

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

**SuAVE: UMA FERRAMENTA PARA ANÁLISE DE PROPRIEDADES
DEPENDENTES DE CURVATURA EM INTERFACES QUÍMICAS**

Recife

2021

DENYS EWERTON DA SILVA SANTOS

**SUAVE: UMA FERRAMENTA PARA ANÁLISE DE PROPRIEDADES
DEPENDENTES DE CURVATURA EM INTERFACES QUÍMICAS**

Tese 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 Doutor em Química.

Área de concentração: Química Teórica

Linha de Pesquisa: Desenvolvimento e Aplicações de Ferramentas Computacionais para Biologia.

Orientadora: Profa. Dra. Thereza Amélia Soares

Co-orientadora: Profa. Dra. Kaline Coutinho

Recife

2021

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- S237s Santos, Denys Ewerton da Silva.
SuAVE: uma ferramenta para análise de propriedades dependentes de curvatura em interfaces químicas / Denys Ewerton da Silva Santos. – 2021.
201 f.: il., fig., tab.
- Orientadora: Thereza Amélia Soares.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, Programa de Pós-graduação em Química. Recife, 2021.
Inclui referências, apêndices e anexos.
1. Membranas lipídicas. 2. Interfaces químicas. 3. Simulação computacional. 4. Propriedades estruturais. 5. Ferramentas de análise. I. Soares, Thereza Amélia (Orientadora). II. Título.

540

CDD (23. ed.)

UFPE- CCEN 2021 - 152

DENYS EWERTON DA SILVA SANTOS

**SUAVE: UMA FERRAMENTA PARA ANÁLISE DE PROPRIEDADES
DEPENDENTES DE CURVATURA EM INTERFACES QUÍMICAS**

Tese 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 Doutor em Química.

Aprovado em: 02/08/2021

BANCA EXAMINADORA

Profa. Thereza Amélia Soares (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Ricardo Luiz Longo
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Filipe da Silva Lima
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Cristiano Luis Pinto Oliveira
Universidade de São Paulo

Prof. Leandro Martinez
Universidade de Campinas

Aos meus pais, cujo trabalho e empenho concederam meu crescimento e realização profissional. São o meu orgulho. Pais maravilhosos, que fortaleceram minha base moral e me guiaram em decisões importantes e me apoiaram em todos os meus projetos. Sintam nesse trabalho uma pequena recompensa por tudo que já fizeram a esse tão amado filho.

À minha companheira que está comigo em tantas batalhas e projetos. Ao apoio incondicional, carinho, doçura e respeito que sempre demonstrou. Pelos momentos de descontração que compõem meus dias e me auxiliaram a aliviar a carga do trabalho necessária no caminhar desse projeto.

Por fim, gostaria de dedicar esse trabalho especialmente aos meus avôs Eliezer Cavalcante dos Santos e Manoel Gomes da Silva, que agora caminham ao lado de Deus. Em suas memórias, pela indiscutível fibra moral, exemplo e carinho. Por terem sido a base familiar necessária no meu crescimento e de toda minha família. Serão sempre lembrados pelas suas virtudes e por todas pessoas que humildemente auxiliaram. Que Deus os ilumine hoje e sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Profa. Thereza Amélia Soares, cujo direcionamento e propostas fizeram desse trabalho, não apenas um exercício de programação, mas uma pesquisa avançada acerca de propriedades geométricas e energéticas de interfaces químicas. Agradeço pelo investimento de tempo, ideias, e por procurar as colaborações que se fizeram tão significativas para resolução de problemas que nos fugiam ao conhecimento. Além disso, agradeço pela amizade que me tem dispensado e confiança no trabalho que executo.

Gostaria também de agradecer à minha coorientadora Profa. Kaline Coutinho, ao Prof. Roberto Lins e ao Prof. Filipe Lima, que me auxiliaram na avaliação matemática de algumas ferramentas e com a inserção de novas ideias a serem aplicadas em novas etapas dessa pesquisa.

À minha caríssima colega de trabalho Manoela Paschoal, cujo simpático auxílio forneceu base para melhoramentos no protocolo de ajuste do programa, além de ser parte integrante do grupo de avaliação e correção de falhas.

A todos que testaram e identificaram problemas na implementação, assim como propuseram novas ideias para facilitar a interação do programa com o usuário.

Ao Prof. Antônio Fernando Pereira de Sousa, do Departamento de Matemática, que gentilmente me concedeu acesso às aulas de Geometria Diferencial, por ele ministradas. Com certeza, esses momentos se mostraram demais valiosos para o desenvolvimento metodológico aqui apresentado.

