a visão frontal do sistema, enquanto que em b) a visão superior é demonstrada. Em vermelho e amarelo estão representados, respectivamente, os oxigênios e fósforo do grupamento fosfato dos lipídeos, ao passo que em cinza estão as cadeias alquílicas. Em verde são destacadas as moléculas de polimixina em contato com a membrana.	66
Figura 9	Esquema mostrando como é calculado o ângulo de desvio utilizado na quantificação do parâmetro de ordem de curvatura. A) exemplo de sistema não apresentando curvatura, onde o eixo normal a membrana coincide com o eixo normal do sistema. B) exemplo de sistema com curvatura leve onde pode ser verificado o ângulo de desvio da normal do sistema utilizado no cálculo do parâmetro de ordem de curvatura.	71
Figura 10	Função de autocorrelação para a cadeia do anel da Polimixina B quando utilizando os parâmetros GROMOS54A7 e Campo de Reação. Em preto encontra-se a curva para a simulação a 300 K, enquanto que em vermelho encontra-se a curva para o mesmo sistema utilizando o método do Arrefecimento Simulado (<i>Simulated Annealing</i>).	80
Figura 11	Diagrama de Ramachandran para variantes de polimixinas: polimixina B (preto), polimixina E (vermelho) e polimixina M (verde). Na linha superior são mostrados os resultados para as simulações com DM e na linha inferior com DM/SA. Os pontos amarelos e purpúreos correspondem aos valores de $^3J_{HN,H\alpha}$ obtidos experimentalmente por espectroscopia de RMN (PRITOVSEK e KIDRIC, 1999).	82
Figura 12	Gráfico de Ramachandran para as 10 melhores estruturas da família representada pelas duas conformações descritas na Tabela 2.	83
Figura 13	Descrição das famílias estruturais agrupadas por similaridade conformacional (RMSD = 1 Å) identificadas para cada variante de polimixina na simulação com o protocolo GROMOS 54A7, campo de reação e amostragem DM/SA.	85
Figura 14	Transições entre famílias estruturais da polimixina B. Ligações de hidrogênio demarcadas pelas linhas pontilhadas. A Matriz indica o número de transições entre os agrupamentos, que é também representada na espessura da seta de equilíbrio entre as estruturas.	87

Figura 15	Transições entre famílias estruturais da polimixina E. Ligações de hidrogênio demarcadas pelas linhas pontilhadas. A Matriz indica o número de transições entre os agrupamentos, que é também representada na espessura da seta de equilíbrio entre as estruturas.	87
Figura 16	Transições entre famílias estruturais da polimixina M. Ligações de hidrogênio demarcadas pelas linhas pontilhadas. A Matriz indica o número de transições entre os agrupamentos, que é também representada na espessura da seta de equilíbrio entre as estruturas.	88
Figura 17	Superposição da conformação predominante amostrada por DM/SA para polimixina B, E e M, em azul, vermelho e verde respectivamente. Superposição feita a partir dos átomos N, C α , C, O da cadeia principal de cada variante.	88
Figura 18	Perfil da área por lipídeo para bicamadas lipopolissacarídicas compostas por diferentes quimiotipos do LPS de <i>P. aeruginosa</i> (Tabela 4). Em preto tem-se o lipídeo A penta-acilado, em vermelho o lipídeo A hexa-acilado, em verde o lipídeo A penta-acilado com adição da 4-amino-4-deoxy-1-arabinose e em azul o lipídeo A com adição de duas unidades de KDO, configurando o conhecido LPS RE (Apêndice 2).	90
Figura 19	Resultados da espessura média da bicamada lipídica para os sistemas estudados. . Em preto tem-se o lipídeo A penta-acilado, em vermelho o lipídeo A hexa-acilado, em verde o lipídeo A penta-acilado com adição da 4-amino-4-deoxy-1-arabinose e em azul o lipídeo A com adição de duas unidades de KDO, configurando o conhecido LPS RE.	92
Figura 20	Perfis de densidade para os sistemas simulados. A) lipídeo penta-acilado, B) lipídeo hexa-acilados, C) lipídeo com adição de 4-amino-4-deoxy-1-arabinose e D) lipídeo com adição de duas unidades de KDO, configurando o conhecido LPS RE. Em azul está o perfil das moléculas de água, em vermelho a estrutura da bicamada lipídica e em verde os contra-íons utilizados para estabilizar a membrana. A curva dos contra-íons apresentada em cada gráfico foi aumentada vinte vezes, a fim de facilitar sua visualização no gráfico.	95
Figura 21	Gráfico de Ramachandran para as 10 estruturas de menor energia potencial obtidas a partir de medidas de NOE para a polimixina B em presença de agregados de lipídeo A.	97
Figura 22	Gráficos de Ramachandran para as seis cópias de polimixina B quando interagindo na superfície de uma bicamada de lipídeo A penta-acilado de <i>P. aeruginosa</i> .	99
Figura 23	Gráficos de Ramachandran para as seis cópias de polimixina B quando interagindo na superfície de uma bicamada de lipídeo A penta-acilado de <i>P. aeruginosa</i> com adição de 4-amino-4-deoxy-1-arabinose.	100
Figura 24	Gráficos de Ramachandran para as seis cópias de polimixina B quando interagindo na superfície de uma bicamada de LPS Re penta-acilado de <i>P. aeruginosa</i> .	100
Figura 25	Distribuição dos ângulos de curvatura calculados para o lipídeo A quando na ausência de moléculas de polimixina e em presença de duas e seis moléculas.	101
Figura 26	Gráficos da projeção dos parâmetros de ordem de curvatura médios sobre a superfície da bicamada na ausência e presença de múltiplas cópias da polimixina B. A primeira coluna mostra os sistemas constituídos por lipídeo A penta-acilado, a segunda coluna por lipídeo A hexa-acilados, a terceira por lipídeo A modificado com 4-amino-4-deoxy-1-arabinose e a última coluna por LPS Re.	103
Figura 27	Distribuição dos ângulos de curvatura calculados ao longo de 100 ns para bicamadas constituídas por diferentes quimiotipos de <i>P. aeruginosa</i> na ausência e em presença de seis moléculas de polimixina B.	104
Figura 28	Conformação final dos sistemas simulados quando em presença da polimixina B. Na sequência estão A) o lipídeo A penta-acilado, B) o LPS Re, C) o lipídeo A hexa-acilados e por último D) o lipídeo A penta-acilado com adição de 4-amino-4-deoxy-1-arabinose.	107
Figura 29	Gráfico da área por lipídeo para simulações dos quimiotipos B) em presença e A) na ausência da polimixina B. Em preto tem-se o lipídeo A penta-acilado, em vermelho o lipídeo A hexa-acilado, em verde o lipídeo A penta-acilado com adição da 4-amino-4-deoxy-1-arabinose e em azul o lipídeo A com adição de duas unidades de KDO, configurando o conhecido LPS RE.	108

Figura 30	Resultados da espessura média da bicamada lipídica para os sistemas estudados B) em presença e A) na ausência da polimixina B. Em preto tem-se o lipídeo A penta-acilado, em vermelho o lipídeo A hexa-acilado, em verde o lipídeo A penta-acilado com adição da 4-amino-4-deoxy-1-arabinose e em azul o lipídeo A com adição de duas unidades de KDO, configurando o conhecido LPS RE.	109
Figura 31	Bicamadas em presença das polimixinas. A) lipídeo penta-acilado, B) lipídeo hexa-acilados, C) lipídeo com adição de 4-amino-4-deoxy-1-arabinose e D) lipídeo com adição de duas unidades de KDO, configurando o conhecido LPS RE. Em azul está o perfil das moléculas de água, em vermelho a estrutura da bicamada lipídica, em verde os contra-íons utilizados para estabilizar a membrana e em preto o das polimixinas. Os perfis para os íons Ca^{2+} foram aumentados vinte vezes, enquanto que os perfis para as polimixinas foram aumentados cinco vezes.	110
Figura 32	Distribuição espacial da espessura da bicamada para os sistemas descritos na Tabela 5. Na primeira coluna estão os sistemas com lipídeo A penta-acilado, na segunda estão presentes os com lipídeo A hexa-acilados, na terceira estão presentes os sistemas compostos por lipídeo A adicionado de 4-amino-4-deoxy-1-arabinose e na última coluna estão os sistemas com LPS Re. A última linha de imagens é constituída pelos perfis de densidade bidimensional das seis moléculas de polimixina presentes nos sistemas.	111
Figura 33	Histograma dos valores de difusividade em intervalos de 10 ns ao longo de todo o tempo de simulação para os sistemas descritos na Tabela 5. A) lipídeo A penta-acilado, B) lipídeo A hexa-acilados e C) LPS Re. Em preto estão os valores das simulações na ausência de polimixinas, em azul estão os dados das simulações em presença das polimixinas e em vermelho estão os dados da simulação em presença das polimixinas e 150 mM de NaCl.	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição das diferenças encontradas entre as polimixinas A, B, D e E. Adaptado de Storm, Rosenthal e Swanson, 1977.	23
Tabela 2	Valores dos ângulos diédricos para as duas conformações médias de menor energia da polimixina B obtidas por espectroscopia de RMN e utilizadas na construção de modelos tridimensionais para simulações.	62
Tabela 3	Descrição da combinação de parâmetros de campo de força, TELD e métodos de amostragem utilizados nas simulações das variantes de polimixina em água.	63
Tabela 4	Setup dos sistemas de bicamada utilizados para simulação das membranas bacterianas sem presença dos polipeptídios antimicrobianos. Nessas simulações o solvente utilizado foi a água.	64
Tabela 5	Descrição do número de moléculas de cada componente do sistema utilizados na montagem das simulações e do tempo total de simulação alcançado ao final do trabalho.	65
Tabela 6	Comparação dos valores de acoplamentos vicinais $^3J_{HN,H\alpha}$ obtidos por espectroscopia de RMN e calculados para o conjunto de conformações amostrados com diferentes protocolos de simulação.	78
Tabela 7	Comparação dos valores de acoplamentos vicinais $^3J_{HN,H\alpha}$ obtidos por espectroscopia de RMN e calculados para o conjunto de conformações amostrados com o protocolo (GROMOS54A7/Campo de Reação) três variantes de Polimixina.	79
Tabela 8	Comparação dos valores de acoplamentos vicinais $^3J_{HN,H\alpha}$ obtidos por espectroscopia de RMN e calculados para o conjunto de conformações amostrados com o protocolo (GROMOS54A7/campo de Reação/DM-SA) para três variantes da polimixina	81
Tabela 9	Difusividade dos íon Ca^{2+} , com respectivos desvios, para os diferentes sistemas apresentados.	93
Tabela 10	Valores do número de coordenação para os íons de Ca^{2+} em cada um dos sistemas descritos na Tabela 9. Esses valores foram tomados através da integração do perfil de distribuição radial de pares entre os íons e os átomos de oxigênio das moléculas de água até a distância de 0,33 nm, correspondendo ao final da primeira esfera de coordenação.	96
Tabela 11	Dados estruturais de duas prováveis conformações da polimixina B em uma mistura com lipídeo A.	98
Tabela 12	Análise quantitativa dos perfis de distribuição de ângulos de curvatura.	104
Tabela 13	Média temporal das constantes de difusão, com respectivos desvios, calculada ao longo de todo o tempo de simulação, para os sistemas descritos na Tabela 5.	112
Tabela 14	Número de coordenação do nitrogênio em relação aos oxigênios das moléculas de água, aos átomos de fósforo dos grupamentos fosfato dos lipídeos e aos oxigênios dos grupamentos carboxila das moléculas de KDO do LPS RE.	113

LISTA DE ABREVIATURAS

AIMD	<i>ab initio</i> Molecular Dynamics
AMBER	<i>Assisted Model Building with Energy Refinement</i>
AMH	Ácido 6-metil-heptanóico
AMO	Ácido 6-metil-octanóico
AMP	<i>Antimicrobial Peptides</i>
Ara4N	4-amino-4-deoxy-1-arabinose
PAC/CAP	Peptídios Antimicrobianos Catiônicos (do Inglês - <i>Cationic Antimicrobial Peptides</i>)
CHARMM	<i>Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics</i>
COMPASS	<i>Condensed-phase Optimized Molecular Potentials for Atomistic Simulation Studies</i>
CrCl	<i>Creatinine Clearance</i> (depuração de creatinina)
CSD	<i>Cambridge Structural Database</i>
DAB	Ácido L- α,γ -diaminobutírico
FFT/TRF	Transformadas Rápidas de Fourier – do inglês Fast Fourier Transform
Gal	Galactosamina N-alanilada
Glc	D-glucose
GROMACS	<i>Groningen Machine for Chemical Simulations</i>
GROMOS	<i>Groningen Molecular Simulation</i>
HEP	L-glicero-D-manno-heptose
ITC	<i>Isothermal titration calorimetry</i>
KDO	Ácido D-manno-oct-2-usolónico
LEU	Leucina (Ácido 2-amino-4-metilpentanoico)
LINCS	<i>Linear Constraint Solver</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
MC	Monte Carlo

DM/MD	Dinâmica Molecular (do inglês - <i>Molecular Dynamics</i>)
MDR	<i>MultiDrug Resistance</i>
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NPT	Número de partículas, Pressão e Temperatura
OPLS	<i>Optimized Potential for Liquid Simulations</i>
PBC	<i>Periodic Boundary Conditions</i>
PHE	Fenilalanina (Ácido 2-amino-3-fenil-propanoico)
PMBN	Nonapeptídeo da Polimixina B
PME	<i>Particle Mesh Ewald</i>
RDF	<i>Radial Distribution Function</i>
RF	<i>Reaction Field</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
SA	<i>Simulated Annealing</i>
SEP	Superfície de Energia Potencial
SER	Serina (Ácido 2-amino-3-hidroxipropiônico)
SKS	Abreviação para Smit, Karaborni e Siepmann
TELD	Tratamento Eletrostático de Longa Distância
THR	Treonina (Ácido 2-amino-3-hidroxibutanoico)
TraPPE	<i>Transferable Potentials for Phase Equilibria</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 ENTENDENDO O ALVO	19
1.2 UM ANTIMICROBIANO DE ÚLTIMA INSTÂNCIA	22
1.3 SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS E A DINÂMICA MOLECULAR	28
2. METODOLOGIA	32
2.1 FUNDAMENTAÇÃO METODOLÓGICA	32
2.1.1 Considerações prévias	32
2.1.2 O método de dinâmica molecular, as funções potenciais e o campo de força	34
2.1.3 O potencial de estiramento	38
2.1.4 O potencial de ângulo de ligação covalente	40
2.1.5 O potencial de torção	40
2.1.6 Potenciais de restrição para o ângulo de torção	42
2.1.7 O potencial de van der Waals	43
2.1.8 O potencial de interação eletrostática	44
2.1.9 As cargas atômicas	45
2.1.10 Método de minimização (<i>Steepest Descent</i>)	47
2.1.11 Algoritmo de dinâmica (<i>Leap Frog</i>)	49
2.1.12 Condições Periódicas de Contorno	50
2.1.13 <i>Ensembles</i> Termodinâmicos	51
2.1.14 Termostato (<i>v-rescale</i>)	52
2.1.15 Barostato (Berendsen)	53
2.1.16 <i>Particle-Mesh Ewald</i> (PME)	54
2.1.17 <i>Reaction Field</i> (RF)	56
2.1.18 <i>Linear Constraint Solver</i> (LINCS)	57
2.1.19 Método de amostragem melhorada	59
2.2 PARÂMETROS ATOMICOS E PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS	61
2.2.1 Estrutura e parâmetros utilizados nas simulações das polimixinas	61
2.2.2 Estrutura e parâmetros utilizados nas simulações dos lipídeos	63
2.2.3 Setup das simulações das interações entre membrana externa bacteriana e AMP	65
2.2.4 Parâmetros utilizados nas simulações de dinâmica molecular	66
2.3 ANÁLISES	68
2.3.1 Área por cabeça	68
2.3.2 Densidade	69

2.3.3 Espessura da bicamada	70
2.3.4 Curvatura	70
2.3.5 Diagrama de Ramachandran	71
2.3.6 Acoplamento vicinal e a equação de Karplus	72
2.3.7 Difusão dos íons	73
2.3.6 Função de autocorrelação	73
2.3.7 Função Distribuição Radial de Pares (RDF)	74
2.3.8 Análise de <i>clusters</i>	75
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
3.1 DESENVOLVIMENTO ESTRUTURAL DA POLIMIXNA B	77
3.1.1 Validação dos parâmetros atômicos	77
3.1.2 Análise da conformação mais representativa do <i>ensemble</i> conformacional amostrado	85
3.2 BICAMADA LIPOPOLISSACARIDICA	89
3.2.1 Área por lipídeo e espessura da bicamada	89
3.2.2 Difusão dos íons	93
3.2.3 Perfil de densidade das bicamadas lipopolissacarídicas compostas por diferentes quimiotipos	94
3.3 INTERAÇÕES ENTRE POLIMIXINAS E BICAMADAS LIPOPOLISSACARIDICAS: MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS E INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO ANTIMICROBIANO	96
3.3.1 Avaliação do comportamento das polimixinas	97
3.3.2 Efeito da concentração das polimixinas sobre a estrutura das membranas	101
3.3.3 A indução de curvatura em bicamadas lipopolissacarídicas	102
3.3.4 Área por lipídeo e espessura da bicamada	108
3.3.5 O perfil de densidade das bicamadas lipopolissacarídicas	109
3.3.6 Espessura bidimensional	111
3.3.7 O deslocamento dos íons e os sítios de interação da polimixina com as membranas	112
4. CONCLUSÃO	116
REFERÊNCIAS	119
APÊNDICE 1 (Tabelas)	128
APÊNDICE 2 (Figuras)	135
APÊNDICE 3 (Estruturas)	137
APÊNDICE 4 (Exemplo de input das dinâmicas e custo computacional)	143
APÊNDICE 5 (Desvio médio quadrático)	146
APÊNDICE 6 (Publicações e Eventos)	147

1. INTRODUÇÃO

1.1 ENTENDENDO O ALVO

Segundo Vasil (1986), a *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa com formato de bastonete, bacilo, pertencente a família Pseudomonadaceae. É um organismo aeróbio estrito, não fermentador de glicose, pertencente ao grupo fluorescente dos pseudomonídeos, sendo facilmente identificado pela coloração azulada de suas colônias, causada pela produção da piocianina, motivo pelo qual foi inicialmente nomeada como *Bacillus pyocyaneus*. São capazes de crescer em ambientes com temperaturas superiores a 43 °C, com limitação de nutrientes, em água destilada, em condições anaeróbias onde há presença de nitratos ou arginina e até mesmo em meios desinfetantes, o que indica uma grande capacidade adaptativa e explica sua presença em diversos ambientes físicos.

É um agente infeccioso e sua virulência se dá através de uma gama de fatores, tanto extracelulares, produzidos através do seu metabolismo, como estruturais, intrínsecos a sua constituição biológica. Segundo Vasil (1986), os fatores produzidos como material extracelular são as toxinas, hemolisinas, agressinas, fatores de aderência e cápsulas polissacarídicas. Este último sendo ligado a patogenicidade da bactéria, a sua adesão e penetração sobre a célula hospedeira (DAFEE e ETIENNE, 1999). Por outro lado entre os fatores relacionados à sua constituição celular está a camada lipopolissacarídica (LPS) existente na membrana externa dos bacilos, sendo esta a responsável pela maior parte da sua virulência. Sua estrutura é composta principalmente pelo lipídeo A, uma camada de oligossacarídeos constituindo o que pode ser diferenciado em duas regiões distintas, o *inner core* e o *outer core* (Figura 1) e uma região polissacarídica que varia para cada espécie e que pode modificar sua interação com as células do hospedeiro, o antígeno-O (STRASTASMA e SOARES, 2009; PIER, 2007).

O lipídeo A é base principal sobre a qual se desenvolvem as outras estruturas já descritas. É constituído por duas moléculas de glucosamina ligadas covalentemente nas posições 1-6, fosfatadas nas posições 1-4, e aciladas nas posições 2-3 do sacarídeo, como mostrado na Figura 1. O número de cadeias aciladas do lipídeo pode variar dependendo do meio de desenvolvimento do micro-organismo, estando diretamente relacionado com o tipo de infecção desenvolvida nos pacientes hospitalares (STEIMLE, AUTENRIETH e FRICK, 2016; PIER, 2007).

O *inner core* do LPS é constituído por dois sacarídeos, a saber, o ácido D-manno-oct-2-usolónico (KDO) e a L-glicero-D-manno-heptose (HEP). Este último possuindo inserções de grupamentos fosfatos no formato de mono, di ou até mesmo trifosforilações. Segundo Walsh *et al.* (2000), que estudaram mutações no gene *waaP* da *P. aeruginosa*, responsável pela fosforilação do HEP, essas inserções de fosfato são essenciais, não só para viabilidade da bactéria, mas também para sua capacidade de resistência a antimicrobianos. Entretanto, não só a existência desses grupos serve como meio de defesa para o organismo bacteriano, mas também, segundo Steimle, Autenrieth e Frick (2016) e Caroff e Karabian (2003), a modificação da carga superficial do LPS pela adição de resíduos positivamente carregados como, por exemplo, a 4-amino-4-deoxy-1-arabinose, são respostas de sobrevivência e resistência a meios com pouca concentração de Mg^{2+} ou com presença de peptídios antimicrobianos catiônicos (CAP).

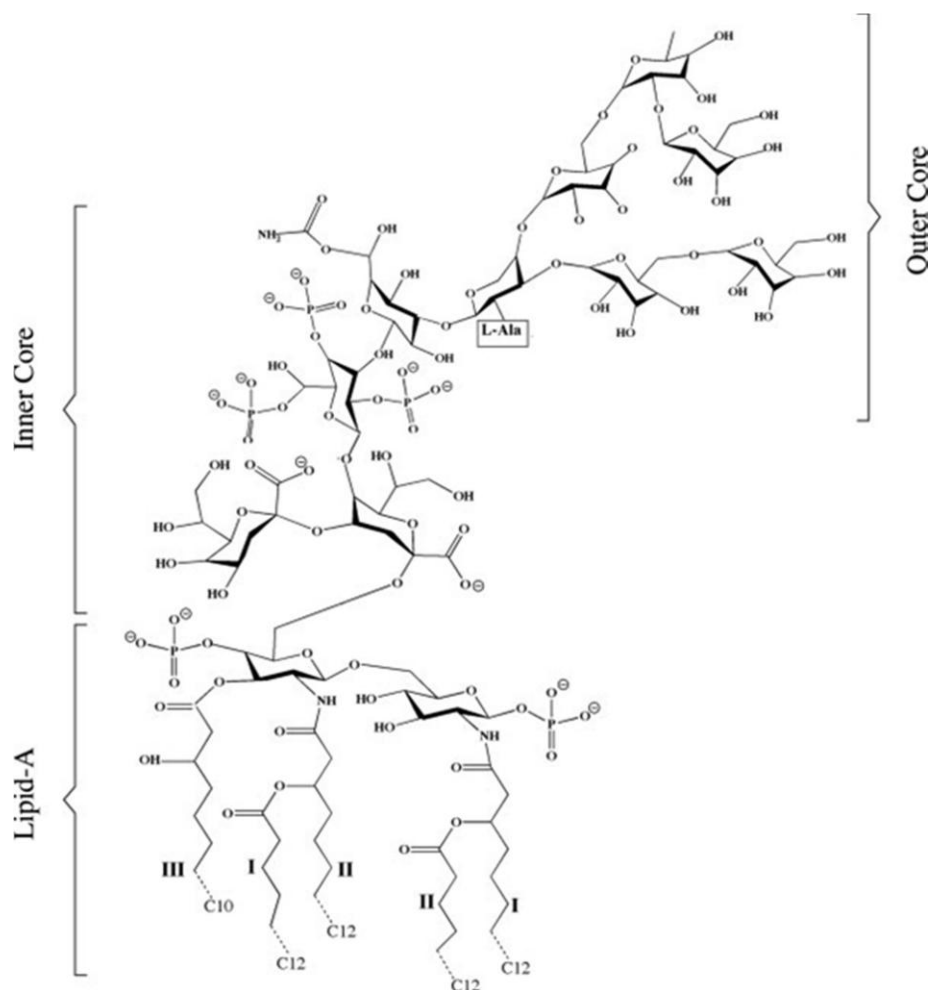


Figura 1. Estrutura química da molécula de lipopolissacarídeo da bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa*. Podem ser observadas três regiões funcionais: o lipídeo A, cujas cadeias alquílicas formam a parte lipídica da bicamada, e o *inner* e *outer core* constituídos por oligossacarídeos.
Fonte: STRAATSMA e SOARES, 2009.

O *outer core*, de forma similar a região mais interna do core lipopolissacarídico, é basicamente composto por uma sequência de oligossacarídeos ligados ao HEP do *inner core* chegando até seis unidades covalentemente ligadas de D-glucose (Glc) e galactosamina N-alanilada (Gal), normalmente sofrendo algumas variações, ramificações e adições de outros oligossacarídeos, como a L-ramnose na *P. aeruginosa*, e variantes da HEP dependendo da espécie da bactéria. Essas variações na composição da região e a própria existência do core, que também depende da espécie e do ambiente onde os organismos se desenvolvem, são em geral uma primeira defesa antigênica das cepas bacterianas, principalmente nas que não possuem o antígeno-O, caso do *rough* LPS (CAROFF e KARIBIAN, 2003; PIER, 2007).

O antígeno O, apenas presente em LPS do tipo *smooth*, é composto de maneira semelhante ao core, por uma sequência de oligossacarídeos que variam de espécie para espécie de forma única, exemplificando o que seria o relativo a uma impressão digital do organismo bacteriano. Por esse motivo, o antígeno-O é responsável por expressar o que se conhece como o serotipo bacteriano, além de fornecer mais uma forma de defesa dos organismos contra a ação de antimicrobianos, o que pode ser demonstrado pela maior susceptibilidade dos microrganismos sem a presença dessa estrutura, LPS *rough*, frente a CAPs (CAROFF e KARIBIAN, 2003).

Em se tratando do desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos, Vasil (1986) realizou uma descrição completa da *P. aeruginosa*, detalhando sua biologia, virulência e epidemiologia. Ele descreve que esta espécie, dentre todas as pseudomonídeas, possui os três sistemas de recombinação genética, a saber, conjugação, transdução e transformação, sendo esses, portanto, fatores que explicam sua facilidade em recombinação que lhes efetiva o rápido desenvolvimento de resistência a antibióticos.

Esse fato tem marcado inúmeras páginas de periódicos desde o século passado, e principalmente nos últimos anos onde as manobras médicas não padronizadas dentro do âmbito hospitalar tem impulsionado o crescimento de cepas resistentes aos antimicrobianos comerciais no mundo todo (PIER, 2007). Um exemplo disso foi citado resumidamente por Andrade *et al.* (2003), em um estudo realizado entre 1997 e 2001 com diversos hospitais e unidades de saúde da América Latina. Eles demonstraram a diminuição gradativa da susceptibilidade dos microrganismos aos medicamentos disponíveis comercialmente na região.

Essa avaliação se mostra como uma perspectiva muito pessimista quando unida a grande capacidade adaptativa do microrganismo e a falta de desenvolvimento de novas

alternativas terapêuticas por parte da indústria farmacêutica. Por vezes se torna necessária a utilização de antimicrobianos muito agressivos ao ser humano para tratar situações onde há a expressão de uma resistência de amplo espectro a antibióticos comuns, caso onde são utilizadas as polimixinas como última linha de defesa contra os organismos invasores, assim como descreve Neves *et al.* (2011).

É nesse ponto que será introduzido o próximo tópico. Segundo alguns estudos, os antimicrobianos da classe polimixina são potentes biocidas que tem a capacidade de atacar as células bacterianas de modo a dificultar uma manobra de resistência por parte do microrganismo, mesmo que embora já tenham sido constatados alguns poucos casos de mecanismos de defesa contra esses peptídios antimicrobianos (AMP). No mesmo tipo de estudo realizado por Andrade *et al.* (2003), mas descrito de forma mais detalhada e estendido para os anos entre 2001 e 2004, Gales, Jones e Sader (2006) compararam a atividade da polimixina B com a de outros antimicrobianos disponíveis comercialmente e comumente utilizados em âmbitos hospitalares. Foi possível demonstrar que em um número expressivo de ensaios com *P. aeruginosa*, inclusive para aquelas cepas resistentes a carbapenem, a susceptibilidade dos microrganismos chega a 98,7%, que salvas algumas exceções, é superior a da maioria dos outros antimicrobianos mesmo que apresente pequenas variações dependendo da origem geográfica da cepa. Essa estatística é significativa e útil para demonstrar a eficiência desse antimicrobiano frente ao caso problemático do avanço da multirresistência apresentado anteriormente por Neves *et al.* (2011).

1.2 UM ANTIMICROBIANO DE ÚLTIMA INSTÂNCIA

As polimixinas são uma classe de peptídios antimicrobianos catiônicos (CAP) sintetizadas por várias cepas de bactérias gram-positivas da *Bacillus polymyxa*. Desenvolvem carga positiva pela presença de uma alta porcentagem de ácido L- α,γ -diaminobutírico em sua cadeia, que de modo similar à lisina, possuem pKa próximo de 10,0, justificando a probabilidade de 99,96% dessas moléculas estarem protonadas em ambientes com pH próximo de 7,0 ou inferior (ANDRÉ, LINSE e MULDER, 2007). Elas são decapeptídios contendo tanto L- como D-aminoácidos, formadas por um anel composto por sete peptídios encadeados, ligados a uma cauda tripeptídica (Figura 2). Nessa cauda encontra-se um ácido carboxílico ligado por uma ligação peptídica ao N-terminal da cadeia descrita, garantindo por assim dizer, o caráter anfifílico da molécula.

Esses polipeptídios englobam um conjunto de cinco pequenos grupos classificados como A, B, C, D e E, sendo o último mais conhecido como colistina, uma vez que é sintetizado por uma subespécie da *Bacillus polymyxa*, denominada *colistinus*. Todos os tipos citados guardam entre si uma significativa inter-relação que pode ser confirmada pelo fato de compartilharem a mesma estrutura química a menos de pequenas modificações nos resíduos 3, 6, 7 e na cauda alquílica, como é descrito na Tabela 1 (MENDES e BURDMANN, 2009; STORM, ROSENTHAL e SWANSON, 1977; FALAGAS e KASIAKOU, 2005).

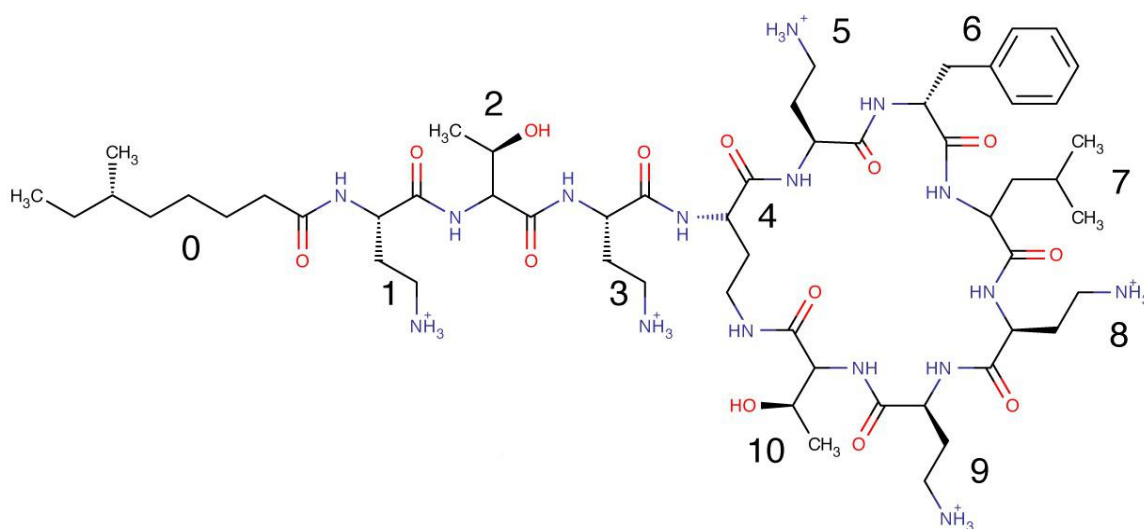


Figura 2. Estrutura química da polimixina B1 em pH neutro ou ácido.

Tabela 1. Descrição das diferenças encontradas entre as polimixinas A, B, D e E. Adaptado de Storm, Rosenthal e Swanson, 1977.

Antibiótico	Resíduos modificados			
	Cauda	3	6	7
Polimixina A (M)	AMO	D-DAB	D-LEU	L-THR
Polimixina B1	AMO	L-DAB	D-PHE	L-LEU
Polimixina B2	AMH	L-DAB	D-PHE	L-LEU
Polimixina D1	AMO	D-SER	D-LEU	L-THR
Polimixina E1 (Colistina A)	AMO	L-DAB	D-LEU	L-LEU
Polimixina E2 (Colistina B)	AMH	L-DAB	D-LEU	L-LEU

Fonte: WILKINSON e LOWE, 1964a, 1964b, 1966; SUZUKI *et al.*, 1965; HAYASHI *et al.*, 1966.

Pela existência de uma similaridade estrutural tão acentuada, não é difícil se verificarem relatos onde a utilização de uma das variantes em algum tratamento médico resultou em desenvolvimento de resistência cruzada para com os outros tipos de polimixina (FALAGAS e KASIAKOU, 2005).

Como já descrito, segundo Gales, Jones e Sader (2006), esses peptídios são altamente eficazes no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas chegando a ser utilizados, com algumas exceções, contra qualquer espécie de bactéria dentro dessa classe. Por outro lado, apenas as polimixinas B e E (Colistina) são utilizadas em tratamentos hospitalares por apresentarem menor agressividade ao nosso organismo em comparação as outras variantes dessa classe de CAP, pois como há de ser com qualquer medicamento, as polimixinas apresentam aspectos de toxicidade ao ser humano, limitando assim sua utilização indiscriminada em tratamentos (MENDES e BURDMANN, 2009). Seus efeitos adversos se concentram principalmente em alterações no sistema renal e neural.

No sistema neural os efeitos colaterais à utilização do antibiótico são descritos como parestesias periféricas e faciais, dificuldade de deglutição, ataxia, ptose palpebral e oftalmoplegia, dentre outros sintomas relacionados a insuficiência respiratória (MENDES e BURDMANN, 2009). Existem, na verdade poucos casos onde foram verificadas tais reações quando da aplicação das polimixinas para tratamento hospitalar. Contudo, Weinstein, Doan e Smith (2009) relatam em um trabalho breve dois casos em que pacientes em estado de saúde delicado desenvolveram parestesia facial após administração intravenosa do antibiótico. Embora pequeno, esse relato evidencia a necessidade de monitoramento do quadro geral dos pacientes em uso do polipeptídio para que possíveis reações adversas possam ser controladas.

No sistema renal há o aparecimento de lesões renais e disfunção renal aguda que pode ser detectada em pacientes pela observação do nível de depuração da creatinina (Creatinine Clearance, CrCl). Segundo Mendes e Burdmann (2009), o mecanismo de formação das lesões renais em pacientes em tratamento está ligado a existência do ácido L- α,γ -diaminobutírico (DAB) nos peptídios e sua ação de permeabilização da membrana citoplasmática, ocasionando perda de conteúdo celular e futura lise. Embora o caso de toxicidade aguda desperte receio na utilização desses peptídios, alguns estudos utilizando a colistina, como o de Falagas *et al.* (2005), demonstraram que nem todos os pacientes tratados com este medicamento desenvolvem o quadro de disfunção renal. De modo geral o seu desenvolvimento depende do quadro de saúde do paciente, do tempo de exposição e da quantidade de medicamento administrada no tratamento. Foi por esse motivo que apenas 14,3% dos pacientes estudados desenvolveram quadros severos relacionados a toxicidade do

antibiótico, enquanto que os outros tiveram respostas muito suaves no que diz respeito a variações no CrCl, chegando a ser considerados como estatística insignificante pelos autores.

De modo geral, os casos de reações adversas são poucos, e sempre reversíveis uma vez suspensa a administração do medicamento nos pacientes. Entretanto, esses poucos casos, juntamente com a agressividade do medicamento e a possibilidade de sua administração ter contribuído para o falecimento de pacientes com saúde frágil fizeram o interesse por esta classe de antimicrobianos diminuir, principalmente em virtude do desenvolvimento de antibióticos com toxicidade inferior (FALAGAS *et al.*, 2005; MENDES e BURDMANN, 2009). Contudo, essa situação logo se reverteu na década de 90 com o advento de microrganismos bacterianos expressando multirresistência aos antibióticos de uso comum (do inglês – *MultiDrug Resistance*, MDR), em especial, a *P. aeruginosa*, como descrito por Andrade *et al.* (2003). Levando em conta seu amplo espectro de ação e eficiência em se tratando da neutralização dos agentes patológicos das infecções, esses biocidas se tornam extremamente úteis como uma barreira de última instância onde os antibióticos usuais já não surtem efeito algum, assim como já descrito no tópico anterior (NEVES *et al.*, 2011; GALES, JONES e SADER, 2006).

Sobre essa perspectiva é que os estudos sobre a utilização das polimixinas foram retomados, buscando auxiliar no entendimento do seu mecanismo de ação e no desenvolvimento de formulações menos agressivas que viabilizassem sua utilização em tratamento de infecções hospitalares. Por exemplo, trabalhos como o de Velkov *et al.* (2010), tentaram descrever o papel de cada parte da estrutura das polimixinas através do relato de ensaios da sua atividade antimicrobiana relacionada com modificações estruturais na carga dos resíduos, no anel e na cauda alquílica. Assim, através das respostas encontradas nas susceptibilidades microbianas aos antibióticos modificados é fácil entender quais resíduos da estrutura são mais importantes e se algumas variações poderiam aperfeiçoar seu papel biocida. Infelizmente, segundo os autores, até o momento os estudos apenas descreveram uma diminuição do seu espectro de ação ou até mesmo a total perda de atividade biológica quando sua composição foi modificada. Mas por outro lado, os resultados foram eficientes em evidenciar dois aspectos principais na atividade antimicrobiana das polimixinas, a saber, a carga do polipeptídeo e o tamanho da cauda hidrofóbica, assim como corroborado pelo trabalho de Storm, Rosenthal e Swanson (1977).

Com esses dois principais aspectos vários trabalhos tentaram esboçar quais as são as etapas que compõem o mecanismo de ação desses antimicrobianos frente às membranas bacterianas. Podem-se citar os trabalhos de Velkov *et al.* (2010), Mendes e Burdmann (2009),

Storm, Rosenthal e Swanson (1977) e Falagas e Kasiakou (2005) como alguns dos muitos que descrevem o mecanismo de ação antimicrobiana das polimixinas pelo mesmo caminho deduzido pelas observações experimentais da ação do biocida quando em contato com as membranas de LPS. Segundo o modelo descrito, a carga positiva adquirida pelo polipeptídio em soluções neutras ou ácidas lhe confere um fator de atração eletrostático para com a membrana de LPS que, por sua vez, é negativamente carregada pela presença dos grupamentos fosfatos na cadeia pertencente ao *core* ou até mesmo aos oligossacarídeos do antígeno-O. A atração serve como instrumento para condução das polimixinas até as células do invasor. Quando na superfície do LPS, o antimicrobiano atua de modo a deslocar os íons Mg^{2+} ou Ca^{2+} , responsáveis pela estruturação da camada de lipopolissacarídeos, e causar uma perturbação na membrana externa que resulta em uma permeabilização da mesma, consequente perda de material citoplasmático e morte celular, como pode ser observado na Figura 3.

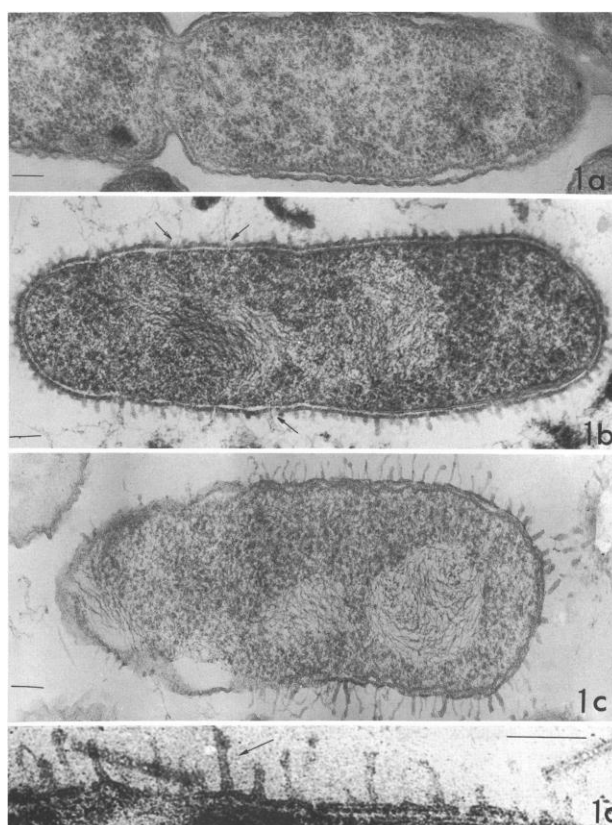


Figura 3: Imagem mostrando seção da célula de uma *P. aeruginosa*. A) bactéria não tratada com antibiótico. B) tratada com Polimixina B. C) tratada com Polimixina E. D) ampliação da imagem B, realçando as estruturas formadas pelo ataque do antimicrobiano à membrana externa da bactéria.
Fonte: KOIKE, IIDA e MATSUO, 2005.

Brandenburg *et al.* (2002) forneceram uma importante contribuição para elucidação do mecanismo já descrito através da avaliação de dados de titulação por calorimetria isotérmica

(ITC) e difração de raios-X, onde foi possível identificar novas etapas de interação entre as polimixinas e o LPS de bactérias Gram-negativas. Segundo o estudo, as interações entre o antimicrobiano e a membrana externa variam com a constituição do LPS, mas seguem em geral duas etapas principais que, em parte combinam com o modelo já descrito, e por outra nos dão um novo significado. De acordo com esses pesquisadores, o antibiótico se liga eletrostaticamente à membrana, assim como já descrito, via um processo exotérmico entalpicamente direcionado. Entretanto, logo após essa interação inicial há uma modificação estrutural na organização da membrana causada por um processo entropicamente dirigido de interação da região hidrofóbica do polipeptídeo com as cadeias alquílicas dos lipídeos. Essa modificação pode ser percebida pela modificação do perfil de difração entre amostras do LPS em ausência e em presença das polimixinas e pela fluidização das cadeias lipídicas dentro da estrutura da bicamada. Esse movimento estrutural também pode estar relacionado com a saída dos íons de estruturação da membrana anteriormente mencionados.

Além da sua atuação eficiente em aniquilar o organismo invasor, as polimixinas ainda têm um papel muito importante, com mecanismo ainda desconhecido, que é o de neutralizar as moléculas de LPS. Essa tarefa impede que essas moléculas possam ser liberadas no corpo do paciente infectado e causar choque séptico. Logo, esse tipo de medicamento é um ótimo indicado para tratar de casos de choque séptico de forma rápida e eficiente (FALAGAS e KASIAKOU, 2005).

Com certeza toda essa descrição experimental detalhada deixa exposto um ótimo esboço do mecanismo de ação da polimixinas sobre as membranas externas bacterianas, entretanto, essa descrição carece de explicação mais detalhada e que chegue até o nível atômico. Em outras palavras, ainda é necessário um nível de detalhamento que explique, por exemplo, o porquê de a polimixinas perder sua atividade antimicrobiana quando há a retirada da cadeia alquílica da estrutura química (caso do nonapeptídeo da polimixina B, PMBN), ou quando há uma substituição química dos seus resíduos constituintes. Melhor ainda, mesmo que seja possível verificar que existe uma modificação estrutural na membrana, como foi mostrado, ainda é necessário entender como exatamente essa modificação se dá, a fim de utilizar essa informação para promover melhoras nos tratamentos hospitalares, desenvolvimento de novos antibióticos mais eficazes e diminuição da toxicidade dos já existentes. Para isso são necessárias novas ferramentas que possam trazer intrinsecamente em sua metodologia o nível de detalhamento que está sendo procurado (BRANDENBURG *et al.*, 2002; STORM, ROSENTHAL e SWANSON, 1977).

1.3 SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS E A DINÂMICA MOLECULAR

As simulações computacionais são uma ferramenta poderosa para interligar teoria e prática, um auxílio para validação de modelos, uma maneira de observar o que não pode ser facilmente quantificado por medidas experimentais e para ultrapassar barreiras impostas seja pela natureza intrínseca de certos fenômenos ou pela limitação instrumental para acessar tais eventos. São, além disso, caminhos para predição do que pode ou não ser efetivamente realizado na realidade, para avaliar respostas sobre problemas muito complexos do ponto de vista analítico ou para promover soluções eficientes diante de problemas onerosos do ponto de vista físico e mental. São, em resumo, uma valiosa ponte entre o mundo micro e o macroscópico, capazes de trazer fundamentos e justificativas tão precisas e corretas acerca de um problema quanto se queira ou se possa investir. Dentre a diversidade de aplicações, algumas podem ser citadas, como por exemplo, o estudo de sistemas sob altas pressões e altas temperaturas, sistemas com muitas partículas (analiticamente inviável), mecânica celeste e avaliação dinâmica de sistemas biológicos (ALLEN, 2004).