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

*De formas tais e maneiras
que, se era de ir, acabou indo.
(Eliezer Cavalcante dos Santos)*

RESUMO

O software SuAVE (*Surface Assessment Via grid Evaluation*) é uma suíte de programas (ferramentas), escritos em Fortran 90, que facultam a análise de propriedades estruturais de modelos computacionais de superfícies e interfaces químicas, considerando a morfologia destes sistemas. O programa foi desenvolvido para ser aplicado a qualquer superfície ou interface orgânica, inorgânica ou biológica, apresentando ou não curvatura e exibindo uma ampla gama de morfologias. O software SuAVE utiliza como arquivos de entrada, a localização das partículas de uma superfície ou interface química, em formato PDB, oriunda de qualquer metodologia de simulação molecular, determinística ou estocástica. É capaz de calcular, eficientemente, uma série de propriedades relevantes para sistemas biológicos: área e volume por molécula, espessura de membranas e vesículas, raio de giro e forma de vesículas e micelas, perfis de densidade, parâmetros de ordem de curvatura, e curvaturas Gaussianas. A exatidão da metodologia numérica implementada no SuAVE para avaliar as propriedades mencionadas foi testada e validada através da análise estrutural de quatro bicamadas de diferentes quimiotipos de Lipídio A, apresentando morfologias distintas e de uma vesícula de Lipídio A. O resultado dessas análises foi comparado com o obtido através de metodologias convencionais que não levam em consideração a curvatura das interfaces químicas. Para o caso das superfícies abertas, as bicamadas, foi possível verificar que os resultados apresentados pelo SuAVE guardam elevado nível de semelhança com os obtidos pelas metodologias convencionais, quando os sistemas analisados exibem uma conformação plana. Entretanto, para os sistemas apresentando regiões altamente curvadas em sua morfologia, os resultados foram sensivelmente diferentes, alertando para a influência da conformação das membranas lipídicas sobre suas propriedades estruturais. Na avaliação estrutural da vesícula, as análises realizadas mostraram como a metodologia implementada no SuAVE é capaz de auxiliar o correto entendimento acerca das mudanças morfológicas que esta estrutura sofre ao longo da simulação. Portanto, por ser capaz de levar em consideração a morfologia das interfaces químicas em estudo, o SuAVE demonstrou maior versatilidade e acurácia para lidar com uma ampla variedade de análises estruturais para qualquer tipo de superfície ou interface química.

Palavras-chave: membranas lipídicas; interfaces químicas; simulação computacional; propriedades estruturais; ferramentas de análise; curvatura.

ABSTRACT

The SuAVE software (*Surface Assessment Via grid Evaluation*) is a suite of programs, written in Fortran 90, which provide analysis of structural properties of computational models of surfaces and chemical interfaces taking into account their morphology. The program was developed to be applied to any organic, inorganic or biological surface or chemical interface, presenting or not curvature and exhibiting a wide range of morphologies. SuAVE programs require as input the position of the particles composing a surface or chemical interface, in PDB format, arising from any molecular simulation methodology, deterministic or stochastic. SuAVE is able to efficiently calculate a series of relevant properties concerning biological systems: the area and volume per molecule, membrane and vesicle thickness, radius of gyration and the shape of vesicles and micelles, density profiles, curvature order parameters and Gaussian curvatures. The accuracy of the routines implemented in SuAVE to evaluate the aforementioned properties were tested and validated through the analysis of several geometrical properties of bilayers composed of four different Lipid A chemotypes with distinct membrane morphologies, and a Lipid A vesicle. The result of these analyses was compared with that obtained by conventional methodologies which do not take into account the curvature of the lipid membranes. In the case of open surfaces, it was found that curvature-dependent or independent methods lead to similar quantities and accuracy for planar surfaces. However, a great discrepancy between the two methods was observed for curved surfaces, emphasizing the importance of taking into account the effect of surface curvature in the calculation of structural properties of lipid membranes. By analyzing the Lipid A vesicle, it was possible to show the power of SuAVE tools for helping the correct understanding as for the morphological changes observed on the vesicle shape along the simulation. Therefore, SuAVE presents an increased accuracy and versatility to handle a wide variety of structural analysis for nearly any type of chemical surfaces or interfaces.