Os dois métodos de simulações computacionais mais comumente utilizados na atualidade e que se baseiam em princípios físicos matemáticos robustos são a dinâmica molecular (DM) baseada em modelos determinísticos da natureza, e o Monte Carlo (MC), baseado em modelos estocásticos de eventos onde o desenvolvimento de equações dinâmicas é impraticável. Tais métodos abordam problemas reais por perspectivas diferenciadas, mas, no entanto, podem chegar às mesmas conclusões dependendo do sistema em consideração, do fenômeno investigado e do tempo de simulação (ALLEN, 2004; COUTINHO, 2012). Nesse trabalho, foi utilizado o método de DM, e portanto um modelo determinístico.

O método de DM se originou em meados do século passado com o propósito de avaliar o que nenhuma técnica experimental, até então, poderia fornecer, a dinâmica conformacional pequenas moléculas, e posteriormente de biomoléculas, como proteínas, lipídeos, ou, como se deu inicialmente com Alder e Wainwright e por Rahman entre 1950 e 1960, o estudo de líquidos. Simulações de DM permitem a investigação de várias propriedades dinâmicas dos sistemas, tais como coeficientes de difusão, resposta a perturbações e funções de autocorrelação estrutural dentre uma gama de possibilidades de análise (MELLER, 2001; ALLEN, 2004). Dentro desse método podem ser encontrados diferentes níveis de representação dos graus de liberdade dos sistemas moleculares, possibilitando investigações em diferentes escalas de observação dos fenômenos naturais. São elas, em ordem decrescente de custo computacional: o método de DM de primeiro princípio

(ou quântica) e o método de DM clássica com modelos atomísticos ou *coarse-grain* (Figura 4) (CRETON, NIETO-DRAGHI e PANNACCI, 2013).

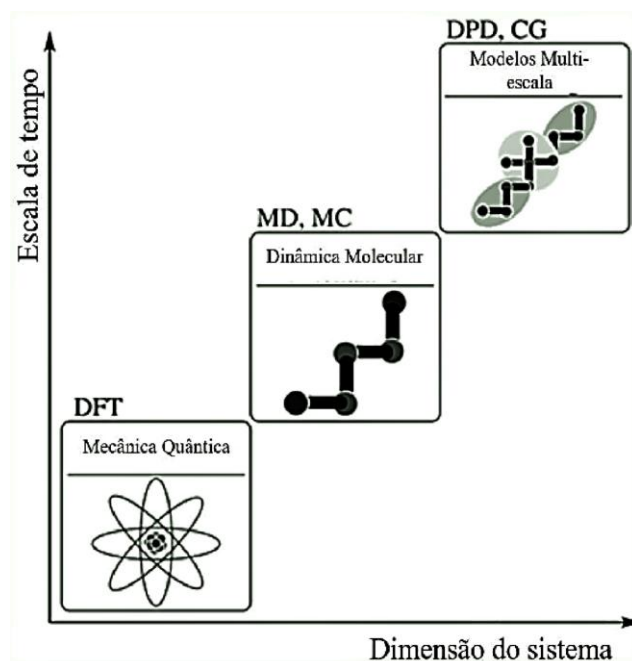


Figura 4. Comparação entre diferentes escalas espacial e temporal amostradas pelo método de simulação de dinâmica molecular com tratamento de partículas por mecânica quântica, mecânica clássica atomística e *coarse-grained*. **Modificação da original em:** CRETON, NIETO-DRAGHI e PANNACCI, 2013.

O método de DM de primeiro princípio, ou quântica, é a implementação computacional de uma metodologia baseada nos cálculos *ab initio*, ou seja, que utilizam apenas a mecânica ondulatória de átomos e moléculas expressa na equação de Erwin Schrödinger e potenciais quânticos para calcular a energia total do sistema e as forças sobre cada átomo, sem inserção de nenhuma medida experimental (caso encontrado nos conhecidos cálculos semi-empíricos) (SCHRÖDINGER, 1926). Segundo Coutinho (2012), atualmente as metodologias de Car-Parrinello e Born-Oppenheimer são as mais consolidadas para estudo desse tipo de dinâmica, não olvidando, entretanto o intenso trabalho de pesquisa nessa área que lhe tem rendido melhoras significativas e o desenvolvimento de novas aproximações que permitem simulações de sistemas em maiores escalas de tempo e dimensão, como no exemplo das metodologias de Car-Parrinello de segunda geração (CAR e PARRINELLO, 1985; KUHNE, 2013).

A Dinâmica Molecular *ab initio* (do inglês *ab initio* Molecular Dynamics, AIMD), hoje, é a mais sofisticada em calcular as configurações acessíveis para as moléculas, porém é a mais custosa computacionalmente. Sua execução demanda um elevado custo computacional relacionado à construção de *clusters* computacionais altamente eficientes e ao longo tempo de

processamento dos cálculos necessários para resolução das equações aplicadas aos sistemas (COUTINHO, 2012; KUHNE, 2013). Essa demanda computacional necessária para sua execução resulta em observações de fenômenos essencialmente quânticos, muito importantes em dimensões próximas da escala atômica. Entretanto, em se tratando de sistemas moleculares (com muitos átomos), esses fenômenos tornam-se progressivamente menos importantes para explicar o que acontece com a matéria, sendo muitas vezes abstraídos em detrimento do desenvolvimento de modelagens mais simples, que embora não levem em consideração os eventos quânticos, são eficientemente capazes de explicar e prever a dinâmica conformacional de moléculas e átomos.

O método de DM clássica é um exemplo dessas modelagens alternativas que descrevem o comportamento das moléculas apenas pelo ponto de vista da mecânica clássica. É, portanto, uma ferramenta potencialmente importante no oneroso estudo da dinâmica de sistemas com muitos átomos, ganhando destaque pela sua simplicidade. Essa metodologia consiste numa solução numérica e discreta para as equações de movimento de Newton resolvidas no tempo, com a utilização de funções potenciais empíricas parametrizadas para reproduzir dados experimentais ou advindos de cálculos mecânico quânticos. Nesse modelo, as moléculas são tratadas como sendo um conjunto de partículas ligadas através dessas funções potenciais, capazes de expressar as principais interações existentes entre os átomos. Através desse conjunto de funções e da estrutura tridimensional do sistema é possível gerar superfície de energia potencial (SEP) total que descreve como a energia do sistema varia em termos das posições e orientações dos átomos e moléculas que o compõem, e dessa forma, fornece a base necessária para a execução dessa metodologia (NAMBA, DA SILVA, DA SILVA, 2008; KUHNE, 2013; ADCOCK e McCAMMOM, 2006). Uma descrição mais aprofundada desse modelo será dada no próximo tópico.

O método de DM com representação *coarse-grain* é uma simplificação da dinâmica anterior. Nessa abordagem, embora as equações e modelos de interações entre os constituintes da molécula sejam similares, as interações são calculadas entre um conjunto de átomos, em vez de para cada átomo. Isso quer dizer que se assume um conjunto de átomos agindo como um elemento único, com propriedades que dependem do conjunto escolhido. Uma consequência direta da utilização dessa metodologia é a perda de informação química detalhada do sistema em função do agrupamento dos átomos. Assim, embora seja possível simular como a estrutura geral do sistema se configura ao longo do tempo, não é possível saber qual átomo do grupamento é responsável por cada interação existente e observada, e como as modificações nesses átomos alterariam a dinâmica do sistema. Entretanto, de acordo

com Maurel *et al.* (2015), a metodologia *coarse-grain* permite alcançar com o mesmo esforço computacional, no que diz respeito a tempo de cálculo e processamento, maiores escalas de tempo de simulação e dimensões físicas para os sistemas estudados, chegando assim a poder descrever eventos naturais que acontecem em escalas de tempo muito difíceis de serem alcançadas pelas outras metodologias.

Em geral, cada metodologia traz consigo benefícios operacionais e perdas relacionadas às simplificações assumidas em cada uma. É preciso para a correta utilização de cada tipo de modelagem verificar quais eventos se deseja observar nas simulações, em que dimensão espacial e escala de tempo eles ocorrem, e se as simplificações atribuídas nas metodologias são compatíveis com o problema desenvolvido. Nesse trabalho, a metodologia utilizada para simular as interações existentes entre os peptídios antimicrobianos, polimixinas, e os diferentes quimiotipos de membrana externa bacteriana de *P. aeruginosa* foi a de dinâmica molecular clássica.

2. METODOLOGIA

2.1 FUNDAMENTAÇÃO METODOLÓGICA

Antes de descrever qual o procedimento computacional utilizado para o desenvolvimento estrutural dos sistemas simulados e para a execução das análises realizadas é preciso discutir propriamente sobre como a DM é realizada, sobre quais bases está fundamentada a pesquisa deste trabalho e quais considerações foram realizadas para que o modelo pudesse ser utilizado. Portanto, segue aqui uma breve descrição dos pontos mais importantes ligados a essa metodologia computacional.

2.1.1 Considerações prévias

Como o próprio termo sugere, e como já mencionado anteriormente, a DM clássica se utiliza da mecânica Newtoniana para descrever e modelar o comportamento das partículas em um sistema sobre investigação. Sobre esse aspecto, várias considerações podem ser levantadas acerca da validade dessa aproximação e sobre os limites de aplicabilidade dessa metodologia.

Um primeiro ponto a ser extraído das considerações realizadas para aplicação da metodologia é que ela é apenas capaz de explicar ou investigar fenômenos cuja natureza são eficientemente bem modelados por funções clássicas de energia e de força. De forma simplificada, nessa modelagem clássica, os átomos são definidos como partículas carregadas, cujas cargas são previamente avaliadas em cálculos mecânico-quânticos e assumidas como constantes durante toda a simulação. Portanto, reações químicas ou mudanças de estado eletrônico são o tipo de informação que não pode ser avaliada pela DM clássica. Existe, atualmente, uma diversidade significativa de metodologias para cálculo de cargas atômicas utilizando diferentes abordagens matemáticas para sua avaliação. No próximo tópico será abordada a metodologia utilizada para avaliação das cargas atômicas aplicadas nesse trabalho (GUADAGNINI, BRUNS e SOUZA, 1996).

As funções são conservativas. Como consequência da fixação de uma carga para cada átomo, como explicitado acima, as funções potenciais utilizadas na DM clássica têm como variáveis apenas as posições dos átomos que compõem o sistema, fazendo com que a energia total do mesmo se conserve em relação ao tempo. Mais detalhes a esse respeito serão salientados no próximo tópico (VAN DER SPOEL *et al.*, 2010; NUSSENZVEIG, 2013).

O terceiro ponto a ser observado diz respeito a possibilidade de se relacionar medidas computacionais efetuadas durante a dinâmica com medidas experimentais transcorridas durante um tempo experimental finito, mas relativamente alto comparado com o tempo de simulação. Não importa o quão rápidas sejam as medidas experimentais, elas não serão capazes de obter resultados de um único evento isolado do sistema sob estudo para que possa ser comparado com uma estrutura gerada nas simulações. Ao contrário disso, é preciso uma coleção de estruturas extraídas da dinâmica para que sua média possa corresponder aos valores experimentais. Portanto, para que seja possível uma comparação direta entre resultados extraídos das metodologias computacionais e dados físicos, é preciso garantir que as simulações sejam longas o bastante para que sua média amostral possa, de forma confiável, responder a realidade observada (VAN DER SPOEL *et al.*, 2010).

Os campos de força são aproximados. Assim como já pode ser avaliado intuitivamente, e será discutido no próximo tópico, os parâmetros utilizados para descrever as interações atômicas entre cada partícula dentro do sistema simulado são ajustados a partir de medidas experimentais de forma a otimizar o poder de previsão do modelo utilizado frente a estas medidas. Disso nascem duas consequências diretas. Primeiramente, os modelos passam a ter validade física, uma vez que foram ajustados sobre dados reais e respondem também com valores na dimensão física das medidas realizadas. Em segundo lugar, considerando os modelos como aproximações e simplificações que tornam os cálculos das simulações viáveis, eles são incapazes de responder a qualquer classe de fenômenos físicos ou químicos de modo indiscriminado, ou seja, cada conjunto de parâmetros sempre vai responder melhor aos dados experimentais sobre os quais foi ajustado. Logo, é evidente que existam uma série de diferentes conjuntos de parâmetros descritos na literatura especializada, cada um com uma aplicação específica que diretamente indica sobre quais dados os modelos foram ajustados (VAN DER SPOEL *et al.*, 2010; NAMBA, DA SILVA E DA SILVA, 2008).

Após essas breves observações, finalmente é possível introduzir os principais tópicos da metodologia do trabalho levando em conta cada uma das aproximações realizadas na aplicação do modelo computacional escolhido e quais as suas limitações inerentes. Existem ainda muito mais considerações que são realizadas na aplicação da Dinâmica Molecular, mas as apresentadas aqui já são suficientes para justificar algumas decisões tomadas ao longo da pesquisa.

2.1.2 O método de dinâmica molecular, as funções potenciais e o campo de força

Como já discutido, na abordagem clássica da DM, a organização e movimentação de cada partícula dentro de um sistema obedece à mecânica Newtoniana, sendo, portanto, descrita pelas Leis de Newton e obedecendo as equações de movimento dessa mecânica vetorial clássica. É possível, nessa abordagem, descrever a evolução temporal do sistema, uma vez definidas a posição das partículas e as forças que agem sobre cada uma delas em cada instante de tempo. Para demonstrar tal proposição é conveniente descrever a posição de cada partícula pertencente ao sistema, como uma função temporal representada através da sua expansão em série de Taylor como mostrado na Equação 1.

$$\vec{r} = \vec{r}_0 + \left. \frac{d\vec{r}}{dt} \right|_0 \Delta t + \frac{1}{2!} \left. \frac{d^2\vec{r}}{dt^2} \right|_0 \Delta t^2 + \frac{1}{3!} \left. \frac{d^3\vec{r}}{dt^3} \right|_0 \Delta t^3 + \dots \quad (1)$$

Evidentemente não é possível implementar um somatório sobre todos os termos dessa série infinita em uma rotina computacional, sendo pois, necessário realizar uma operação de truncamento em algum termo do somatório, uma vez que seja possível aproximar os termos de ordem mais alta por expressões conhecidas. No trabalho de revisão de Adcock e McCammom (2006), os autores descrevem que um truncamento conveniente no termo de segunda ordem do somatório, o relativo ao termo da aceleração de uma partícula, é suficiente para a solução numérica das equações de movimento de Newton, considerando que o somatório dos termos de ordem mais alta se anula. A Equação 1 pode ser então resumida à Equação 2.

$$\vec{r} \cong \vec{r}_0 + \left. \frac{d\vec{r}}{dt} \right|_0 \Delta t + \frac{1}{2} \left. \frac{d^2\vec{r}}{dt^2} \right|_0 \Delta t^2 \quad (2)$$

Embora represente grande praticidade na resolução do problema do somatório infinito, negligenciar os termos com diferenciais de ordem mais alta é uma escolha pouco satisfatória, uma vez que a energia total e o momento linear resultante no sistema sofrem desvios e flutuações ao longo do tempo, não satisfazendo, portanto, a conservação esperada pela terceira lei de Newton. Disso resulta que são necessárias modificações na Equação 2 que permitam sua utilização, mas que efetivamente conservem a energia total e o momento linear

do sistema. Existem numerosas metodologias para realizar tal tarefa, algumas das quais serão sucintamente explicadas no tópico 2.1.11.

Voltando à demonstração, é possível, através da segunda Lei de Newton, descrever a relação entre a força que age sobre as partículas e a posição de cada uma delas no espaço, como representado na Equação 3.

$$\vec{F}_i = \frac{d\vec{p}_i}{dt} = m_i \frac{d\vec{v}}{dt} = m_i \frac{d^2\vec{r}}{dt^2} \quad (3)$$

Em que $\vec{p}_i$ é o momento linear da particular no instante t. Acrescentando, agora as relações descritas na Equação 4 pode-se chegar a Equação 5, que relaciona as principais variáveis envolvidas no cálculo da evolução temporal do sistema.

$$\frac{d\vec{r}_i}{dt} = \vec{v}_i = \vec{v}_{0i} + \frac{d\vec{v}_i}{dt}\Delta t = \vec{v}_{0i} + \frac{\vec{F}_i}{m_i}\Delta t \quad (4)$$

$$\vec{r}_i = \vec{r}_{0i} + \vec{v}_{0i}\Delta t + \frac{1}{2} \frac{\vec{F}_i}{m_i} \bigg|_0 \Delta t^2 \quad (5)$$

Essa equação mostra o que foi introduzido acima. Pode-se calcular a posição e velocidade de cada partícula do sistema ao longo do tempo, uma vez que as posições e velocidades iniciais e forças agindo sobre cada uma delas são conhecidas. O procedimento envolvido no cálculo da posição, velocidade e forças agindo sobre cada partícula compondo um sistema em cada instante de tempo resume o processo conhecido como Dinâmica Molecular clássica. (ADCOCK e McCAMMOM, 2006).

Através do que foi descrito é evidente que torna-se inerentemente necessário à utilização dessa metodologia, ser capaz de calcular as forças intra e intermoleculares atuando em cada componente do sistema a fim de poder descrever a sua evolução temporal. Justifica-se, então o desenvolvimento dos campos de força como ferramenta para a realização desses cálculos. São eles, como conhecidos na área de química computacional, um conjunto de parâmetros e funções que servem para avaliar e quantificar como os átomos ou moléculas interagem entre si dentro de um sistema sobre condições predeterminadas.

A forma funcional dos campos de força utilizados em Dinâmica Molecular, é expressa através do somatório de potenciais conservativos, ou seja, que dependem apenas da posição

dos átomos como já descrito no tópico anterior. Essa classificação conveniente das funções permite introduzir algumas simplificações e propriedades intrínsecas de qualquer função potencial conservativa. Primeiramente, qualquer variação da energia potencial entre duas partículas cuja função que a descreve obedece a essa definição, depende única e exclusivamente dos valores iniciais e finais da função potencial entre essas partículas, não levando em conta o deslocamento espacial sobre o qual foi variada a energia entre elas. Um segundo ponto, muito útil na implementação computacional e numérica da Dinâmica Molecular, é que as forças que atuam sobre cada partícula dentro do sistema podem ser descritas como o vetor oposto ao gradiente da energia potencial total agindo sobre cada partícula, assim como representado na Equação 6.

$$\vec{F} = -\vec{\nabla}V(x,y,z) = -\frac{dV(\vec{r})}{d\vec{r}}\vec{\nabla}\cdot\vec{r} \quad (6)$$

A partir dessa última consideração, então, a necessidade da metodologia utilizada, que é o cálculo das forças agindo sobre cada partícula, recai agora sobre a necessidade de descrever a energia potencial total agindo sobre cada uma delas em cada instante da dinâmica. É necessário, pois, entender qual o formato da função potencial que descreve o sistema, de quais termos ela depende e quais parâmetros são necessários para sua utilização.

Existem diversas propostas para esses questionamentos na forma funcional dos campos de força já desenvolvidos e testados. Alguns exemplos a serem citados são os campos de força AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*) desenvolvido para simulação de ácidos nucleicos e proteínas, OPLS (*Optimized Potential for Liquid Simulations*) desenvolvido para simulação de proteínas, mas com parâmetros baseados em simulações de líquidos orgânicos, como o próprio nome sugere. CHARMM (*Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics*) desenvolvido sobre as bases de potenciais empíricos para reproduzir propriedades estruturais e dinâmicas de moléculas isoladas, em solução e em sólidos cristalinos, e GROMOS (*Groningen Molecular Simulation*) desenvolvido para reproduzir propriedades de líquidos puros e as entalpias de solvatação de diferentes moléculas em solução (WEINER *et al.*, 1984; JORGENSEN e TIRADO-RIVES, 1988; BROOKS *et al.*, 1983; VAN GUNSTEREN e BERENDSEN, 1987). Além de muitos outros campos de força que continuam a ser desenvolvidos para aplicações em diferentes sistemas que vão além da interface biológica e são aplicados para sistemas mais específicos, como por exemplo, o COMPASS (*Condensed-phase Optimized Molecular Potentials for Atomistic Simulation*

Studies) desenvolvido para estudar a dinâmica de pequenas moléculas inorgânicas em fase condensada, e o TraPPE (*Transferable Potentials for Phase Equilibria*) e o SKS (abreviação para Smit, Karaborni e Siepmann, autores do trabalho) aplicados para o estudo do equilíbrio líquido-vapor de moléculas de n-alcenos (SUN, 1998; YANG *et al.*, 2000; MARTIN e SIEPMANN, 1998; SMIT, KARABONI e SIEPMANN, 1994).

Cada um deles é modelado sobre as bases de diferentes filosofias e parametrizado de modo a melhor compreender os fenômenos físicos e químicos observados em sistemas moleculares de interesse. Por isso, é importante escolher bem qual deles aplicar para a modelagem do sistema em estudo, considerando a forma com a qual seus parâmetros tenham sido obtidos e com que acurácia eles reproduzem tendências experimentais (COUTINHO, 2012; NAMBA, DA SILVA e DA SILVA, 2008).

Nesse trabalho foi utilizado o campo de força GROMOS para modelar o comportamento do sistema em estudo (VAN GUNSTEREN e BERENDSEN, 1987; VAN GUNSTEREN *et al.*, 1996). Esse campo de força tem sofrido ao longo dos anos várias contribuições que o integram a um contínuo trabalho de parametrizações, validações e extensões, assim como pode ser visto nos trabalhos de Oostenbrink *et al.* (2004, 2005), Lins e Hunenberger (2005), Soares *et al.* (2005), Pontes *et al.* (2012) e Pol-Fachin *et al.* (2012). Um destaque de sua metodologia é a utilização da filosofia *united atom* (do inglês – átomos unidos), referente ao fato de que alguns átomos são tratados implicitamente como parte de outros grupos que passam a ser chamados de pseudo-átomos. Esse detalhe, que é em geral aplicado aos hidrogênios alifáticos, reduz o tempo de cálculo para cada passo de simulação, como consequência do menor número de átomos no sistema, sem que seja perdida uma quantidade significativa de informação útil da simulação, assim como afirmado por Kukol (2009), que estima a redução do número de átomos em lipídeos chegando 60%. É uma aproximação útil e válida para campos de força que direcionam o foco de seus estudos para as interações intermoleculares muito mais do que para as intramoleculares. Ou seja, quando os movimentos relacionados às interações entre moléculas são mais importantes que os movimentos dentro das próprias moléculas (SCHULER, DAURA e VAN GUNSTEREN, 2001; DAURA, MARK e VAN GUNSTEREN, 1998). Não por acaso, a escolha desse campo de força para estudo das membranas lipídicas se deu por conta do intenso trabalho de parametrização dessas estruturas como pode ser verificado nos trabalhos de Chandrasekhar *et al.* (2003) e Poger, Van Gunsteren e Mark (2009).

As funções que englobam esse campo de força, assim como em muitos outros, são tipicamente divididas entre potenciais envolvendo átomos ligados quimicamente e potenciais

de interações entre átomos que não apresentam essa conexão, assim como pode ser visto na Equação 7 (COUTINHO, 2012; NAMBA, DA SILVA E DA SILVA, 2008). Como a energia potencial é uma grandeza escalar, a soma de todos esses potenciais em relação a cada partícula do sistema configura a descrição necessária para utilização da Equação 6 e desenvolvimento da evolução temporal do sistema através da Dinâmica Molecular.

$$V(\vec{r}) = V(\vec{r})_{lig} + V(\vec{r})_{ang} + V(\vec{r})_{tors} + V(\vec{r})_{v/w} + V(\vec{r})_{elet} \quad (7)$$

Em que cada termo do somatório representa uma função potencial conservativa, assim como descrito no trabalho de Oostenbrink *et al.* (2004) para o campo de força GROMOS e verificado nos tópicos em sequência, com auxílio da Figura 5 onde é esquematizado um segmento de uma cadeia de átomos ligados covalentemente.

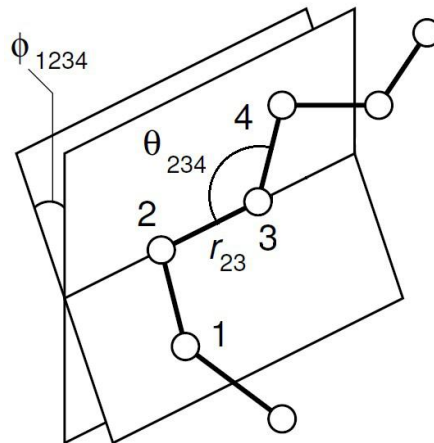


Figura 5. Exemplo de conexão entre os átomos de uma cadeia. **Modificação da original em:** ALLEN, 2004.

2.1.3 O potencial de estiramento

Esse potencial, Equação 8, descreve a vibração em torno da ligação covalente estabelecida entre duas partículas, assim como verificado entre 1-2, 2-3 e 3-4, ou como demarcado pelo símbolo r_{23} , no caso da ligação entre 2-3, na Figura 5.

$$V_{lig}(b; K_b, b_0) = \frac{1}{4} K_b (b^2 - b_0^2)^2 \quad (8)$$

Em que o símbolo “ ; ” separa a variável independente, b , dos parâmetros K_b e b_0 . O valor de “ b ” descreve a distância entre as partículas conectadas em cada instante da simulação. Este termo é obtido vetorialmente como a norma do vetor que liga as duas partículas, Equação 9.

$$b = \|\vec{r}_{ij}\| = \sqrt{\vec{r}_{ij} \cdot \vec{r}_{ij}} \quad , \vec{r}_{ij} = \vec{r}_j - \vec{r}_i \quad (9)$$

O parâmetro K_b descreve o quão forte é a ligação e quão rápidas são as vibrações em torno do valor de equilíbrio b_0 . Esses parâmetros, assim como os que se apresentam nos demais potenciais, são intrinsecamente dependentes dos tipos de átomos envolvidos e da natureza da interação sendo descrita. O tipo dos átomos (do inglês – *atom type*), por sua vez, se refere a como é classificado um conjunto de átomos com propriedades físicas e químicas similares o bastante para que eles sejam dados como iguais em moléculas diferentes, são diferenciados pelo tipo e geometria de suas ligações e pelo ambiente químico em que se apresentam. A característica das suas interações diz respeito à função química que esses átomos desempenham, por exemplo, se são íons ou se estão envolvidos na formação de ligações de hidrogênio. Essas definições são parte integrante dos campos de força já citados, sendo diferentes para cada um deles em função das diferentes metodologias de parametrização. Os parâmetros apresentados podem ser obtidos através de estudos quânticos de modos vibracionais dessa ligação, ou por dados experimentais. No caso do campo de força escolhido, o valor de K_b é advindo de dados espectroscópicos, enquanto que o valor de equilíbrio para a ligação é extraído de difração de raio-X (VAN GUNSTEREN e KARPLUS, 1987; GURSKAYA, 1968).

Um último ponto a ser considerado sobre esse potencial é o fato dele não ser um potencial harmônico como o utilizado nos demais campos de força. Segundo Oostenbrink *et al.* (2004), essa modificação serve para que reduzir o custo computacional do cálculo de energias e forças entre as partículas por não mais precisar contabilizar raízes quadradas dos vetores posição.

2.1.4 O potencial de ângulo de ligação covalente

Esse potencial descreve a vibração angular das moléculas em torno de uma estrutura estável ditada pela geometria e hibridização dos átomos, Equação 10. Pode ser verificada na Figura 5 como o potencial formado pela oscilação dos ângulos calculados entre as partículas 1-2-3 e 2-3-4, assim como exemplificado pelo ângulo θ_{234} .

$$V_{ang}(\theta; K_\theta, \theta_0) = \frac{1}{2} K_\theta (\cos(\theta) - \cos(\theta_0))^2 \quad (10)$$

Em que K_θ e θ_0 , assim como, no exemplo anterior, são obtidos experimentalmente por medidas espectroscópicas e de difração de raios-X (VAN GUNSTEREN e KARPLUS, 1987; GURSKAYA, 1968). O valor do cosseno do ângulo θ é medido, também durante a simulação através da seguinte expressão vetorial, Equação 11.

$$\cos\theta_{ijk} = \frac{\vec{r}_{ji} \cdot \vec{r}_{jk}}{\|\vec{r}_{ji}\| \|\vec{r}_{jk}\|} \quad (11)$$

Da mesma forma que na descrição do potencial anterior, pode-se observar que a função potencial descrita na Equação 10 não se trata de uma função harmônica em θ , como em boa parte dos outros campos de força existentes, mas harmônica no cosseno de θ . Essa escolha também se dá por razões de simplificação computacional. Nesse caso, para diminuir o custo de cálculo que se daria sobre o arco-cosseno dos ângulos dados na Equação 11 (OOSTENBRINK *et al.*, 2004).

2.1.5 O potencial de torção

Assim como no caso anterior, o formato funcional desse potencial segue uma descrição trigonométrica como pode ser verificado na Equação 12.

$$V_{tors}(\theta; \delta, M, K_\varphi) = \sum K_\varphi (1 + \cos(\delta) \cos(M\theta)) \quad (12)$$

Nessa equação, o termo δ é a constante de fase do potencial, enquanto os termos M e θ são respectivamente a multiplicidade e o ângulo definido entre os dois planos descritos pelos átomos i-j-k e j-k-l, assim como exemplificado na Figura 5 como o ângulo entre os planos formados pelos átomos 1-2-3 e 2-3-4. A utilização do somatório como parte da definição desse potencial se deve ao fato de ser necessário utilizar mais de uma função senoidal para corretamente descrever o perfil torcional dos diversos grupos funcionais parametrizados nos campos de força.

O valor do ângulo torcional descrito entre os planos mostrados na Figura 5 pode ser calculado através da Equação 13.

$$\theta = \sin(\theta) \arccos \left(\frac{\vec{r}_{mj} \cdot \vec{r}_{qk}}{\|\vec{r}_{mj}\| \|\vec{r}_{qk}\|} \right) \quad (13)$$

Onde $\vec{r}_{mj}$ e $\vec{r}_{qk}$ são os vetores normais aos planos definidos pelos átomos i-j-k e j-k-l, calculados através do produto vetorial, “ $\wedge$ ”, entre $\vec{r}_{ij}$ e $\vec{r}_{jk}$, e $\vec{r}_{jk}$ e $\vec{r}_{kl}$ respectivamente, como mostrado na Equação 14.

$$\vec{r}_{mj} = \vec{r}_{ij} \wedge \vec{r}_{jk}; \quad \vec{r}_{qk} = \vec{r}_{jk} \wedge \vec{r}_{kl}; \quad \sin(\theta) = \frac{\vec{r}_{ij} \cdot \vec{r}_{qk}}{|\vec{r}_{ij} \cdot \vec{r}_{qk}|} \quad (14)$$

Os parâmetros da Equação 12 foram definidos de modo a melhor ajustar o perfil energético descrito pelo ângulo torcional entre os átomos quando analisados por métodos quânticos. Entretanto, da forma como foi definida no GROMOS, o perfil torcional, tal como descrito, precisa dos potenciais de interação do tipo 1-4 entre átomos não ligados para ser corretamente descrita (OOSTENBRINK *et al.*, 2004). Uma melhor descrição dessa interação será dada no próximo tópico.

A partir da versão GROMOS54A7 (SCHMID *et al.*, 2011), também utilizada nesse trabalho, uma correção a esse potencial foi introduzida devido ao relato de alguns trabalhos como o de Hu, Elstner e Hermans (2003), onde foram verificados problemas em vários campos de força no que tange a correta descrição dos ângulos φ e ψ nos gráficos de Ramachandran, caracterizados mais à frente no tópico 2.3.5. Para corrigir o problema, várias abordagens foram desenvolvidas, e dentre elas destaca-se o trabalho de Cao *et al.* (2009),

onde foi introduzido a esse potencial um termo cruzado, de modo a corrigir o problema, Equação 15.

$$\begin{aligned}
 V_{tors}(\varphi, \psi; K_{\varphi+\psi}, M_{\varphi+\psi}, \delta_{\varphi+\psi}, K_{\varphi}, K_{\psi}, M_{\varphi}, M_{\psi}, \delta_{\varphi}, \delta_{\psi}) \\
 = \sum K_{\varphi} (1 + \cos(M_{\varphi}\varphi + \delta_{\varphi})) + \sum K_{\psi} (1 + \cos(M_{\psi}\psi + \delta_{\psi})) \\
 + \sum K_{\varphi+\psi} (1 + \cos(M_{\varphi+\psi}(\varphi + \psi) + \delta_{\varphi+\psi})) \quad (15)
 \end{aligned}$$

Onde φ e ψ são os ângulos torcionais relacionados à estrutura da cadeia principal de polipeptídios definidos entre os átomos H-N-C α -R e O-C-C α -R, sendo R o substituinte da cadeia lateral.

2.1.6 Potenciais de restrição para o ângulo de torção

Segundo van der Spoel *et al.* (2010), os potenciais de restrição são responsáveis por limitar os movimentos de partículas, impedir oscilações vigorosas ou introduzir na estrutura das moléculas simuladas conhecimentos experimentais em situações cujos os termos já descritos não são suficientes. No GROMOS são definidos como padrão dois tipos de restrição, são casos onde é necessário descrever grupos planos em que existe ressonância, como por exemplo, nas ligações peptídicas entre aminoácidos ou em resíduos contendo anel benzênico, como fenilalanina, e casos onde é preciso manter a estrutura tetraédrica para carbonos ligados explicitamente a apenas três átomos. A função potencial utilizada para tal finalidade pode ser encontrada na Equação 16.

$$V_{rest}(\xi; K_{\xi}, \xi_0) = \frac{1}{2} K_{\xi} (\xi - \xi_0)^2 \quad (16)$$

Em que o ângulo ξ é definido da mesma forma que o ângulo θ na Equação 13 e K_{ξ} é o parâmetro que modela a intensidade da restrição. Os valores para essas constantes podem ser encontradas no trabalho de van Gunsteren e Berendsen (1987) e Oostenbrink *et al.* (2004).

2.1.7 O potencial de van der Waals

Assim como descrito brevemente por Kendall e Roberts (2015), em 1873, a fim de explicar a incompressibilidade e a condensação de gases, van der Waals, no desenvolvimento de sua equação cúbica de estado, postulou que deveriam existir forças de atração entre os átomos, não relacionadas a ligações covalentes ou cargas. Posteriormente, essa força foi descrita, por alguns pesquisadores, através de diversas funções potenciais que conseguiam satisfatoriamente transcrever as observações de van der Waals. Entre os potenciais desenvolvidos, destaca-se o descrito por Jones (1924), também conhecido como potencial de Lennard-Jones (12/6), desenvolvido para explicar propriedades de átomos inertes como o argônio.

Segundo Oostenbrink *et al.* (2004), foi implementado no GROMOS uma versão do potencial de Lennard-Jones dada pela Equação 17.

$$V_{v/w}(\vec{r}_{ij}; C12_{ij}, C6_{ij}) = \left[\frac{C12_{ij}}{(\|\vec{r}_{ij}\|)^{12}} - \frac{C6_{ij}}{(\|\vec{r}_{ij}\|)^6} \right] \quad (17)$$

Em que r_{ij} é definido como na Equação 9, e $C12_{ij}$ e $C6_{ij}$ são parâmetros que descrevem as interações entre os átomos i e j , e que dependem dos tipos desses átomos e da característica da sua interação. Uma vez realizada a correta definição dos átomos, os termos $C12_{ij}$ e $C6_{ij}$ de interação entre eles podem ser encontrados através de regras de combinação dadas pelas médias geométricas dos parâmetros definidos para cada tipo de átomo descrito no campo de força, assim como mostrado através da Equação 18.

$$C12_{ij} = \sqrt{C12_{ii} \cdot C12_{jj}} \quad C6_{ij} = \sqrt{C6_{ii} \cdot C6_{jj}} \quad (18)$$

Segundo van der Spoel *et al.* (2010), átomos com até duas ligações de distância não necessitam ser modelados pelo potencial de van der Waals, pois as interações entre eles são adequadamente descritas pelos potenciais de ligação e ângulo já detalhados. Suas interações de van der Waals são, portanto, excluídas e esses átomos são chamados de exclusões uns dos outros. Uma descrição mais ampla de todas as definições de átomos, dos parâmetros $C12_{ij}$ e $C6_{ij}$ e de outros tipos de exclusão pode ser encontrada no trabalho de van Gunsteren e Berendsen (1987), van der Spoel *et al.* (2010) e Oostenbrink *et al.* (2004).

2.1.8 O potencial de interação eletrostática

Com certeza uma das interações mais relevantes compondo o somatório de energias potenciais de qualquer campo de força é o potencial eletrostático, Equação 19.

$$V_{elet}^{ij}(\vec{r}_{ij}, q_i, q_j; \epsilon_r, f) = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r\|\vec{r}_{ij}\|} = f \frac{q_i q_j}{\epsilon_r\|\vec{r}_{ij}\|} \quad (19)$$

Nessa equação q_i e q_j são as cargas dos átomos que estão interagindo, ϵ_0 é a permissividade elétrica do vácuo e ϵ_r é a permissividade relativa do meio em que os átomos se encontram em relação ao seu valor quando no vácuo (OOSTENBRINK *et al.*, 2004). Por vezes pode-se simplificar a expressão introduzindo a constante f dada pelo inverso de $4\pi\epsilon_0$, como pode ser visto acima.

Embora essa seja uma equação simples, o custo computacional referente ao cálculo do potencial eletrostático para o sistema inteiro escala com o número de partículas ao quadrado, N^2 . Esse custo é consideravelmente maior que no caso dos outros potenciais, exceto para o potencial de van der Waals, que tem a mesma escala. Para corrigir esse problema e tentar otimizar o tempo de processamento de cálculo algumas abordagens podem ser encontradas. Entre elas estão, o uso de máquinas mais eficientes (utilização de placas GPU para efetuar as simulações), o aumento do intervalo de integração das equações de movimento (restringindo os modos vibracionais de osciladores muito rápidos, como átomos de hidrogênio) ou diminuindo o número de partículas sobre as quais será levado em conta o processo de cálculo.

Dessa última metodologia decorrem modificações importantes nas funções potenciais utilizadas. Para diminuir o número de partículas com as quais um átomo de interesse está a interagir é necessária a utilização de um raio de corte (do inglês - *cutoff*) acima do qual as contribuições dessas partículas não serão mais contabilizadas. É uma metodologia eficiente em otimizar o tempo de processamento, mas perde informação significativa acerca das interações que o átomo de interesse realiza.

Para então permitir o uso do raio de corte, mas mantendo de certa forma as interações realizadas entre um átomo de interesse e aqueles que estão a sua volta, são introduzidas à Equação 19 termos adicionais. Esses termos serão tratados mais adiante nos tópicos 2.1.16 e 2.1.17, através das metodologias de tratamento eletrostático de longa distância.

Com a finalidade de descrever brevemente alguns detalhes acerca de como funciona o processo de parametrização das cargas para sua posterior utilização na Equação 19, segue um tópico detalhado.

2.1.9 As cargas atômicas

Em princípio, cargas atômicas pontuais, como as utilizadas nessa metodologia, não são grandezas observáveis em sistemas reais, pois não podem ser extraídas diretamente de medidas experimentais (DUPRADEAU *et al.*, 2010). Porém, a densidade eletrônica que permeia os átomos pode ser observada e calculada através de experimentos de difração de raio-X. São medidas extraídas de mapas de densidade eletrônica desenvolvidos através da transformada inversa de Fourier dos fatores de forma dos padrões de difração. Segundo Coppens (1989), essas medidas, embora não possam descrever as funções de onda dos átomos, são uma base consistente na validação de modelos teóricos que possam realizar essa função. Um exemplo bem sucedido de tal aplicação é o trabalho de Krijn e Feil (1988), onde medidas de difração de raio-X foram utilizadas a fim de validar a metodologia melhorada do funcional da densidade através do cálculo de densidade eletrônica média levando em conta os modos vibracionais dos átomos em um cristal. E analogamente, outras metodologias *ab initio* são também validadas como no trabalho de Genoni *et al.* (2017).

Através da validação de metodologias teóricas próprias para cálculo de densidade eletrônica em moléculas ou funções de onda moleculares, é possível calcular, enfim, parâmetros de interação eletrostática, representados através das cargas pontuais utilizadas no modelo clássico de DM. Entretanto, segundo Guadagnini, Bruns e Souza (1996), não há apenas um método para calcular as cargas atômicas, pois uma diversidade de abordagens matemáticas já foi, e continua a ser desenvolvida para alcançar essa finalidade. Não obstante esse intenso desenvolvimento, uma vez que cargas pontuais não são medidas reais e não podem ser diretamente comparadas com nenhum experimento, cada metodologia desenvolvida pode gerar valores arbitrários que, embora diferentes, reproduzam as mesmas propriedades observáveis. É preciso, portanto, realizar testes e verificar qual metodologia melhor se aplica ao sistema sendo estudado, além de avaliar sua eficiência em termos de custo computacional para realizar a avaliação das cargas. O cálculo de cargas utilizando avaliação de potencial eletrostático se mostra capaz de reproduzir propriedades moleculares de interesse como, por exemplo, dipolo elétrico e o próprio potencial eletrostático, que são altamente relevantes para a metodologia de DM clássica, uma vez que as interações intermoleculares

são a principal via de análise dessa metodologia. A metodologia para cálculo das cargas utilizadas nesse trabalho foi baseada nos cálculos de potencial eletrostático (ESP) (equações 20-23).

A primeira equação fornece a densidade eletrônica de uma molécula descrita por funções de onda aproximadas por orbitais.

$$\rho(\vec{r}) = \sum_{i=1}^K \sum_{j=1}^K P_{ij} X_i(\vec{r}) X_j(\vec{r}) \quad (20)$$

Em que K é o número de orbitais atômicos formando os orbitais moleculares que aproximam a função de onda, X_i é a função do i-ésimo orbital atômico calculado em $\vec{r}$ e P_{ij} são os elementos da matriz de densidade calculados através da Equação 21. Nessa equação, C_{im} são os coeficientes utilizados na combinação linear dos orbitais e calculados pela metodologia Hartree-Fock (GUADAGNINI, BRUNS e SOUZA, 1996).

$$P_{ij} = 2 \sum_{m=1}^{N/2} C_{im} C_{jm} \quad (21)$$

O potencial eletrostático devido às cargas dos núcleos fixos e da densidade eletrônica, $\rho(\vec{r})$, pode ser descrito assim como mostrado na seguinte equação.

$$V^q(\vec{r}_p) = \sum_{i=1}^M \frac{Z_i}{\|\vec{r}_p - \vec{R}_i\|} - \int \frac{\rho(\vec{r})}{\|\vec{r}_p - \vec{r}\|} d\vec{r} \quad (22)$$

Em que Z_i é a carga do núcleo de cada um dos M átomos compondo a molécula e posicionados no espaço em $\vec{R}_i$. A posição da carga de prova, ou da grade desenvolvida para obtenção dos pontos com os valores de potencial é dada por $\vec{r}_p$. Nessa equação, o primeiro termo é responsável pela contribuição repulsiva entre cargas positivas dos núcleos e a carga de prova, enquanto que o segundo termo é o que contribui com o potencial atrativo desenvolvido pela densidade eletrônica da molécula (GUADAGNINI, BRUNS e SOUZA, 1996).

Uma vez calculado o potencial eletrostático, $V^q(\vec{r}_p)$, numa grade de pontos, pode-se ajustar os valores das cargas pontuais atômicas igualando o potencial já calculado com um gerado por considerações clássicas assim como mostrado na Equação 23.

$$V^c(\vec{r}_p) = \sum_{i=1}^L \frac{q_i}{\vec{r}_p} \quad (23)$$

Em que q_i é a carga do i -ésimo átomo compondo a molécula para qual estão sendo calculadas as cargas. Através da comparação entre os dois tipos de potencial, e por um algoritmo melhorado de ajuste dessas funções utilizando restrição nos valores das cargas, assim como descrito no desenvolvimento da metodologia RESP (do inglês *restrained electrostatic potential*), é possível obter as cargas pontuais que melhor reproduzem o potencial eletrostático na vizinhança da molécula, assim como descrito por Bayly *et al.* (1993).

Felizmente, as cargas para os resíduos compondo as moléculas em estudo já foram descritas. As cargas para os resíduos pertencentes a molécula de polimixina foram extraídas dos campo de força GROMOS54A7, enquanto que a carga das caudas alquílicas dos lipídeos foram extraídas dos parâmetros GROMOS53A6 (SCHMID *et al.*, 2011; OOSTENBRINK *et al.*, 2004, 2005). As cargas atômicas para os carboidratos foram igualmente extraídas do GROMOS 54A7, onde foi utilizado o software NWChem versão 4.1 (VALIEV *et al.* 2010), com implementação da metodologia RESP, já citada, teoria Hatree-Fock e base 6-31G*, para obtenção dos orbitais atômicos (LINS e HUNENBERGER, 2005; POL-FACHIN *et al.*, 2012). Essas cargas podem ser visualizadas nas Tabelas A1.1 e A1.2 do Apêndice 1.

2.1.10 Método de minimização (*Steepest Descent*)

Após toda a parametrização previamente descrita, chega à vez mais um dos passos necessários para se efetuar um estudo de Dinâmica Molecular em um sistema de interesse. Não por acaso, sempre antes da dinâmica de fato, é necessária a busca por estruturas do sistema que tenham sido energeticamente minimizadas, quer dizer, estruturas que estejam em um mínimo da superfície de energia potencial do sistema (SEP), a fim de que a simulação se inicie de uma configuração estável (ADCOCK e McCAMMOM, 2006).

Estruturas minimizadas energeticamente são uma informação complementar às estruturas geradas durante a dinâmica e podem fornecer a estrutura média em volta da qual as flutuações ocorrem. Desse modo, a geração de estruturas minimizadas pode auxiliar no trabalho de entender que está acontecendo com o sistema ao longo da simulação.

Existem diversas metodologias desenvolvidas com a finalidade de minimizar energeticamente as estruturas dos sistemas simulados. Nesse trabalho foi aplicada uma das mais simples, contudo, eficiente. A metodologia *Steepest Descent* é uma abordagem matemática que se utiliza das propriedades do gradiente da função de energia potencial que descreve o sistema, com a finalidade de encontrar valores mínimos dessa função e que refletem uma organização estruturalmente estável do conjunto de partículas estudado (VAN DER SPOEL *et al.*, 2010; ADCOCK e McCAMMOM, 2006).

Lembrando da Equação 6, o processo de minimização descrito nessa metodologia pode ser resumido nas seguintes equações.

$$\varphi(t) = f(\vec{r}_n - t\vec{\nabla}V_n) \quad (24)$$

Em que φ é uma função do passo que será dado em direção ao mínimo de energia, $\vec{r}_n$ é a posição espacial dos átomos no ciclo n e V_n é o potencial total dessa configuração. Derivando essa expressão e igualando a zero pode-se chegar no valor t do passo que será dado para minimizar a energia do sistema. A posição espacial de cada partícula no conjunto pode ser, então, recalculada pela Equação 25.

$$\vec{r}_{n+1} = \vec{r}_n - t\vec{\nabla}V_n = \vec{r}_n + t\vec{F}_{tot} \quad (25)$$

Assim, calculando a força que age em cada partícula no sistema é possível progressivamente caminhar em direção ao mínimo de energia, onde a força resultante sobre as partículas se aproxima de zero. Esse, portanto, é um dos critérios de parada do método, um limite para a magnitude da força resultante sobre as partículas acima do qual o processo continua até encontrar uma configuração tão estável quanto se deseje (VAN DER SPOEL *et al.*, 2010).

2.1.11 Algoritmo de dinâmica (*Leap Frog*)

Uma vez realizada a minimização de energia na estrutura inicial do sistema, pode-se então iniciar a dinâmica Newtoniana através das equações 4, 5 e 6. Entretanto, como foi evidenciado no tópico 2.1.2, são necessárias algumas modificações nas equações de modo a poder implementá-las computacionalmente. Uma das abordagens mais simples é a utilização de algoritmos baseados em diferenças finitas para realizar a integração das equações diferenciais de segunda ordem que regem o movimento das partículas na Dinâmica Clássica. Um dos algoritmos mais famosos para realizar tal tarefa é o algoritmo de Verlet, onde são as posições das partículas em um instante qualquer da simulação depende da posição no instante anterior e das forças que nele estava agindo, assim como pode ser verificado na Equação 26.

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) - \vec{r}(t - \Delta t) + \frac{\vec{F}(t)}{m} \Delta t^2 \quad (26)$$

Embora eficiente em gerar a trajetória das partículas ao longo do tempo de simulação, essa abordagem entra em falta com a avaliação das suas energias cinéticas ao longo da simulação. Como a velocidade das partículas não entra na equação, mesmo podendo ser estimada pela Equação 27, não há um controle da energia cinética do sistema (ALLEN e TILDESLEY, 1987).

$$\vec{v}(t) = \frac{\vec{r}(t + \Delta t) - \vec{r}(t - \Delta t)}{2\Delta t} \quad (27)$$

Uma variante do algoritmo de Verlet e que visa resolver esse problema é o algoritmo *Leap-Frog*, cujas equações são mostradas abaixo.

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) \Delta t \quad (28)$$

$$\vec{v}\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \vec{v}\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{\vec{F}(t)}{m} \Delta t \quad (29)$$

Através dessas equações pode-se, agora, levar a velocidade das partículas do sistema em consideração durante o cálculo das suas posições ao longo do tempo de simulação, além

de corretamente calcular a energia cinética do sistema. O único ponto desfavorável à utilização dessa metodologia é que o cálculo da energia cinética e potencial do sistema não está sincronizado, de modo que elas são calculadas em instantes diferentes de tempo, e dessa forma a energia mecânica total não pode efetivamente ser calculada em cada momento da simulação. Outros algoritmos mais elaborados foram, então, desenvolvidos para melhorar a abordagem matemática da integração das equações de movimento. Maiores detalhamentos podem ser encontrados nos trabalhos de Adcock e McCammom (2006), van der Spoel *et al.* (2010) e Allen e Tildesley (1987).

2.1.12 Condições Periódicas de Contorno

O desenvolvimento de estudos com sistemas finitos sempre trouxe a diversas áreas de pesquisa científica um problema comumente conhecido como efeito de borda. Efeito causador de modificações sensíveis nas propriedades físicas, químicas e biológicas nos contornos de qualquer material e alvo de intensos trabalhos de investigação e modelagem como os de Jiang, Bouret, e Kindt (2004) e West *et al.* (2013) que estudaram esse efeito em simulações de bicamadas lipídicas.

Segundo Adcock e McCammom (2006) e van der Spoel *et al.* (2010), em simulações de DM é de prática comum a utilização de condições periódicas de contorno (do inglês, *Periodic Boundary Conditions*, PBC) para minimizar os artefatos causados pela simulação do sistema isolado (sem PBC) onde se verificam os problemas de efeito de borda. Nessa metodologia o sistema em estudo é replicado em todas as direções de modo a simular um ambiente com dimensões ilimitadas. É de fundamental importância esclarecer que essa aproximação não resolve a essência do problema, retratado na questão principal da existência de fronteiras, mas que o transmite para os artefatos causados pela presença de condições periódicas em sistemas que não apresentam essa condição. Entretanto, segundo van der Spoel *et al.* (2010), esses artefatos são menos severos que os primeiros, justificando sua aplicação.

No GROMACS, a metodologia de condições periódicas de contorno é utilizada nos potenciais ligados e não ligados de curto alcance conjuntamente com a convenção da imagem mínima (do inglês, *minimum image convention*) que garante que nenhum deles é contabilizado mais que uma única vez, em virtude de que apenas a réplica mais próxima de cada partícula é utilizada nos cálculos. Contudo, para a avaliação dos potenciais não ligados de longo alcance, interação eletrostática, são necessários métodos de soma em rede (do inglês, *lattice sum methods*), ou derivados, que serão discutidos no tópico 2.1.16 e 2.1.17.

2.1.13 *Ensembles* Termodinâmicos

Embora com a descrição das metodologias para avaliar a evolução temporal do sistema através das integrações das equações de movimento, a DM ainda não se faz completa. Os sistemas reais, alvo da dinâmica, estão sempre definidos dentro de condições termodinâmicas específicas, e como tal, devem estar também os sistemas simulados através dessa abordagem. Para tal configuração, algumas variáveis importantes do sistema precisam ser definidas e fixadas, constituindo o que se chama de *ensemble* termodinâmico.

Dá-se o nome de *ensemble* ao conjunto de microestados de um sistema, definidos pela organização espacial das partículas e seus momentos lineares, mas que pertencem ao mesmo estado termodinâmico. Cada microestado dentro de um *ensemble* pertence a um espaço de fases que representa todas as possibilidades estruturais de um dado sistema, uma vez consideradas as restrições desse *ensemble* (ADCOCK e McCAMMOM, 2006; HILSER *et al.* 2006).

A depender dos vínculos termodinâmicos existentes em um sistema, o *ensemble* no qual esse sistema se encontra pode ser classificado de diferentes formas e apresentar diferentes descrições estatísticas e características macroscópicas. Segundo Adcock e McCammom (2006) e Salinas (2005) os *ensembles* mais utilizados em simulações são o microcanônico (NVE), onde são mantidas constantes a energia total do sistema, o número de partículas e o volume ocupado por elas, o canônico (NVT), onde são mantidas constantes a temperatura, o número de partículas e o volume, e o grã-canônico (μ VT), onde o potencial químico é mantido constante em substituição ao número de partículas do *ensemble* anterior. Entretanto, podem ser encontrados também estudos onde são utilizados os *ensembles* isentálpico-isobárico (NPH), onde são mantidas constantes a pressão total, a entalpia e o número de partículas do sistema e o *ensemble* isobárico-isotérmico, ou *ensemble* das pressões (NPT) onde a pressão, a temperatura e o número de partículas são fixados.

Em essência, as simulações de DM são desenvolvidas no *ensemble* microcanônico, uma vez que todos os potenciais utilizados nos campos de força são conservativos, conservam a energia total do sistema, e os algoritmos de integração das equações de movimento foram desenvolvidos para tal finalidade. Entretanto, a maioria dos experimentos que constituem o alvo das simulações é realizada a volume e temperatura constantes, *ensemble* canônico (NVT), ou à pressão e temperatura constantes, *ensemble* isobárico-isotérmico (NPT) (ADCOCK e McCAMMOM, 2006).

Para realizar tal restrição à DM são necessários alguns algoritmos numéricos de acoplamento que introduzem pequenas modificações no sistema de modo que suas variáveis termodinâmicas se mantenham constantes ao longo de toda a simulação. São eles, o algoritmo de acoplamento de temperatura, Termostato, e o algoritmo de acoplamento de pressão, o Barostato. Uma melhor descrição de cada um segue nos tópicos subsequentes.

2.1.14 Termostato (v-rescale)

A fim de poder controlar a temperatura do sistema no decorrer da simulação de dinâmica molecular (DM) faz-se uso de um termostato que re-escala a magnitude dos vetores velocidades de cada partícula dentro do sistema de modo que a distribuição resultante desses valores se aproxime de uma curva Gaussiana centrada na temperatura desejada.

Assim como nos algoritmos numéricos apresentados até aqui, várias abordagens matemáticas foram desenvolvidas para a realização de tal tarefa. Um dos mais utilizados é o termostato de Berendsen *et al.* (1984), onde é modelado um banho térmico acoplado ao sistema que lhe fornece ou retira energia de tal modo que ele permanece com sua temperatura constante. O algoritmo é dado por um acoplamento fraco descrevendo uma cinética de primeira ordem, como pode ser visto na Equação 30.

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{\tau} \quad (30)$$

Em que T_0 é a temperatura que se deseja manter constante ao longo de toda a simulação e τ é o parâmetro de acoplamento da temperatura, que pode ser modificado para melhor ajustar as necessidades da simulação. Através dessa definição e de uma modificação ocasional nas equações de movimento descritas por Berendsen *et al.* (1984), esse acoplamento é aplicado ao sistema escalonando as magnitudes dos vetores velocidade de cada partícula no sistema por uma quantidade λ a cada n_p passos de simulação, dada pela Equação 31.

$$\lambda = \left[1 + \frac{n_p \Delta t}{\tau_t} \left(\frac{T_0}{T \left(1 - \frac{\Delta t}{2} \right)} - 1 \right) \right]^{1/2} \quad (31)$$

Em que τ_t pode ser encontrado através da seguinte equação.

$$\tau = \frac{2C_v\tau_t}{N_{gl}k} \quad (32)$$

Em que C_v é a capacidade calorífica do sistema, k é a constante de Boltzmann e N_{gl} é o número de graus de liberdade do sistema. Essa metodologia é muito útil por permitir a modificação da constante de acoplamento da temperatura de acordo com as necessidades da dinâmica. Entretanto, ela suprime a variação da energia cinética que existe devido às flutuações ao longo da simulação. Essa característica leva a simulação a uma incorreta amostragem do *ensemble*, com um erro que é proporcional ao inverso do número de partículas no sistema. Para sistemas apresentando um número muito grande de partículas a média das propriedades extraídas do *ensemble* não é afetada (VAN DER SPOEL *et al.*, 2010).

A fim de evitar esse problema, foi utilizado no trabalho o termostato de Bussi, Donadio e Parrinello (2007), que basicamente é um melhoramento do termostato de Berendsen, com a adição de um termo estocástico que assegura que o *ensemble*, assim como a energia cinética do sistema, será corretamente amostrado durante a simulação. O termo de escalonamento das velocidades das partículas é dado pela Equação 33.

$$\alpha = \sqrt{\frac{K_t}{K}} \quad (33)$$

Em que K é a energia cinética das partículas do sistema, enquanto que K_t é a energia cinética calculada através da distribuição de equilíbrio canônico do *ensemble*, assim como pode ser verificado no trabalho dos autores.

2.1.15 Barostato (Berendsen)

Assim como no algoritmo anterior, existem diversas abordagens que podem ser utilizadas para controlar a pressão do sistema. A que foi utilizada no trabalho é descrita por Berendsen *et al.* (1984) como um banho de pressão, de forma análoga ao termostato. Seguindo o mesmo desenvolvimento descrito no tópico anterior, os autores modificam ocasionalmente as equações de movimento de modo a levar em consideração as variações na pressão do sistema. Utilizando o mesmo decaimento de primeira ordem também relatado no algoritmo do termostato, Equação 34, os autores chegam a um fator de escalonamento para a

posição das partículas e para as dimensões da caixa de simulação, a cada n_p passos de simulação, dada pela Equação 35. Através desse fator a nova posição das partículas é dada pela Equação 36.

$$\frac{dP}{dt} = \frac{P_0 - P}{\tau_p} \quad (34)$$

$$\mu = 1 - \frac{n_p \beta \Delta t}{3\tau_p} (P_0 - P) \quad (35)$$

$$\vec{r}' = \mu \vec{r} \quad (36)$$

Em que τ_p é a constante de acoplamento da pressão, β é a compressibilidade isotérmica do sistema e P_0 é o valor de pressão que se deseja manter constante ao longo da simulação. As Equações 35 e 36 podem se generalizar como equações tensoriais (onde P e μ são descritos na forma de tensores), caso o sistema não se apresente em uma geometria cúbica, assim como descrito por Berendsen *et al.* (1984) e van der SPOEL *et al.* (2010).

2.1.16 Particle-Mesh Ewald (PME)

Como já introduzido no tópico 2.1.12, a utilização de condições periódicas de contorno necessárias para evitar o problema de efeito de borda nas simulações gera a necessidade de contabilizar o potencial de interação eletrostática em todas as réplicas periódicas do sistema. Nesse tipo de configuração, a Equação 19 se transforma na Equação 37.

$$V_{ele}^{ij}(\vec{r}_{ij}, q_i, q_j; f, \epsilon_r) = \frac{f}{2} \sum_{nx} \sum_{ny} \sum_{nz} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{\epsilon_r \|\vec{r}_{ij}\|} \quad (37)$$

Em que n_x , n_y e n_z são o número de réplicas do sistema em cada direção cartesiana. Como descrito por van der Spoel *et al.* (2010), essa soma converge, mas de modo muito lento ou condicional. Para superar esse problema, Ewald, em 1921, propôs uma metodologia conhecida como soma de Ewald que consegue simplificar o trabalho introduzido por esse

somatório. Ele propôs uma modificação na Equação 37 que torna a sua convergência significativamente mais rápida. Para isso, ele dividiu a expressão contida no somatório em dois termos, através da aplicação de uma identidade matemática dada pela Equação 38, assim como descrito por Holm (2004).

$$\frac{1}{r} = \frac{f(r)}{r} + \frac{1-f(r)}{r} \quad (38)$$

Existem dois requerimentos principais para a escolha da função $f(r)$ utilizada. Ela deve ser tal que o primeiro termo dessa identidade decaia rapidamente, sendo negligenciável para valores de “ r ” maiores que o raio de corte (*cutoff*) utilizado nas simulações, enquanto o segundo deve variar lentamente para qualquer valor de “ r ” possibilitando a descrição desse termo através da sua transformada de Fourier e, portanto, sendo expresso no espaço recíproco (HOLM, 2004). A escolha utilizada por Ewald foi a função complementar de erro observada na Equação 39.

$$\text{erfc}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_x^{\infty} e^{-t^2} dt \quad (39)$$

Através dessa metodologia, o potencial elétrico total do sistema é dado pela soma do potencial no espaço real e no espaço recíproco, tal como é mostrado nas equações abaixo.

$$V = V_{real} + V_{rec} + V_0 \quad (40)$$

$$V_{real}(\vec{r}_{ij}, q_i, q_j; f, \beta) = \frac{f}{2} \sum_{i,j}^N \sum_{nx} \sum_{ny} \sum_{nz} q_i q_j \frac{\text{erfc}(\beta \|\vec{r}_{ij}\|)}{\|\vec{r}_{ij}\|} \quad (41)$$

$$V_{rec}(\vec{m}, q_i, q_j; f, \beta) = \frac{f}{2\pi Vol} \sum_{i,j}^N q_i q_j \sum_{mx} \sum_{my} \sum_{mz} \frac{\exp\left(-\left(\frac{\vec{m}\pi}{\beta}\right)^2 + 2\pi i \vec{m} \cdot (\vec{r}_i - \vec{r}_j)\right)}{\vec{m}^2} \quad (42)$$

$$V_0(q_i; f, \beta) = -\frac{f\beta}{\sqrt{\pi}} \sum_{i=1}^N q_i^2 \quad (43)$$

Em que V_{real} é o potencial atribuído à soma no espaço real, V_{rec} é o potencial atribuído à soma no espaço recíproco, β é um parâmetro positivo que ajusta o peso relativo do somatório no espaço real e no espaço recíproco ao modificar a convergência de cada um deles, $\vec{r}_i$ é a posição da partícula i no sistema e $\vec{r}_{ij}$ é o vetor entre a partícula e sua imagem mais próxima encontrada nas réplicas, Vol é o volume da célula de simulação e $\vec{m}$ é o vetor de comprimentos de onda no espaço recíproco relativos às dimensões da célula de simulação no espaço real (VAN DER SPOEL *et al.*, 2010; DARDEN, YORK e PEDERSEN, 1993).

Como explicado, essa soma permite que o cálculo do potencial eletrostático do sistema seja realizado mais rapidamente que o desenvolvido pela Equação 37, entretanto o algoritmo tem um escalonamento que vai com o quadrado do número de partículas no sistema, N^2 , o que torna esse cálculo quase impraticável para sistemas muito grandes ($N > 10^4$). Uma alternativa dada por Darden, York e Pedersen (1993) a esse problema é a utilização de uma interpolação multidimensional por partes do somatório no espaço recíproco seguindo a metodologia *particle-mesh*, com auxílio das Transformadas Rápidas de Fourier (do inglês, *Fast Fourier Transform*, FFT) (VAN DER SPOEL *et al.*, 2010; DARDEN, YORK e PEDERSEN, 1993; HOCKNEY e EASTWOOD, 1981). Essa metodologia, mais conhecida como *particle-mesh* Ewald (PME), consegue melhorar o escalonamento do algoritmo chegando um processo que depende de $N \cdot \ln(N)$, assim como pode ser verificado no trabalho dos autores. Além dessa, muitas outras metodologias de aprimoramento da soma de Ewald podem ser desenvolvidas à partir de modificações do somatório do espaço recíproco. Alguns exemplos que podem ser citados são os trabalhos de Hockney, Eastwood e Lawrence (1980) com a metodologia *particle-particle particle-mesh* (P3M) e o de Essmann *et al.* (1995) com o *Smooth Particle-Mesh Ewald* (SPME). Maiores detalhamentos e comparações com outras metodologias já desenvolvidas podem ser encontradas nos trabalhos de Ballenegger *et al.* (2008) e Holm (2004).

2.1.17 Reaction Field (RF)

Outra alternativa ao somatório da Equação 37 é realizada através da metodologia do campo de reação (do inglês *Reaction Field*). Nessa abordagem, as interações eletrostáticas são calculadas via Equação 19 até o raio de corte definido (*cutoff*) nos parâmetros da simulação, e qualquer interação entre partículas que estejam mais afastadas que esse raio de corte serão tratadas como um campo de reação criado por elas. Essa descrição pode ser observada na Equação 44.

$$V_{ele}^{ij}(\vec{r}_{ij}, q_i, q_j; f, \epsilon_r, k_{rf}, c_{rf}) = \frac{f q_i q_j}{\epsilon_r} \left[\frac{1}{\|\vec{r}_{ij}\|} + k_{rf} (\vec{r}_{ij})^2 - c_{rf} \right] \quad (44)$$

Em que as constantes do campo de reação expressas acima são descritas nas equações 45 e 46 fazendo uso das definições de raio de corte, r_c , e constante dielétrica do campo de reação ϵ_{rf} (VAN DER SPOEL *et al.*, 2010; TIRONI *et al.*, 1995).

$$k_{rf} = \frac{1}{r_c^3} \frac{\epsilon_{rf} - \epsilon_r}{(2\epsilon_{rf} + \epsilon_r)} \quad (45)$$

$$c_{rf} = \frac{1}{r_c} \frac{3\epsilon_{rf}}{(2\epsilon_{rf} + \epsilon_r)} \quad (46)$$

O raio de corte pode ser modificado dependendo da necessidade de cada sistema a ser simulado, mas é preciso ter em mente que quanto maior seu valor, maior o número de interações que seguem a Equação 19 e, portanto, maior o custo computacional da dinâmica. O valor da constante dielétrica do campo de reação pode ser obtida através de estudos computacionais a fim de avaliar qual valor melhor reproduzirá propriedades experimentais, assim como pode ser visto no trabalho de Gattli, Daura e van Gunsteren (2002).

2.1.18 Linear Constraint Solver (LINCS)

Como citado no tópico 2.1.8, uma das metodologias para diminuir o tempo de processamento da dinâmica e mais rapidamente avaliar um longo tempo de simulação se dá pelo aumento do passo temporal utilizado nas equações de dinâmica. Entretanto essa modificação não pode ser aplicada de forma generalizada por conta da existência de átomos do sistema que oscilam tão rapidamente que o aumento do passo temporal faria sua dinâmica perder sentido e sua trajetória ficar desconectada, como no caso dos hidrogênios em muitas moléculas. Em resumo, o passo temporal deve ser pelo menos, menor do que o tempo de oscilação do oscilador mais rápido dentro do sistema (VAN DER SPOEL, 2010).

Uma alternativa a essa condição é a restrição de comprimentos de ligação e de ângulos em átomos que se apresentam como osciladores muito rápidos, de tal maneira que seus modos de vibração não sejam mais levados em conta na simulação permitindo o aumento do passo temporal de integração nas equações de movimento.

Para realizar essa restrição são necessárias metodologias especiais que possam garantir a restrição dos valores de ângulo e ligação dos átomos. Algumas metodologias já desenvolvidas para tal finalidade são o SHAKE, o LINCS, o RATTLE e o SETTLE para moléculas de água (RYCAERT *et al.*, 1977; HESS *et al.*, 1997, ANDERSEN, 1983; MIYAMOTO e KOLLMAN, 1992).

Nesse trabalho foi utilizada a metodologia LINCS, por ser avaliada como mais simples, rápida e eficiente que o SHAKE (HESS *et al.*, 1997) e seus variantes.

É uma metodologia que redefine os comprimentos de ligação dos átomos utilizando álgebra matricial. Como descrito por van der Spoel *et al.* (2010) é uma metodologia não iterativa e que sempre é realizada em dois procedimentos computacionais, assim como pode ser verificado no esquema da Figura 6.

De forma resumida, as equações aplicadas sobre os átomos seguem o formato dado pela Equação 47.

$$g(\vec{r}) = |\vec{r}_{i1} - \vec{r}_{i2}| - d_i = 0 \quad i = 1, 2, 3, \dots \quad (47)$$

Em que $\vec{r}_{i1}$ e $\vec{r}_{i2}$ são os vetores posição dos átomos envolvidos na i -ésima equação de restrição e d_i é o comprimento da ligação realizada entre esses átomos. Uma descrição mais detalhada sobre o desenvolvimento matricial do algoritmo pode ser encontrado em Hess *et al.* (1997) e van der Spoel *et al.* (2010).

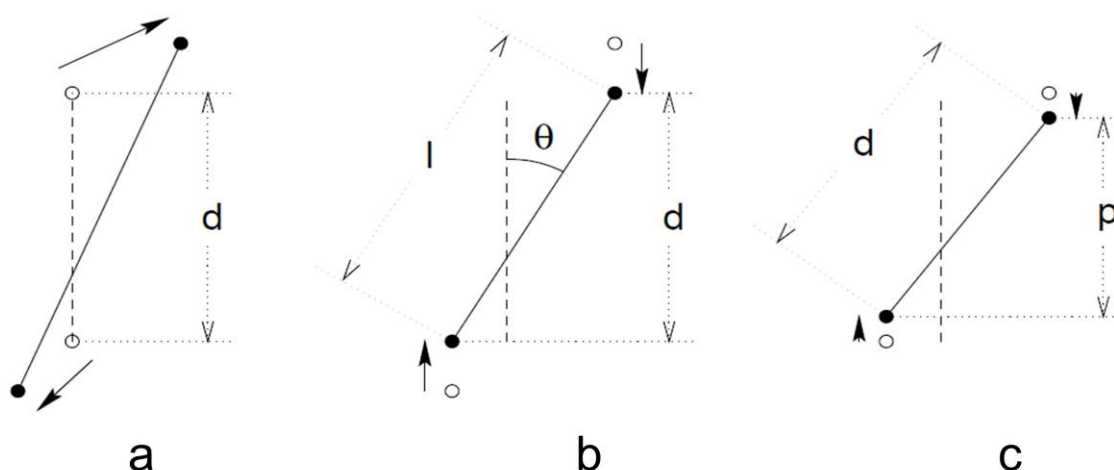


Figura 6. Esquema para visualização de como o algoritmo funciona. A) rotação não restringida de dois átomos, B) definição da projeção da nova orientação sobre a antiga como nula e C) redefinição do comprimento de ligação como o valor antigo. **Fonte:** HESS *et al.*, 1997.

2.1.19 Método de amostragem melhorada

Assim como inicialmente discutido no início dessa seção, medidas experimentais de certas propriedades de um sistema podem ser comparadas com as médias do seu espaço amostral simulado através da metodologia de DM ou outra metodologia computacional. É possível verificar que, uma vez garantida a correta parametrização do sistema simulado e a correta descrição dos parâmetros da dinâmica, o desvio das medidas extraídas das simulações, em relação aos dados reais, é tão menor quanto melhor for a amostragem do espaço de fases do sistema. Infelizmente, a amostragem de um modelo computacional inserido em um ensemble termodinâmico depende do tipo de sistema sendo simulado, dos parâmetros utilizados na sua modelagem e da metodologia computacional empregada. Em particular, uma das situações que podem dificultar a completa amostragem do espaço de fases do sistema é a utilização de uma estrutura inicial para a dinâmica que pertença a um mínimo da superfície de energia potencial cujas barreiras que devem ser ultrapassadas para amostragem de novas estruturas se encontra acima dos níveis de energia termicamente acessível (BERNARDI, MELO e SCHULTEN, 2015).

Nesses casos é necessária a utilização de metodologias melhoradas de amostragem do espaço de fases do sistema que possam ultrapassar essa inconveniente barreira energética. Dentre as várias abordagens já desenvolvidas para esse propósito podem ser citadas a metodologia *Replica-Exchange*, *Local Elevation* e *Simulated Annealing*, também conhecido como arrefecimento simulado (SUGITA e OKAMOTO, 1999; HUBER, TORDA e VAN GUNSTEREN, 1994; KIRKPATRIK, GELATT e VECCHI, 1983).

Nesse trabalho, como será visto mais à frente, foi utilizada a metodologia do arrefecimento simulado (do inglês *Simulated Annealing*, *SA*), por ser uma metodologia simples e de baixo custo computacional, para melhor amostrar o espaço de conformações acessíveis aos polipeptídios utilizados no estudo. De maneira objetiva, na metodologia do arrefecimento simulado, como o próprio nome diz, o sistema simulado é aquecido a uma temperatura tal que conformações antes impedidas energeticamente sejam, agora, termicamente acessíveis. Após certo tempo de amostragem sobre as novas conformações, o sistema é resfriado voltando à temperatura inicial da simulação, mas com suas configurações modificadas. A amostragem, através dessa metodologia é tão mais representativa do espaço conformacional do sistema, quanto maior for o número de vezes que o processo de aquecimento e resfriamento ocorre. Modificações nesse algoritmo permitiram o desenvolvimento do *Fast Simulated Annealing* e do *Generalized Simulated Annealing* que

apresentam, respectivamente, melhorias no tempo de processamento e no método de amostragem entre conformações permitindo a utilização de temperaturas mais brandas para efetuar o mesmo trabalho do algoritmo original. Maiores detalhes podem ser encontrados nos trabalhos de Szu e Hartley (1987) e Tsallis e Stariolo (1996). Uma vez que essas metodologias não puderam ser implementadas no código utilizado para o desenvolvimento das simulações, o algoritmo empregado foi o descrito por Kirkpatrick, Gelatt e Vecchi (1983), sendo satisfatório e eficiente para alcançar os objetivos do trabalho.

Com essa finalidade, foi definido um ciclo aquecimento e resfriamento que durou cerca de 500 ps, levando 50 ps para aquecer e resfriar e 200 ps de amostragem em cada temperatura. As simulações seguindo essa metodologia se estenderam por até 100 ns garantindo pelo menos 40 ns de simulação em cada temperatura e um total de 20 ns nos intervalos transientes (Figura 7).

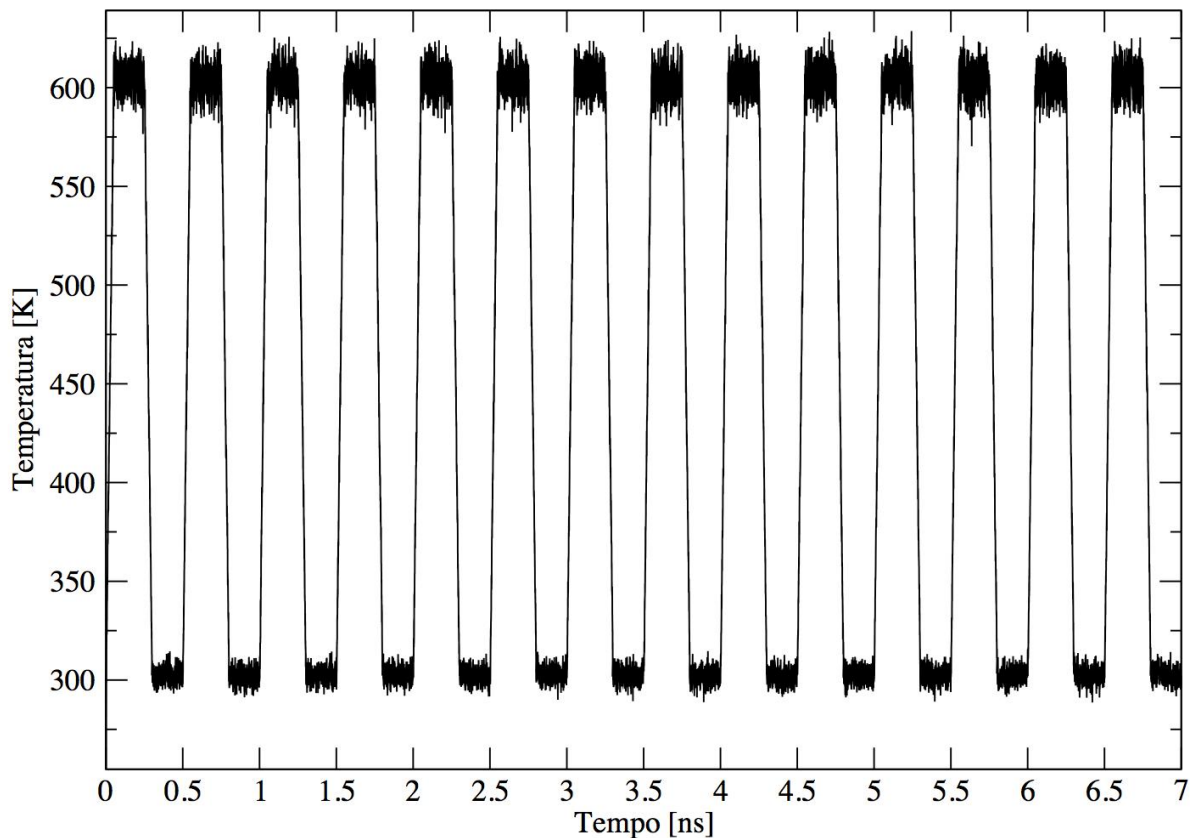


Figura 7. Pequeno intervalo da simulação demonstrando como a temperatura do sistema foi variada durante a utilização do método de amostragem melhorada.

2.2 PARÂMETROS ATOMICOS E PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS

2.2.1 Estrutura e parâmetros utilizados nas simulações das polimixinas

Nesse trabalho foram desenvolvidos modelos moleculares para três variantes da classe das polimixinas, a saber, as polimixinas B1, E1 e M (por vezes denominada como A). Essa avaliação é importante para verificar possíveis variações nas interações entre antimicrobianos e membranas bacterianas que dependam diretamente da variante do polipeptídio utilizado. Por simplificação a nomenclatura para as polimixinas será adotada como sendo B, E e M.

Inicialmente, como em qualquer simulação computacional, faz-se necessária a descrição tridimensional da molécula a ser modelada. Descrição essa, que no caso das polimixinas, embora muito estudada experimentalmente, não foi totalmente resolvida ou publicada, assim como visto para um número considerável de proteínas, lipídeos e outras moléculas encontradas na literatura. Alguns resultados de ressonância magnética nuclear, como o de Pritovsek e Kidric (1999), deram abertura para avaliação de valores de Nuclear Overhauser Effect (NOE) pertencentes a interações entre prótons dentro da cadeia molecular dessa classe de polipeptídios e que podem consequentemente fornecer informações valiosas sobre a proximidade de grupos estruturais, auxiliando assim, no design da molécula. Entretanto, pelo fato desse antimicrobiano ser muito pequeno e muito móvel, todos os valores obtidos foram de intensidade média ou baixa resultando em uma configuração espacial que, embora explique parcialmente os valores de NOE, não podem ser referidos como a estrutura definitiva da molécula.

Dessa forma, fez-se necessária a modelagem estrutural do polipeptídio, trabalho realizado através simulações computacionais de Dinâmica Molecular aliada aos dados estruturais reportados nos estudos de Pritovsek e Kidric (1999), de modo a obter nesse processo uma estrutura média da molécula modelada, que responde a mudanças estruturais, assim como descrito nos resultados experimentais e que pode ser utilizada nas simulações da interação entre peptídios antimicrobianos e membrana bacteriana. Para alcançar tal finalidade, foi utilizado o pacote computacional GROMACS versão 4.6.5 (VAN DER SPOEL *et al.*, 2010). A estrutura tridimensional das polimixinas foi construída com auxílio de um software computacional SPARTAN e dos dados estruturais reportados e descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Valores dos ângulos diédricos para as duas conformações médias de menor energia da polimixina B obtidas por espectroscopia de RMN e utilizadas na construção de modelos tridimensionais para simulações.

Resíduos	Sequência*	Exp1.		Exp2.	
		φ_1	ψ_1	φ_2	ψ_2
DAB	4	-85	72	-148	26
DAB	5	-125	110	-164	155
D-PHE	6	70	-108	-45	-66
LEU	7	-95	62	-78	30
DAB	8	-142	132	53	64
DAB	9	-70	169	-132	-94
THR	10	68	-56	-52	49

Fonte: PRITOVSEK e KIDRIC, 1999. (* A sequência dos aminoácidos pertencente à cadeia polipeptídica é definida na Figura 2 e Tabela 1.)

Embora esses dados sejam apenas para a polimixina B, eles foram utilizados para modelar a estrutura inicial de todas as três variantes de polimixina estudadas no trabalho, uma vez verificada a semelhança estrutural do conjunto. Dos dados apresentados, apenas a primeira conformação foi utilizada na modelagem estrutural. Essa escolha é possível porque ambos são parte de uma mesma família de 100 estruturas correlacionadas, derivadas dos mesmos valores de NOE encontrados no trabalho de Pritovsek e Kidric (1999) e com variações estruturais menores que 1 Å em relação esses dados. Além disso, os resultados apresentados nas simulações da primeira estrutura dispensam a simulação partindo da estrutura gerada com a segunda conformação, assim como será visto na primeira parte dos resultados.

Para descrever as interações atômicas para cada partícula constituindo a molécula do polipeptídeo, foram utilizados diferentes conjuntos de parâmetros de campo de força GROMOS, que juntamente com diferentes escolhas de tratamentos eletrostáticos de longa distância (TELD) para o sistema, permitiram desenvolver um pequeno ensaio sistemático em busca da melhor combinação de parâmetros e TELD, assim como pode ser verificado na Tabela 3, identificando aquele que melhor reproduziria os dados experimentais.

Tabela 3. Descrição da combinação de parâmetros de campo de força, TELD e métodos de amostragem utilizados nas simulações das variantes de polimixina em água.

Sistemas	Número de moléculas			Simulações DM				Simulações DM/SA	
	Soluto	Solvente	Íons	Parâmetros		TELD		Parâmetros	TELD
PmxB	1	2106	5 Cl ⁻	53a6	54a7	RF	PME	54A7	RF
PmxE	1	2111	5 Cl ⁻	-	54a7	RF	-	54A7	RF
PmXM	1	2013	5 Cl ⁻	-	54a7	RF	-	54A7	RF

Considerando o fato de que a estrutura química de todas as variantes é muito similar, a menos de pequenas modificações pontuais, assim como descrito na Tabela 1, então é plausível afirmar que a dinâmica conformacional dessas variantes também será muito similar de modo que a melhor escolha de parâmetros de campo de força e TELD para uma delas a fim de reproduzir resultados experimentais, também irá refletir a melhor escolha para as outras variantes. Desse modo, a avaliação sistemática da melhor combinação de parâmetros de campo de força e TELD foi apenas executada para a polimixina B, e como não é necessário repetir as simulações para todas as variantes, uma vez que a mesma tendência de concordância com os resultados experimentais seria observada é possível simplificar o trabalho e reduzir custos computacionais com simulações excessivas.

Uma vez determinada essa combinação que melhor descreve a dinâmica conformacional das polimixinas, foram realizadas novas simulações com todas as variantes utilizando esses parâmetros e logo após utilizando um algoritmo de amostragem melhorada já descrito no tópico 2.1.19 com a finalidade de que fosse possível verificar, de maneira mais ampla, as conformações acessíveis à estrutura modelada, e se essa estrutura poderia condizer com os dados experimentais.

2.2.2 Estrutura e parâmetros utilizados nas simulações dos lipídeos

Para as simulações com as membranas foram desenvolvidos cinco modelos computacionais para diferentes quimiotipos da membrana externa de *P. aeruginosa*. Dentre eles estão o lipídeo A penta e hexa-acilados, o lipídeo A com adição de 4-amino-4-deoxy-1-arabinose (Ara4N) penta e hexa-acilados, e o lipídeo Re penta-acilado, que possui mesma estrutura do lipídeo A, mas com adição de duas moléculas de Ácido D-manno-oct-2-usolónico (KDO) constituindo o núcleo do *inner core* da membrana externa bacteriana.

A modelagem computacional dos lipídeos de cada quimiotipos bacteriano descrito acima e utilizados nesse trabalho, foi significativamente mais simples que no desenvolvimento dos modelos para as polimixinas. Isso decorre do fato de que a estrutura dos lipídeos e os parâmetros que descrevem as interações entre cada átomo compondo a molécula já se encontravam descritos na literatura relacionada. Para modelagem dos carboidratos foi utilizado o conjunto de parâmetros de campo de força GROMOS 54A7 com refinamento de potenciais torcionais para carboidratos (LINS e HUNENBERGER, 2005; POL-FACHIN *et al.*, 2012).

O conjunto de parâmetros GROMOS53A6_{GLYC}, como descrito pelos autores acima, contém correções para potenciais diédricos dos resíduos de hexapiranoose com todos os outros parâmetros atômicos permanecendo os mesmos do já reportado 54A7 (SCHMID *et al.*, 2011). Os parâmetros utilizados no cálculo do potencial de van der Waals foram extraídos dos conjuntos GROMOS 45A4/53A6. As cargas atômicas para os novos grupos químicos e potenciais torcionais na bicamada lipopolissacarídicas (LPS), como na ligação P-glicosídica e para todos os diedros no formato C-C-C-O, foram calculados para manter a compatibilidade com versões previas do campo de força GROMOS (LINS e HUNENBERGER, 2005; SOARES *et al.*, 2005; CHANDRASEKHAR *et al.*, 2003).

As topologias, bem como a estrutura inicial do lipídeo A, base estrutural comum a todos os quimiotipos estudados e utilizados na construção das bicamadas, podem ser encontradas nos Apêndices 1 e 3, respectivamente. Abaixo, na Tabela 4, segue a descrição dos sistemas de bicamadas simuladas sem a presença de antimicrobianos.

Tabela 4. Setup dos sistemas de bicamada utilizados para simulação das membranas bacterianas sem presença dos polipeptídios antimicrobianos. Nessas simulações o solvente utilizado foi a água.

Sistemas	Número de moléculas			Tempo de simulação
	lipídeo	Solvente	Íons	
LipA _{penta}	256	44050	256 Ca ²⁺	200 ns
LipA _{hexa}	256	38266	256 Ca ²⁺	200 ns
LPSRe _{penta}	256	47516	512 Ca ²⁺	200 ns
LipA _{Ara4N,penta}	256	50002	0	200 ns

O tempo de simulação foi definido como o necessário para que fosse observado um equilíbrio estrutural em cada quimiotipo em termos do parâmetro de “área por cabeça”, ou melhor, do empacotamento das moléculas compondo a membrana. A quantidade de íons de cálcio inseridos nos sistemas foi a mínima necessária para neutralizar as bicamadas. Disso decorrem as diferentes concentrações de íons verificados na quarta coluna da Tabela 4.

2.2.3 Setup das simulações das interações entre membrana externa bacteriana e AMP.

Uma vez realizadas as construções dos modelos para as polimixinas e para as membranas, foi possível, então realizar o estudo das interações entre esses componentes. Para tal tarefa, foi necessária apenas a utilização da polimixina B, pois como antecipado no tópico 2.2.1 e melhor avaliado no tópico 3.1, as variantes de polimixina apresentam uma dinâmica conformacional muito semelhante de modo que o comportamento de uma delas serve como um indicativo para a dinâmica das outras. Foram realizadas ao todo 7 simulações. Do total, cinco delas foram desenvolvidas para avaliar as interações entre o AMP e os diferentes quimiotipos de membrana externa, enquanto que as remanescentes foram utilizadas para avaliar efeito de concentração do polipeptídeo e de sais inseridos no sistema para modificar a força iônica do meio. Na Tabela 5, segue uma descrição do número de moléculas utilizadas em cada sistema desenvolvido, bem como o tempo de simulação alcançado ao longo do trabalho.

Tabela 5. Descrição do número de moléculas de cada componente do sistema utilizados na montagem das simulações e do tempo total de simulação alcançado ao final do trabalho.

Sistemas	Número de moléculas			Íons	Tempo de simulação
	Pmx-B	Lípídeo	Solvente		
Pmx ₂ +LipA	2	256	65761	10 Cl ⁻ , 256 Ca ²⁺	200 ns
Pmx ₆ +LipA _{penta}	6	256	61204	30 Cl ⁻ , 256 Ca ²⁺	200 ns
Pmx ₆ +LipA _{hexa}	6	256	73168	30 Cl ⁻ , 256 Ca ²⁺	200 ns
Pmx ₆ +LPSRe	6	256	64050	30 Cl ⁻ , 512 Ca ²⁺	200 ns
Pmx ₆ +LipA _{Ara4N_{penta}}	6	256	73587	30 Cl ⁻	200 ns
Pmx ₆ +LipA _{penta-mM}	6	256	60766	249 Cl ⁻ , 256 Ca ²⁺ , 219 Na ⁺	200 ns

A configuração inicial das simulações descritas acima foi desenvolvida com a utilização da estrutura final das simulações de cada um dos componentes isolados, ou seja, referentes aos sistemas observados nas Tabelas 3 e 4. Na Figura 8 pode ser observado um exemplo da montagem dos sistemas acima. Nela é possível verificar que os antimicrobianos foram posicionados muito próximos a membrana, sem, no entanto tocá-la. A decisão de aproximar os polipeptídios da bicamada decorre da escolha do raio de corte, *cutoff*, para cálculo de interações eletrostáticas utilizado nas simulações. Se os peptídios fossem colocados muito distantes da membrana, haveria pouca interação com a essa última e só em simulações muito longas seria possível verificar a natureza das interações entre os componentes do sistema. Logo, como justificado no próximo tópico, as polimixinas foram posicionadas em no máximo 1,4 nm de distância da membrana, de modo a maximizar as interações entre elas e mais rapidamente observar os fenômenos delas decorrentes.