Key words: lipid membranes; chemical interfaces; computational simulations; structural properties; analysis tools; curvature.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Exemplo de tesselação de Voronoi (linha pontilhada) para 8 pontos de uma superfície e sua relação com a triangulação de Delaunay (linha cheia) realizada sobre os mesmos pontos.	30
Figura 2	Comparação entre a tesselação de Voronoi realizada pelos programas APL@VORO e MEMBPLUGIN (à esquerda) e o programa FATSLiM (à direita). Em verde estão representados os pontos amostrais de uma superfície de interesse (átomos), e em vermelho estão os polígonos de Voronoi orientados de acordo com a metodologia de cada programa	37
Figura 3	Visão geral do funcionamento do SuAVE, e sua divisão nas etapas principais	39
Figura 4	Descrição da relação entre a convenção de coordenadas esféricas utilizadas e os eixos cartesianos. P_s é o ponto referente a um átomo do sistema e que tem sua localização totalmente determinada pelo conjunto de variáveis $(r_s, \theta_s, \varphi_s)$ em relação ao centro de coordenadas, O_c , tomado como centroide do conjunto de átomos compondo o sistema.	43
Figura 5	Comparação entre a função implementada na segunda versão do SuAVE e as curvas Gaussiana e Lorentziana	47
Figura 6	Malhas de ajuste (em cinza) construídas sobre os fosfatos (em laranja) de uma bicamada lipídica. A figura é apenas uma comparação entre as superfícies criadas por diferentes versões do SuAVE. A primeira versão do programa está representada na figura A, enquanto que a segunda e terceira são representadas pelas figuras B e C, respectivamente.	49
Figura 7	Gráfico da função de ponderação utilizada na terceira versão do SuAVE em função de diferentes densidades de átomos em uma interface amostral. As densidades estão em átomos/nm ² .	50
Figura 8	Número de átomos dentro do raio máximo, avaliado para cada densidade amostral	51
Figura 9	Projeção dos quatro pontos compondo a seção retangular da malha de ajuste sobre o plano xy (à esquerda) e sobre o plano yz (à direita). Em azul estão definidos os vetores que são utilizados pelo programa para calcular as propriedades de interesse. Figura realizada sobre a malha de ajuste de uma superfície aberta	54
Figura 10	Estudo da convergência dos valores de área total da superfície 3 do Apêndice B	58
Figura 11	Definição dos ângulos de cada vértice do triângulo esférico	59
Figura 12	Convergência da área da esfera calculada pela fórmula de Heron para diferentes resoluções da malha de ajuste. Em azul está o valor calculado analiticamente, enquanto que em preto com círculos vermelhos estão os valores calculados para essa variável em diferentes valores de bin	60
Figura 13	Descrição das superfícies desenvolvidas pelo <i>s dens</i> para avaliação do perfil de densidade parcial de uma membrana lipídica com leve ondulação. Em verde, estão as superfícies de ajuste desenvolvidas tomando como referencial os fosfatos dos lipídios (em vermelho). Em azul está a superfície média tomada como referencial para o cálculo da distribuição espacial dos componentes do sistema. O símbolo (Δh) representa o espaçamento entre as fatias curvadas mostradas em verde.	62
Figura 14	Comparação entre os perfis de densidade do sistema mostrado na Figura 13, realizados com malhas de ajuste com diferentes resoluções (número de pontos). O perfil A conta com uma malha de 11X11 pontos, enquanto que o perfil B foi desenvolvido com uma malha de 601X601 pontos	63