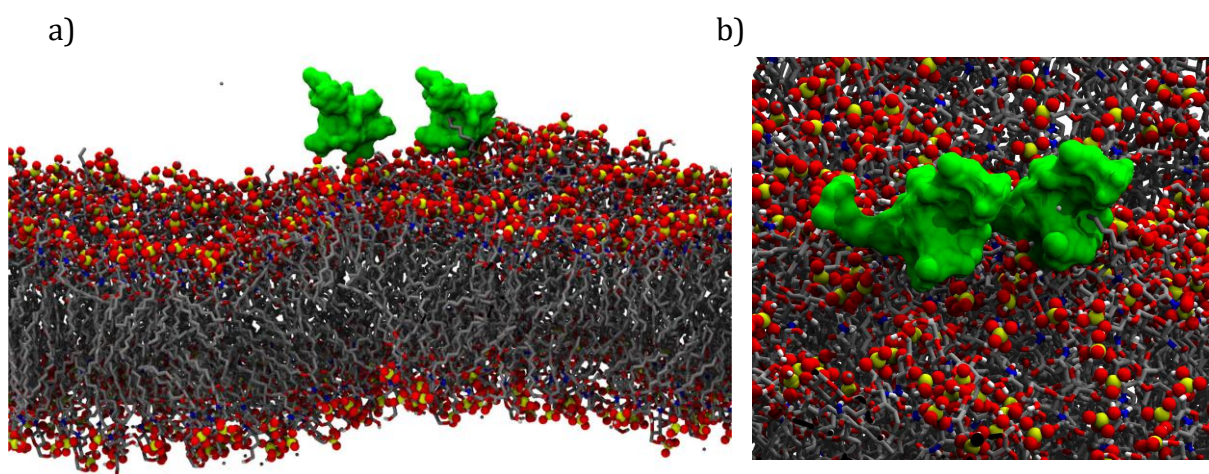


Figura 8. Exemplo da configuração inicial das simulações entre polipeptídio e membranas bacterianas. Em a) pode ser observada a visão frontal do sistema, enquanto que em b) a visão superior é demonstrada. Em vermelho e amarelo estão representados, respectivamente, os oxigênios e fósforo do grupamento fosfato dos lipídeos, ao passo que em cinza estão as cadeias alquílicas. Em verde são destacadas as moléculas de polimixina em contato com a membrana.

2.2.4 Parâmetros utilizados nas simulações de dinâmica molecular

O modelo de água utilizado nas simulações foi o SPC (GATTLI, DAURA e VAN GUNSTEREN, 2002). O algoritmo utilizado nas etapas de minimização de energia foi o já relatado *Steepest Descent*. O algoritmo foi empregado até que a maior força encontrada sobre as partículas do sistema tenha menor que $10 \text{ kJmol}^{-1}\text{nm}^{-1}$. O raio de corte utilizado para otimizar o cálculo das interações eletrostáticas e de van der Waals foi de 1,4 nm. Nas

simulações, as quais fizeram uso do campo de reação (Reaction Field) como tratamento eletrostático de longa distância, foi utilizado um valor de 66,6 para a constante dielétrica do campo de reação seguindo a descrição do trabalho de Glatli, Daura e van Gunsteren (2002).

O algoritmo de restrição LINCS foi utilizado a fim de manter o comprimento das ligações dos solutos e da geometria das moléculas de água constantes (HESS *et al.*, 1997). Com a aplicação dessa metodologia, foi possível utilizar um passo temporal para as dinâmicas de 2 fs.

Nas simulações que não fizeram uso da metodologia de arrefecimento simulado (*Simulated Annealing*, SA) a temperatura foi mantida, através do algoritmo *V-rescale*, nas proximidades de 300 K, utilizando uma constante de acoplamento de 0,4 ps (BUSSI, DONADIO e PARRINELLO, 2007). O acoplamento foi realizado separadamente para diferentes grupos. Nas simulações das polimixinas em água, os grupos foram representados pelo polipeptídio e pelo solvente com adição dos íons. Nas simulações com a presença da membrana, o primeiro grupo foi definido pela membrana lipídica e as moléculas de polimixina e o segundo grupo pelo solvente com adição dos íons. A pressão do sistema foi mantida constante, através da utilização do barostato de Berendsen, no valor de 1 bar, com uma constante de acoplamento de 1 ps (BERENDSEN *et al.*, 1984). A pressão foi corrigida separadamente para os mesmos grupos definidos no banho térmico. O acoplamento de pressão para as simulações das polimixinas em solução aquosa foi isotrópico, enquanto que nos sistemas contendo as membranas esse acoplamento foi semi-isotrópico, ou seja, o acoplamento no eixo “z” se desenvolveu de forma independente do acoplamento nos outros eixos. A compressibilidade isotérmica foi definida como $4,5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$, para ambos os casos isotrópico e semi-isotrópico, correspondendo ao valor próprio para o solvente escolhido na temperatura da simulação em questão.

Nas simulações que fizeram uso da metodologia de arrefecimento simulado (SA), foi utilizado um ciclo periódico de aquecimento e resfriamento com um tempo total de cerca de 500 ps, levando 50 ps para aquecer e resfriar e 200 ps de amostragem em cada temperatura. As temperaturas utilizadas nesse ciclo foram 300 K e 600 K. Não houve uma razão específica para a escolha do limite superior de temperatura, pois os resultados dessas dinâmicas apenas levaram em consideração os segmentos simulados a 300 K, de modo que o intervalo de simulação a 600 K apenas serviu para intercambiar conformações antes não acessíveis termicamente. No Apêndice 4 podem ser encontrados os arquivos de entrada de cada simulação, bem como os valores do seus custos computacionais.

2.3 ANÁLISES

As análises realizadas nesse trabalho focam na estrutura e estabilidade do sistema em estudo. Para tal, são utilizados dois pacotes de programas que tornam essa avaliação possível.

O primeiro e mais conhecido é o GROMACS versão 4.6.5, que além de conter os parâmetros utilizados na modelagem do sistema, fornece uma gama de diferentes rotinas computacionais capazes de avaliar diversas propriedades de interesse. Nesse trabalho, esse pacote será utilizado para avaliar propriedades como a difusão dos íons presentes no sistema, acoplamento vicinal do tipo 1-4 (J^3) entre prótons presentes na cadeia principal dos peptídios antimicrobianos e a interrelação entre os valores dos ângulos phi (ϕ) e psi (ψ) também presentes na cadeia principal do peptídio na forma do conhecido gráfico de Ramachandran (HOVMOLLER, ZHOU e OHLSON, 2002). Em todas as análises realizadas através desse pacote de programas foram utilizadas as configurações padrão sugeridas pelos desenvolvedores.

O segundo programa é um desenvolvimento próprio fazendo parte de um projeto de implementação de rotinas computacionais que avaliam propriedades estruturais de superfícies com formatos generalizados. Com esse programa serão avaliadas a área por cabeça das membranas em cada sistema simulado, o perfil de densidade parcial para cada grupo de moléculas compondo os sistemas, a espessura de cada bicamada e o grau de ordem de curvatura, expresso através de uma modificação do polinômio de Legendre de segundo tipo, como será visto em seguida.

2.3.1 Área por cabeça

A análise de área por cabeça realizada no trabalho é obtida através de um protocolo especial capaz de inserir características morfológicas, como por exemplo, a curvatura da superfície, na propriedade mensurada. Através desse refinamento, podem ser verificadas de forma mais precisa quais as modificações morfológicas apresentadas nos sistemas de bicamadas lipídicas quando em contato com os antimicrobianos catiônicos.

Essa grandeza é uma medida simples de quanto espaço bidimensional um lipídeo ocupa como parte de uma bicamada ou monocamada, e sendo, portanto, uma ótima propriedade para descrever o empacotamento dos lipídeos pertencentes a esses sistemas. Além dessa consideração, é importante ressaltar que uma simples avaliação dessa propriedade é capaz de informar se o sistema em estudo convergiu, ou não, estruturalmente para uma

conformação estável, de modo que não possam ser verificadas variações significativas do seu valor e é um indicativo de qual fase estrutural a membrana se encontra. Essa grandeza é, também, um ótimo ponto de referência para comparações com dados experimentais, uma vez que esses valores podem ser medidos e encontrados em revistas especializadas. O cálculo de área por cabeça é dado pela Equação 48.

$$A_{pc} = \frac{A_t}{n_l} \quad (48)$$

Em que A_t é a área medida pelo algoritmo que leva em consideração a curvatura da membrana e n_l é o número de lipídeos em cada lamela da bicamada.

2.3.2 Densidade

O perfil de densidade parcial dos componentes do sistema é uma descrição espacial de como eles se encontram distribuídos ao longo de um eixo de orientação escolhido. Através desse método é possível descrever parcialmente a composição dos sistemas em estudo em relação a esse eixo de referência. De modo usual, em sistemas compostos por bicamadas, o eixo normal da membrana é escolhido como orientação de referência. Essa escolha é conveniente uma vez que ela interfere diretamente no formato do gráfico de densidade do sistema. Um exemplo bem típico e que pode explicar a escolha desse eixo é que para bicamadas simétricas, ou seja, com o mesmo tipo de lipídeo em cada lamela, onde o sistema tenha convergido estruturalmente, o gráfico de densidade que toma como referência o eixo normal da membrana apresenta simetria em relação ao centro da bicamada.

Existem diversos tipos de gráfico de densidade parcial, cada um deles voltado a análise de uma distribuição espacial observada no sistema. Por exemplo, o gráfico que leva em conta o número de átomos de cada componente do sistema pode informar qual a percentagem desse componente em qualquer posição do espaço em relação a orientação referencial, enquanto que o perfil de densidade eletrônica do sistema pode ser utilizado para avaliar regiões com maior ou menor número de elétrons por unidade de volume, ou melhor, densidade espacial da nuvem eletrônica das moléculas. Essa última, entretanto, é apenas uma aproximação visto que não utiliza cálculos quânticos, mas sim contabiliza o número de elétrons de cada átomo pelo seu número atômico. Contudo, pode ser diretamente comparada com resultados derivados de

experimentos com difração e também serve como bom parâmetro para avaliação do modelo desenvolvido para o estudo (SNYDER, KIM e MCINTOSH, 1999).

2.3.3 Espessura da bicamada

A espessura da bicamada é uma medida simples e reflete o tamanho das cadeias lipídicas presentes na membrana além de poder também refletir a fase estrutural em que essa bicamada se encontra. Há diversos estudos experimentais que descrevem medidas para a espessura das bicamadas avaliadas nesse trabalho, entretanto, alguns apresentam diferentes definições acerca de quais os limites físicos da membrana que devem ser levados em consideração na definição da sua espessura, em outras palavras, de que ponto até que ponto das membranas está a região a ser mensurada nessa avaliação (KUCERKA, KISELEV e BALGAVY, 2004; FETTIPLACE, ANDREWS e HAYDON, 1971). Para facilitar o trabalho desenvolvido, foi definido como a espessura da membrana a distância entre os grupamentos fosfatos de cada lamela pertencente a bicamada, de modo que possa haver uma análise comparativa entre os diferentes quimiotipos estudados, uma vez que todos apresentam esse grupo.

2.3.4 Curvatura

A curvatura da membrana é a única propriedade que não pode ser medida experimentalmente, mas uma vez que o modelo tenha sido validado pelas outras propriedades já descritas, ela se torna incrivelmente útil em mostrar e localizar modificações estruturais nas bicamadas que interferem diretamente na sua organização estrutural.

Essa grandeza é calculada como o ângulo de desvio entre o vetor normal a superfície da membrana e o vetor normal ao sistema, que por definição é o eixo z, uma vez que a membrana esteja distribuída ao longo do plano xy (Figura 9).

Com a distribuição dos ângulos de desvio para toda a extensão da membrana pode-se então calcular o parâmetro de ordem de curvatura que é definido pela Equação 49, derivada da expressão do polinômio de Legendre de segundo tipo, com o cosseno do ângulo medido ocupando o lugar da variável na expressão original (BOAS, 2006).

$$P(\theta) = \frac{1}{2}(3\cos^2(\theta) - 1) \quad (49)$$

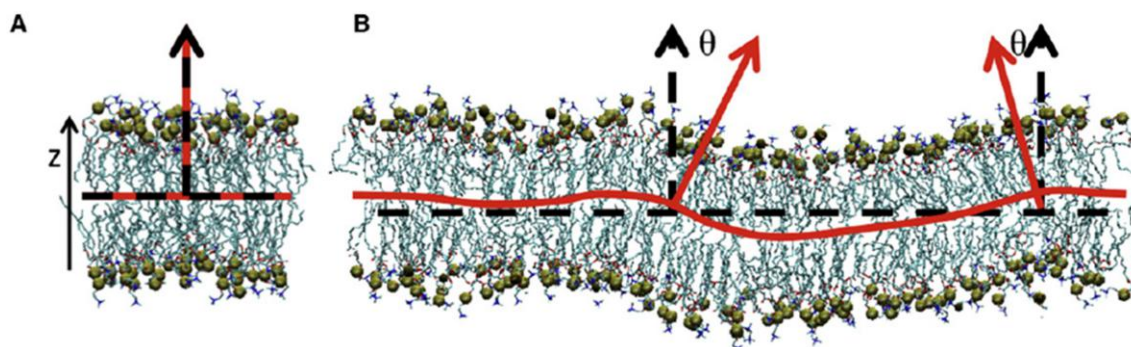


Figura 9. Esquema mostrando como é calculado o ângulo de desvio utilizado na quantificação do parâmetro de ordem de curvatura. A) exemplo de sistema não apresentando curvatura, onde o eixo normal a membrana coincide com o eixo normal do sistema. B) exemplo de sistema com curvatura leve onde pode ser verificada o ângulo de desvio da normal do sistema utilizado no cálculo do parâmetro de ordem de curvatura. **Fonte:** BRAUN *et al.*, 2011.

Em que θ é o ângulo de desvio calculado e P é o parâmetro de ordem de curvatura. Neste tipo de medida, o parâmetro de curvatura assume um valor de 1 quando a superfície local da membrana é normal ao eixo z do sistema, isto é, $\theta = 0^\circ$, e admite um valor de -0,5 quando a superfície local é paralela ao eixo z , ocasião em que $\theta = 90^\circ$. Nos resultados que serão apresentados, há uma distribuição bidimensional desse parâmetro de modo a possibilitar a localização de modificações estruturais da membrana e um histograma que pode ser utilizado para comparar o quanto cada sistema de bicamada se aproxima de um padrão planar, referente a fase gel ou lamelar.

2.3.5 Diagrama de Ramachandran

Em 1968, Ramachandran e Sasisekharan propuseram uma metodologia capaz de relacionar a conformação estrutural de proteínas e polipeptídeos aos valores dos ângulos torcionais das suas cadeias principais, os ângulos φ e ψ . Esses ângulos são definidos, respectivamente, entre os átomos H-N-C α -R e O-C-C α -R das ligações peptídicas, sendo R o substituinte da cadeia lateral.

Como verificado pelos pesquisadores, há uma relação entre os valores desses ângulos que pode ser utilizada para descrever a estrutura de uma proteína ou polipeptídeo. O gráfico de Ramachandran é gerado através da plotagem dos valores dos ângulos ψ X φ para cada aminoácido compondo a proteína ou polipeptídeo. Como pode ser verificado pelo trabalho de Hovmoller, Zhou e Ohlson (2002), as regiões desse gráfico formadas pela junção dos pontos

definidos pelos ângulos torcionais de cada aminoácido constituindo a proteína ou polipeptídeo podem definir qual a estrutura tridimensional essa molécula apresenta, ou seja, qual a estrutura terciária dessas moléculas. Através de uma técnica de suavização eles mostraram de forma mais clara quais valores dos ângulos descrevem cada estrutura. Para uma estrutura em conformação de hélice alfa os valores de ψ vão de -100° a 45° enquanto que os valores de φ ficam entre -180° a 0° . Para a conformação de uma folha beta são encontrados para ψ os valores entre 45 a 225° enquanto que os valores de φ ficam entre -180° a 45° . Uma região também verificada em alguns aminoácidos classificada como volta beta (do inglês – *beta turn*) é encontrada entre os valores de -90° a 90° para o ângulo ψ e 0° a 180° para o ângulo φ .

Uma vez com essas relações é possível extrair informações relevantes acerca da conformação das polimixinas, como será visto mais adiante na seção dos resultados.

Para realizar a análise de Ramachandran foi utilizada a rotina computacional *g_rama* que faz parte do pacote GROMACS versão 4.6.5 utilizado no trabalho. Essa rotina avalia em cada passo de simulação qual o valor dos ângulos torcionais φ e ψ e plota num único gráfico os pontos correspondentes a toda a simulação. Tais resultados serão vistos mais adiante.

2.3.6 Acoplamento vicinal e a equação de Karplus

Uma análise complementar a anterior é a avaliação da constante de acoplamento entre os prótons pertencentes à cadeia principal do polipeptídeo, ou seja, entre o hidrogênio ligado ao nitrogênio da ligação peptídica e o hidrogênio ligado ao carbono alfa de cada aminoácido. O valor do acoplamento está intimamente ligado à conformação estrutural de qualquer aminoácido e dessa forma pode, em conjunto com o gráfico de Ramachandran, auxiliar a extrair informações estruturais importantes das simulações.

Essa informação, que à princípio só poderia ser extraída de experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), é facilmente extraída das simulações através da utilização da Equação de Karplus, Equação 50 (KARPLUS, 1963).

$$^3J = A \cos^2 \theta + B \cos \theta + C \quad (50)$$

Em que o ângulo θ é o ângulo formado entre os átomos $H_N-N-C\alpha-H\alpha$. As constantes da equação são definidas empiricamente de modo a melhor ajustar os resultados

experimentais de RMN. Os valores utilizados no trabalho foram $A = 6.51$, $B = -1.76$, $C = 1.6$ Hz, como descrito por van Gunsteren *et al.* (1996).

Os dados de acoplamento vicinal podem ser extraídos da simulação através da utilização da rotina `g_chi`, pertencente ao GROMACS.

2.3.7 Difusão dos íons

A difusão dos íons dentro do sistema é uma propriedade importante, pois está relacionada diretamente com as leis de transporte de massa às quais todo sistema deve obedecer. Nas simulações de Dinâmica Molecular, a difusividade dos íons, ou de qualquer molécula dentro do sistema pode ser calculada através da relação de Einstein para o movimento Browniano, apresentada abaixo (SALINAS, 2005; VAN DER SPOEL *et al.*, 2010).

$$\langle \vec{r}_i(t)^2 \rangle = 2D_a t \quad (51)$$

Em que o primeiro termo da equação representa o desvio médio quadrático da posição das partículas compondo o sistema ao longo do tempo de simulação e a constante D_a é a constante de difusão da partícula sendo considerada, em relação ao sistema em que ela se encontra. Essa propriedade pode ser extraída das simulações através da utilização do algoritmo computacional implementado no `g_msd`, também presente no GROMACS. É importante destacar que na sua configuração padrão, utilizada nesse trabalho, 10% da trajetória, no início e no fim da simulação, não é contabilizada, de modo a melhorar o ajuste da curva de desvio médio quadrático da posição das partículas ao longo do tempo. Dessa forma, as curvas apresentadas no Apêndice 5, relativo a seção de resultados, têm apenas o intervalo entre 10 ns e 90 ns sendo efetivamente utilizado para realizar o ajuste linear e avaliação do coeficiente de difusão dos íons.

2.3.6 Função de autocorrelação

A função de autocorrelação é uma ferramenta matemática que determina quanto peso estatístico certo evento dentro do espaço amostral imprime no evento subsequente, em outras palavras, qual a correlação entre dois eventos subsequentes ou o quanto um condiciona outro.

Em dinâmica molecular é muito importante avaliar a função de autocorrelação das estruturas sendo modeladas de modo a verificar se a amostragem dos seus espaços de fase está sendo satisfatória. Essa variável está limitada aos valores entre 1 e -1, sendo o valor 1 o que implica em uma correlação perfeita entre os eventos e -1 uma anti-correlação perfeita. O valor nulo indica nenhuma correlação entre os eventos, e é o que se deseja em uma simulação computacional (VAN DER SPOEL *et al.*, 2010).

A função de autocorrelação para qualquer propriedade $f(t)$ que se queira avaliar é dada pela Equação 52. Através de uma adaptação, em Dinâmica Molecular, a função de autocorrelação é medida através da seguinte expressão, Equação 53.

$$C_f(k) = \frac{E[(f(t) - \mu)(f(t + k) - \mu)]}{\sigma^2} \quad (52)$$

$$C_f(j\Delta t) = \frac{1}{N-j} \sum_{i=0}^{N-1-j} f(i\Delta t)f((i+j)\Delta t) \quad (53)$$

Onde E é o valor esperado das funções definidas na Equação 52, μ é a média da propriedade sendo medida, σ é o seu desvio padrão em torno da média. Na Equação 53, N é o número de eventos amostrados e Δt é o espaço temporal entre esses eventos.

A fim de calcular a função de autocorrelação para as propriedades do sistema sendo estudado, foi utilizada a rotina computacional `g_analyze` do GROMACS.

2.3.7 Função Distribuição Radial de Pares (RDF)

A função de distribuição radial de pares, ou como é conhecida, $g(r)$, é uma medida de correlação das partículas, assim como explica Madeira e Vitiello (2012). É uma ferramenta importante que pode fornecer informações acerca do ordenamento das partículas presentes no sistema simulado. De outra forma, ela pode fornecer informações de como e quão ordenadas as partículas B existentes em um sistema, estão no em torno de uma partícula A. É uma informação útil para observar as camadas de solvatação de íons em solução e, conseqüentemente, para calcular o seu número de coordenação. Na Equação 54 está representada uma das formas de se calcular essa propriedade.

$$g_{AB}(r) = \frac{\langle \rho(r) \rangle}{\langle \rho_{local} \rangle} \quad (54)$$

Em que $\rho(r)$ é a densidade calculada de partículas B a uma distância r da partícula A em consideração e ρ_{local} é a densidade local, nesse mesmo valor de r para um sistema composto por partículas que não interagem, ou seja, para um sistema composto por gases ideais. Essa razão fornece qual a magnitude e a forma da interação realizada as partículas A e B. Se houver uma interação de atração, então a densidade calculada será maior que a dos gases ideais e o valor de $g(r)$ é maior que a unidade. Entretanto, para interações repulsivas, a densidade calculada será menor que a dos gases ideais e a $g(r)$ será menor que a unidade. Portanto, o formato dessa função e a intensidade dos picos nela existentes podem trazer informações importantes acerca das interações existentes entre as partículas do sistema.

Em Dinâmica Molecular essa propriedade é calculada através da Equação 55.

$$g_{AB}(r) = \frac{1}{\langle \rho_{local} \rangle} \frac{1}{N_A} \sum_{i \in N_A} \sum_{j \in N_B} \frac{\delta(\|\vec{r}_{ij}\| - r)}{4\pi r^2} \quad (55)$$

Em que N_A e N_B são, respectivamente, o número de partículas tipo A e tipo B no sistema, e a função dentro do somatório é a função delta de Dirac que é responsável por calcular o número de partículas B em uma posição $\vec{r}_{ij}$ em relação as partículas A.

A função de distribuição radial de pares pode ser calculada através de uma rotina computacional presente no GROMACS, o `g_rdf`.

2.3.8 Análise de *clusters*

Essa é uma análise muito utilizada em mineração de dados como técnica de classificação e identificação não supervisionadas. Seu objetivo é através da utilização de variáveis de similaridade, particionar um grupo de dados em diferentes aglomerados de modo que estes se apresentem tão homogêneos quanto possível, mas heterogêneos entre si.

De acordo com Milligan e Cooper (1987), existem centenas de diferentes metodologias de agrupamento não supervisionado, podendo elas, contudo, ser divididas em quatro grandes grupos. As técnicas de agrupamento hierárquico, por particionamento, por ordenação e por sobreposição.

A técnica utilizada neste trabalho se pode ser classificada como uma técnica de agrupamento por particionamento, onde o conjunto de dados em estudo será dividido segundo condições impostas previamente gerando um número não fixado de *clusters*, que será a base dos estudos sobre a variabilidade conformacional das moléculas de polimixina.

A condição utilizada para a formação dos agrupamentos foi baseada na raiz do deslocamento médio quadrático das estruturas (RMSD). Em uma coleção de estruturas de polimixina, foram calculados os valores de RMSD para cada possível par dentro desse conjunto. Em seguida, para cada estrutura foram atribuídos vizinhos cujo valor de RMSD relativo a essa estrutura estivesse dentro de 1 Å. A estrutura com maior número de vizinhos foi separada em um *cluster*, que é retirado da coleção juntamente com seus vizinhos. O processo continua até que cada estrutura tenha sido atribuída a um único *cluster* (DAURA *et al.*, 1999).

A análise de *clusters* pode ser calculada através de uma rotina computacional presente no GROMACS, o *g_cluster*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DESENVOLVIMENTO ESTRUTURAL DA POLIMIXINA B

3.1.1 Validação dos parâmetros atômicos

Seguindo a descrição dada na seção metodológica, serão apresentados os resultados das simulações da polimixina B levando-se em consideração os diferentes parâmetros de campo de força (GROMOS 53A6 / 54A7), os diferentes tratamentos eletrostáticos de longa distância (PME / Campo de Reação) e as diferentes técnicas de amostragem da dinâmica conformacional do sistema (Dinâmica molecular Clássica / *Simulated Annealing*). Estes protocolos foram comparados e validados em função da representação do ensemble conformacional da polimixina B em solução por espectroscopia de RMN e por simulações de DM. Portanto, os valores experimentais para o acoplamento vicinal próton-próton ($^3J_{HN,H\alpha}$) na cadeia principal do polipeptídeo foram comparados com os valores calculados a partir do ensemble estrutural gerado por simulações de DM (PRITOVSEK e KIDRIC, 1999).

Através desse tipo de análise é possível verificar quais conjuntos de parâmetros de campo de força e TELD melhor habilitam o modelo computacional a reproduzir dados experimentais. Uma vez que os dados de acoplamento vicinal dependem diretamente da conformação espacial da molécula, é possível inferir que a estrutura modelada e simulada estará tão próxima da estrutura real quanto mais próximos estiverem os valores de acoplamento calculados dos experimentais. Assim, pelos resultados apresentados, é possível verificar que o conjunto de parâmetros GROMOS54A7 combinados com a utilização do método de campo de reação (*Reaction Field*) como TELD permitem uma melhor reprodução dos valores $^3J_{HN,H\alpha}$ experimentais como assinalado pelos valores de desvio médio quadrático do erro (RMSD) entre os resultados computacionais e experimentais.

Com essa combinação de parâmetros e tratamentos compondo a melhor configuração para as simulações computacionais foi então possível realizar a avaliação estrutural para as outras variantes de polimixina. Os dados de acoplamento vicinal para cada uma das variantes podem ser verificados na Tabela 7 juntamente com os dados experimentais disponíveis para as variantes B1 e E1 (Pritovsek e Kidric, 1999).

Tabela 6. Comparação dos valores de acoplamentos vicinais $^3J_{\text{HN,H}\alpha}$ obtidos por espectroscopia de RMN e calculados para o conjunto de conformações amostrados com diferentes protocolos de simulação.

Resíduos	Sequência*	Exp.	Calc. $^3J_{\text{HN,H}\alpha}$			
		$^3J_{\text{exp}}$	53a6/PME	54a7/PME	53a6/RF	54a7/RF
DAB	1	7.0	7.76 ± 1.99	6.46 ± 1.95	8.10 ± 1.94	6.46 ± 2.02
THR	2	7.0	7.39 ± 2.29	6.43 ± 2.03	7.62 ± 2.30	6.66 ± 1.98
DAB	3	7.5	7.96 ± 1.92	6.93 ± 1.86	7.81 ± 2.05	5.84 ± 2.00
DAB	4	6.9	7.87 ± 2.18	7.06 ± 1.96	8.11 ± 1.98	6.14 ± 1.68
DAB	5	7.0	7.68 ± 2.01	7.97 ± 1.69	7.52 ± 2.16	7.79 ± 1.94
DPHE	6	5.2	8.07 ± 2.22	4.81 ± 1.76	7.06 ± 2.27	5.63 ± 2.59
LEU	7	8.2	7.24 ± 2.11	5.96 ± 1.62	8.26 ± 1.77	7.17 ± 2.01
DAB	8	5.9	5.26 ± 2.02	7.38 ± 1.93	8.33 ± 2.00	6.39 ± 2.19
DAB	9	7.4	6.98 ± 2.42	6.09 ± 0.64	5.29 ± 1.83	5.78 ± 2.16
THR	10	7.2	8.46 ± 1.69	5.56 ± 1.37	6.88 ± 2.18	5.97 ± 0.84
RMSD			1.17	1.17	1.32	1.06

(*A sequência dos aminoácidos pertencente à cadeia polipeptídica é definida na Figura 2 e Tabela 1.)

Embora esses resultados se mostrem satisfatórios, os mesmos devem ser também avaliados a partir de outras perspectivas. Em todo desenvolvimento de simulações computacionais várias propriedades devem ser avaliadas de modo a se entender mais do que um único gráfico pode informar sobre o sistema sendo modelado. Para esse sistema, por exemplo, a avaliação de quão representativos se mostraram os valores de acoplamento vicinal em relação aos dados experimentais não nos informa sobre o tempo de simulação necessário o sistema atingir convergência conformacional, qual o intervalo de tempo ou número de passos de integração foram necessários para que a estrutura perdesse correlação com a estrutura inicial, qual foi o espaço de conformações assumidas pelo polipeptídio. Em resumo, muitas análises são necessárias para discutir a validade do modelo quanto à sua capacidade de reproduzir dados experimentais. Portanto, seguem aqui alguns dos pontos a serem avaliados para verificação desse modelo computacional.

Tabela 7. Comparação dos valores de acoplamentos vicinais $^3J_{\text{HN,H}\alpha}$ obtidos por espectroscopia de RMN e calculados para o conjunto de conformações amostrados com o protocolo (GROMOS54A7/Campo de Reação) três variantes de Polimixina

Resíduos	Sequência*	PmxB		PmxE		PmxM
		$^3J_{\text{exp}}$	$^3J_{\text{calc}}$	$^3J_{\text{exp}}$	$^3J_{\text{calc}}$	$^3J_{\text{calc}}$
DAB	1	7.0	6.46 ± 2.02	7.5	5.89 ± 1.77	6.40 ± 1.57
THR	2	7.0	6.66 ± 1.98	7.3	8.44 ± 1.74	6.71 ± 1.90
DAB	3	7.5	5.84 ± 2.00	7.1	8.34 ± 1.78	6.54 ± 2.29
DAB	4	6.9	6.14 ± 1.68	6.5	7.04 ± 1.51	6.22 ± 1.50
DAB	5	7.0	7.79 ± 1.94	7.8	7.56 ± 2.07	6.83 ± 1.79
R-6	6	5.2	5.63 ± 2.59	5.6	3.96 ± 1.25	3.56 ± 1.44
R-7	7	8.2	7.17 ± 2.01	8.2	6.86 ± 1.78	6.12 ± 1.89
DAB	8	5.9	6.39 ± 2.19	7.3	6.26 ± 1.63	5.56 ± 1.66
DAB	9	7.4	5.78 ± 2.16	8.2	5.34 ± 1.37	6.62 ± 1.78
THR	10	7.2	5.97 ± 0.84	7.4	5.87 ± 0.67	5.51 ± 1.24
RMSD			1.06		1.48	

(*A sequência dos aminoácidos pertencente à cadeia polipeptídica é definida na Figura 2 e Tabela 1.)

Como primeira análise complementar a análise dos acoplamentos vicinais, foi realizada a avaliação da função de autocorrelação da estrutura do peptídeo para verificar quão rápido este perde a memória conformacional com relação à conformação inicial. Portanto, essa análise mostra o tempo ao longo da simulação no qual as conformações da molécula tornam-se independentes umas das outras. Essa propriedade é importante pois pode informar se a metodologia de amostragem está sendo satisfatória, de modo a explorar diferentes regiões da superfície de energia potencial do sistema. Se o tempo necessário para que a correlação entre as conformações amostradas seja perdido é demasiado longo, então esse é um indício de que a simulação está amostrando um espaço conformacional restrito, de modo que mudanças conformacionais observadas são muito próximas e não refletem, portanto, todas as conformações compondo a SEP do sistema. Essa característica também pode ser verificada no caso onde as conformações amostradas fazem parte de um mínimo de energia cuja barreira não é transponível na temperatura em que a simulação está sendo realizada.

É possível verificar que dentre as simulações da polimixina B aquela que obteve os melhores resultados de acoplamento vicinal em relação aos dados experimentais também apresenta um tempo de correlação longo, aproximadamente 30 ns, para que as conformações compondo uma partição do espaço amostral da SEP se tornem totalmente independentes umas das outras (Figura 10). Portanto, é imprescindível utilizar-se uma técnica de amostragem melhorada para a simulação desse sistema, de modo a diminuir esse tempo e garantir uma estatística mais completa sobre as possíveis conformações das moléculas de polimixina e melhor avaliar a capacidade do modelo em reproduzir dados experimentais.

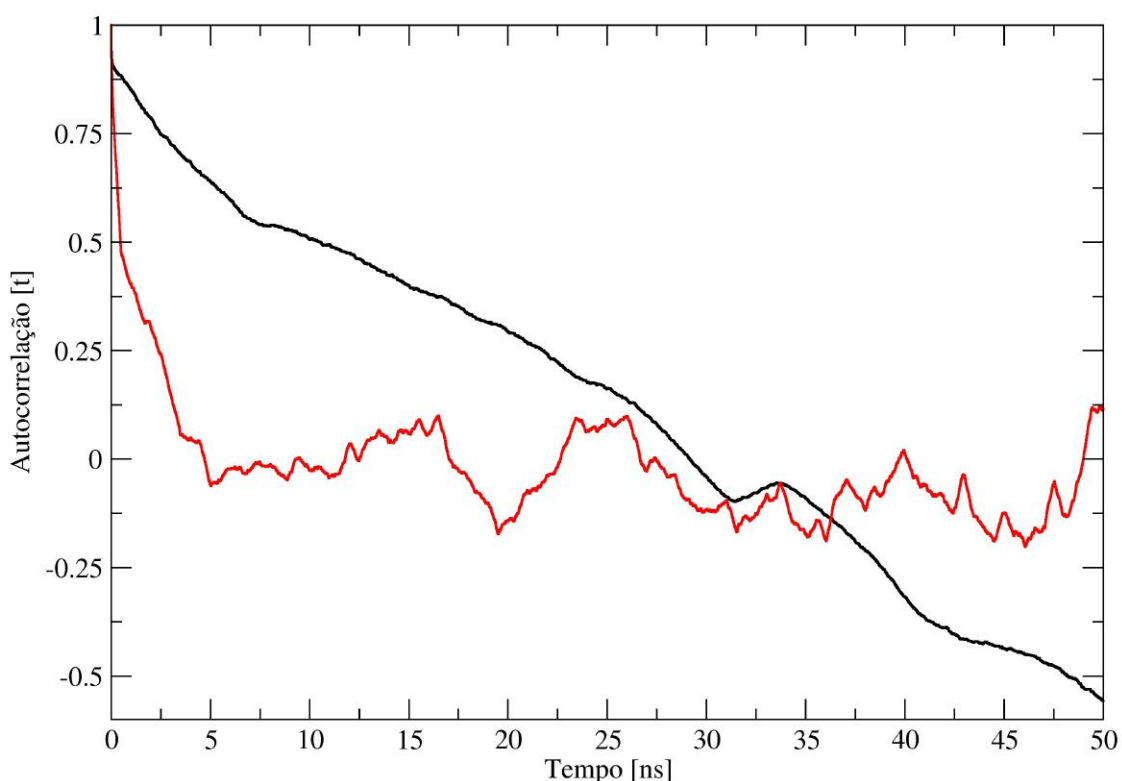


Figura 10. Função de autocorrelação para a cadeia do anel da Polimixina B quando utilizando os parâmetros GROMOS54A7 e Campo de Reação. Em preto encontra-se a curva para a simulação a 300 K, enquanto que em vermelho encontra-se a curva para o mesmo sistema utilizando o método do Arrefecimento Simulado (*Simulated Annealing*).

A metodologia escolhida para melhor avaliar as possíveis conformações do antimicrobiano foi a do arrefecimento simulado, ou *Simulated Annealing* (SA) descrito na subsecção 2.1.10. Neste método o sistema é aquecido por um período determinado de tempo durante a simulação até uma temperatura suficiente para que a molécula transponha a barreira de energia necessária para amostrar conformações em mínimos de energia distintos, e em seguida é resfriado até a temperatura inicial de onde a simulação prossegue com essas novas conformações (BERNARDI, MELO e SHULTEN, 2015).

A análise da função de autocorrelação para as conformações amostradas pelo método do arrefecimento simulado mostra um decréscimo significativo no tempo necessário para que as conformações percam correlação entre si. Portanto, esse *ensemble* de conformações fornece melhores estimativas para a análise conformacional do polipeptídio, e melhor reproduz os dados experimentais (Figura 10). Utilizando agora as conformações obtidas através do método de amostragem melhorada para o cálculo das constantes de acoplamento vicinais $^3J_{\text{HN,H}\alpha}$ via a equação de Karplus (Equação 50), pode-se chegar aos resultados descritos na Tabela 8.

Tabela 8. Comparação dos valores de acoplamentos vicinais $^3J_{\text{HN,H}\alpha}$ obtidos por espectroscopia de RMN e calculados para o conjunto de conformações amostrados com o protocolo (GROMOS54A7/campo de Reação/DM-SA) para três variantes da polimixina

Residues	Sequência*	PmxB		PmxE		PmxM
		$^3J_{\text{exp}}$	$^3J_{\text{calc}}$	$^3J_{\text{exp}}$	$^3J_{\text{calc}}$	$^3J_{\text{calc}}$
DAB	1	7.0	6.39 ± 2.03	7.5	6.34 ± 1.95	6.42 ± 1.97
THR	2	7.0	7.14 ± 2.09	7.3	6.98 ± 2.05	6.93 ± 2.11
DAB	3	7.5	6.79 ± 2.12	7.1	6.43 ± 2.12	6.61 ± 2.16
DAB	4	6.9	6.54 ± 1.72	6.5	6.56 ± 1.75	6.70 ± 1.79
DAB	5	7.0	7.41 ± 1.93	7.8	7.23 ± 1.88	7.32 ± 1.91
R-6	6	5.2	5.07 ± 2.35	5.6	4.97 ± 2.32	5.06 ± 2.29
R-7	7	8.2	6.01 ± 1.96	8.2	6.14 ± 2.02	6.14 ± 2.05
DAB	8	5.9	6.24 ± 2.04	7.3	6.33 ± 2.05	6.66 ± 2.14
DAB	9	7.4	7.29 ± 1.76	8.2	7.47 ± 1.73	7.17 ± 1.74
THR	10	7.2	6.06 ± 1.94	7.4	5.91 ± 1.83	5.83 ± 1.84
RMSD			0.8621		1.0276	

(*A sequência dos aminoácidos pertencente à cadeia polipeptídica é definida na Figura 2 e Tabela 1)

É importante notar que houve uma melhor reprodução dos resultados experimentais pelas simulações obtidas por amostragem melhorada (cerca de 23% para polimixina B e 44% para polimixina E) quando comparados com os resultados prévios, indicando primeiramente que a metodologia de amostragem utilizada foi eficiente em visitar regiões antes não acessíveis e necessárias para validação do modelo. Em segundo lugar, os resultados

apresentados na Tabela 7 são menos acurados por oferecerem uma amostragem deficiente do espaço conformacional da molécula, e não traduzindo corretamente o desempenho do modelo em reproduzir os dados experimentais.

Como uma segunda análise complementar aos dados de acoplamento vicinal descritos, foi realizada uma avaliação das conformações acessíveis às variantes de polimixina durante as simulações. Isto pode ser obtido através da construção de diagramas de Ramachandran para cada variante de polimixinas como descritos na subsecção 2.3.5 (Figura 11). Tais diagramas permitem verificar dentro da metodologia de amostragem utilizada, quais as combinações dos ângulos diédricos ϕ (N-C α) e ψ (C α -C) definindo as conformações adotadas pela cadeia principal do polipeptídeo, e por conseguinte, quais conformações foram visitadas durante as simulações. Com essa informação é possível comparar diretamente os ensembles conformacionais obtidos por espectroscopia de RMN e por simulações de DM.

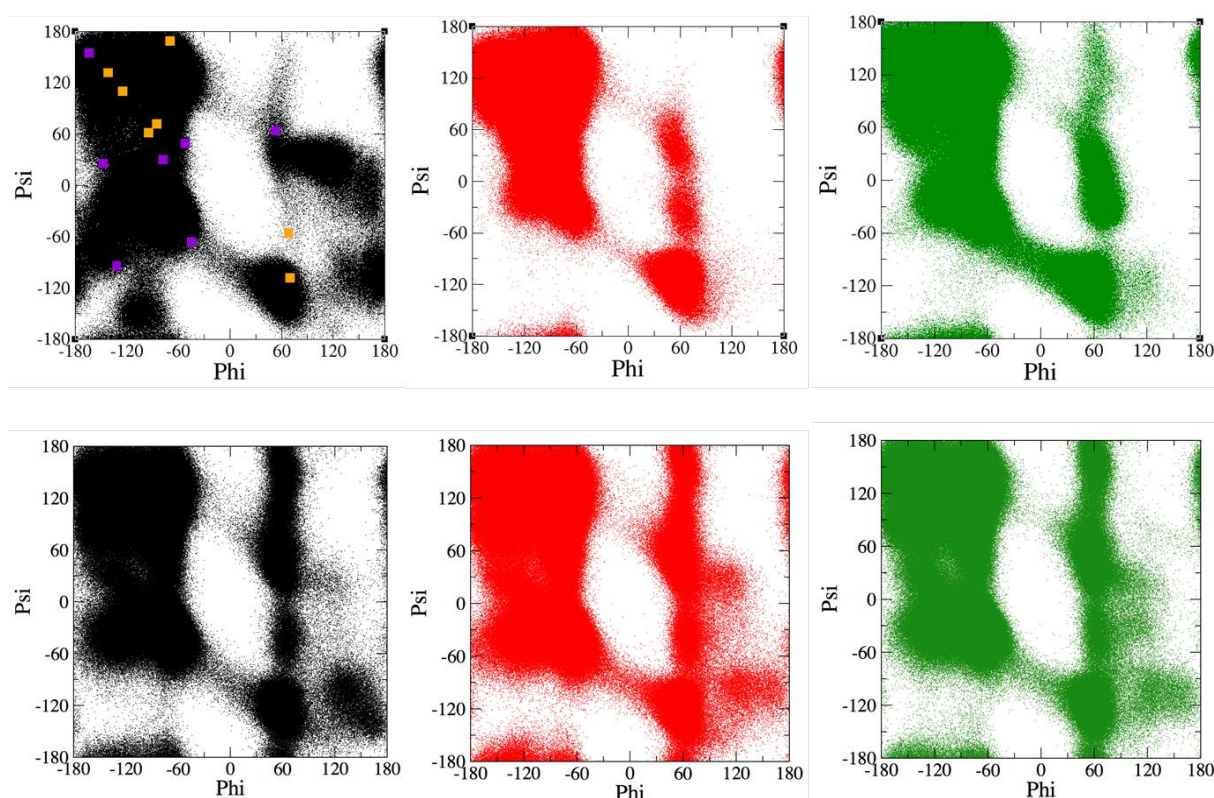


Figura 11. Diagrama de Ramachandran para variantes de polimixinas: polimixina B (preto), polimixina E (vermelho) e polimixina M (verde). Na linha superior são mostrados os resultados para as simulações com DM e na linha inferior com DM/SA. Os pontos amarelos e purpúreos correspondem aos valores de $^3J_{\text{HN,H}\alpha}$ obtidos experimentalmente por espectroscopia de RMN (PRITOVSEK e KIDRIC, 1999).

Várias conclusões podem ser obtidas a partir dos diagramas de Ramachandran calculados para as variantes da polimixinas (Figura 11). A primeira e mais importante delas é que o modelo desenvolvido e testado através do uso de vários protocolos de simulação

considerando diferentes parâmetros de campo de força e tratamentos eletrostáticos de longo alcance representa efetivamente o ensemble conformacional em solução determinado experimentalmente. A convergência entre o ensemble conformacional amostrado experimentalmente e computacionalmente pode ser verificado em cada gráfico através de toda a região demarcada. Uma parte mais significativa dessas regiões também pode ser verificadas nos estudos de Pritovsek e Kidric (1999) onde é proposta uma família de conformações prováveis para a polimixina B, com as duas mostradas no gráfico acima dadas apenas como as representantes que mais concordam com os valores experimentais de NOE por eles verificados. É importante notar que embora os autores tenham obtidos algumas medidas de NOE para a polimixina B, estes não foram suficientes e nem possuíam a intensidade minimamente necessária para a obtenção de estruturas tridimensionais. Desta forma, duas famílias de conformeros preenchem as distâncias inter-atômicas derivadas das medidas de NOEs (Figura 12), indicando o alto grau de flexibilidade deste peptídeo cíclico. Em adição, pode-se perceber que, assim como anteriormente, todos os pontos experimentais (Figura 12) estão contidos nas regiões amostradas no decorrer das simulações (Figura 11).

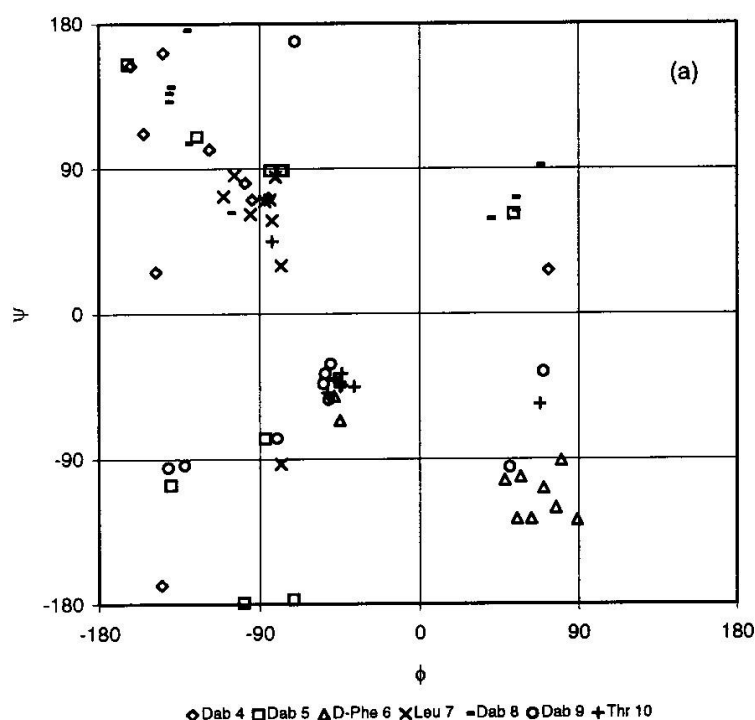


Figura 12. Gráfico de Ramachandran para as 10 melhores estruturas da família representada pelas duas conformações descritas na Tabela 2. **Fonte:** PRITOVSEK e KIDRIC, 1999.

Uma outra conclusão importante é que não foi necessário a utilização da metodologia de amostragem melhorada (DM/SA) para que o ensemble conformacional experimental fosse

representado em sua completude durante as simulações das variantes da polimixina. Contudo, a amostragem melhorada foi necessária para reproduzir de forma acurada os valores de acoplamento vicinal. Essa conclusão é intuitiva se colocado no contexto explicitado na subsecção 2.1.1, onde foram feitas considerações prévias acerca da metodologia de DM. De forma objetiva, a média das configurações compondo o espaço de estruturas amostradas durante a dinâmica se aproxima dos resultados reais à medida em que a amostragem, num tempo de simulação suficientemente longo, alcança todas as conformações possíveis para o sistema. Essa afirmação encontrada no trabalho de van der Spoel *et al.* (2010), é justificada pelo fato de que não importa o quão rápidas sejam as medidas experimentais, elas sempre serão resultados médios da distribuição da propriedade de interesse. Assim, há mais regiões visitadas nos sistemas onde foi utilizada a amostragem melhorada do que nos sistemas transcorridos sobre a dinâmica convencional (Figura 11). Isso explica, portanto, a melhor concordância com os resultados de acoplamento vicinal para os sistemas que foram periodicamente aquecidos e resfriados de modo a explorar a SEP do sistema.

A última conclusão acerca dos gráficos da Figura 11 é acerca de quais regiões foram visitadas durante a simulação. Experimentalmente é verificada a existência característica de uma volta β distorcida do tipo II entre os resíduos 5 e 8 da cadeia principal, ou seja, entre os dois ácidos L- α,γ -diaminobutírico nos limites da região onde ocorrem as modificações específicas de cada variante de polimixina, e uma volta γ no resíduo 10, a treonina (THR - ácido 2-amino-3-hidroxibutanoico). De acordo com Hovmoller, Zhou e Ohlson (2002) a região do diagrama de Ramachandran específica para esse tipo de conformação situa-se ao redor dos valores de 60° para φ e ψ , com a característica de um alongamento do tipo $\varphi = -\psi$. Essa região é seguramente amostrada dentro do espaço de conformações acessadas durante as simulações, como pode ser verificado em cada gráfico da Figura 11, bem como no gráfico experimental da Figura 12, concordando mais uma vez com as conclusões anteriores e explicitando a eficiência do modelo desenvolvido.

Assim sendo, através de todas essas conclusões é possível inferir que as estruturas desenvolvidas, juntamente com os parâmetros escolhidos podem seguramente ser utilizados para prever o comportamento real desses antimicrobianos frente a diferentes ambientes, bem como no estudo das interações dessas moléculas com membranas externas bacterianas.

3.1.2 Análise da conformação mais representativa do ensemble conformacional amostrado

Uma vez validados os parâmetros, é desejável identificar a conformação predominante para o ensemble de conformações amostrados para cada uma das variantes da classe de polimixinas, nas quais estejam ineridas todas as propriedades relevantes descritas no tópico anterior para que, assim, possam ser utilizadas nos estudos acerca da interação entre esses antimicrobianos e membranas externas de *P. aeruginosa*. Para obter-se tais estruturas é conveniente realizar uma análise de agrupamento por similaridade conformacional ou *cluster* de forma a identificar uma conformação média que seja representativa das propriedades estruturais da conformação predominante amostrada. A análise de agrupamento por similaridade conformacional mostra o número de famílias estruturais identificados e separados considerando a raiz do desvio médio quadrático (RMSD) entre essas conformações como 1 Å (Figura 13). Tal valor é idêntico ao utilizado na análise simplificada de Pritovsek e Kidric (1999) para gerar a família de estruturas que utilizada na modelagem estrutural relatado neste trabalho.

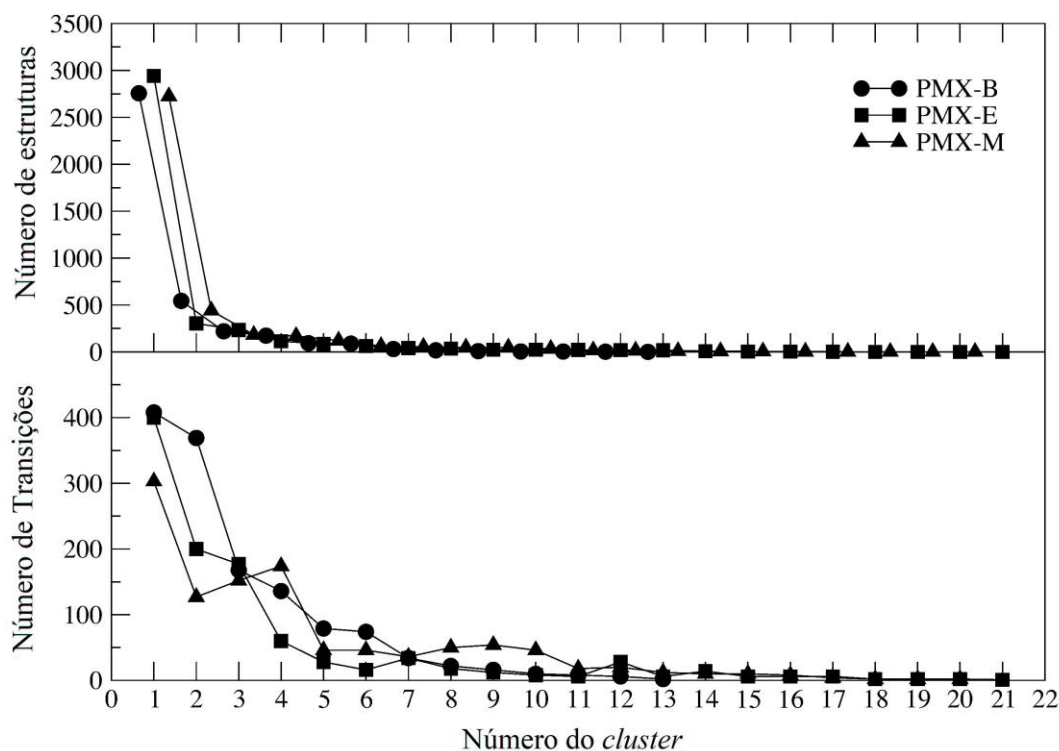


Figura 13. Descrição das famílias estruturais agrupadas por similaridade conformacional (RMSD = 1 Å) identificadas para cada variante de polimixina na simulação com o protocolo GROMOS 54A7, campo de reação e amostragem DM/SA.

Com o valor de RMSD utilizado foram diferenciadas 13 famílias estruturais para a polimixina B, 21 para a polimixina E e 20 para a polimixina M. Pode-se identificar em todas três simulações ao menos um agrupamento altamente populado, o qual participa invariavelmente das principais transições estruturais com os demais grupos de conformações (Figuras 14-16). O número de transições indica um *scaffold* estrutural bastante flexível, consistente com o baixo número de NOEs medidos experimentalmente. Observa-se também que as conformações mais representativas de cada variante exibe ligações de hidrogênio entre os resíduos 5 e 8 da cadeia principal, configurando a estrutura secundária de volta β distorcida do tipo II, consistente com o modelo estrutural derivado de medidas de espectroscopia de RMN (PRITOVSEK E KIDRIC, 1999).

A dinâmica conformacional das variantes da polimixina é ligeiramente diferentes, com as variações recaindo sobre transições entre famílias estruturais menos populadas (Figuras 14-16). Esse fato não necessariamente indica que cada variante possui uma dinâmica conformacional diferente, mas que possivelmente a simulação não foi longa o suficiente para que, por exemplo, as transições apresentadas por uma delas pudessem também ser verificadas nas outras. Além do mais, uma vez que essa análise conformacional tenha sido realizada sobre a dinâmica utilizando o Arrefecimento Simulado, onde o sistema foi mantido efetivamente na temperatura de análise (300 K) por apenas 40% do tempo de simulação, os resultados não são conclusivos acerca da diferenciação entre as variantes.

Entretanto, mesmo não sendo possível diferenciar efetivamente a dinâmica dos tipos de polimixina simuladas, pode-se verificar a alta similaridade conformacional entre essas variantes. Esta similaridade pode ser inferida através da comparação entre os i. diagramas de Ramachandran para as polimixinas B, E e M (Figura 11), ii. da análise do número de agrupamentos conformacionais (Figura 13), iii. do número de estruturas na família mais populada para cada variante, iv. da constatação de que em todas as simulações existem pelo menos as mesmas transições entre o primeiro, segundo e terceiro grupo de conformações mais populadas, e v. da superposição da cadeia principal da estrutura mais representativa de cada variante (Figura 17).

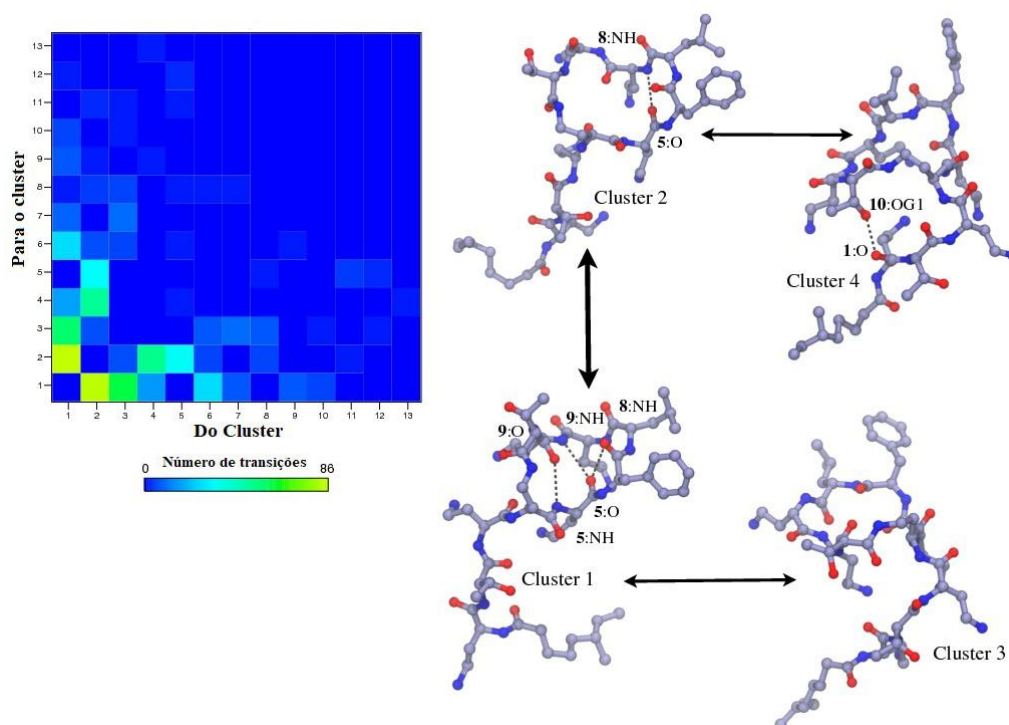


Figura 14. Transições entre famílias estruturais da polimixina B. Ligações de hidrogênio demarcadas pelas linhas pontilhadas. A Matriz indica o número de transições entre os agrupamentos, que é também representada na espessura da seta de equilíbrio entre as estruturas.

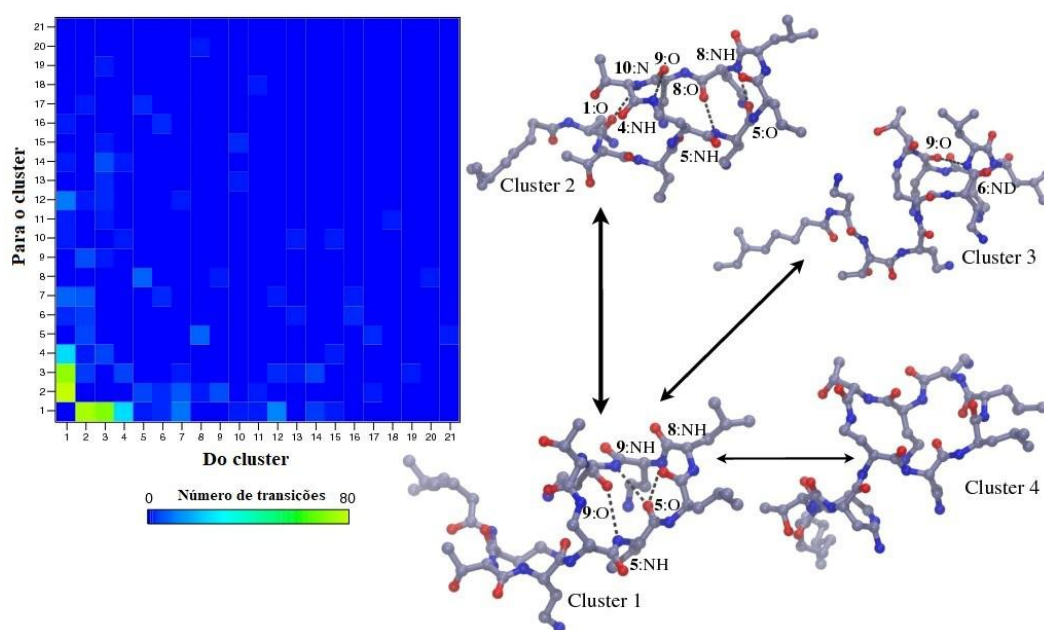


Figura 15. Transições entre famílias estruturais da polimixina E. Ligações de hidrogênio demarcadas pelas linhas pontilhadas. A Matriz indica o número de transições entre os agrupamentos, que é também representada na espessura da seta de equilíbrio entre as estruturas.

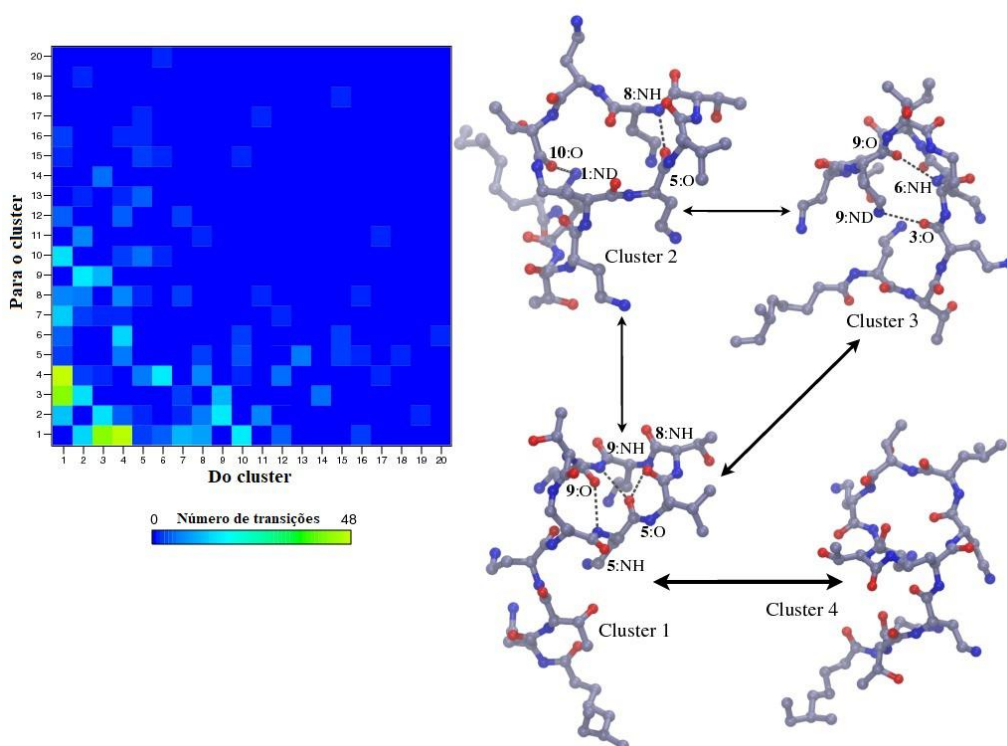


Figura 16. Transições entre famílias estruturais da polimixina M. Ligações de hidrogênio demarcadas pelas linhas pontilhadas. A Matriz indica o número de transições entre os agrupamentos, que é também representada na espessura da seta de equilíbrio entre as estruturas.

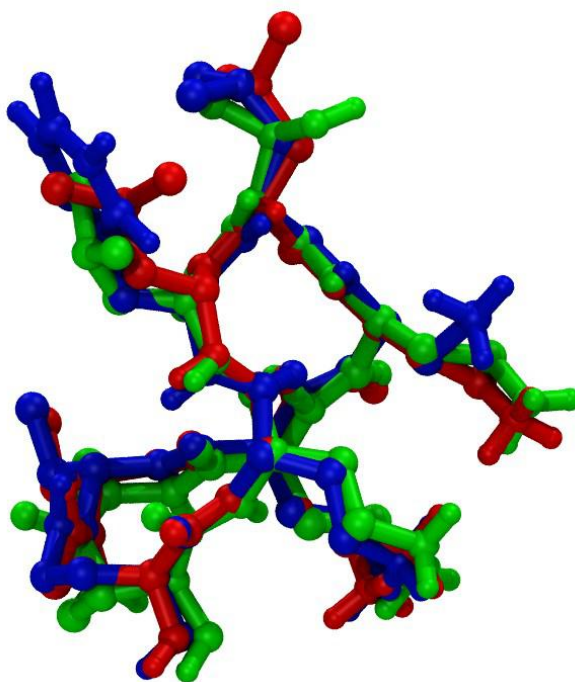


Figura 17. Superposição da conformação predominante amostrada por DM/SA para polimixina B, E e M, em azul, vermelho e verde respectivamente. Superposição feita a partir dos átomos N, C α , C, O da cadeia principal de cada variante.

É evidente que as polimixinas B, E e M guardam uma significativa semelhança estrutural que é utilizada nas simulações incluindo diferentes quimiotipos do LPS como uma simplificação que possibilita a redução do trabalho necessário para o estudo sistemático das interações entre esses antimicrobianos e as membranas externas bacterianas. Assim, as simulações envolvendo as bicamadas lipopolissacarídicas foram realizadas apenas para a polimixina B visto que esta variante tem sido experimentalmente caracterizada de forma mais extensiva, além dos resultados apresentados indicarem que essa variante pode, sem prejuízo às conclusões a serem extraídas, representar a conformação das demais variantes. Adicionalmente, medidas experimentais de espectroscopia de RMN foram realizadas para a polimixina B em solução e em agregados de lipídeo A, um dos quimiotipos do LPS abordado neste trabalho (PRITOVSEK E KIDRIC, 1999).

Para finalizar esse tópico de análise das polimixinas, encontra-se no Apêndice 3 o motivo de todo esse trabalho. Uma estrutura extraída das simulações e representativa da conformação experimental desse antimicrobiano em formato PDB. Essa estrutura é a mais populada da simulação da polimixina B utilizando os parâmetros do conjunto GROMOS 54A7 e o *Reaction Field* como tratamento eletrostático de longa distância e foi extraída da análise descrita acima. Essa mesma conformação pode ser utilizada para gerar a conformação das outras variantes, uma vez assinalada a semelhança estruturais entre elas.

3.2 BICAMADA LIPOPOLISSACARIDICA

Antes de iniciar a discussão dos resultados referentes às interações entre polimixinas e membranas lipopolissacarídicas é necessário avaliar a estabilidade do modelo atômico desenvolvido para o estudo conformacional das membranas lipopolissacarídicas da bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa*. Posteriormente, esses sistemas lipopolissacarídicos serão comparados com os sistemas equivalentes contendo múltiplas cópias da polimixina B. A seguir serão apresentadas análises propriedades estruturais como área por lipídeo, difusão espacial dos contra-íons da membrana, e perfil de densidade de cada componente dos sistemas simulados e descritos na Tabela 4.

3.2.1 Área por lipídeo e espessura da bicamada

A área por lipídeo é uma medida do grau de empacotamento dos lipídeos constituindo as membranas estudadas. Esta grandeza tem relação direta com as forças de interação entre

cada molécula, com a geometria do agregado lipídico, com o número de cadeias alquílicas em cada lipídeo e com o quimiotipo bacteriano no caso de membranas lipopolissacarídicas (DIAS *et al.*, 2014). Para um mesmo lipídeo, essa propriedade estrutural pode ser modificada pela manipulação da temperatura e pelo tipo do contra-íon presente no sistema, assim como descrevem os trabalhos de Nascimento *et al.* (2014) e Pontes *et al.* (2012). O grande benefício da utilização desse parâmetro para avaliação dos sistemas consiste no fato de que essa propriedade pode ser diretamente comparada com resultados experimentais e informar se o modelo proposto para a bicamada condiz com o esperado a fim de que possa ser utilizado para prever o comportamento da bicamada quando frente aos antimicrobianos (BRANDERBURG *et al.*, 1999; SNYDER, KIM e MCINTOSH, 1999).

O cálculo dessa propriedade foi realizado para todos os sistemas simulados neste trabalho (Figura 18, Tabela 4). Esta análise descreve os sistemas partindo de uma configuração inicial criada manualmente, então os primeiros nanossegundos de simulação correspondem à fase de equilíbrio e, portanto, não foram considerados em nenhuma das análises discutidas a seguir. Assim, observando os valores de área por lipídeo para os últimos 20 ns é possível extrair informações dos sistemas.

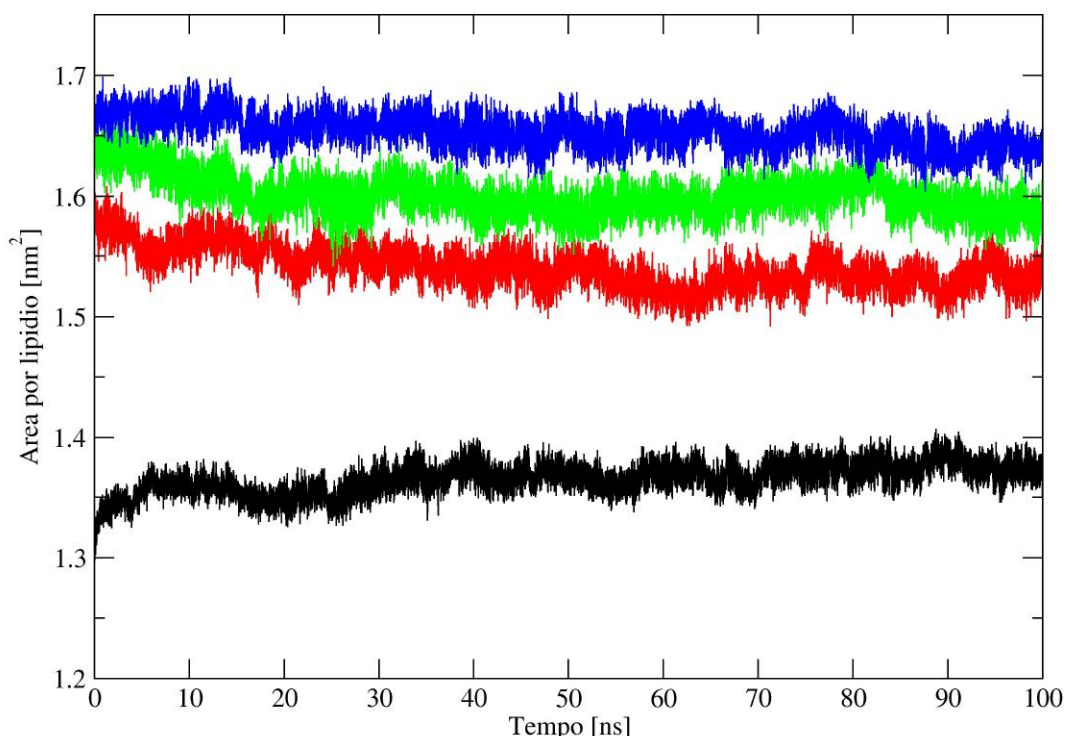


Figura 18. Perfil da área por lipídeo para bicamadas lipopolissacarídicas compostas por diferentes quimiotipos do LPS de *P. aeruginosa* (Tabela 4). Em preto tem-se o lipídeo A penta-acilado, em vermelho o lipídeo A hexa-acilado, em verde o lipídeo A penta-acilado com adição da 4-amino-4-deoxy-1-arabinose e em azul o lipídeo A com adição de duas unidades de KDO, configurando o conhecido LPS RE (Apêndice 2).

É possível perceber duas tendências interessantes nesse gráfico. A primeira refere-se ao efeito da adição de cadeias alquílicas ao lipídeo A. Como pode ser verificado pela relação entre o perfil para o lipídeo A penta e hexa-acilados, quanto maior o número de cadeias alquílicas, maior a área ocupada pelo lipídeo na membrana e, por conseguinte maior o valor da razão área por lipídeo. Esse resultado é intuitivo e foi reportado para membranas lipopolissacarídicas através de simulações computacionais no trabalho de Pontes *et al.* (2012) e em medidas experimentais no trabalho de Snyder, Kim e McIntosh (1999). Nesse último, foram analisadas as áreas por lipídeos para *P. aeruginosa* e duas cepas de *Salmonella*, a saber, *S. minnesota* e *S. typhimurium*. Nos trabalhos foram verificados valores de área por lipídeo para os quimiotipos hexa-acilados entre 1,50 e 1,54 nm², enquanto para o quimiotipos penta-acilados os valores ficaram entre 1,30 e 1,42 nm² o que está perfeitamente consistente com os resultados obtidos (Figura 18). A segunda tendência diz respeito ao efeito da adição de sacarídeos sobre a superfície do lipídeo. Como pode ser verificado pela observação dos perfis acima, a adição dos oligossacarídeos no *inner core* da membrana externa resulta no aumento do valor da área por lipídeo para cada constituinte dessa membrana. Essa tendência pode ser racionalizada em termos das forças eletrostáticas de repulsão entre as regiões polares da bicamada lipopolissacarídica e, mais significativamente, do grau de hidratação dos íons presentes nessas regiões. Quanto maior a cadeia de oligossacarídeos, maior a carga eletrostática em cada molécula de lipopolissacarídeo, consequentemente, maior a quantidade de contra-íons necessária para neutralizá-las. Assim, como será visto adiante, os contra-íons encontram-se altamente hidratados, implicando em um maior volume de moléculas de água na região polissacarídica que resulta no afastamento dos lipopolissacarídeos, constatado pelos resultados da análise de área por lipídeo nos diferentes quimiotipos.

Essa relação entre quimiotipos bacterianos e comprimento da região formada pelos oligossacarídeos foram reportadas por Brandenburg *et al.* (1999) e Dias *et al.* (2014), onde vários quimiotipos diferentes de *P. aeruginosa* e *S. minnesota* foram estudados permitindo a quantificação da área por lipídeo em relação a essas variáveis e confirmando satisfatoriamente o resultado apresentado. E essa confirmação vai além da observação dos valores e tendências para a área por lipídeo, no trabalho de Dias *et al.* (2014) é também mostrado que essa quantidade está correlacionada de modo inversamente proporcional com o valor de espessura hidrofóbica das membranas (hidrofóbica, pois foi calculada como as distâncias entre os limites da região hidrofóbica na bicamada). Assim, quanto maior o valor de área por lipídeo, menor o valor da espessura da bicamada. Essa observação pode ser verificado na Figura 19,

onde são mostrados os dados de espessura média de toda a bicamada como função do tempo de simulação para os sistemas estudados.

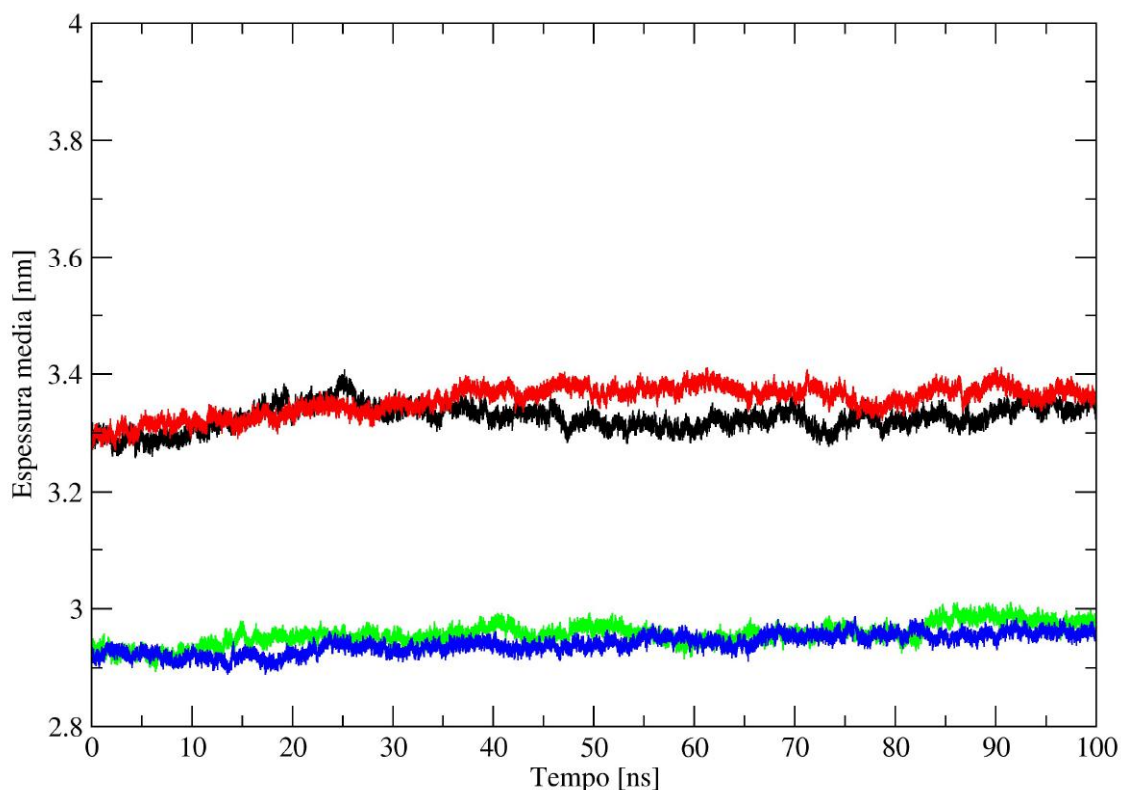


Figura 19. Resultados da espessura média da bicamada lipídica para os sistemas estudados. . Em preto tem-se o lípídeo A penta-acilado, em vermelho o lípídeo A hexa-acilado, em verde o lípídeo A penta-acilado com adição da 4-amino-4-deoxy-1-arabinose e em azul o lípídeo A com adição de duas unidades de KDO, configurando o conhecido LPS RE.

Pode-se observar que não há diferença significativa entre os valores das espessuras das bicamadas formadas quimiotipos com a mesma composição de monossacarídeos mas com diferente número de cadeias alquílicas. Embora algumas propriedades sejam diretamente relacionadas com o número de cadeias alquílicas do quimiotipo, como é o caso da área por lípídeo, não é possível verificar essa proporcionalidade no valor da espessura. Isso se dá por que o aumento da área causado pela adição de mais cadeias é no plano perpendicular ao eixo sobre o qual a análise de espessura é realizada, e sendo assim, essa última não sofre influência da primeira.

Em resumo, o modelo descrito para as membranas compostas por diferentes quimiotipos lipopolissacarídicos reproduz adequadamente as medidas experimentais disponíveis na literatura e, portanto, é esperado oferecer uma previsão do comportamento desses sistemas em diferentes condições em presença do peptídio antimicrobiano, polimixina B, conforme discutido adiante.

3.2.2 Difusão dos íons

Uma análise muito interessante para bicamadas contendo contra-íons é a avaliação da constante de difusão, ou difusividade molar. Essa grandeza está diretamente relacionada com o deslocamento médio quadrado através da equação de Einstein (Equação 51) e permite quantificar o grau de liberdade translacional que os íons apresentam em cada sistema. Um ponto positivo comum entre essa análise e área por lipídeo é que esta pode ser também comparada com resultados já estabelecidos na literatura, como por exemplo, através do trabalho de Dias *et al.* (2014), onde foram avaliadas as difusividades dos contra-íons nas membranas de diferentes quimiotipos de *P. aeruginosa*. Na Tabela 9, encontram-se os valores de difusividade dos íons de Ca^{2+} utilizados nas simulações para o lipídeo A e para o LPS Re. O lipídeo A contendo Ara4N possui uma carga total neutra e, portanto, não possui contra-íons.

É importante destacar que as medidas de difusividade são extraídas dos gráficos, de acordo com o que foi explicado na seção de análises, como o coeficiente angular da reta de ajuste desenvolvida sobre a curva que corresponde à relação entre desvio médio quadrático da posição das partículas e o tempo. Quão melhor o ajuste sobre a curva, menor o erro associado à medida. No Apêndice 5 podem ser encontrados gráficos do desvio médio quadrático da posição das partículas ao longo da simulação cujos coeficientes angulares correspondem aos valores explicitados na Tabela 9 e na Tabela 13 do tópico 3.3.7. O erro também está associado a uma medida estatística sobre os valores de difusividade tomados individualmente sobre cada íon, de modo que quanto mais semelhantes forem os comportamentos das partículas individuais, menor será o erro associado à medida apresentada (VAN DER SPOEL *et al.*, 2010).

Tabela 9. Difusividade dos íon Ca^{2+} , com respectivos desvios, para os diferentes sistemas apresentados.

Quimiotipo	Coeficiente de Difusão (Difusividade) [$10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$]		
	Plano xy	Eixo z	Total
LipA _{penta}	2.51 ± 0.25	1.00 ± 0.17	2.00 ± 0.22
LipA _{hexa}	1.02 ± 0.14	0.51 ± 0.02	0.85 ± 0.08
LPSRe	1.29 ± 0.36	0.93 ± 0.21	1.17 ± 0.17

É possível verificar que a difusão dos íons ocorre predominantemente ao longo do plano xy. Poderia ser especulado que este comportamento é devido às simulações terem sido realizadas sem concentração adicional de sais e, por conseguinte, com o número de íons necessários apenas para neutralizar a carga das moléculas de LPS constituindo as bicamadas simuladas. Em um meio de força iônica reduzida, seria mais favorável para os íons de Ca^{2+} permanecer próximo das membranas lipopolissacarídicas contendo vários grupos carregados negativamente do que difundir para o meio aquoso. Como será discutido mais adiante, uma simulação com concentração salina de 150 mM de NaCl foi realizada para contabilizar o efeito da força iônica sobre a difusão dos íons para um dos sistemas polimixinas adsorvidas à bicamada lipopolissacarídica, e observa-se o mesmo padrão de difusão de íons observado em simulações com força iônica reduzida, *i.e.* valores de constantes de difusão maiores ao longo da superfície da membrana que ao longo do eixo z. Adicionalmente, a análise da difusão iônica para os diferentes sistemas pode revelar um padrão interessante. Como reportado por Dias *et al.* (2014), quanto maior a cadeia de oligossacarídeos constituindo o quimiotipo, menor a difusão dos íons devido a interação destes na forma hidratada com os grupos funcionais dos carboidratos. Comparando os valores para o lipídeo A e o LPS Re penta-acilados, essa tendência torna-se evidente e mostra que, assim como as demais análises discutidas até aqui, os modelos moleculares utilizados reproduzem o comportamento observado experimentalmente.

3.2.3 Perfil de densidade das bicamadas lipopolissacarídicas compostas por diferentes quimiotipos

Após a avaliação das propriedades anteriores, chega a vez da análise dos perfis parciais de densidades dos sistemas simulados como ferramenta para descrever a configuração do sistema em termos da localização de cada um dos seus componentes, bem como para avaliar qualitativamente o grau de hidratação de cada um deles. O perfil ainda pode ser utilizado para verificar se as membranas seguem um perfil lamelar, caso onde as curvas se tornam simétricas em torno do centro do sistema. Todos esses detalhes juntamente com a possibilidade de comparar os perfis calculados com valores experimentais extraídos de difração/espalhamento de raio-X/nêutrons torna essa análise muito útil para avaliação do modelo molecular desenvolvido (SNYDER, KIM e MCINTOSH, 1999).

Os perfis de densidade parcial para os componentes dos sistemas simulados mostram sistemas lamelares e estão consistentes com simulações anteriores (Figura 20) (DIAS *et al.*, 2014; PONTES *et al.*, 2012).

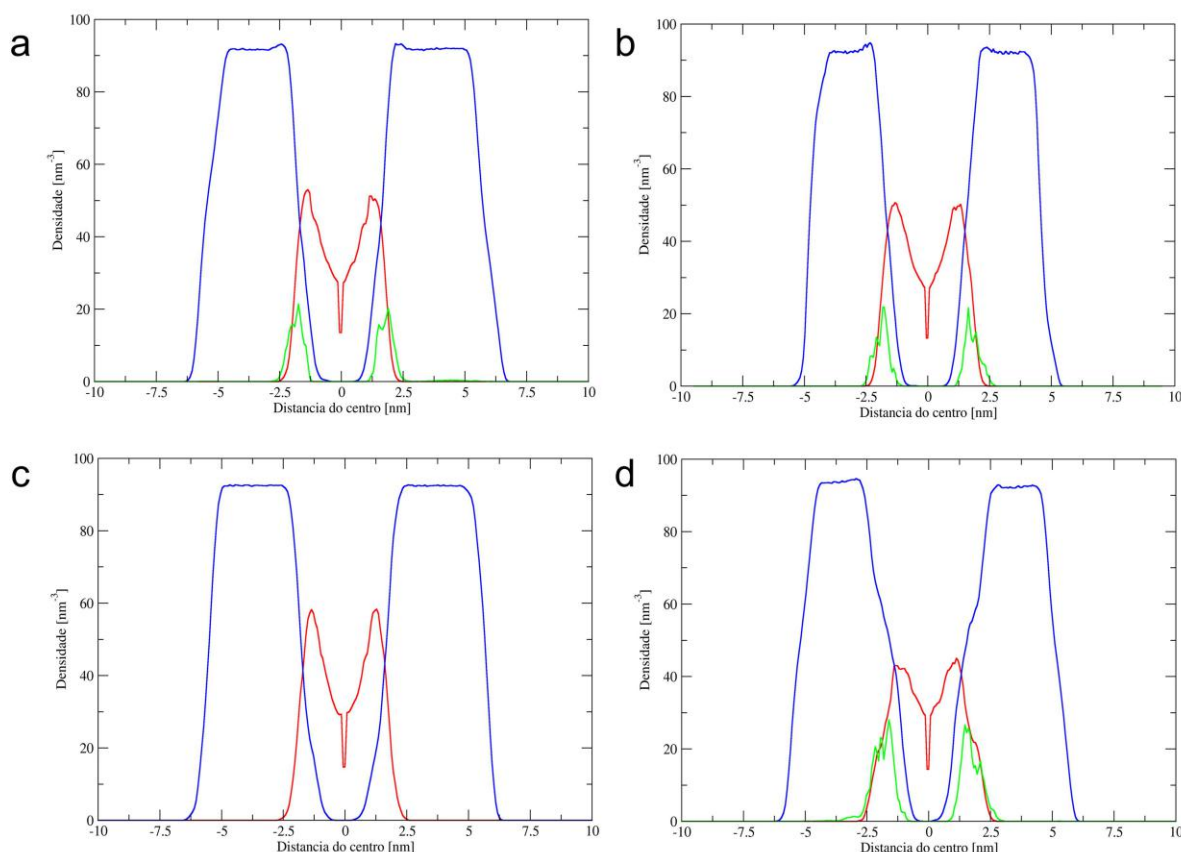


Figura 20. Perfis de densidade para os sistemas simulados. A) lipídeo penta-acilado, B) lipídeo hexa-acilados, C) lipídeo com adição de 4-amino-4-deoxy-1-arabinose e D) lipídeo com adição de duas unidades de KDO, configurando o conhecido LPS RE. Em azul está o perfil das moléculas de água, em vermelho a estrutura da bicamada lipídica e em verde os contra-íons utilizados para estabilizar a membrana. A curva dos contra-íons apresentada em cada gráfico foi aumentada vinte vezes, a fim de facilitar sua visualização no gráfico.

Através dessa análise pode ser verificado que os contra-íons localizam-se na região contendo os grupos fosfatos, *i.e.* na região polissacarídica. Além da interação com esses grupos carregados, é possível verificar que os contra-íons encontram-se altamente hidratados (Tabela 10). Isso é mostrado pelo número de coordenação de moléculas de água por íon.

Os valores apresentados estão consistentes com medidas experimentais (KATZ *et al.*, 1996) e com valores obtidos por simulações computacionais de quimiotipos com um campo de força distinto (DIAS *et al.*, 2014; KIRSCHNER *et al.*, 2012). Por vezes, ainda podem ser encontradas estruturas onde os íons de Ca^{2+} admitem valores de coordenação maiores,

chegando até um máximo de 9 moléculas de água, como foi visto por Katz *et al.* (1996) em uma análise no banco de dados da *Cambridge Structural Database* (CSD).

Tabela 10. Valores do número de coordenação para os íons de Ca^{2+} em cada um dos sistemas descritos na Tabela 9. Esses valores foram tomados através da integração do perfil de distribuição radial de pares entre os íons e os átomos de oxigênio das moléculas de água até a distância de 0,33 nm, correspondendo ao final da primeira esfera de coordenação.

Sistema	Coordenação Ca^{2+} -OW
LipA _{penta}	7.26
LipA _{hexa}	7.62
LPSRe	7.13

É, portanto, intuitivo concluirmos que nessa mesma região onde estão presentes os íons de Ca^{2+} , encontra-se a maior quantidade de moléculas de água existente dentro do perfil dos lipídeos. Entretanto, também é possível observar que a curva descrevendo a quantidade de água cai rapidamente a medida que essa cruza a curva descrevendo o perfil dos lipídeos, chegando a anular-se quando no interior da estrutura da bicamada, assim como esperado, indicando que as moléculas de água apenas estão presentes por conta dos íons, que consequentemente, não há permeação das membranas por essas moléculas e que a estrutura da bicamada em cada sistema se mantém organizada.

3.3 INTERAÇÕES ENTRE POLIMIXINAS E BICAMADAS LIPOPOLISSACARIDICAS: MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS E INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO ANTIMICROBIANO

Uma vez avaliadas a qualidade dos parâmetros atômicos para a descrição de propriedades estruturais de cada um dos componentes de interesse quando isolados, a bicamada lipopolissacarídica e as moléculas de polimixina, é possível avaliar como tais propriedades se modificam uma vez simulada a interação entre esses componentes. Nas subsecções seguintes serão avaliadas as modificações observadas nas propriedades estruturais do sistema composto pela polimixina B e pelas bicamadas lipopolissacarídica representando a membrana externa da *P. aeruginosa*.

3.3.1 Avaliação do comportamento das polimixinas

Para avaliar o comportamento conformacional das moléculas de polimixina quando adsorvidas à membrana externa bacteriana, é possível comparar os diagramas de Ramachandran obtidos para os *ensembles* conformacionais derivados da espectroscopia de RMN (Figura 21) e das simulações computacionais para a polimixina B em presença de agregados de lipídeo A. No primeiro caso, o diagrama de Ramachandran foi calculado para as estruturas de uma família de 10 conformações da polimixina B em presença de agregados de lipídeo A através do assinalamento de distâncias inter-atômicas correspondendo à valores de NOE extraídos de experimentos de espectroscopia de RMN (PRITOVSEK e KIDRIC, 1999).

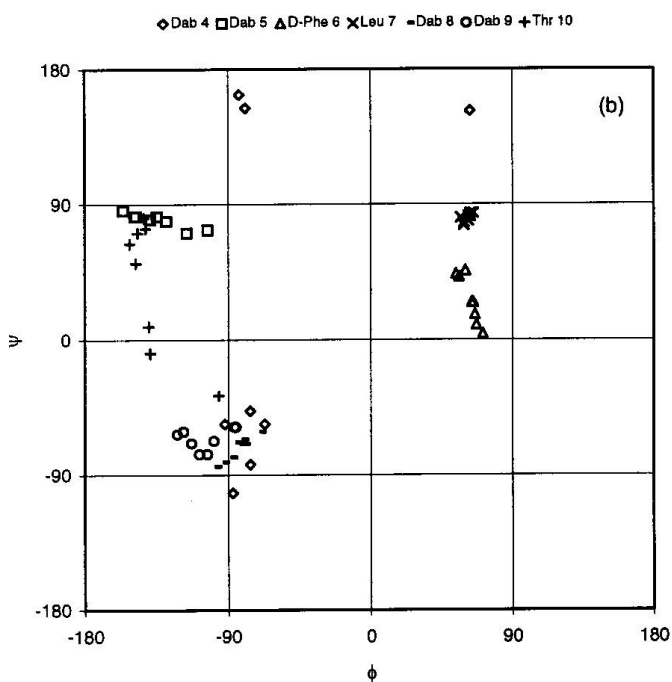


Figura 21. Gráfico de Ramachandran para as 10 estruturas de menor energia potencial obtidas a partir de medidas de NOE para a polimixina B em presença de agregados de lipídeo A. **Fonte:** PRITOVSEK e KIDRIC, 1999.