Figura 15	A Vesícula de POPG (do inglês: palmitoyloleoyl phosphatidylglycerol, POPG) a nível Coarse-Grain é mostrada à esquerda, enquanto que à direita, são mostrados os perfis de densidade para os grupos químicos que compõem o sistema. Em verde estão as superfícies de ajuste das camadas interna e externa da vesícula.	64
Figura 16	Descrição das superfícies de ajuste da interface superior e inferior da bicamada (em azul). Em verde, apresenta-se a superfície média que serve como ponto de referência para outras análises. Em vermelho estão os fosfatos de cada lipídio, em cinza estão as cadeias alquílicas	66
Figura 17	Visualização da pirâmide utilizada no cálculo do volume de cada fatia retangular da malha de ajuste em coordenadas esféricas. A pirâmide de base retangular é particionada em duas pirâmides de base triangular (uma em roxo e a outra em verde). Em laranja, estão alguns dos pontos da malha mostrada em cinza, com maior resolução, e que apresenta um corte transversal, para melhor visualização de sua estrutura.	70
Figura 18	Descrição dos vetores normais à superfície parabólica utilizada como exemplo, à esquerda, e descrição do parâmetro de ordem de curvatura para cada ponto desta superfície, à direita. O vetor normal à superfície está representado pelo versor $\mathbf{k}$, e o ângulo entre esse eixo e o vetor normal à superfície parabólica é definido por θ .	71
Figura 19	Distribuição dos ângulos de desvio do vetor normal às superfícies em relação ao eixo z .	73
Figura 20	Avaliação do impacto da resolução da malha de ajuste na distribuição bidimensional do parâmetro de ordem de curvatura.	74
Figura 21	Distribuição dos ângulos de desvio do vetor normal às superfícies em relação ao vetor radial.	75
Figura 22	Representação gráfica dos vetores tangentes e normal à uma superfície bidimensional, classificação das curvaturas principais (κ_1 e κ_2) da superfície e sua relação com as Curvaturas Gaussiana, K , e média, H .	78
Figura 23	Demonstração da imagem topográfica e curvas de nível da superfície utilizada. Em azul estão os pontos com maior valor da coordenada Z (máximos locais) e, em vermelho, estão os pontos com os menores valores desta coordenada (mínimos locais).	80
Figura 24	Corte transversal da vesícula utilizada para estudo das propriedades geométricas de superfícies fechadas. Configuração inicial, após equilíbrio da vesícula em água. Em verde, estão representadas as superfícies de ajuste geradas pelo SuAVE sobre os fosfatos (em vermelho) dos lipídios (em cinza) compondo a vesícula. No centro, podem ser observadas as moléculas de água encapsuladas pela superfície interna da estrutura.	83
Figura 25	Análise da convergência dos valores de área interfacial por lipídio para os sistemas apresentados na Tabela 1. Em preto está o sistema C_H_C14_343, em vermelho está o sistema C_T_C10_300, em verde está o sistema P_H_C10_315 e em azul está representado o sistema P_H_C10_328. O gráfico no interior corresponde de uma ampliação dos primeiros pontos para a curva em vermelho. O número de pontos da malha está relacionado com o valor do bin da Equação 8, na seção 2.2.1.1.	90
Figura 26	Tempo de processamento dos cálculos realizados na análise de área interfacial por lipídio em função do número de divisões da malha de ajuste utilizada. A análise foi realizada com a versão serial, sequencial, do programa.	91
Figura 27	Análise da convergência dos valores de área total calculados para as camadas interna e externa da vesícula. Os dados foram obtidos em uma análise com os primeiros 50 frames da simulação da vesícula de lipídio A. Os valores mostrados correspondem à área calculada para o último frame, o de número 50.	92
Figura 28	Tempo de processamento para o cálculo de área interfacial da vesícula em função do número de divisões da malha de ajuste utilizada. Os dados foram obtidos em uma análise com os primeiros 50 frames da simulação da vesícula de lipídio A, utilizando uma máquina 64-bits com processador Intel Core i3 com 2,10 GHz de clock interno, SSD de 500 Gb e 8Gb de memória RAM.	93