No segundo caso, o diagrama de Ramachandran foi calculado para as trajetórias obtidas por simulações de DM a partir do rastreamento dos ângulos diédricos ϕ e ψ (Figura 22). Em adição às simulações da polimixina B em bicamadas constituídas por lipídeo A, foram também simulados sistemas formados por bicamadas de lipídeo A contendo de 4-amino-4-deoxy-1-arabinose e LPS Re (Figuras 23 e 24). Ao todo são apresentados seis gráficos por painel, pois como será visto mais adiante, com exceção de uma simulação com apenas duas cópias da molécula de polimixina interagindo com a membrana bacteriana, todas

as demais simulações foram realizadas com seis cópias, como descrito na metodologia, de modo a diminuir o tempo necessário para observar uma resposta estrutural advinda do efeito antimicrobiano sobre as bicamadas lipopolissacarídicas. Os valores de ϕ e ψ calculados a partir das duas estruturas de menor energia obtidas por espectroscopia de RMN são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Dados estruturais de duas prováveis conformações da polimixina B em uma mistura com lipídeo A.

Resíduos	Sequência*	Exp1.		Exp2.	
		ϕ_1	ψ_1	ϕ_2	ψ_2
DAB	4	-79	154	-76	-47
DAB	5	-135	82	-148	82
D-PHE	6	56	42	67	10
LEU	7	62	82	59	76
DAB	8	-93	-81	-82	-69
DAB	9	-86	-58	-103	-76
THR	10	-139	-9	-152	64

Fonte: PRITOVSEK e KIDRIC, 1999. (* Os números descritos para cada aminoácido pertencente a cadeia do polipeptídeo estão em acordo com a Figura 2 e Tabela 1.)

É possível observa-se que cada uma das moléculas interagindo com a membrana possui uma conformação similar, com diferenças restritas à regiões que não são visitadas por todas. Dessa informação é possível extrair uma conclusão importante. A estrutura da molécula interagindo com a membrana depende diretamente da sua localização, pois como cada molécula está inserida em regiões diferentes da membrana, como descrito na metodologia, cada uma deve da mesma forma apresentar uma conformação distinta dependente das interações que lhes estão sendo atribuídas. Contudo, deve ser adicionada a mesma observação descrita durante a análise da estrutura das polimixinas em solução aquosa. Mesmo que as conformações sejam distintas, uma vez desenvolvendo as simulações em um tempo suficientemente longo com uma correta amostragem do espaço conformacional dos polipeptídios, as diferenças mensuradas diminuem ou até mesmo se anulam, de modo que as moléculas apresentem um comportamento médio que pode ser diretamente comparado com os

dados experimentais (VAN DER SPOEL *et al.* , 2010; BERNARDI, MELO e SCHULTEN, 2015). Desse modo, comparando os pontos extraídos das simulações com os dados experimentais, pode-se ver que as conformações amostradas para as moléculas em presença das bicamadas lipídicas são compatíveis com as estruturas descritas na literatura, sendo portanto, um indicativo de que as moléculas de polimixina B modeladas em presença das membranas simuladas se comportam como as moléculas reais e podem ser utilizadas para prever como efetivamente acontecem as etapas de interação entre os polipeptídios e as bicamadas.

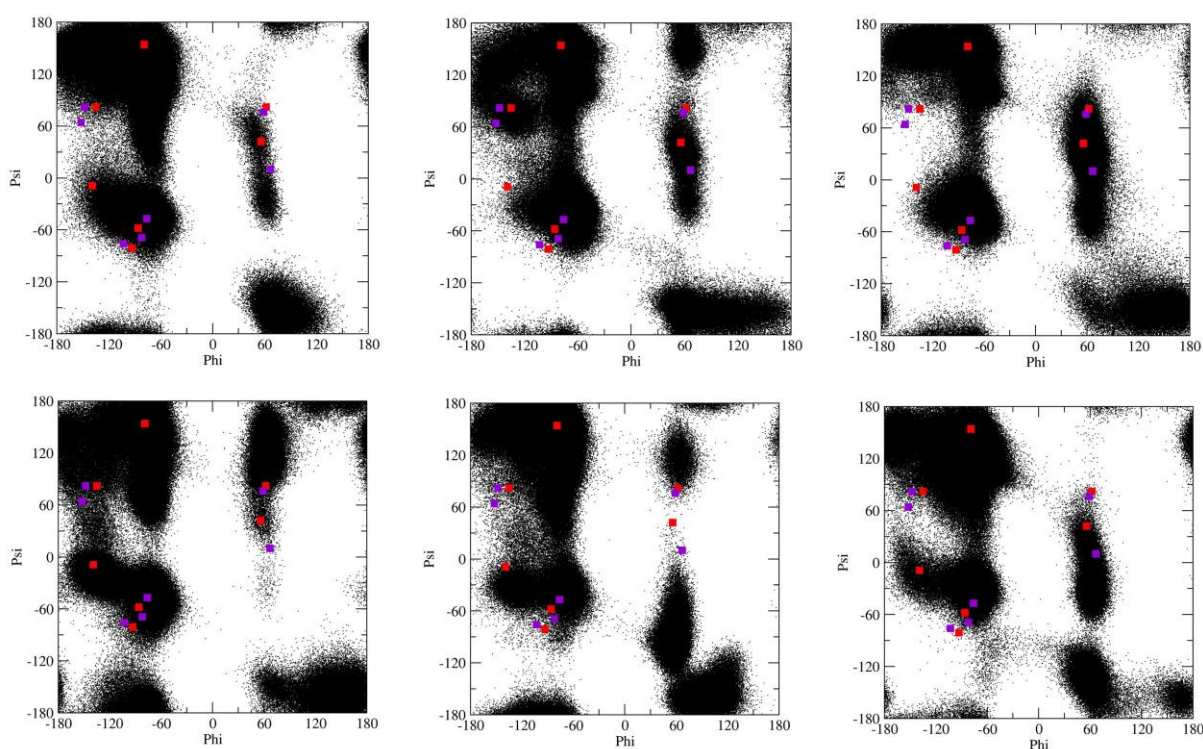


Figura 22. Gráficos de Ramachandran para as seis cópias de polimixina B quando interagindo na superfície de uma bicamada de lipídeo A penta-acilado de *P. aeruginosa*.

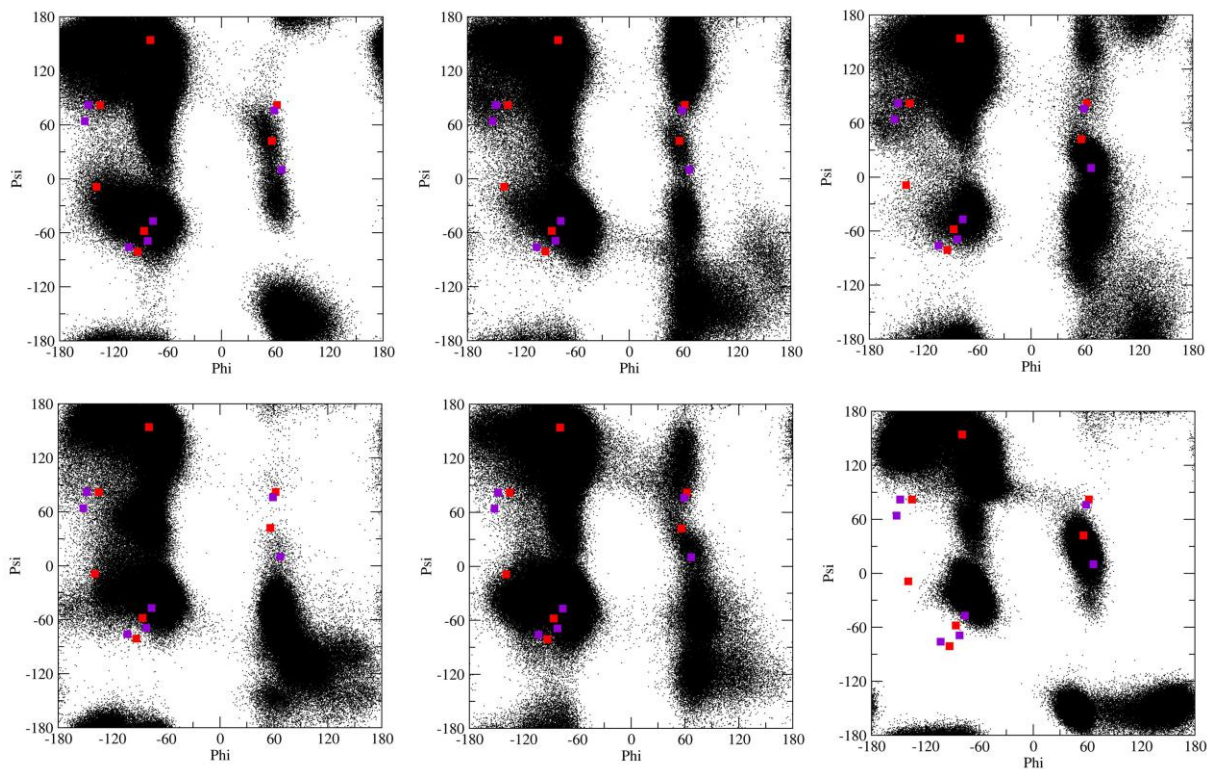


Figura 23. Gráficos de Ramachandran para as seis cópias de polimixina B quando interagindo na superfície de uma bicamada de lipídeo A penta-acilado de *P. aeruginosa* com adição de 4-amino-4-deoxy-1-arabinose.

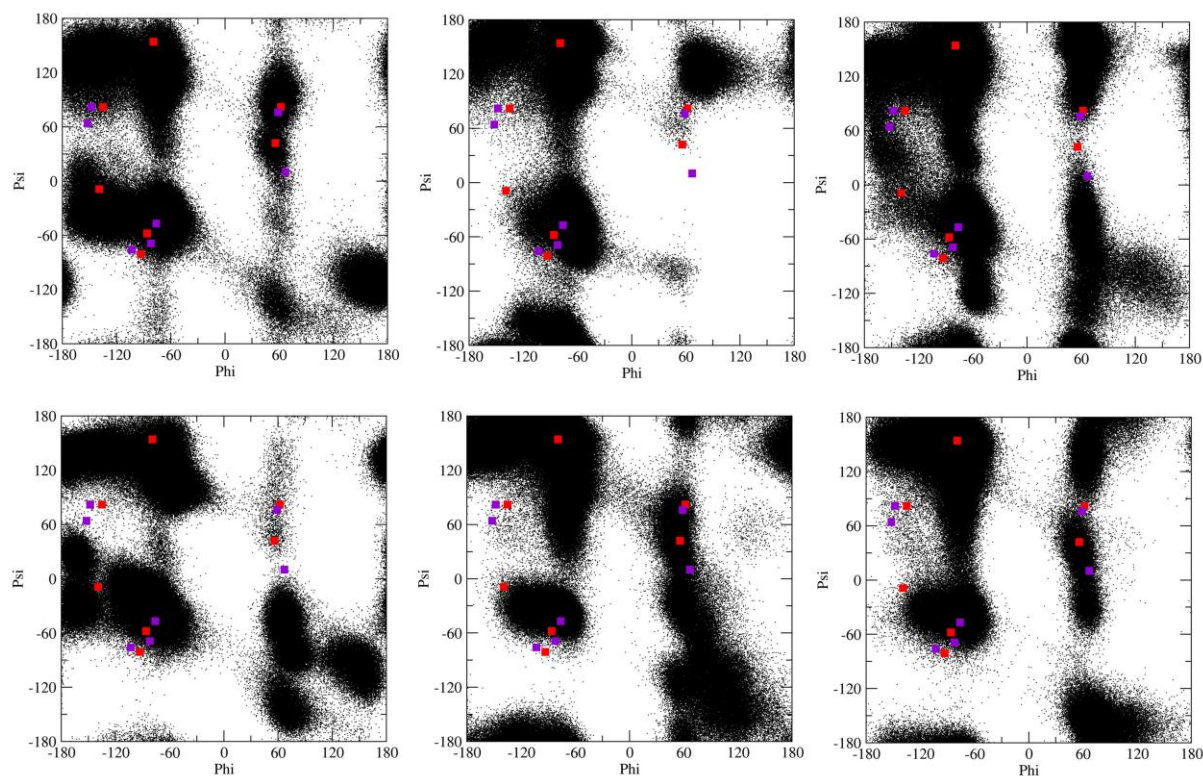


Figura 24. Gráficos de Ramachandran para as seis cópias de polimixina B quando interagindo na superfície de uma bicamada de LPS Re penta-acilado de *P. aeruginosa*.

3.3.2 Efeito da concentração das polimixinas sobre a estrutura das membranas

Nesse primeiro tópico será avaliado rapidamente o efeito da concentração das moléculas de polimixina B no meio e o seu impacto sobre as modificações estruturais sofridas pela membrana como parte do mecanismo de ação desse antimicrobiano. Como exemplificado em maior detalhe na próxima subsecção, a inserção das moléculas de polimixina B induzem uma curvatura positiva da superfície da bicamada lipopolissacarídica que acredita-se ser responsável por muitos dos efeitos observados experimentalmente. Essa saída de um perfil perfeitamente plano, assim como apresentado na subsecção 3.2 quando do estudo das propriedades estruturais das membranas isoladas, pode ser caracterizada pelo cálculo da distribuição do ângulo de curvatura descrito na metodologia e que mostra quantitativamente, através do perfil dessa distribuição, o quanto o sistema se modificou estruturalmente em relação a algum efeito ou variável estudada. A análise da distribuição do ângulo de curvatura em função ao número de cópias de moléculas de polimixina B inseridas em um sistema como o lipídeo A, pode verificar o quanto essa variável afeta a estrutura da bicamada (Figura 25).

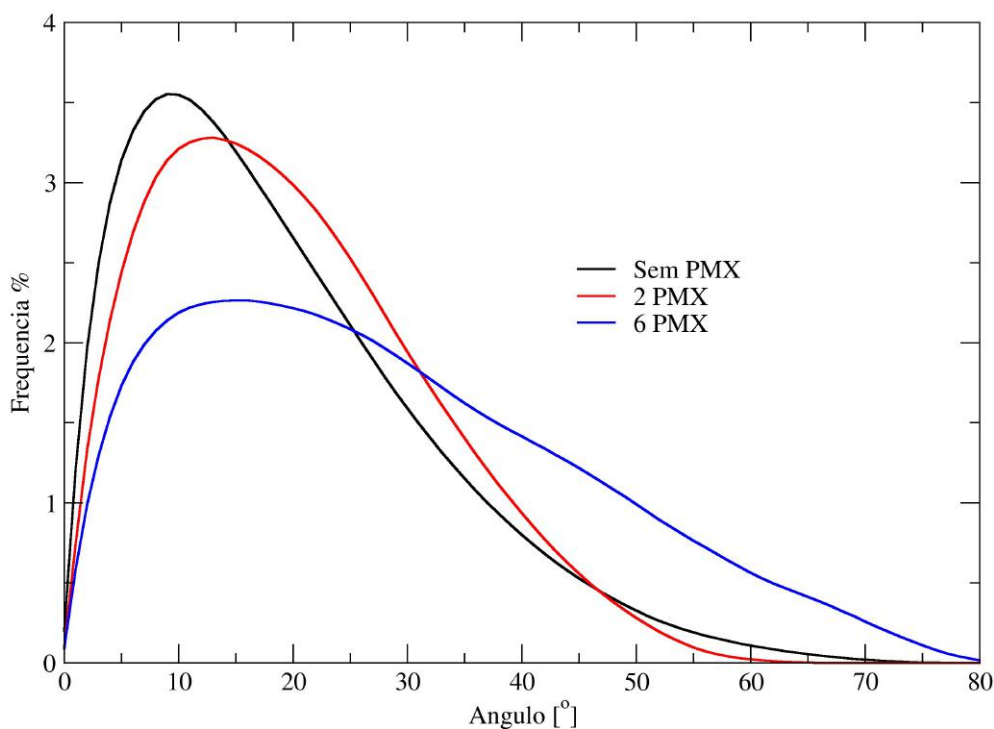


Figura 25. Distribuição dos ângulos de curvatura calculados para o lipídeo A quando na ausência de moléculas de polimixina e em presença de duas e seis moléculas.

Para entendimento dos resultados apresentados é preciso lembrar que o valor do ângulo representa o desvio do ângulo normal da superfície em relação ao eixo normal do sistema, que nesse caso é o eixo z. Dessa forma um valor de 0 representa uma superfície com normal paralela ao eixo normal do sistema, ou seja, uma superfície plana orientada sobre o plano xy que pode representar perfeitamente as membranas sem presença de polimixina B apresentando um perfil lamelar. Qualquer valor diferente desse indica algum desvio em relação a normal como pode ser verificado em todos os sistemas simulados. O fato de existir uma distribuição de ângulos nos perfis acima é que a superfície das membranas possui rugosidade, sendo essa tão maior quanto maior for a perturbação causada pela inserção dos antimicrobianos ou mais distante de um formato planar ela se apresente. Entretanto, mesmo para as membranas mais planares simuladas nesse estudo, é possível verificar uma leve rugosidade intrínseca da bicamada uma vez que um modelo de plano perfeito é impossível. Portanto, o que deve ser avaliado nos perfis acima é o quanto eles estão espalhados e quão próximos os valores máximos estão de 0.

Por essas avaliações é fácil verificar que a membrana sem presença de polimixina B apresenta o perfil mais planar possível dentro do conjunto avaliado, enquanto que nos outros sistemas é verificado um aumento gradual do espalhamento com a relação a concentração de polimixinas presente no meio. Portanto, como foi observado que o efeito da inserção de apenas duas cópias de polimixina não foi tão pronunciado quanto no caso da inserção de seis, sendo muito similar ao perfil do sistema sem o antimicrobiano, então, na finalidade de simplificar o trabalho e o custo computacional total das simulações, foi definido que elas seriam executadas sempre com seis cópias do polipeptídeo, justificando os seis gráficos de Ramachandran do tópico anterior.

3.3.3 A indução de curvatura em bicamadas lipopolissacarídicas

Nesta subsecção serão discutidas alterações da curvatura da superfície da bicamada constituídas por quimiotipos de *P. aeruginosa* susceptíveis ou resistentes à atividade antimicrobiana da polimixina B. Essas alterações da curvatura são induzidas pela presença da polimixina quando em concentrações apropriadas. O primeiro resultado a ser apresentado é o parâmetro de ordem de curvatura, que pode ser calculado como descrito na subsecção 2.3.4, através dos ângulos de curvatura ou desvio em relação a normal do sistema com utilização da Equação 49 (Figura 26).

Nesse tipo de análise, a intensidade da coloração de uma região é representativa do valor do ângulo de desvio entre o vetor normal da superfície em relação a normal do sistema, quantidade que é designada por curvatura local da superfície da membrana. Pode-se verificar que nos sistemas compostos pelo antimicrobiano e o lipídeo A penta-acilado e o LPS Re penta-acilado há uma modificação estrutural significativa, evidenciada pelo aumento das regiões com coloração mais intensa. Essa variação estrutural está relacionada com a formação de curvatura nas bicamadas lipídicas desses quimiotipos e que não é verificada nos outros sistemas.

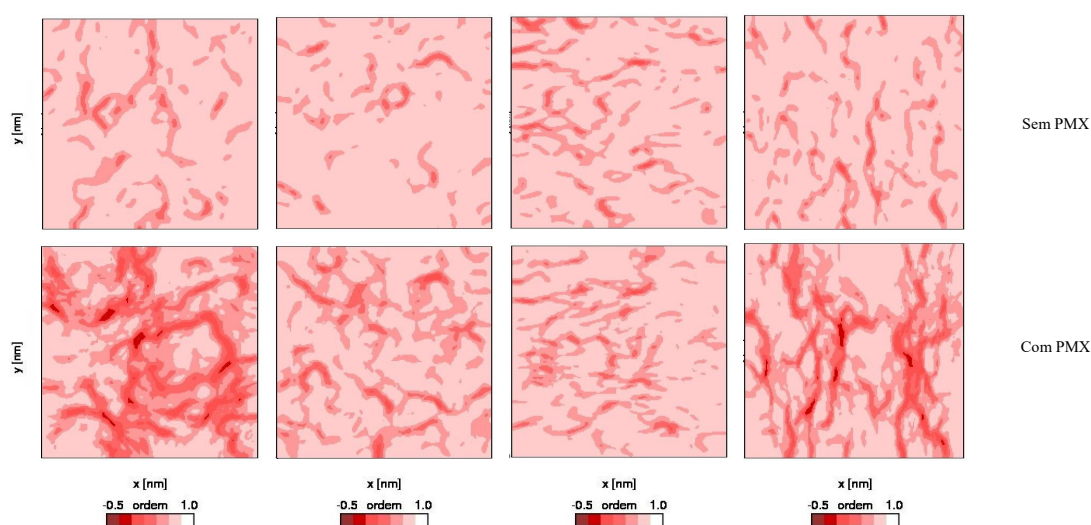


Figura 26. Gráficos da projeção dos parâmetros de ordem de curvatura médios sobre a superfície da bicamada na ausência e presença de múltiplas cópias da polimixina B. A primeira coluna mostra os sistemas constituídos por lipídeo A penta-acilado, a segunda coluna por lipídeo A hexa-acilados, a terceira por lipídeo A modificado com 4-amino-4-deoxy-1-arabinose e a última coluna por LPS Re.

Outra forma de avaliar essa tendência é através do, já apresentado, perfil de distribuição de ângulos de curvatura (Figura 27). É possível perceber que inicialmente todos os sistemas sem polimixina B apresentam uma distribuição homogênea e semelhante, com valores máximos em ângulos menores que dez graus de desvio e muito pouco espalhados, o que indica que todos apresentam aproximadamente um formato plano, fato que é corroborado pelos perfis de densidade característicos de sistemas lamelares. Por outro lado, uma vez colocados em presença das seis cópias de polimixina B os perfis dos sistemas se modificam de forma diferenciada (Figuras 26 e 27). A bicamada constituída pelo quimiotipo com adição de 4-amino-4-deoxy-1-arabinose mantém o perfil plano juntamente com o lipídeo A hexa-acilado, enquanto isso, os perfis dos sistemas compostos pelas bicamadas de lipídeo A penta-acilado e LPS Re penta-acilado sofrem modificações significativas (Figuras 26 e 27). Uma

forma mais quantitativa de realizar essa mesma análise é através da integração dos perfis de distribuição de ângulos de curvatura (Tabela 12).

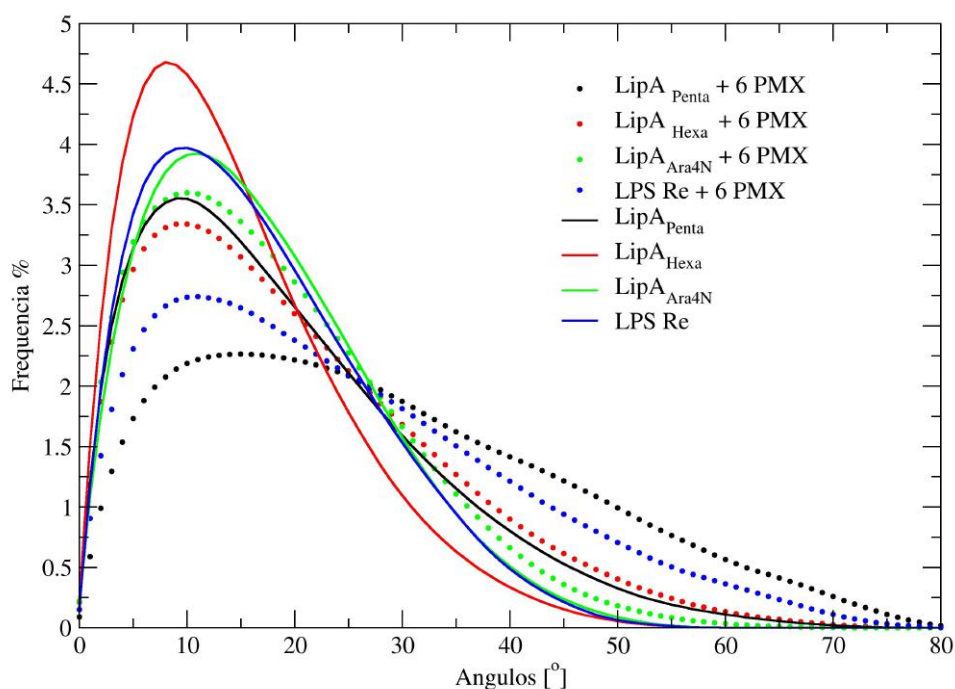


Figura 27. Distribuição dos ângulos de curvatura calculados ao longo de 100 ns para bicamadas constituídas por diferentes quimiotipos de *P. aeruginosa* na ausência e em presença de seis moléculas de polimixina B.

Tabela 12. Análise quantitativa dos perfis de distribuição de ângulos de curvatura.

Sistema	#polimixinas	Frequência entre 0 e 20°	Intervalo com 90%
LipA _{penta}	6	37,80 %	0 – 53,36°
LipA _{hexa}	6	56,25 %	0 – 39,86°
LipA _{Ara4N,penta}	6	61,08 %	0 – 34,44°
LPSRe _{penta}	6	46,53 %	0 – 47,40°
LipA _{penta}	-	58,95 %	0 – 37,90°
LipA _{hexa}	-	73,78 %	0 – 28,41°
LipA _{Ara4N,penta}	-	63,98 %	0 – 31,89°
LPSRe _{penta}	-	65,42 %	0 – 31,62°

Na segunda coluna dessa tabela, onde estão apresentados os resultados das frequências, o que deve ser avaliado é que quanto maior o valor obtido, maior o formato plano da superfície, pois maior quantidade de pontos da superfície se encontra entre ângulos pequenos ($0 - 20^\circ$). Assim, pode-se observar que para os sistemas sem polimixina B, todos os quimiotipos encontram-se com mais de 50% da superfície nesse intervalo de pequenos ângulos caracterizando um sistema próximo a planar e pouco desordenado. Entretanto, para os sistemas com inserção do antimicrobiano, apenas o quimiotipo com 4-amino-4-deoxy-1-arabinose (Ara4N) se mantém nesse formato, pois o lipídeo A e o LPS Re têm seus valores diminuídos significando uma perda da forma plana e formação de curvatura mais acentuada, como também descrito pelas análises anteriores.

Na terceira coluna da tabela, onde se encontram os resultados do intervalo de ângulos que cobrem 90% das frequências observadas, pode-se observar a mesma conclusão anterior, mas com uma apresentação diferente. Esses resultados mostram que em sistemas sem polimixina B, com características planares, o intervalo que contém 90% dos ângulos da superfície está entre 0 e 38° o que significa que nesses sistemas 90 % da superfície encontra-se levemente inclinada, combinando com o aspecto da forma plana. Com a inserção dos polipeptídios nos sistemas, pode-se observar um aumento desse intervalo, significando que há uma maior distribuição das frequências e formação de curvatura mais acentuada nos sistemas lipídeo A e LPS Re, onde o limite superior do intervalo se aproxima de 54° . A membrana com adição de Ara4N, como já observado, mantém o intervalo mostrando sua invariância estrutural frente ao antimicrobiano.

Esses resultados quando comparados com tendências experimentais fornecem uma validação do que é observado. Pois, como descrito no primeiro tópico da introdução, segundo Steimle, Autenrieth e Frick (2016), Caroff e Karabian (2003) e Pier (2007), a modificação da carga superficial do LPS pela adição de resíduos positivamente carregados como, por exemplo, a 4-amino-4-deoxy-1-arabinose significa um fator de sobrevivência para as cepas bacterianas quando em presença de peptídios antimicrobianos catiônicos ou pequena concentração dos contra-íons que estabilizam a estrutura de suas membranas. Ainda segundo Steimle, Autenrieth e Frick (2016), algumas cepas de bactérias Gram-negativas são capazes de modificar o número e o comprimento das cadeias alquílicas presentes no lipídeo A da membrana, também como uma alternativa a sobrevivência em meios agressivos a esses microrganismos. Portanto, o que a estabilidade observada nos sistemas contendo Ara4N é uma expressão da resistência dessa cepa a presença das polimixinas, enquanto que a formação de curvatura nos outros quimiotipos é um sinal de susceptibilidade a esses polipeptídios.

Toda essa discussão detalhada pode ser inteiramente resumida apenas na observação da Figura 28, onde são visualizadas as configurações finais para os sistemas simulados, em ordem decrescente de curvatura formada. Pode-se notar que a maior curvatura é expressa pela bicamada de lipídeo A penta-acilado, seguida pelo LPS Re, lipídeo A hexa-acilados e, por fim, o lipídeo A com adição de 4-amino-4-deoxy-1-arabinose (Ara4N), que não demonstra curvatura alguma, como consequência de sua habilidade em resistir a presença dos antimicrobianos. Uma racionalização da resistência do lipídeo arabinosilado está na avaliação da sua carga superficial. Uma vez que o lipídeo neutraliza sua carga ao adicionar a molécula de 4-amino-4-deoxy-1-arabinose ele perde a forte atração eletrostática, existente nos outros quimiotipos, que faz com que a polimixina se fixe e cause a perturbação observada na forma da curvatura. Os contra-íons utilizados para manter a estabilidade estrutural das membranas carregadas tem a mesma consequência que a molécula de Ara4N e é por isso que para efetiva ação das polimixinas, como será visto mais adiante, é preciso extrair alguns dos íons da superfície como será discutido na subsecção 3.3.7.

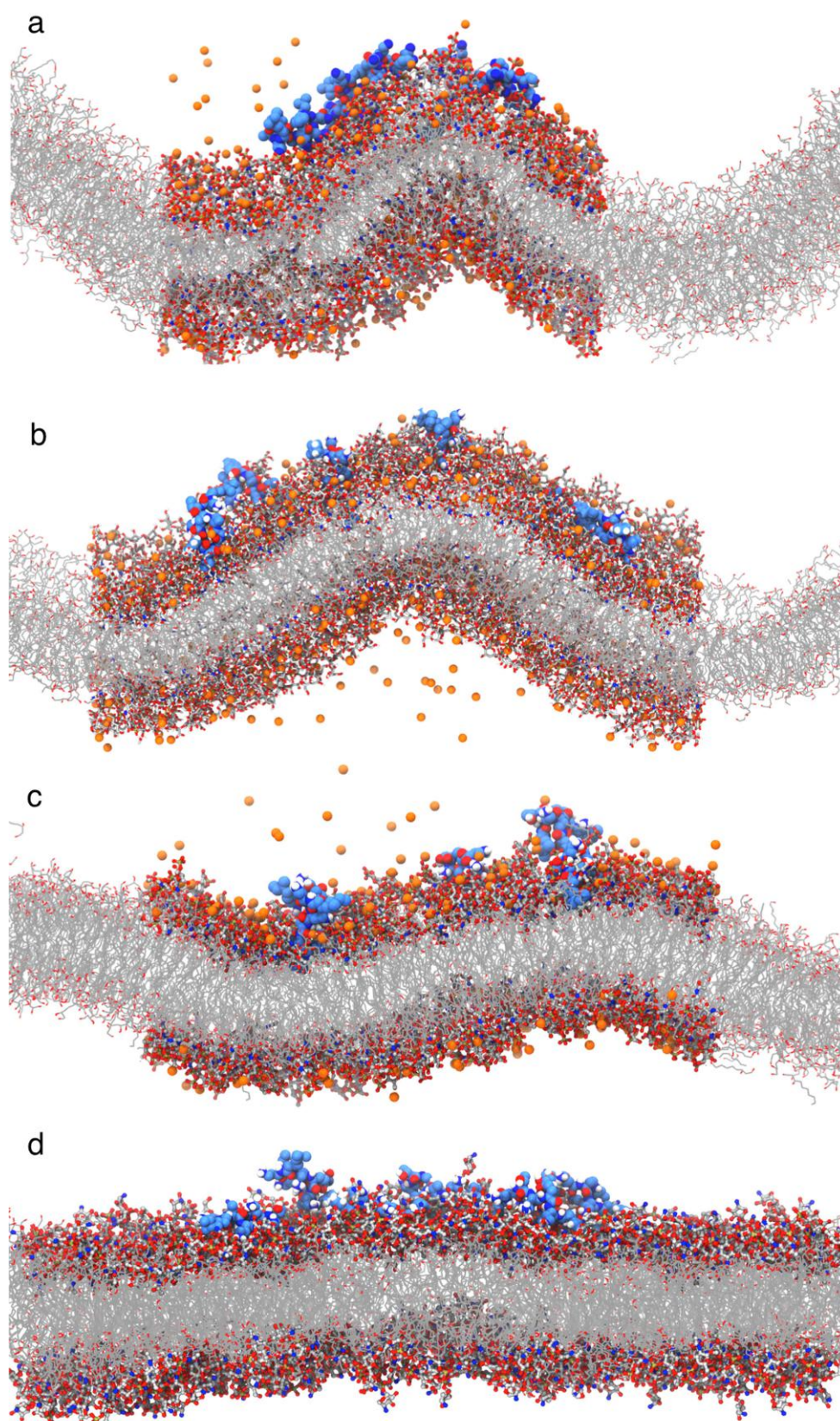


Figura 28. Conformação final dos sistemas simulados quando em presença da polimixina B. Na sequência estão A) o lipídeo A penta-acilado, B) o LPS Re, C) o lipídeo A hexa-acilados e por último D) o lipídeo A penta-acilado com adição de 4-amino-4-deoxy-1-arabinose

3.3.4 Área por lipídeo e espessura da bicamada

Assim como estudada no caso das membranas sem presença das polimixinas, a área por cabeça em cada uma das membranas simuladas em presença do antimicrobiano é um parâmetro estrutural interessante, em conjunto com o já apresentado, que possibilita entender o que está acontecendo nos sistemas estudados quando há a interação entre as moléculas de antimicrobiano e da bicamada lipídica (Figura 29). Assim como nas análises na ausência de polimixinas, os primeiros nanossegundos de simulação são apenas parte da estabilização dos sistemas e, portanto, para evitar qualquer possível problema acerca do intervalo de tempo considerado para avaliação dos resultados, as conclusões serão tomadas apenas em relação aos últimos 20 ns de simulação.

Ao comparar os resultados descritos para os sistemas na presença e na ausência de polimixina, é evidente que não há mudanças significativas, de modo que os valores finais das duas configurações são muito semelhantes. Essa observação, embora contra intuitiva, implica que essa variável não é afetada na formação da curvatura mostrada na análise anterior, e que o espaçamento entre as moléculas de lipídeo nas membranas permanece aproximadamente constante ao longo de todas as simulações.

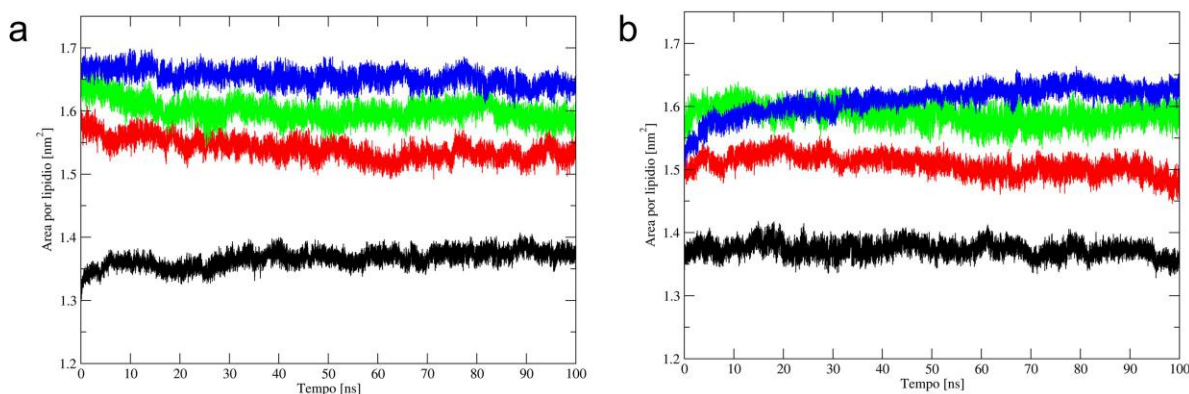


Figura 29. Gráfico da área por lipídeo para simulações dos quimiotipos B) em presença e A) na ausência da polimixina B. Em preto tem-se o lipídeo A penta-acilado, em vermelho o lipídeo A hexa-acilado, em verde o lipídeo A penta-acilado com adição da 4-amino-4-deoxy-1-arabinose e em azul o lipídeo A com adição de duas unidades de KDO, configurando o conhecido LPS RE.

Por outro lado, pela a avaliação da espessura da bicamada nos sistemas em presença das moléculas de polimixina é possível verificar uma significativa variação ao longo da simulação indicando que essa variável é afetada pela formação de curvatura nas membranas. Apenas no sistema contendo Ara4N adicionado a constituição das membranas não é

observada variação, uma vez que esse sistema apresenta resistência a ação da classe de antimicrobianos estudados.

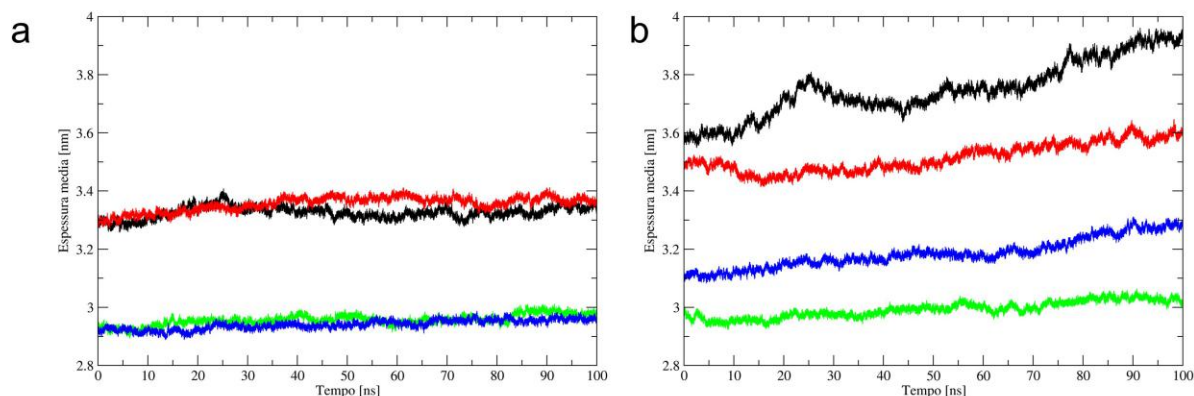


Figura 30. Resultados da espessura média da bicamada lipídica para os sistemas estudados B) em presença e A) na ausência da polimixina B. Em preto tem-se o lipídeo A penta-acilado, em vermelho o lipídeo A hexa-acilado, em verde o lipídeo A penta-acilado com adição da 4-amino-4-deoxy-1-arabinose e em azul o lipídeo A com adição de duas unidades de KDO, configurando o conhecido LPS RE.

É possível observar que em cada análise foram mantidas as considerações realizadas na subsecção 3.2.1 acerca dos valores relativos de área por lipídeo e espessura da bicamada para cada quimiotipo, obedecendo aos dados já validados e presentes na literatura através do trabalho de Kirschner *et al.* (2012), Pontes *et al.* (2012), Snyder, Kim e McIntosh (1999), Brandenburg *et al.* (1999) e Dias *et al.* (2014).

3.3.5 O perfil de densidade das bicamadas lipopolissacarídicas

Uma análise muito importante que deve ser realizada com as membranas em presença das polimixinas é certamente a do perfil de densidade parcial para cada componente desses sistemas (Figura 31). É possível observar uma modificação nas curvas descrevendo a densidade das moléculas de água quando distantes do centro da membrana. Esse efeito mais intensamente observado nos sistemas susceptíveis a ação das polimixinas decorre do fato que essa análise foi realizada levando em consideração a curvatura da membrana e, por conseguinte, modificando a referência sobre a qual é realizada a avaliação do perfil de distribuição de cada componente. Em resumo, mesmo que a caixa de simulação seja um paralelogramo regular com suas fronteiras representadas por planos interceptados pelos eixos de orientação dos sistemas, quando a superfície de referência sobre a qual será calculado o perfil de densidade é curvada, como acontece mais intensamente nos sistemas A e D (Figura 31), então as moléculas de água presentes nos limites da caixa são observadas pela superfície

de referência com distâncias diferenciadas resultando no efeito de decaimento dos perfis das moléculas de água descrito nos gráficos. Excepcionalmente, o perfil encontrado para a membrana de LPS Re, sistema D, se justifica pela configuração inicial utilizada na simulação. Nela, foi colocada mais moléculas de água na região do sistema que continha as moléculas de polimixina e por isso o perfil da água nesse sistema se apresenta como uma camada de água de menor espessura à esquerda, e em contrapartida, com maior espessura camada à direita.

O perfil dos demais componentes revela que as bicamadas, embora curvadas pela ação do antimicrobiano, ainda permanecem organizadas em uma configuração lamelar. É possível perceber, assim como nas análises das bicamadas sem polimixinas, que os íons Ca^{2+} encontram-se localizados próximos aos grupamentos negativamente carregados nos sistemas A, B e D. Esses íons se encontram hidratados justificando a presença de moléculas de água nos limites do perfil para as cadeias alquilas dos lipopolissacarídeos compondo as membranas. O perfil das polimixinas descreve a localização das mesmas na superfície das membranas, onde encontram-se também os íons Ca^{2+} altamente hidratados.

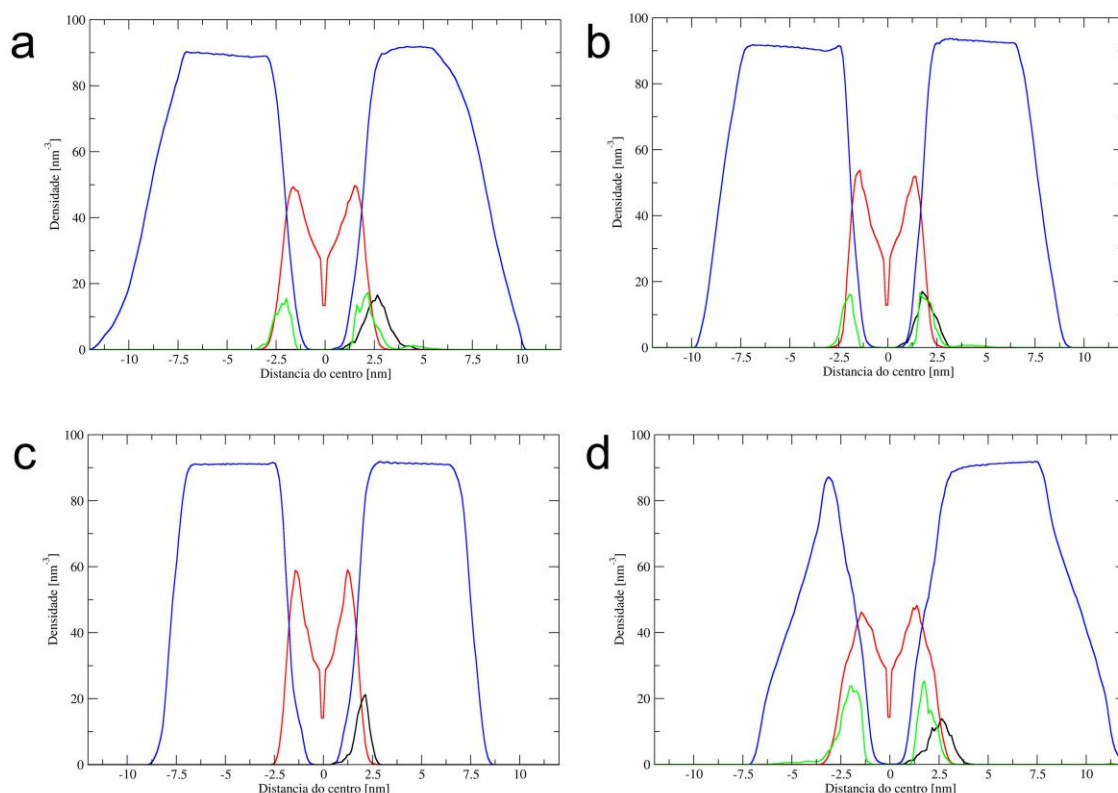


Figura 31. Bicamadas em presença das polimixinas. A) lipídeo penta-acilado, B) lipídeo hexa-acilados, C) lipídeo com adição de 4-amino-4-deoxy-1-arabinose e D) lipídeo com adição de duas unidades de KDO, configurando o conhecido LPS RE. Em azul está o perfil das moléculas de água, em vermelho a estrutura da bicamada lipídica, em verde os contra-íons utilizados para estabilizar a membrana e em preto o das polimixinas. Os perfis para os íons Ca^{2+} foram aumentados vinte vezes, enquanto que os perfis para as polimixinas foram aumentados cinco vezes.

3.3.6 Espessura bidimensional

O cálculo de espessura das bicamadas lipídicas pode ser tomado de duas formas. A primeira, já apresentada, resume-se em um perfil temporal de uma média espacial da espessura em toda a extensão da membrana presente nas simulações. A segunda segue o pensamento oposto, é uma média temporal da distribuição espacial da espessura da membrana ao longo de toda sua extensão (Figura 32). Nessa última, é possível observar a projeção da espessura média da bicamada da membrana, onde é plotada a distribuição da espessura da bicamada na forma de uma variação na intensidade da cor mostrada na legenda.

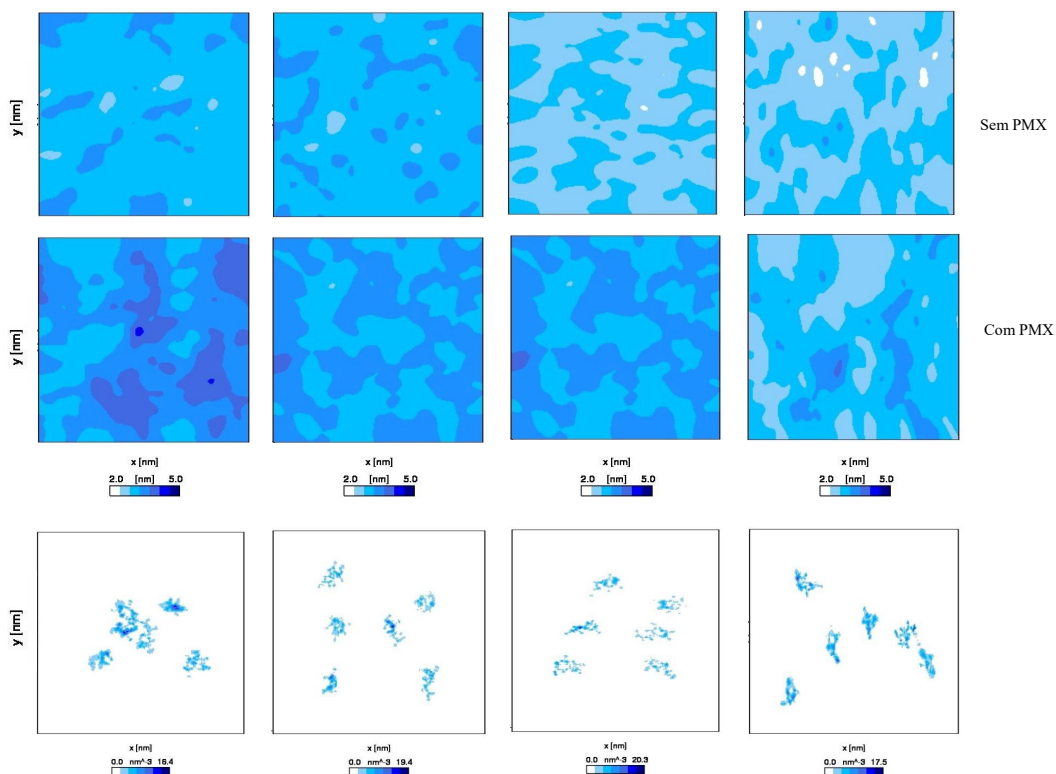


Figura 32. Distribuição espacial da espessura da bicamada para os sistemas descritos na Tabela 5. Na primeira coluna estão os sistemas com lipídeo A penta-acilado, na segunda estão presentes os com lipídeo A hexa-acilados, na terceira estão presentes os sistemas compostos por lipídeo A adicionado de 4-amino-4-deoxy-1-arabinose e na última coluna estão os sistemas com LPS Re. A última linha de imagens é constituída pelos perfis de densidade bidimensional das seis moléculas de polimixina presentes nos sistemas.

Assim como na Figura 26, nessa projeção é possível verificar uma maior modificação estrutural no lipídeo A penta-acilado e no LPS Re, agora evidenciado pelo aumento da espessura da bicamada localizado quase que especificamente onde se observam os pontos de densidade da polimixina B.

Como mostrado na Figura 30, apenas o lipídeo A penta-acilado adicionado de Ara4N não sofre modificação no valor da sua espessura, e a tendência observada no lipídeo A hexa-acilados é sobre toda extensão da bicamada e de intensidade muito pequena, evidenciando que esse quimiotipo também não se mostra tão susceptível a ação das polimixinas. Portanto, é possível inferir que o aumento da espessura da bicamada é causado pela presença das moléculas do antimicrobiano e, conseqüentemente, é um dos efeitos da sua ação frente a quimiotipos susceptíveis, lipídeo A penta-acilado e LPS Re, em conjunto com a formação de uma curvatura acentuada na mesma região onde se encontram os polipeptídios.

3.3.7 O deslocamento dos íons e os sítios de interação da polimixina com as membranas

Uma última análise importante que pode fornecer muitas informações acerca do fenômeno observado nas simulações é o valor da difusividade dos contra-íons do sistema quando em presença da Polimixina B (Tabela 13).

É possível observar que a difusão dos contra-íons nas bicamadas polissacarídicas ocorre majoritariamente no plano xy, independentemente da presença de polimixinas. Entretanto, a difusão é significativamente maior na presença desses antimicrobianos. Esse é um último aspecto a ser ressaltado no trabalho acerca do mecanismo de ação das polimixinas sobre as membranas externas de *P. aeruginosa*. Como rapidamente discutido na subseção 3.3.3, os íons presentes nas bicamadas não favorecem as interações entre elas e as moléculas de antimicrobiano, sendo, portanto, necessária a remoção de alguns deles de modo a permitir a melhor interação entre esses componentes. É exatamente isso que é observado através dos dados abaixo.

Tabela 13. Média temporal das constantes de difusão, com respectivos desvios, calculada ao longo de todo o tempo de simulação, para os sistemas descritos na Tabela 5.

Quimiotipos	Coeficiente de difusão (Difusividade molar) [$10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$]		
	Plano xy	Eixo z	Total
Pmx₆+LipA_{penta}	11.58 ± 7.10	2.60 ± 0.06	8.59 ± 4.75
Pmx₆+LipA_{penta-mM}	21.28 ± 0.72	6.46 ± 1.51	16.34 ± 0.02
Pmx₆+LipA_{hexa}	4.26 ± 1.50	2.73 ± 0.01	3.75 ± 1.00
Pmx₆+LPSRe	2.41 ± 0.83	1.46 ± 0.32	2.09 ± 0.44

Uma análise rápida com auxílio da função de distribuição radial de pares (RDF) revela que as moléculas de polimixina interagem preferencialmente com os mesmos grupos presentes nos diferentes quimiotipos estudados no trabalho. Os nitrogênios das cadeias laterais dos ácidos L- α,γ -diaminobutíricos, grupo carregado positivamente em meios com pH neutro ou ácido, apresentam interações eletrostáticas com os oxigênios das moléculas de água, com os átomos de fósforo dos grupos fosfato dos lipídeos e com os oxigênios dos grupos carboxila das moléculas de KDO do LPS RE. Na Tabela 14, podem ser observados os valores de coordenação do nitrogênio em relação a cada um desses sítios de interação.

Tabela 14. Número de coordenação do nitrogênio em relação aos oxigênios das moléculas de água, aos átomos de fósforo dos grupos fosfato dos lipídeos e aos oxigênios dos grupos carboxila das moléculas de KDO do LPS RE.

Coordenação	N-OW	N-P	N-COO ⁻	Total
LipA_{penta}	3.66	0.31	--	3.97
LipA_{hexa}	3.31	0.44	--	3.75
LPSRe	3.03	0.51	0.29	3.83
LipA_{Ara4N,penta}	3.27	0.52	--	3.79

Além de perceber que os valores do número de coordenação para cada interação do grupo amina da cadeia lateral do ácido L- α,γ -diaminobutírico não variam significativamente entre os diferentes quimiotipos, é importante destacar que essas são também as interações preferenciais dos íons de Ca²⁺ de acordo com Dias *et al.* (2014) e Nascimento *et al.* (2014). A semelhança das interações entre as polimixinas e os diferentes quimiotipos sugere que o fator de resistência ou susceptibilidade não deve estar ligado à existência de interações específicas, mas sim, à competição entre as polimixinas e os contra-íons para interagirem com os mesmos grupos químicos dos lipopolissacarídeos.

Por serem carregadas positivamente e interagirem repulsivamente com os íons de Ca²⁺, a presença das moléculas de polimixina deve desorganizar as interações entre os íons e a bicamada, aumentando significativamente mobilidade desses contra-íons utilizados na estabilização dessa estrutura, possibilitando a solubilização de alguns deles que, deixando a bicamada, incrementam, portanto, a difusividade calculada nas simulações como mostrado na

Tabela 13 em comparação com os resultados da Tabela 9, e na Figura 33, onde esses dados são comparados em intervalos de 10 ns ao longo de toda a simulação na forma de histograma.

Com as observações computacionais seguindo o que é proposto no modelo de interação de Steimle, Autenrieth e Frick (2016), Caroff e Karabian (2003) e Pier (2007), vale ressaltar ainda que é possível verificar a mesma tendência entre os quimiotipos, descrita por Dias *et al.* (2014). Quanto maior a carga do lipídeo menor a mobilidade dos seus contra-íons e consequentemente, menor a difusividade calculada, mesmo quando em presença das moléculas de polimixina. Essa concordância serve como mais um ponto de verificação da validade dos modelos utilizados e das conclusões extraídas dos resultados.

Observando o primeiro gráfico da Figura 33 é possível comparar os dados da difusividade dos contra-íons da bicamada de lipídeo A quando em solução aquosa contendo ou não concentração salina de NaCl, ou seja, é possível avaliar o efeito da força iônica do meio no deslocamento dos íons causados pela ação da polimixina B. É possível verificar que com o aumento da força iônica, mais facilmente os contra-íons são extraídos da superfície da membrana, como pode ser avaliado nos valores das barras em vermelho no histograma. Neles é possível inferir que em muitos momentos ao longo da simulação a difusividade dos íons de Ca^{2+} chega a ser dez vezes superior à encontrada nas simulações sem força iônica, como é de se esperar, uma vez que a solução se mostra mais atrativa para os íons. Infelizmente, nada pode ser avaliado em relação a como esse efeito altera a ação dos antimicrobianos sobre os quimiotipos susceptíveis de *P. aeruginosa*, pois ainda são necessárias análises complementares que fazem parte da continuação desse trabalho.

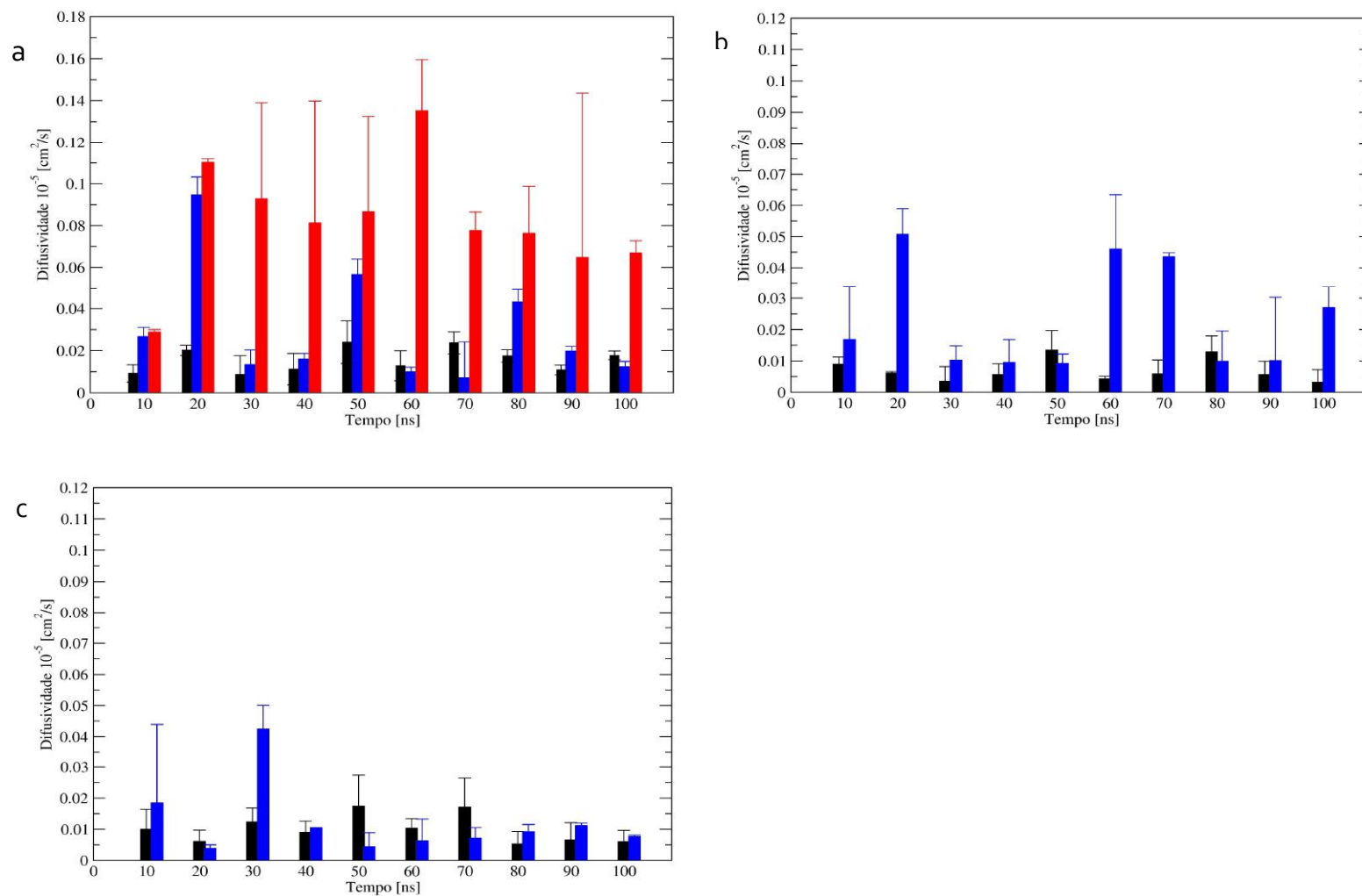


Figura 33. Histograma dos valores de difusividade em intervalos de 10 ns ao longo de todo o tempo de simulação para os sistemas descritos na Tabela 5. A) lipídeo A penta-acilado, B) lipídeo A hexa-acilados e C) LPS Re. Em preto estão os valores das simulações na ausência de polimixinas, em azul estão os dados das simulações em presença das polimixinas e em vermelho estão os dados da simulação em presença das polimixinas e 150 mM de NaCl.

4. CONCLUSÃO

É possível concluir com base nas análises realizadas na primeira seção dos resultados deste trabalho, que a modelagem dos peptídios antimicrobianos é consistente com as medidas experimentais de RMN (Pritovsek e Kidric (1999)). Várias análises envolvendo dois conjuntos de parâmetros de campo de força GROMOS e dois tratamentos eletrostáticos de longa distância demonstraram que o GROMOS 54A7 combinado com o método de campo de reação reproduz com maior precisão o ensemble conformacional da polimixina A em solução. Entretanto, mesmo com todo o ensaio para estabelecer o melhor protocolo de simulação para simulação da polimixina B, foi verificado através da análise da função de autocorrelação das estruturas obtidas ao longo da simulação que o método de amostragem utilizado foi ineficiente em amostrar completamente o espaço conformacional em solução do peptídio. Desta forma, utilizou-se a metodologia de arrefecimento simulado para perturbar e induzir transições entre diferentes mínimos de energia. As análises das simulações geradas com a metodologia de amostragem melhorada mostrou um maior alcance em termos de exploração do espaço de conformações das polimixinas. O novo conjunto amostral de conformações para as polimixinas possibilitou uma análise de *cluster* que evidenciou uma família de estruturas mais populadas que descreviam eficientemente as características observadas nos trabalhos experimentais. A partir dessas estruturas foi verificada a semelhança entre os diferentes tipos de polimixina estudados, o que simplificou o trabalho realizado posteriormente através da diminuição do número de sistemas que necessitavam ser simulados. Uma vez utilizando uma das polimixinas nas simulações, é possível extrapolar seu comportamento como sendo semelhante ao das demais. Assim, apenas a polimixina B foi utilizada.

De modo análogo ao que foi realizado para os antimicrobianos, foi realizada uma etapa de avaliação do modelo dos diferentes quimiotipos de *P. aeruginosa*, representados pelos diferentes quimiotipos de membrana externa simulados. Através das análises de empacotamento (área por lipídeo), perfil de densidade, espessura das bicamadas estudadas, e difusividade dos contra-íons foi possível verificar que as estruturas e parâmetros utilizados conseguiam satisfatoriamente reproduzir as tendências já descritas na literatura nos trabalhos de Pontes *et al.* (2012), Snyder, Kim e McIntosh (1999), Brandenburg *et al.* (1999) e Dias *et al.* (2014). Após validação dos modelos moleculares também para bicamadas, foi possível utilizá-los para avaliação do mecanismo de ação dos peptídios sobre a membrana externa bacteriana de cada um dos quimiotipos de *P. aeruginosa* estudados.

Análises preliminares acerca do efeito de concentração de polimixinas e seu impacto sobre as bicamadas revelou que a ação dos antimicrobianos é tão mais acentuada, quanto maior for o número de moléculas na superfície das membranas. Logo, todas as simulações foram realizadas com seis cópias de polimixina sobre a superfície das bicamadas descartando as realizadas com apenas duas. Realizadas as simulações, foi preciso verificar se o comportamento das polimixinas e das bicamadas condiziam com dados experimentais a fim de que as conclusões extraídas das análises pudessem ser dadas como válidas e representativas do que efetivamente ocorre nos sistemas reais. Foi verificado que os modelos ainda seguiam as tendências experimentais satisfatoriamente, sendo, portanto válidos para prever e avaliar o que acontece na realidade.

Acerca do mecanismo de ação verificado através de todas as análises subsequentes nos sistemas contendo as polimixinas em contato com as bicamadas lipídicas, é possível concluir que tudo que foi analisado está em acordo com os modelos citados nos trabalhos de Velkov *et al.* (2010), Mendes e Burdmann (2009), Storm, Rosenthal e Swanson (1977) e Falagas e Kasiakou (2005). Segue-se então que, para os quimiotipos susceptíveis, a presença das polimixinas causa uma perturbação na distribuição de cargas sobre a membrana, mais especificamente sobre os íons utilizados na estruturação da bicamada, de modo que esses íons tendam a se solubilizar abandonando a estrutura da membrana, o que pôde ser verificado através da análise da difusividade dos íons ao longo da simulação. Nesse estágio, a desorganização das cargas superficiais da membrana inicia um processo de formação de curvatura que depende do quão susceptíveis são os quimiotipos bacterianos aos antimicrobianos sendo utilizados. Concomitantemente à formação de curvatura nas membranas susceptíveis, é verificado o aumento local da espessura das bicamadas na região onde as moléculas do antimicrobiano se localizaram. Essas conclusões poder ser facilmente verificadas nas Figuras 26 e 32. Em resumo, os estágios iniciais da ação dessa classe de antimicrobianos contra as cepas de *P. aeruginosa* são dados pela desestruturação das cargas superficiais das membranas externas e expulsão dos contra-íons, sendo seguida pela formação acentuada de curvatura e aumento da espessura da bicamada nas proximidades do contato entre polimixinas e lipídeos.

Não foi verificada inserção significativa dos polipeptídios nas membranas durante todo o tempo de simulação exigindo uma extensão do trabalho a fim de avaliar se isso de fato pode ocorrer, principalmente em membranas que demonstrem susceptibilidade. Não foram verificadas modificações estruturais nas membranas contendo Ara4N, como já esperado, uma vez que esse quimiotipo não é susceptível ao antimicrobiano utilizado. Essa afirmação é

confirmada nos trabalhos de Steimle, Autenrieth e Frick (2016), Caroff e Karabian (2003) e Pier (2007), e através de todos os resultados observados ao longo do trabalho, evidenciando que os modelos desenvolvidos são sensíveis a esse tipo de avaliação.

REFERÊNCIAS

- ADCOCK, S. A.; McCAMMOM, J. A. Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins. **Chemical Review**, v.106(5), p. 1589–1615, 2006.
- ALLEN, M. P. Introduction to Molecular Dynamics Simulation. John von Neumann Institute for Computing, Julich, NIC Series, **Computational Soft Matter: From Synthetic Polymers to Proteins**, v. 23, pp. 1-28, 2004.
- ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. **Computer Simulation of Liquids**. Oxford University Press, New York, 1987.
- ANDERSEN, H. C. RATTLE: A “Velocity” Version of the Shake Algorithm for Molecular Dynamics Calculations. **Journal of Computational Physics**, v.52, p. 24-34, 1983.
- ANDRADE, S. S.; JONES, R. N.; GALES, A. C.; SADER, H. S. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomona aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 140-141, 2003.
- ANDRÉ, I.; LINSE, S.; MULDER, F. A. A. Residue-Specific pKa Determination of Lysine and Arginine Side Chains by Indirect ¹⁵N and ¹³C NMR Spectroscopy: Application to apo Calmodulin. *Journal of American Chemical Society*, v. 129, p. 15805-15813, 2007.
- BALLENEGGER, V.; CERDA, J. J.; LENZ, O.; HOLM, CH. The optimal P3M algorithm for computing electrostatic energies in periodic systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 128, 034109, 2008.
- BAYLY, C. I.; CIEPLAK, P.; CORNELL, W. D.; KOLLMAN, P. A. A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints for Deriving Atomic Charges: The RESP Model. **Journal of Physical Chemistry**, v. 97, p. 10269-10280, 1993.
- BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; VAN GUNSTEREN, W. F.; DINOLA, A.; HAAK, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, v. 81, p. 3684-3690, 1984.
- BERNARDI, R. C.; MELO, M. C. R.; SCHULTEN, K. K. Enhanced sampling techniques in molecular dynamics simulations of biological systems. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1850, p. 872–877, 2015.
- BOAS, M. L. **Mathematical Methods in the Physical Sciences**. DePaul University. 3^o Edição, John Wiley & Sons, 2006, p. 1-859.
- BRANDENBURG, K.; MORIYON, I.; ARRAIZA, M. D.; LEWARK-YVETOT, G.; KOCH, M. H. J.; SEYDEL, U. Biophysical investigations into the interaction of lipopolysaccharide with polymyxins. **Thermochimica Acta**, v. 382, p. 189–198, 2002.

- BRANDENBURG, K.; FUNARI, S. S.; KOCH, M. H. J.; SEYDEL, U. Investigation into the Acyl Chain Packing of Endotoxins and Phospholipids under Near Physiological Conditions by WAXS and FTIR Spectroscopy. **Journal of Structural Biology**, v. 128, p. 175–186, 1999.
- BRAUN, A. R.; BRANDT, E. G.; EDHOLM, O.; NAGLE, J. F.; SACHS, J. N. Determination of Electron Density Profiles and Area from Simulations of Undulating Membranes. **Biophysical Journal**, v. 100, p. 2112–2120, 2011.
- BROOKS, B. R.; BRUCCOLERI, R.; OLAFSON, B. D.; STATES, D. J.; SWAMINATHAN, S.; KARPLUS, M. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 4, p. 187–217, 1983.
- BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **The Journal of Chemical Physics**, v.126, 014101, 2007.
- CAO, Z.; LIN, Z.; WANG, J.; LIU, H. Refining the Description of Peptide Backbone Conformations Improves Protein Simulations Using the GROMOS 53A6 Force Field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, p. 645–660, 2009.
- CAR, R.; PARRINELLO, M. Unified approach for molecular dynamics and density-functional theory. **Physical Review Letters**, v. 55, p. 2471-2474, 1985.
- CAROFF, M.; KARIBIAN, D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 2431-2447, 2003.
- CHANDRASEKAR, I.; KASTENHOLTZ, M.; LINS, R.D.; OOSTENBRINK, C.; SCHULER, L.D.; TIELEMAN, P.D.; HUNENBERGER, P.H.; VAN GUNSTEREN, W.F. A Consistent Potential Energy Parameters Set for Lipids. Dipalmitoylphosphatidylcholine as benchmark of the GROMOS96 45A3 force field. **European Biophysical Journal**, v. 32, p. 67-77, 2003.
- COPPENS, P. Experimental Charge Densities in Chemistry: What is Next? **Journal of Physical Chemistry**, v. 93, p. 7979-7984, 1989.
- COUTINHO, K. R. Modelagem Molecular: efeito do meio em propriedades eletrônicas estruturais. **Tese (Livre-Docência)**, USP, 2012.
- CRETON, B.; NIETO-DRAGHI, C.; PANNACCI, N. Prediction of Surfactants' Properties using Multiscale Molecular Modeling Tools: A Review. **Oil & Gas Science and Technology**, 2013.
- DAFEE, M.; ETIENNE, G. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. **Tubercle and Lung Disease**, v. 79, p. 153-169, 1999.
- DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An $N\log(N)$ method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, p. 10089-10092, 1993.

DAURA, X.; MARK, A. E.; VAN GUNSTEREN, W. F. Parametrization of Aliphatic CH United n Atoms of GROMOS96 Force Field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19(5), p. 535-547, 1998.

DAURA, X.; GADEMANN, K.; JAUN, B.; SEEBACH, D.; VAN GUNSTEREN, W. F.; MARK, A. E. Peptide Folding: When Simulation Meets Experiment. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, p. 236-240, 1999.

DEPRADEAU, François-Yves; PIGACHE, A.; ZAFFRAN T.; SAVINEAU, C.; LELONG R.; GRIVEL, N.; LELONG, D.; ROSANKIA, W.; CIEPLAK, P. The R.E.D. tools: advances in RESP and ESP charge derivation and force field library building. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, p. 7821–7839, 2010.

DIAS, R. P.; DA HORA, G. C. A.; RAMSTEDT, M.; SOARES, T. A. Outer Membrane Remodeling: The Structural Dynamics and Electrostatics of Rough Lipopolysaccharide Chemotypes. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 10, p. 2488–2497, 2014.

ESSMANN, U.; PERERA, L.; BERKOWITZ, M. L.; DARDEN, T.; LEE, H.; PEDERSEN, L. G. A smooth particle mesh Ewald method. **The Journal of Chemical Physics**, v. 103(19), p. 8577-8593, 1995.

FALAGAS, M. E.; KASIAKOU, S. K. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, p. 1333–1341, 2005.

FALAGAS, M. E.; FRAGOULIS, K. N.; KASIAKOU, S. K.; SERMAIDIS, G. J. MICHALOPOULOS, A. Nephrotoxicity of intravenous Colistin: a prospective evaluation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 504-507, 2005.

FETTIPLACE, R.; ANDREWS, D. M.; HAYDON, D. A. The Thickness, Composition and Structure of Some Lipid Bilayers and Natural Membranes. **Journal of Membrane Biology**, v. 5, p. 277-296, 1971.

GALES, A. C.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001–2004). **Clinical, Microbiology and Infection**, v. 12, p. 315–321, 2006.

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

GENONI, A.; DOS SANTOS, L. H. R; MEYER, B.; MACCHI, P. Can X-ray constrained Hartree–Fock wavefunctions retrieve electron correlation? **International Union of Crystallography Journal**, v. 4, p. 136–146, 2017.

GUADAGNINI, P. H.; BRUNS, R. E.; SOUZA, A. A. Cargas atômicas em moléculas. **Química Nova**, v. 19(2), p. 148-155, 1996.

GURSAKAYA, G. V. **The Molecular Structure of Amino Acids Determination by X-Ray Diffraction Analysis**. Bureau, C. New York, 1968.

HAYASHI, K.; SUKETA, Y.; TSUKAMOTO, K.; SUZUKI, T. Chemical Structure of Polymyxin D1, **Experientia**, v. 22, p. 354-355, 1966.

HESS, B.; BEKKER, H.; BERENDSEN, H. J. C.; FRAAIJE, J. G. E. M. LINCS: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v.18, p. 1463-1472, 1997.

HILSER, V. J.; GARCIA-MORENO, B.; OAS, T. G.; KAPP, G.; WHITTEN, S. T. A Statistical Model of the Protein Ensemble. **Chemical Review**, v. 106, p. 1545-1558, 2006.

HOCKNEY, R. W.; EASTWOOD, J. W. **Computer Simulation Using Particles**. New York, McGraw-Hill, 1981.

HOCKNEY, R. W.; EASTWOOD, J. W.; LAWRENCE, D. N. P3M3DP – The three-dimensional periodic particle-particle/particle-mesh program. **Computational Physics Communication**, v. 19(2), p. 215-261, 1980.

HOLM, C. Efficient Methods for Long Range Interactions in Periodic Geometries Plus One Application. **Computational Soft Matter**, v. 23, p. 195-236, 2004.

HOVMOLLER, S.; ZHOU, T.; OHLSON, T. Conformations of amino acids in proteins. **Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography**, v. D58, p. 768-776, 2002.

HU H.; ELSTNER, M.; HERMANS, J. Comparison of a QM/MM Force Field and Molecular Mechanics Force Fields in Simulations of Alanine and Glycine “Dipeptides” (Ace-Ala-Nme and Ace-Gly-Nme) in Water in Relation to the Problem of Modeling the Unfolded Peptide Backbone in Solution. **PROTEINS: Structure, Function, and Genetics**, v. 50, p. 451–463, 2003.

HUBER, T.; TORDA, A. E.; VAN GUNSTEREN, W. F. Local elevation: A method for improving the searching properties of molecular dynamics simulation. **Journal of Computer-Aided Design**, v. 8, p. 695-708, 1994.

JIANG, F. Y.; BOURET, Y.; KINDT, J. T. Molecular Dynamics Simulations of the Lipid Bilayer Edge. **Biophysical Journal**, v. 87, p. 182–192, 2004.

JONES, J. E. On the Determination of Molecular Fields. -II. From the Equation of State of a Gas. **Proceedings of Royal Society of London A**, v. 106, p. 463-477, 1924.

JORGENSEN, W. L.; TIRADO-RIVES, J. The OPLS Potential Functions for Proteins. Energy Minimizations for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110(6), p. 1657-1666, 1988.

KARPLUS, M. Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance. **Journal of American Chemical Society**, v. 85 (18), p. 2870–2871, 1963.

KATZ, A. K.; GLUSKER, J. P.; BEEBE, S. A.; BOCK, C. W. Calcium Ion Coordination: A Comparison with That of Beryllium, Magnesium, and Zinc. **Journal of American Chemical Society**, v. 118, p. 5752-5763, 1996.

KENDALL, K.; ROBERTS, A. D. van der Waals forces influencing adhesion of cells. **Philosophical Transactions B**, Royal Society. B 370: 20140078, 2015.

KIRKIPATRICK, S.; GELATT, C. D.; VECCHI, M. P. Optimization by Simulated Annealing. **Science**, v. 220(4598), p. 671-680, 1983.

KIRSCHNER, K. N.; LINS, R. D.; MAASS, A.; SOARES, T. A. A GLYCAM-based force field for simulations of lipopolysaccharide membranes: parametrization and validation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 8, p. 4719-4731, 2012.

KOIKE, M.; IIDA, K.; MATSUO, T. Electron Microscopic Studies on Mode of Action of Polymyxin. **Journal of Bacteriology**, v. 97, p. 448-452, 1969.

KRIJN, M. P. C. M.; FEIL, D. Electron density distributions in hydrogen bonds: A local density-functional study of α -oxalic acid dihydrate and comparison with experiment. **The Journal of Chemical Physics**, v. 89, p. 4199-4208, 1988.

KUCERKA, N.; KISELEV, M. A.; BALGAVY, P. Determination of bilayer thickness and lipid surface area in unilamellar dimyristoylphosphatidylcholine vesicles from small-angle neutron scattering curves: a comparison of evaluation methods. **European Biophysics Journal**, v. 33, p. 328-334, 2004.

KUKOL, A. Lipid Models for United-Atom Molecular Dynamics Simulations of Proteins. **Journal of Chemistry Theory and Computation**, v. 5, p. 615-626, 2009.

KUHNE, T. D. Second generation Car-Parrinello molecular dynamics. **WIREs Computational Molecular Science**, v. 4, p. 391-406, 2013.

LINS, R.D.; HUNENBERGER, P. H. Engineering of a New GROMOS Force Field for Hexopyranoses, **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, p. 1400-1412, 2005.

MADEIRA, L.; VITIELLO, S. A. A função radial de distribuição de pares para sistemas Lennard-Jones bidimensionais. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 34(4), 4303, 2012.

MARTIN, M. G.; SIEPMANN, J. I. Transferable Potentials for Phase Equilibria. 1. United-Atom Description of n-Alkanes. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, p. 2569-2577, 1998.

MAUREL, G.; GOIJON, G.; SCHNELL, B.; Malfreyt, P. Multiscale Modeling of the Polymer-Silica Surface Interaction: From Atomistic to Mesoscopic Simulations. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 119 (9), p. 4817-4826, 2015.

MELLER, J. Molecular Dynamics. **ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES**. Nature Publishing Group, p. 1-8, 2001.

MENDES, C. A. C.; BURDMANN, E. A. Polimixinas - revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55(6), p. 752-759, 2009.

MILLIGAN, G. W.; COOPER, M. C. Methodology Review: Clustering Methods. **Applied Psychological Measurements**, v. 11(4), p. 329-354, 1987.

MYIAMOTO, S.; KOLLMAN, P. A. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, p. 952-962, 1992.

NAMBA, A. M.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, v. 33(4), p. 13-24, 2008.

NASCIMENTO, A. J.; 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. **Chemical Communications**, v. 50, p. 231-233, 2014.

NEVES, P. R.; MAMIZUKA, E. M.; LEVY, C. E.; LINCOPAN, N. *Pseudomona aeruginosa* multiresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, p. 409-420, 2011.

NUSSENZVEIG, H. M. **Curso de física básica, Mecânica**. 5ª edição, São Paulo, Edgard Blucher, 2013, p. 1-437.

OOSTENBRINK, C.; SOARES, T. A.; VEGT, N. F. A.; VAN GUNSTEREN, W. F. Validation of the 53A6 GROMOS force field. **European Biophysical Journal**, v. 34, p. 273-284, 2005.

OOSTENBRINK, C.; VILLA, A.; MARK, A. E.; VAN GUNSTEREN, W. F. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25(13), p. 1656-1676, 2004.

PIER, G. B. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: A major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, p. 277-295, 2007.

POGER, D.; VAN GUNSTEREN, W. F.; MARK, A. E. A New Force Field for Simulating Phosphatidylcholine Bilayers. **Journal of Computational Chemistry**, v.31(6), 1117-1125, 2009.

POL-FACHIN, L; RUSU, V. H.; VERLI, H.; LINS, R. D. GROMOS 53A6 , an Improved GROMOS Force Field for Hexopyranose-Based Carbohydrates. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 8, p. 4681-4690, 2012.

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**, v. 8, p. 3830-3838, 2012.

PRITOVSEK, P.; KIDRIC, J. Solution Structure of Polymyxins B and E and Effect of Binding to Lipopolysaccharide : An NMR and Molecular Modeling Study. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 4604-4613, 1999.

RYCAERT, JEAN-PAUL; CICCOTTI, G.; BERENDSEN, H. J. C. Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. **Journal of Computational Chemistry**, v. 23, p. 327-341, 1977.

SALINAS, S. R. A. **Introdução à Física Estatística**. 2ª edição, 1ª reimpressão, São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, Edusp, 2005, p. 1-464.

SCHRÖDINGER, E. An undulatory theory of the mechanics of atoms and molecules. **The Physical Review**, v. 28(6), p. 1049-1070, 1926.

SCHMID, N.; EICHENBERGER, A. P.; CHOUTKO, A.; RINIKER, S.; WINGER, M.; MARK, A. E.; VAN GUNSTEREN, W. F. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. **European Biophysical Journal**, v. 40(7), p. 843-856, 2011.

SCHULER, L. D.; DAURA, X.; VAN GUNSTEREN, W. F. An Improved GROMOS96 Force Field for Aliphatic Hydrocarbons in the Condensed Phase. **Journal of Computational Chemistry**, v. 22(11), p. 1205–1218, 2001.

SMIT, B.; KARABONI, S.; SIEPMANN, J. I. Computer simulations of vapor–liquid phase equilibria of n-alkanes. **Journal of Chemical Physics**, v. 102 (5), p. 2126-2140, 1995.

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

SOARES, T.A.; HUNENBERGER, P.H.; KASTENHOLTZ, M.; KRAUTLER, V.; LENZ, T.; LINS, R.D.; OOSTENBRINK, C.; VAN GUNSTEREN, W.F.. An improved nucleic acid parameter set for the GROMOS force field. **Journal of Computational Chemistry**. v. 26, p. 725-737, 2005.

STEIMLE, A.; AUTENRIETH, I. B.; FRICK, J. S. Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, p. 290–301, 2016.

STORM, D. R.; ROSENTHAL, K. S.; SWANSON P. E. Polymyxin and related peptide antibiotics. **Annual Review of Biochemistry**, v. 46, p. 723-763, 1977.

STRAATSMA, T. P.; SOARES, T. A. Characterization of the outer membrane protein OprF of *Pseudomonas aeruginosa* in a lipopolysaccharide membrane by computer simulation. **Proteins**, v. 74, p. 475–488, 2009.

SUGITA, Y.; OKAMOTO, Y. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. **Chemical Physics Letters**, v. 314, p. 141–151, 1999.

SUN, H. COMPASS: An ab Initio Force-Field Optimized for Condensed-Phase Applications Overview with Details on Alkane and Benzene Compounds. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, p. 7338-7364, 1998.

SZU, H.; HARTLEY, R. Fast simulated annealing. **Physics Letters A**, v. 122(3,4), p. 157-162, 1987.

SUZUKI, T.; HAYASHI, K.; FUJIKAWA, K.; TSUKAMOTO, K. The Chemical Structure of Polymyxin E: The Identities of Polymyxin E1 with Colistin A and of Polymyxin E2 with Colistin B. **Journal of Biochemistry**, v. 57(2), p. 226-227, 1965.

TIRONI, I. G.; SPERB, R.; SMITH, P. E.; VAN GUNSTEREN, W. F. A generalized reaction field method for molecular dynamics simulations. **The Journal of Chemical Physics**, v. 102, p. 5451-5459, 1995.

TSALLIS, C.; STARIOLO, D. A. Generalized simulated annealing. **Physica A**, v. 233, p. 395-406, 1996.

VALIEV, M.; BYLASKA, E. J.; GOVIND, N.; KOWALSKI, K.; STRAATSMA, T. P.; VAN DAM, H. J. J.; WANG, D.; NIEPLOCHA, J.; APRA, E.; WINDUS, T. L.; DE JONG, W. A.. NWChem: A comprehensive and scalable open-source solution for large scale molecular simulations. **Computer Physics Communications**, v. 181, p. 1477. 2010.

VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; VAN BUUREN, A. R.; APOL, E.; MEULENHOF, P. J.; TIELEMAN, D. P.; SIJBERS, A. L. T. M.; FEENSTRA, K. A.; VAN DRUNEN, R.; BERENDSEN, H. J. C. **Gromacs User Manual version 4.5.6**, 2010.

VASIL, M. L.. *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. **Journal of Pediatrics**, v. 108, p. 800-805, 1986.

VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. **Groningen Molecular Simulation (GROMOS) Library Manual**, 1987, p. 1-221.

VAN GUNSTEREN, W. F.; BILLETER, S. R.; EISING, A. A.; HUNENGERGER, P. H. ; KRUGER, P.; MARK, A. E.; SCOTT, W. R. P.; TIRONI, I. G. **Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide**, 1996, pp. 1-1042.

VAN GUNSTEREN, W. F.; KARPLUS, M.. Protein Dynamics in Solution and in a Crystalline Environment: A Molecular Dynamics Study. **Biochemistry**, v. 10, p. 2259-2274, 1982.

VELKOV, T.; THOMPSON, P. E.; NATION, R. L.; LI, J. Structure-Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53(5), p. 1898–1916, 2010.

WALSH, A. G.; MATEWISH, M. J.; BURROWS, L. L.; MONTEIRO, M. A.; PERRY, M. B.; LAM, J. S. Lipopolysaccharide core phosphates are required for viability and intrinsic drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, v. 35(4), p. 718-727, 2000.

WEINER, S. J.; KOLLMAN, P. A.; CASE, D. A.; SINGH, U. C.; GHIO, C.; ALAGONA, G.; PROFETA, S.; WEINER, P. A New Force Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic Acids and Proteins. **Journal of American Chemical Society**, v. 106, p. 765-784, 1984.

WEINSTEIN, L.; DOAN, T-L.; SMITH, M. A. Neurotoxicity in patients treated with intravenous polymyxin B: Two cases reports. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 66, p. 345-347, 2009.

WEST, A.; MA, K.; CHUNG, J. L.; KINDT, J. T. Simulation Studies of Structure and Edge Tension of Lipid Bilayer Edges: Effects of Tail Structure and Force-Field. **Journal of Physical Chemistry**, v. 117, p. 7114–7123, 2013.

WILKINSON, S.; LOWE, L. A. Structure of the Polymyxins A and the Question of Identity with the Polymyxins M. **Nature**, v. 212, p. 311, 1966.

WILKINSON, S.; LOWE, L. A. Structure of Polymyxin B1. **Nature**, v. 202, p. 1211, 1964.

WILKINSON, S.; LOWE, L. A. Structure of Polymyxin B2 and Polymyxin E1. **Nature**, v. 204, p. 285, 1964.

YANG, J.; REN, Y.; TIAN, An-min; SUN, H. COMPASS Force Field for 14 Inorganic Molecules, He, Ne, Ar, Kr, Xe, H₂, O₂, N₂, NO, CO, CO₂, NO₂, CS₂, and SO₂, in Liquid Phases. **Journal of Physical Chemistry B**. v. 104, p. 4951-4957, 2000.

APÊNDICE 1 (Tabelas)

Tabela A1.1. Topologias para polimixinas. Foi utilizado o GROMOS 54A7 para a descrição desse peptídio, sendo portanto, totalmente compatível com o conjunto de parâmetros 53A6Glyc utilizado no desenvolvimento da topologia das membranas.

Descrição do grupo de carga	GROMOS <i>atom type</i>	Carga parcial	Descrição do grupo de carga	GROMOS <i>atom type</i>	Carga parcial
	CH ₁ or CH ₂	0.266		CH ₁	0.127
Hidroxila (neutro)	OA	-0.674	Metilamônio (carga +1)	NL	0.129
	H	0.408		H (x3)	0.248
Fenilalanina	CH ₁	0.000		CH ₁	0.000
Cα – Cβ - Cγ	CH ₂	0.000	DAB Neutro	CH ₂	0.000
	C	0.000	Cα – Cβ - Cγ	CH ₂	0.000
	N	-0.310		C	0.450
Backbone N-H	H	0.310	Backbone C=O	O	-0.450
	C	-0.140	DAB	CH ₁	0.000
Aromatico C-H (Fenilalanina)	HC	0.140	Cα – Cβ	CH ₂	0.000
	CH ₂	0.000	Treonina Cγ2	CH ₃	0.000
Cadeia alquílica (AMO)	CH ₃	0.000	Treonina Cα	CH ₁	0.000
Tipo de ligação	k_b [$10^6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-4}$] ^a	b_o [nm]	Tipo de ligação	k_b [$10^6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-4}$] ^a	b_o [nm]
CH _n -CH _n or CH _n -C	7.15	0.153	N-C	11.80	0.133
			C-HC	12.30	0.109
CH _n -OA	8.18	0.143	OA-H	15.70	0.100
CH _n -N or CH _n -NL	8.71	0.147	C-O	16.60	0.123
C-C	10.80	0.139	N-H or NL-H	18.70	0.100
Tipo de ângulo	k_θ [$\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$] ^b	θ_o [deg]	Tipo de ângulo	k_θ [$\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$] ^b	θ_o [deg]

H – NL – H	380	109.5	CH _n – CH _n – CH _n or NL – CH _n – CH _n	530	111.0
H – N – CH _n	400	115.0			
H – N – C	415	123.0	CH _n – C – C or C – C – C	560	120.0
CH _n – NL – H	425	109.5			
CH _n – OA – H	450	109.5	N – C – CH _n	610	115.0
C – C – H	505	120.0	O – C – CH _n	685	121.0
N – CH _n – C, CH _n – CH _n – N or CH _{1n} – CH _n – C	520	109.5	CH _n – N – C N – C – O	700 730	122.0 124.0
Diedro impróprio	k_{ξ} [kJ . mol ⁻¹ . rad ⁻²]	ξ_o [deg]	Diedro impróprio	k_{ξ} [kJ . mol ⁻¹ . rad ⁻²]	ξ_o [deg]
C α – C γ 2 – O γ 1 – C β (Cadeia lateral da Treonina)	334.84	35.2644	C δ 1 – C γ – C ϵ 1 – H δ 1 (Cadeia lateral da fenilalanina)	167.42	0.0
C α – N – C – C β (<i>backbone</i>)	334.84	35.2644	C δ 1 – C ϵ 1 – C ζ – C ϵ 2 (Cadeia lateral da fenilalanina)	167.42	0.0
N – C – C α – H (<i>backbone</i>)	167.42	0.0	C δ 2 – C γ – C δ 1 – C ϵ 1 (Cadeia lateral da fenilalanina)	167.42	0.0
C – C α – N – O (<i>backbone</i>)	167.42	0.0	C δ 2 – C γ – C ϵ 2 – H δ 2 (Cadeia lateral da fenilalanina)	167.42	0.0
C γ – C δ 1 – C δ 2 – C β (Cadeia lateral da fenilalanina)	167.42	0.0	C δ 2 – C ϵ 2 – C ζ – C ϵ 1 (Cadeia lateral da fenilalanina)	167.42	0.0
C γ – C δ 1 – C ϵ 1 – C ζ (Cadeia lateral da fenilalanina)	167.42	0.0	H ϵ 1 – C δ 1 – C ζ – C ϵ 1 (Cadeia lateral da fenilalanina)	167.42	0.0
C γ – C δ 2 – C ϵ 2 – C ζ (Cadeia lateral da fenilalanina)	167.42	0.0	H ϵ 2 – C δ 2 – C ζ – C ϵ 2 (Cadeia lateral da fenilalanina)	167.42	0.0
C δ 1 – C γ – C δ 2 – C ϵ 2 (Cadeia lateral da fenilalanina)	167.42	0.0	C ζ – C ϵ 1 – C ϵ 2 – H ζ (Cadeia lateral da fenilalanina)	167.42	0.0

Diedros próprios	$k_{\square}$ [kJ . mol ⁻¹]	δ	n	Diedros próprios	$k_{\square}$ [kJ . mol ⁻¹]	δ	n
CH _N – CH _N – OA – H (Cadeia lateral da Treonina)	1.26	0	3	C – CH _N – CH _N – CH _N or C – C – CH _N – CH _N	1.00	0	6
C – N – C α – C (backbone)	2.80	0	3	O – C – CH _N – CH _N	2.67	180	1
CH _N – CH _N – NL – H ou CH _N – CH _N – N – H	3.77	0	3	N – C α – C – N (backbone)	3.50	180	2
CH _N – CH _N – CH _N – CH _N , CH _N – CH _N – CH _N – N, CH _N – CH _N – CH _N – NL, C – CH _N – CH _N – N, OA – CH _N – CH _N – N	5.92	0	3	C α – C – N – C α (backbone)	33.50	180	2
N – C α – C – N (backbone)	0.40	0	6	C – N – C α – C (backbone)	0.70	180	6
Exclusões (apenas na fenilalanina)							
C β – H δ 1	C β – H δ 2	C β – C ϵ 1	C β – C ϵ 2	C γ – H ϵ 1	C γ – H ϵ 2	C γ – C ζ	
C δ 1 – H δ 2	C δ 1 – C ϵ 2	C δ 1 – H ζ	H δ 1 – C δ 2	H δ 1 – H ϵ 1	H δ 1 – C ζ	C δ 2 – C ϵ 1	
C δ 2 – H ζ	H δ 2 – H ϵ 2	H δ 2 – C ζ	C ϵ 1 – H ϵ 2	H ϵ 1 – C ϵ 2	H ϵ 1 – H ζ	H ϵ 2 – H ζ	

Table A1.2. Topologias para lipídeo-A, lipídeo A contendo 4-amino-4-deoxy-l-arabinose (LipA_{Ara4N}) e LPS Re na configuração penta e hexa-acilada, utilizando o GROMOS 53A6_{glyc} para a parametrização dos sacarídeos e o GROMOS53A6 para as cadeias lipídicas.

Descrição do grupo de carga	GROMOS atom type	Carga parcial	Descrição do grupo de carga	GROMOS atom type	Carga parcial
	CH ₁ or CH ₂	0.232		C	0.360
Hidroxila (neutro)	OA	-0.642	Carboxila (carga -1)	OM	-0.680
	H	0.410		OM	-0.680
	CH ₁	0.160		CH ₁	0.376
	OE	-0.360		OA	-0.480
Ester (neutro)	C	0.580	Ligação Glicosídica (neutro)	CH ₁	0.232
	O	-0.380		OA	-0.360
	CH ₂	0.000		CH ₁	0.232
	CH ₁	0.232		CH ₁	0.376
	N	-0.200		OA	-0.480
N-acetil (neutro)	H	0.310		CH ₁	0.232
	C	0.108	Ligação Fosfo-glicosídica (carga -1), no lipídeo A com Ara4N	OA	-0.424
	O	-0.450		P	0.990
	CH ₂	0.000		OM (x2)	-0.699
	CH ₁	0.232		OA	-0.424
	OA	-0.507		CH ₁	0.232
Fosfato, Ligado ao C4 (carga -1), no lipídeo A e lipídeo Re	P	1.346		CH ₁	0.376
	OM (x2)	-0.884		OA	-0.480
	OA	-0.733		CH ₁	0.336
	H	0.430	Fosfato, Ligado ao Cl (carga -1), no lipídeo A e lipídeo Re	OA	-0.507
	CH ₁	0.127		P	1.346
Metilamônio (carga +1)	NL	0.129		OM (x2)	-0.884
	H (x3)	0.248		OA	-0.733

Cadeia alquílica (neutro)	CH ₂ or CH ₃	0.000	H	0.430	
Tipo de ligação	k_b [10⁶ kJ . mol⁻¹ . nm⁻⁴]^a	b_o [nm]	Tipo de ligação	k_b [10⁶ kJ . mol⁻¹ . nm⁻⁴]^a	b_o [nm]
OA-P	4.84	0.161	CH ₁ -N ou CH ₁ -NL	8.71	0.147
CH ₁ -CH ₁ , CH ₁ -CH ₂ or C-CH ₁ nos anéis do sacarídeo	5.43	0.152	C-CH ₂ no N-acetil	10.60	0.133
CH ₁ -OE, CH ₁ -OA or CH ₂ -OA na hidroxila e ligação glicosídica	6.10	0.144	N-C or OE-C	11.80	0.133
CH ₂ -CH _{2,3} nas cadeias alquílicas	7.15	0.153	C-OM	13.40	0.125
C-CH ₂ no ester	7.64	0.148	OA-H	15.70	0.100
CH ₁ -OA no fosfato ligações fosfo-glicosídicas	8.18	0.143	C-O	16.60	0.123
OM-P	8.60	0.148	N-H or NL-H	18.70	0.100
Tipo de ângulo	k_θ[kJ . mol⁻¹]^b	θ_o [deg]	Tipo de ângulo	k_θ[kJ . mol⁻¹]^b	θ_o [deg]
CH _{1,2} – CH _{1,2} – CH _{1,2} CH ₁ nos anéis do sacarídeo	285	109.5	C – CH _{1,2} – CH _{1,2} CH _{2,3} – CH ₂ – CH _{2,3} nas cadeias alquílicas or NL – CH ₁ – CH ₁	530	111.0
OA – CH _{1,2} – CH _{1,2}	320	109.5	CH ₁ – OA – P	530	120.0
CH _{1,2} – OA – CH _{1,2} or H – NL – H	380	109.5	OE – C – CH _{1,2}	545	113.0
H – N – C	415	123.0	N – C – CH ₂	610	115.0
OA – P – OA	420	103.0	CH ₁ – OE – C	635	117.0
CH ₁ – NL – H	425	109.5	O – C – CH ₂ no N-acetil	685	121.0
CH _{1,2} – OA – H	450	109.5	CH ₁ – N – C OE – C – O O – C – CH ₂ nas cadeias alquílicas	700	122.0
OA – P – OM	450	109.6	N – C – O	730	124.0
CH ₁ – N – H	460	115.0	O – C – CH ₂ no éster	750	125.0
CH ₂ – CH ₂ – OA CH _{1,2} – CH _{1,2} – N CH _{1,2} – CH _{1,2} – OE	520	109.5	OM – P – OM	780	120.0
Diedro impróprio	k_ξ [kJ . mol⁻¹ . rad⁻²]	ξ_o [deg]	Diedro impróprio	k_ξ [kJ . mol⁻¹ . rad⁻²]	ξ_o [deg]

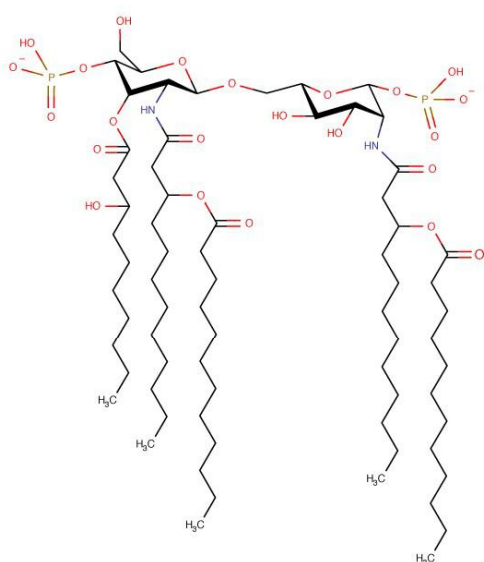
C1 _N – O1 _N – O5 _N – C2 _N (β-anomero)	334.84	35.2644	C2 _N – N _N – C3 _N – C1 _N (equatorial 2-N-acetyl)	334.84	35.2644
C1 _N – O5 _N – O1 _N – C2 _N (α-anomero)	334.84	35.2644	C4 _N – N4 _N – C3 _N – C5 _N (axial 4-NH ₄ ⁺)	334.84	35.2644
C2 _N – O2 _N – C3 _N – C1 _N (equatorial 2-OH)	334.84	35.2644	C4 _N – C3 _N – O4 _N – C5 _N (equatorial 4-OH)	334.84	35.2644
C2 _N – C3 _N – O2 _N – C1 _N (axial 2-OH)	334.84	35.2644	C4 _N – O4 _N – C3 _N – C5 _N (axial 4-OH)	334.84	35.2644
C3 _N – O3 _N – C2 _N – C4 _N (equatorial 3-OH)	334.84	35.2644	C5 _N – O5 _N – C6 _N – C4 _N (equatorial 6-CH ₂ OH)	334.84	35.2644
C3 _N – C2 _N – O3 _N – C4 _N (axial 3-OH)	334.84	35.2644	C5 _N – C6 _N – O5 _N – C4 _N (axial 6-CH ₂ OH)	334.84	35.2644
N – C – CH ₂ – H no N-acetil	167.42	0.0	C – CH ₂ – N – O no N-acetil	167.42	0.0
C – CH2 – OE – O no ester	167.42	0.0	CH ₁ – OM – OM – CH ₁ na carboxila	167.42	0.0

Diedros próprios	k _□ [kJ . mol ⁻¹]	δ	n	Diedros próprios	k _□ [kJ . mol ⁻¹]	δ	n
OA – CH _N – CH _N – CH _N	5.88	0	1	OA – CH _N – OA – P	0.00	0	4
N – CH _N – CH _N – CH _N	0.00	0	2	OE – C – CH _N – CH _N	0.00	0	4
N – CH _N – CH _N – OA	0.42	0	2	OM – CH _N – CH _N – CH _N	1.00	0	6
OA – CH _N – CH _N – OA	2.09	0	2	CH _N – OE – C – CH _N	24.00	180	2
CH _N – OA – P – OA	3.14	0	2	CH _N – N – C – CH _N	33.50	180	2
CH _N – OA – P – OA	1.05	0	3	OA – CH _N – OA – CH _N (α-anomero)	3.65	0	3
OA – P – OA – H	3.14	0	2	OA – CH _N – OA – CH _N (α-anomero)	9.45	180	1
OA – P – OA – H	1.05	0	3	OA – CH _N – OA – CH _N (β-anomero)	4.69	0	3
CH _N – CH _N – OA – CH _N	3.77	0	3	OA – CH _N – OA – CH _N (β-anomero)	3.41	180	1
CH _N – CH _N – OA – H	3.90	0	3	OA – CH _N – CH _N – OA no hidroximetil	9.50	0	3
CH _N – CH _N – NL – H	3.90	0	3	OA – CH _N – CH _N – OA no hidroximetil	9.35	180	1
CH _N – CH _N – N – C	3.90	0	3	Exclusões			

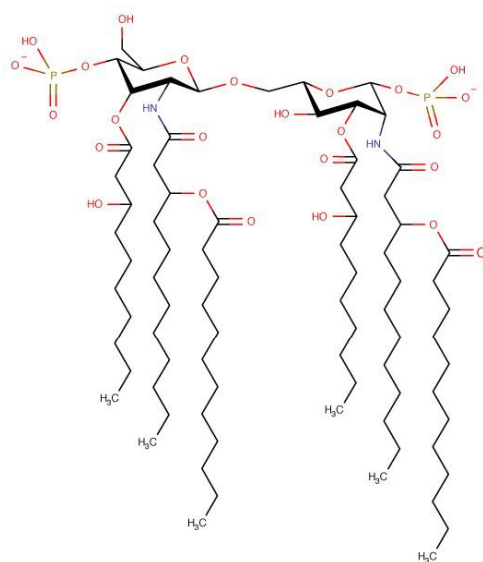
$\text{CH}_\text{N} - \text{CH}_\text{N} - \text{CH}_\text{N} - \text{CH}_\text{N}$	5.92	0	3	OM – H no fosfato
$\text{OA} - \text{CH}_\text{N} - \text{CH}_\text{N} - \text{CH}_\text{N}$	7.67	0	3	

APÊNDICE 2 (Figuras)

Figura A2.1. Estrutura química do lipídeo A utilizado nas simulações

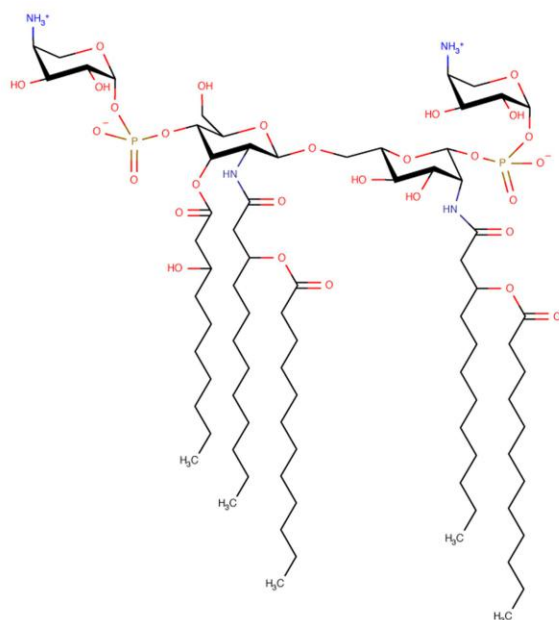


Lipídeo A pentaacilado

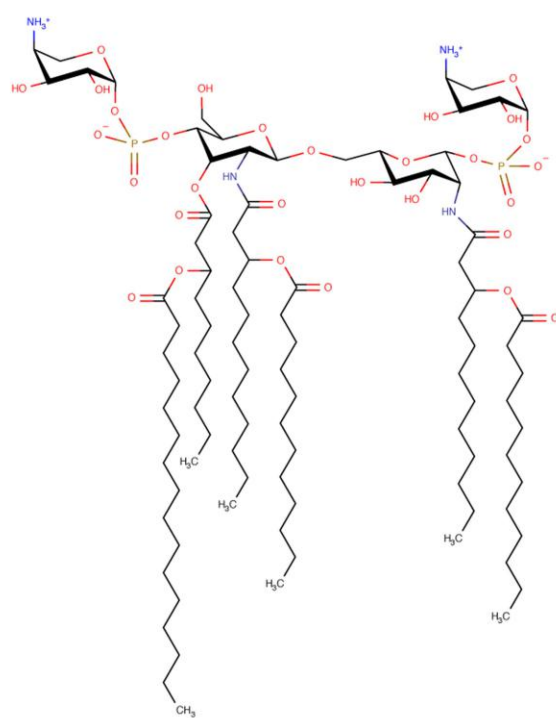


Lipídeo A hexaacilado

Figura A2.2. Estrutura química do lipídeo A com adição de 4-amino-4-deoxy-1-arabinose (Ara4N) utilizado nas simulações

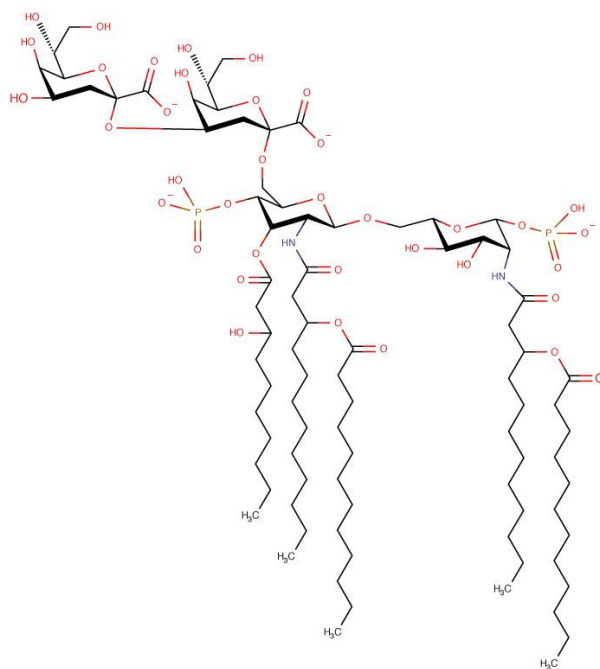


**Lipídeo A pentaacilado
com Ara4N**



**Lipídeo A hexaacilado
com Ara4N**

Figura A2.3. Estrutura do lipídeo Re utilizado nas simulações



Lipídeo Re pentaacilado

APÊNDICE 3 (Estruturas)

Estrutura A3.1. Estrutura mais representativa da polimixina B utilizando GROMOS54A7 e Campo de Reação.

TITLE POLIMIXINA B
MODEL 1

ATOM	1	CA	AMO	0	-4.70	-7.13	-1.18	1.00	0.00	C
ATOM	2	CB	AMO	0	-5.66	-6.89	0.00	1.00	0.00	C
ATOM	3	CG	AMO	0	-5.73	-8.11	0.92	1.00	0.00	C
ATOM	4	CD	AMO	0	-6.46	-7.96	2.26	1.00	0.00	C
ATOM	5	CE	AMO	0	-6.26	-9.17	3.18	1.00	0.00	C
ATOM	6	CF	AMO	0	-6.61	-10.56	2.64	1.00	0.00	C
ATOM	7	CH	AMO	0	-6.69	-11.52	3.82	1.00	0.00	C
ATOM	8	CI	AMO	0	-4.82	-9.16	3.70	1.00	0.00	C
ATOM	9	C	AMO	0	-4.06	-5.85	-1.70	1.00	0.00	C
ATOM	10	O	AMO	0	-4.74	-5.00	-2.26	1.00	0.00	O
ATOM	11	N	DAB	1	-2.76	-5.70	-1.49	1.00	0.00	N
ATOM	12	H	DAB	1	-2.23	-6.42	-1.02	1.00	0.00	H
ATOM	13	CA	DAB	1	-2.02	-4.53	-1.97	1.00	0.00	C
ATOM	14	CB	DAB	1	-0.71	-4.41	-1.18	1.00	0.00	C
ATOM	15	CG	DAB	1	0.15	-3.21	-1.59	1.00	0.00	C
ATOM	16	ND	DAB	1	1.48	-3.05	-0.96	1.00	0.00	N
ATOM	17	HD1	DAB	1	1.48	-2.96	0.04	1.00	0.00	H
ATOM	18	HD2	DAB	1	2.01	-3.87	-1.18	1.00	0.00	H
ATOM	19	HD3	DAB	1	2.07	-2.37	-1.39	1.00	0.00	H
ATOM	20	C	DAB	1	-1.82	-4.62	-3.48	1.00	0.00	C
ATOM	21	O	DAB	1	-0.70	-4.64	-4.01	1.00	0.00	O
ATOM	22	N	THR	2	-2.94	-4.52	-4.18	1.00	0.00	N
ATOM	23	H	THR	2	-3.83	-4.58	-3.74	1.00	0.00	H
ATOM	24	CA	THR	2	-3.10	-4.42	-5.64	1.00	0.00	C
ATOM	25	CB	THR	2	-4.35	-5.15	-6.12	1.00	0.00	C
ATOM	26	OG1	THR	2	-5.50	-4.64	-5.44	1.00	0.00	O
ATOM	27	HG1	THR	2	-6.35	-4.92	-5.88	1.00	0.00	H
ATOM	28	CG2	THR	2	-4.19	-6.67	-5.96	1.00	0.00	C
ATOM	29	C	THR	2	-3.02	-3.05	-6.3	1.00	0.00	C
ATOM	30	O	THR	2	-2.29	-2.84	-7.28	1.00	0.00	O
ATOM	31	N	DAB	3	-3.63	-2.11	-5.59	1.00	0.00	N
ATOM	32	H	DAB	3	-4.18	-2.28	-4.78	1.00	0.00	H
ATOM	33	CA	DAB	3	-3.67	-0.69	-6.02	1.00	0.00	C
ATOM	34	CB	DAB	3	-5.06	-0.29	-6.50	1.00	0.00	C
ATOM	35	CG	DAB	3	-5.44	-1.17	-7.69	1.00	0.00	C
ATOM	36	ND	DAB	3	-6.68	-0.72	-8.31	1.00	0.00	N
ATOM	37	HD1	DAB	3	-6.50	0.24	-8.48	1.00	0.00	H
ATOM	38	HD2	DAB	3	-6.77	-1.14	-9.22	1.00	0.00	H
ATOM	39	HD3	DAB	3	-7.49	-0.93	-7.75	1.00	0.00	H

ATOM	40	C	DAB	3	-3.20	0.35	-5.01	1.00	0.00	C
ATOM	41	O	DAB	3	-3.22	1.55	-5.32	1.00	0.00	O
ATOM	42	N	DABN	4	-3.00	-0.11	-3.78	1.00	0.00	N
ATOM	43	H	DABN	4	-3.52	-0.93	-3.53	1.00	0.00	H
ATOM	44	CA	DABN	4	-2.4	0.60	-2.64	1.00	0.00	C
ATOM	45	CB	DABN	4	-2.77	-0.09	-1.32	1.00	0.00	C
ATOM	46	CG	DABN	4	-4.25	-0.11	-0.97	1.00	0.00	C
ATOM	47	ND	DABN	4	-4.46	-1.00	0.18	1.00	0.00	N
ATOM	48	HD	DABN	4	-4.16	-0.65	1.06	1.00	0.00	H
ATOM	49	C	DABN	4	-0.89	0.78	-2.83	1.00	0.00	C
ATOM	50	O	DABN	4	-0.13	-0.18	-2.70	1.00	0.00	O
ATOM	51	N	DAB	5	-0.48	1.99	-3.18	1.00	0.00	N
ATOM	52	H	DAB	5	-0.97	2.82	-2.92	1.00	0.00	H
ATOM	53	CA	DAB	5	0.91	2.21	-3.57	1.00	0.00	C
ATOM	54	CB	DAB	5	1.09	3.64	-4.11	1.00	0.00	C
ATOM	55	CG	DAB	5	0.20	3.84	-5.34	1.00	0.00	C
ATOM	56	ND	DAB	5	0.71	5.02	-6.05	1.00	0.00	N
ATOM	57	HD1	DAB	5	0.22	5.08	-6.92	1.00	0.00	H
ATOM	58	HD2	DAB	5	0.41	5.87	-5.60	1.00	0.00	H
ATOM	59	HD3	DAB	5	1.68	5.00	-6.27	1.00	0.00	H
ATOM	60	C	DAB	5	1.84	2.13	-2.36	1.00	0.00	C
ATOM	61	O	DAB	5	1.57	2.60	-1.26	1.00	0.00	O
ATOM	62	N	DPHE	6	3.03	1.63	-2.69	1.00	0.00	N
ATOM	63	H	DPHE	6	3.22	1.41	-3.65	1.00	0.00	H
ATOM	64	CA	DPHE	6	4.09	1.40	-1.70	1.00	0.00	C
ATOM	65	CB	DPHE	6	5.41	0.93	-2.31	1.00	0.00	C
ATOM	66	CG	DPHE	6	6.20	1.96	-3.13	1.00	0.00	C
ATOM	67	CD1	DPHE	6	6.49	1.71	-4.46	1.00	0.00	C
ATOM	68	HD1	DPHE	6	6.26	0.75	-4.91	1.00	0.00	H
ATOM	69	CD2	DPHE	6	6.72	3.10	-2.53	1.00	0.00	C
ATOM	70	HD2	DPHE	6	6.83	3.11	-1.45	1.00	0.00	H
ATOM	71	CE1	DPHE	6	7.37	2.51	-5.19	1.00	0.00	C
ATOM	72	HE1	DPHE	6	7.80	2.12	-6.11	1.00	0.00	H
ATOM	73	CE2	DPHE	6	7.57	3.96	-3.23	1.00	0.00	C
ATOM	74	HE2	DPHE	6	7.86	4.95	-2.88	1.00	0.00	H
ATOM	75	CZ	DPHE	6	7.92	3.59	-4.51	1.00	0.00	C
ATOM	76	HZ	DPHE	6	8.82	4.06	-4.92	1.00	0.00	H
ATOM	77	C	DPHE	6	3.73	0.49	-0.52	1.00	0.00	C
ATOM	78	O	DPHE	6	2.84	-0.33	-0.73	1.00	0.00	O
ATOM	79	N	LEU	7	4.19	0.91	0.66	1.00	0.00	N
ATOM	80	H	LEU	7	4.57	1.82	0.81	1.00	0.00	H
ATOM	81	CA	LEU	7	4.08	0.10	1.88	1.00	0.00	C
ATOM	82	CB	LEU	7	5.11	0.64	2.88	1.00	0.00	C
ATOM	83	CG	LEU	7	6.52	0.12	2.68	1.00	0.00	C
ATOM	84	CD1	LEU	7	6.50	-1.38	3.00	1.00	0.00	C
ATOM	85	CD2	LEU	7	7.18	0.32	1.32	1.00	0.00	C

Estrutura A3.2. Estrutura do lipídeo A penta-acilado

TITLE LIPÍDIO A PENTA-ACILADO
MODEL 1

ATOM	1	C4	LP1	1	4.22	4.28	35.41	1.00	0.00
ATOM	2	OP1	LP1	1	2.80	4.36	35.54	1.00	0.00
ATOM	3	P	LP1	1	2.07	3.18	36.32	1.00	0.00
ATOM	4	OP2	LP1	1	1.58	3.83	37.56	1.00	0.00
ATOM	5	OP3	LP1	1	3.08	2.1	36.45	1.00	0.00
ATOM	6	OP4	LP1	1	0.89	2.78	35.31	1.00	0.00
ATOM	7	HP4	LP1	1	0.00	2.96	35.73	1.00	0.00
ATOM	8	C3	LP1	1	4.63	4.71	34.00	1.00	0.00
ATOM	9	O3	LP1	1	3.91	4.02	32.93	1.00	0.00
ATOM	10	C31	LP1	1	3.08	4.72	32.15	1.00	0.00
ATOM	11	O31	LP1	1	2.98	5.95	32.25	1.00	0.00
ATOM	12	C32	LP1	1	2.59	3.96	31.00	1.00	0.00
ATOM	13	C33	LP1	1	3.05	4.62	29.69	1.00	0.00
ATOM	14	3OH3	LP1	1	2.30	5.81	29.48	1.00	0.00
ATOM	15	3HO3	LP1	1	1.32	5.59	29.49	1.00	0.00
ATOM	16	C34	LP1	1	2.91	3.72	28.45	1.00	0.00
ATOM	17	C35	LP1	1	3.50	4.43	27.22	1.00	0.00
ATOM	18	C36	LP1	1	3.24	3.69	25.92	1.00	0.00
ATOM	19	C37	LP1	1	3.69	4.56	24.75	1.00	0.00
ATOM	20	C38	LP1	1	3.38	3.89	23.39	1.00	0.00
ATOM	21	C39	LP1	1	3.77	4.82	22.25	1.00	0.00
ATOM	22	C40	LP1	1	3.47	4.16	20.89	1.00	0.00
ATOM	23	C2	LP1	1	6.14	4.61	33.74	1.00	0.00
ATOM	24	N	LP1	1	6.35	5.02	32.33	1.00	0.00
ATOM	25	HN	LP1	1	5.58	5.54	31.98	1.00	0.00
ATOM	26	C	LP1	1	7.42	4.82	31.56	1.00	0.00
ATOM	27	OC	LP1	1	8.40	4.16	31.90	1.00	0.00
ATOM	28	CA	LP1	1	7.07	4.88	30.28	1.00	0.00
ATOM	29	CB	LP1	1	7.96	5.60	29.25	1.00	0.00
ATOM	30	OB	LP1	1	9.34	5.84	29.59	1.00	0.00
ATOM	31	CB1	LP1	1	10.24	4.86	29.46	1.00	0.00
ATOM	32	OB1	LP1	1	9.94	3.75	29.02	1.00	0.00
ATOM	33	CB2	LP1	1	11.61	5.33	29.73	1.00	0.00
ATOM	34	CB3	LP1	1	12.66	4.71	28.79	1.00	0.00
ATOM	35	CB4	LP1	1	12.44	5.15	27.32	1.00	0.00
ATOM	36	CB5	LP1	1	13.27	4.32	26.35	1.00	0.00
ATOM	37	CB6	LP1	1	12.98	4.76	24.93	1.00	0.00
ATOM	38	CB7	LP1	1	13.73	3.88	23.90	1.00	0.00
ATOM	39	CB8	LP1	1	13.45	4.37	22.48	1.00	0.00
ATOM	40	CB9	LP1	1	14.13	3.48	21.45	1.00	0.00
ATOM	41	0CB1	LP1	1	13.93	4.01	20.01	1.00	0.00
ATOM	42	1CB1	LP1	1	12.45	3.96	19.57	1.00	0.00
ATOM	43	2CB1	LP1	1	12.29	4.56	18.18	1.00	0.00

ATOM	44	3CB1	LP1	1	7.28	6.84	28.66	1.00	0.00
ATOM	45	4CB1	LP1	1	7.85	7.21	27.28	1.00	0.00
ATOM	46	5CB1	LP1	1	7.54	6.15	26.23	1.00	0.00
ATOM	47	6CB1	LP1	1	8.13	6.53	24.86	1.00	0.00
ATOM	48	7CB1	LP1	1	7.77	5.49	23.79	1.00	0.00
ATOM	49	8CB1	LP1	1	8.35	5.90	22.44	1.00	0.00
ATOM	50	9CB1	LP1	1	7.95	4.90	21.35	1.00	0.00
ATOM	51	0CB2	LP1	1	8.51	5.28	19.98	1.00	0.00
ATOM	52	1CB2	LP1	1	7.92	6.58	19.43	1.00	0.00
ATOM	53	C6	LP1	1	4.61	5.00	37.83	1.00	0.00
ATOM	54	O6	LP1	1	5.08	5.98	38.81	1.00	0.00
ATOM	55	HO6	LP1	1	4.75	5.70	39.70	1.00	0.00
ATOM	56	C5	LP1	1	4.97	5.24	36.37	1.00	0.00
ATOM	57	O5	LP1	1	6.41	5.16	36.13	1.00	0.00
ATOM	58	C1	LP1	1	6.82	5.51	34.80	1.00	0.00
ATOM	59	O1	LP1	1	8.25	5.43	34.77	1.00	0.00
ATOM	60	C6	LP2	2	8.83	4.14	35.09	1.00	0.00
ATOM	61	C4	LP2	2	10.93	3.11	34.08	1.00	0.00
ATOM	62	O4	LP2	2	10.12	2.58	32.97	1.00	0.00
ATOM	63	HO4	LP2	2	9.53	3.31	32.54	1.00	0.00
ATOM	64	C3	LP2	2	12.37	3.61	33.76	1.00	0.00
ATOM	65	O3	LP2	2	12.88	2.96	32.54	1.00	0.00
ATOM	66	C31	LP2	2	12.94	1.63	32.41	1.00	0.00
ATOM	67	O31	LP2	2	13.37	0.89	33.31	1.00	0.00
ATOM	68	C32	LP2	2	12.99	1.19	31.00	1.00	0.00
ATOM	69	C33	LP2	2	11.58	1.15	30.41	1.00	0.00
ATOM	70	3OH3	LP2	2	10.61	0.56	31.29	1.00	0.00
ATOM	71	3HO3	LP2	2	10.36	1.26	32.00	1.00	0.00
ATOM	72	C34	LP2	2	11.51	0.56	28.98	1.00	0.00
ATOM	73	C35	LP2	2	10.06	0.51	28.45	1.00	0.00
ATOM	74	C36	LP2	2	9.95	0.04	27.00	1.00	0.00
ATOM	75	C37	LP2	2	10.32	1.13	26.00	1.00	0.00
ATOM	76	C38	LP2	2	10.04	0.66	24.57	1.00	0.00
ATOM	77	C39	LP2	2	10.31	1.76	23.55	1.00	0.00
ATOM	78	C40	LP2	2	10.01	1.29	22.12	1.00	0.00
ATOM	79	C2	LP2	2	13.17	3.80	35.06	1.00	0.00
ATOM	80	N	LP2	2	14.49	4.42	34.85	1.00	0.00
ATOM	81	HN	LP2	2	14.47	5.44	34.83	1.00	0.00
ATOM	82	C	LP2	2	15.65	3.77	34.77	1.00	0.00
ATOM	83	OC	LP2	2	15.75	2.55	34.77	1.00	0.00
ATOM	84	CA	LP2	2	16.71	4.56	34.69	1.00	0.00
ATOM	85	CB	LP2	2	16.95	5.12	33.26	1.00	0.00
ATOM	86	OB	LP2	2	17.26	4.03	32.38	1.00	0.00
ATOM	87	CB1	LP2	2	16.25	3.45	31.74	1.00	0.00
ATOM	88	OB1	LP2	2	15.38	4.12	31.16	1.00	0.00
ATOM	89	CB2	LP2	2	16.65	2.09	31.27	1.00	0.00

APÊNDICE 4 (Exemplo de input das dinâmicas e custo computacional)

Figura A4.1 Exemplo de input das simulações desenvolvidas para as membranas (à esquerda) e para as polimixinas (à direita) utilizando como TELD o campo de reação.

```

title                = MEMBRANE

integrator           = md
nsteps               = 50000000 ; 100 ns
dt                   = 0.002

nstxout              = 1000
nstvout              = 1000
nstenergy            = 1000
nstxtcout            = 1000
comm_grps            = Membrane Water_and_ions

continuation         = no
constraint_algorithm = lincs
constraints           = all-bonds
lincs_iter           = 1
lincs_order          = 4

ns_type              = grid
nstlist              = 5
pbc                  = xyz
rlist                = 1.4
coulombtype          = reaction-field
epsilon-rf           = 66
rcoulomb             = 1.4
rvdw                 = 1.4

tcoupl               = v-rescale
tc_grps              = Membrane Water_and_ions
tau_t                = 0.4 0.4
ref_t                = 300 300

pcoupl               = berendsen
tau_p                = 1.0 1.0
ref_p                = 1.0 1.0
compressibility       = 4.5e-5 4.5e-5
pcoupltype           = semiisotropic
refcoord_scaling     = com

dispcorr             = no
gen_vel              = yes

```

```

title                = POLIMIXIN B

integrator           = md
nsteps               = 50000000 ; 100 ns
dt                   = 0.002

nstxout              = 200
nstvout              = 200
nstenergy            = 200
nstxtcout            = 200
comm_grps            = Protein Water_and_ions

continuation         = no
constraint_algorithm = lincs
constraints           = all-bonds
lincs_iter           = 1
lincs_order          = 4

ns_type              = grid
nstlist              = 5
pbc                  = xyz
rlist                = 1.4
coulombtype          = reaction-field
epsilon-rf           = 66
rcoulomb             = 1.4
rvdw                 = 1.4

tcoupl               = v-rescale
tc_grps              = PROTEIN SOL CL
tau_t                = 0.4 0.4 0.4
ref_t                = 300 300 300

pcoupl               = berendsen
tau_p                = 1.0
ref_p                = 1.0
compressibility       = 4.5e-5
pcoupltype           = isotropic
refcoord_scaling     = com

dispcorr             = no
gen_vel              = yes

```

Figura A4.2 Exemplo de input das simulações desenvolvidas para as polimixinas utilizando DM e PME como TELD (à esquerda), e das simulações de DM/SA utilizando RF como TELD (à direita).

```

title           = POLIMIXIN B

integrator      = md
nsteps         = 50000000 ; 100 ns
dt             = 0.002

nstxout        = 200
nstvout        = 200
nstenergy      = 200
nstxtcout      = 200
comm_grps      = Protein Water_and_ions

continuation    = no
constraint_algorithm = lincs
constraints     = all-bonds
lincs_iter     = 1
lincs_order    = 4

ns_type        = grid
nstlist        = 5
pbc            = xyz
rlist          = 1.4
coulombtype    = PME
rcoulomb       = 1.4
rvdw           = 1.4

pme_order      = 4 ; cubic interpolation
fourierspacing = 0.16

tcoupl         = v-rescale
tc_grps        = PROTEIN SOL CL
tau_t          = 0.4 0.4 0.4
ref_t          = 300 300 300

pcoupl         = berendsen
tau_p          = 1.0
ref_p          = 1.0
compressibility = 4.5e-5
pcoupltype     = isotropic
refcoord_scaling = com

dispcorr       = no

gen_vel        = yes

```

```

title           = POLIMIXIN B

integrator      = md
nsteps         = 50000000 ; 100 ns
dt             = 0.002

nstxout        = 200
nstvout        = 200
nstenergy      = 200
nstxtcout      = 200
comm_grps      = Protein Water_and_ions

continuation    = no
constraint_algorithm = lincs
constraints     = h-bonds
lincs_iter     = 1
lincs_order    = 4

ns_type        = grid
nstlist        = 5
pbc            = xyz
rlist          = 1.4
coulombtype    = generalized-reaction-field
epsilon_rf     = 66
rcoulomb       = 1.4
rvdw           = 1.4

tcoupl         = v-rescale
tc_grps        = PROTEIN Non-Protein
tau_t          = 0.4 0.4
ref_t          = 300 300

;pcoupl        = berendsen
;tau_p         = 1.0
;ref_p         = 1.0
;compressibility = 4.5e-5
;pcoupltype    = isotropic
refcoord_scaling = com
dispcorr       = no
gen_vel        = yes

; MDSA input parameters
annealing      = periodic periodic
annealing-npoints = 5 5
annealing-time = 0 50 250 300 500 0 50 250 300 500
annealing-temp = 300 600 600 300 300 300 600 600 300 300

```

Tabela A4.1 Descrição do custo computacional das simulações dos sistemas descritos na Tabela 3.

Polimixina	Parâmetros GROMOS	TELD	Dinâmica	Núcleos.hora	ns/dia	Núcleos de process.
B	53A6	PME	MD	422,64	68,14	12
B	54A7	PME	MD	500,14	19,19	4
B	53A6	RF	MD	278,05	34,53	4
B	54A7	RF	MD	280,34	34,24	4
E	54A7	RF	MD	289,93	33,11	4
M	54A7	RF	MD	278,99	34,41	4
B	54A7	RF	MDSA	301,82	31,81	4
E	54A7	RF	MDSA	289,11	33,21	4
M	54A7	RF	MDSA	367,76	26,10	4

Tabela A4.2 Descrição do custo computacional das simulações dos sistemas descritos na Tabela 4.

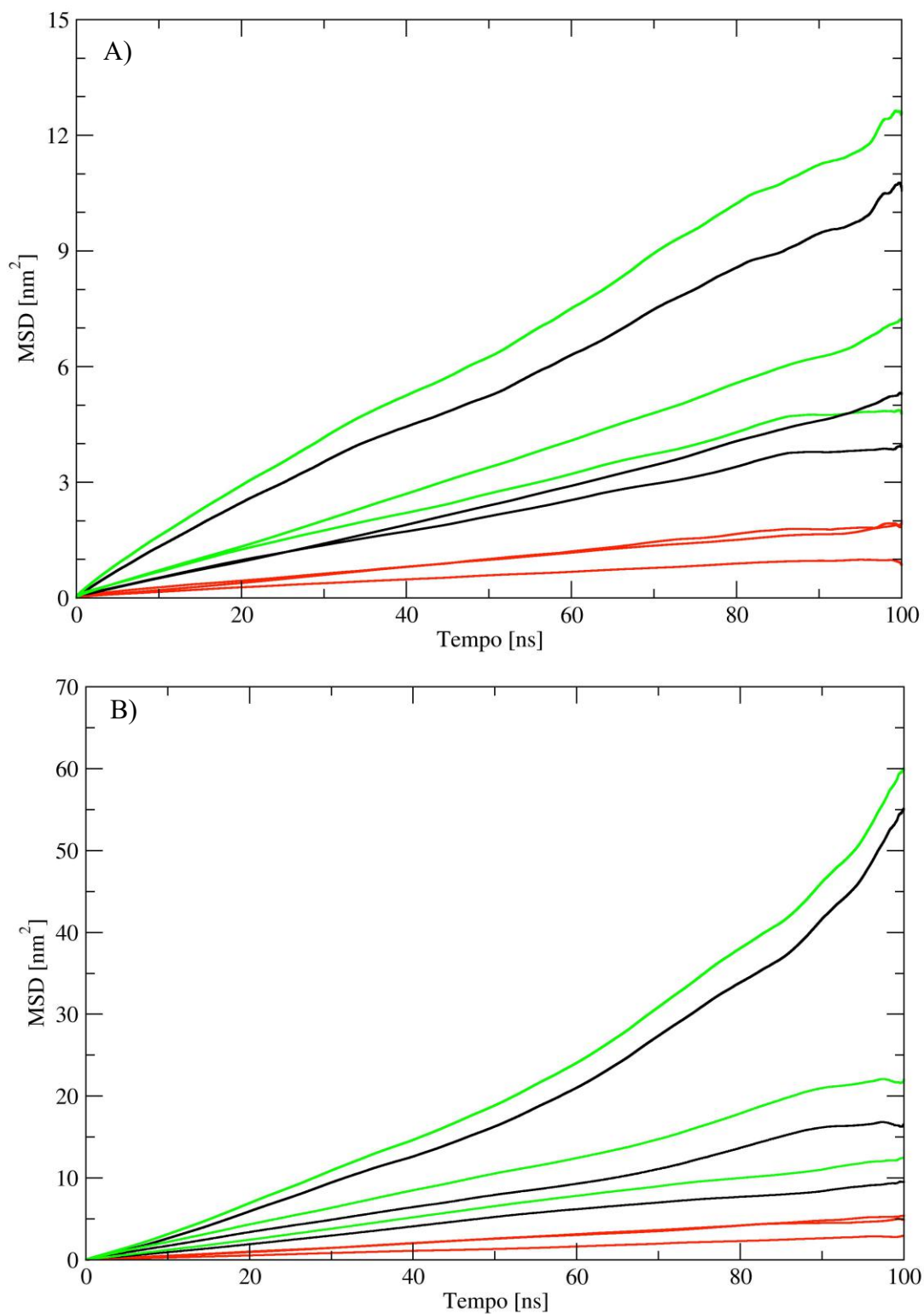
Sistema	Núcleos.hora	ns/dia	Núcleos de process.
LipA _{penta}	15163,08	37,99	240
LipA _{hexa}	18961,40	24,30	192
LipA _{Ara4N,penta}	15211,27	22,72	144
LPSR _{penta}	17747,10	32,46	240

Tabela A4.3 Descrição do custo computacional das simulações dos sistemas descritos na Tabela 5, sem concentração salina e com 6 unidades de polimixina B.

Sistema	Núcleos.hora	ns/dia	Núcleos de process.
LipA _{penta}	20631,30	22,34	192
LipA _{hexa}	21613,51	26,65	240
LipA _{Ara4N,penta}	23709,56	24,29	240
LPSR _{penta}	25799,52	22,33	240

APÊNDICE 5 (Desvio médio quadrático)

Figura A5.1 Relação entre o deslocamento médio quadrático das posições dos íons Ca^{2+} e o tempo de simulação para os sistemas de membranas A) sem presença das polimixinas e B) na presença das polimixinas. Em preto, estão as curvas para o deslocamento no plano xy, em vermelho estão as curvas para o deslocamento ao longo do eixo z e em verde estão as curvas para os deslocamentos em todas as direções (deslocamento global). Estão representadas as curvas para as bicamadas de $\text{LipA}_{\text{penta}}$, $\text{LipA}_{\text{hexa}}$ e LPSRE sem distinção no traço, mas podendo, as inclinações, ser diretamente comparadas aos valores apresentados nas Tabelas 9 e 13.



APÊNDICE 6 (Publicações e Eventos)

Trabalhos publicados

SANTOS, D. E. S.; POL-FACHIIN, L.; LINS, R. D.; SOARES, T. A. Polymyxin Binding to the Bacterial Outer Membrane Reveals Cation Displacement and Increasing Membrane Curvature in Susceptible but not in Resistant LPS Chemotypes. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 57 (9), p. 2181–2193, 2017.

Eventos

VI STINT Workshop. THE VALIDATION OF POLYMER BRUSH MODELS: ACCOUNTING FOR NEW VARIABLES. Londres, Inglaterra, 2017.

III AsBioSim. SuAVE: an alternative for assessment of curved surfaces. Recife, 2017.

II AsBioSim. Polymyxin B and its mechanism of action over different membrane chemotypes. Recife, 2016.

VII SBQ Nordeste. Modelagem computacional e estudo da Dinâmica Molecular de sistemas de Polymer Brushes frente a diferentes ambientes químicos. Recife, 2016.