Figura 29	Valores de área interfacial por lipídio para os sistemas descritos na Tabela 1 segundo cada um dos protocolos computacionais utilizados. Em A estão os resultados adquiridos pela área da bicamada projetada no plano xy, enquanto que em B estão os resultados calculados pelo procedimento do SuAVE. As análises foram realizadas para sistemas previamente equilibrados.	95
Figura 30	Perfil de densidade para os sistemas descritos na Tabela 1, calculados através das duas metodologias analisadas. A, B, C, e D são relativos aos sistemas C_H_C14_343, C_T_C10_300, P_H_C10_315 e P_H_C10_328, respectivamente. Os perfis à esquerda foram obtidos através da metodologia das fatias planas, enquanto que os perfis à direita foram calculados com auxílio da metodologia implementada no SuAVE. Em azul está o solvente, em preto, as cadeias alquílicas, em vermelho estão os fosfatos dos lipídios e em verde estão os contra-íons. Os fosfatos e contra-íons tiveram os perfis aumentados em 5 vezes para melhorar a visibilidade.	98
Figura 31	Estrutura final para cada um dos sistemas descritos na Tabela 1. Em branco, estão representadas as cadeias alquílicas, em azul estão as superfícies de ajuste a cada superfície e em cor palha estão os átomos de fósforo utilizados para realizar o procedimento de ajuste.	100
Figura 32	Espessura das membranas descritas na Tabela 1. As cores seguem a sequência utilizada na Figura 29, onde o sistema C_H_C14_343 está em preto, o sistema C_T_C10_300 está em vermelho, o sistema P_H_C10_315 está em verde e o sistema P_H_C10_328 está em azul.	102
Figura 33	Distribuição bidimensional da espessura das bicamadas descritas na Tabela 1. A, B, C, e D são relativos aos sistemas C_H_C14_343, C_T_C10_300, P_H_C10_315 e P_H_C10_328, respectivamente. Essa distribuição foi calculada como a média sobre os últimos 20000 frames da trajetória de cada sistema	103
Figura 34	Volume por lipídio calculado para os sistemas descritos na Tabela 1.	106
Figura 35	Distribuição do desvio angular das superfícies em estudo em relação ao eixo normal dos sistemas, eixo z. O sistema C_H_C14_343 está em preto, o sistema C_T_C10_300 está em vermelho, o sistema P_H_C10_315 está em verde e o sistema P_H_C10_328 está em azul.	109
Figura 36	Perfil temporal para o parâmetro de ordem de curvatura calculado para os sistemas descritos na Tabela 1. Valores próximos de 1 são referentes a superfícies planas.	110
Figura 37	Distribuição bidimensional do parâmetro de ordem de curvatura para os sistemas descritos na Tabela 1. A, B, C, e D são relativos aos sistemas C_H_C14_343, C_T_C10_300, P_H_C10_315 e P_H_C10_328, respectivamente. O valor 1,0 corresponde a um desvio angular de 0° em relação ao eixo normal do sistema. O valor de 0,0 corresponde a um desvio angular de 54,74°.	111
Figura 38	Área por lipídio para cada lamela compondo a vesícula de lipídio A. O perfil com linha mais forte corresponde ao resultado da aplicação do filtro implementado no SuAVE, com parâmetro de filtragem de 0,001.	114
Figura 39	Raio médio e esfericidade, calculados para cada uma das lamelas compondo a vesícula de Lipídio A. O perfil com linha mais forte corresponde ao resultado da aplicação do filtro implementado no SuAVE, com parâmetro de filtragem de 0,001.	114
Figura 40	Espessura média e volume por lipídio calculados em intervalos de 50 ns, à exceção do primeiro e último valor apresentado, que foram obtidos durante os primeiros e últimos 25 ns de simulação.	115
Figura 41	Distribuição espacial da média temporal da espessura da vesícula. Em destaque é possível avaliar pontos onde a espessura é máxima e mínima, com as colorações sendo, azul e vermelho, respectivamente. Estrutura corresponde ao primeiro frame da trajetória, após a estabilização.	116

Figura 42	Distribuição do parâmetro de ordem de curvatura, Sc , para a superfície externa da vesícula. Os vetores em amarelo são vetores radiais, utilizados como referência para o cálculo de deflexão angular, enquanto que os vetores em roxo são os vetores normais à superfície de ajuste. A coloração é uma indicação visual do valor do parâmetro Sc .	117
Figura 43	Gráfico de violino expressando os valores médios do parâmetro de ordem de curvatura, Sc , para intervalos de 50 ns da simulação. O gráfico à esquerda se refere à camada mais externa da vesícula, enquanto que o gráfico à direita se refere à camada mais interna.	118
Figura 44	Perfil de densidade para os grupos químicos compondo o sistema em estudo. À esquerda está o perfil extraído no primeiro nanossegundo da simulação, enquanto que o perfil à direita apresenta o perfil extraído no último nanossegundo da simulação.	118
Figura 45	Corte transversal da estrutura final da vesícula. Em verde, estão representadas as superfícies de ajuste geradas pelo SuAVE sobre os fosfatos (oxigênios em vermelho e fósforo em amarelo palha) dos lipídios (em cinza) compondo a vesícula. Para a fabricação da figura, a ondulação da superfície de ajuste foi atenuada em 30% através da utilização do parâmetro de rugosidade (flag-rough, utilizada na linha de comando) igual a 0,7.	120
Figura 46	Momentos principais de inércia calculados a partir das interfaces externa (à esquerda) e interna (à direita) da vesícula.	121
Figura 47	Evolução do RMSD calculado para a análise de área interfacial por lipídio para cada um dos sistemas descritos na Tabela 1. O sistema C_H_C14_343 está em preto, o sistema C_T_C10_300 está em vermelho, o sistema P_H_C10_315 está em verde e o sistema P_H_C10_328 está em azul.	123
Figura 48	Evolução do RMSD calculado para a análise de área interfacial por lipídio para cada um dos sistemas descritos na Tabela 1.	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição dos sistemas utilizados para validação da metodologia computacional implementada no SuAVE. O índice “a” indica que o contraíon utilizado no sistema foi Mg^{2+} , enquanto que o índice “b” indica que o contraíon foi Ca^{2+}	80
Tabela 2	Resultados médios para o intervalo entre os frames 20000 e 120000 das trajetórias apresentadas.	94
Tabela 3	Valores da espessura das bicamadas para cada sistema em estudo	104
Tabela 4	Valores medidos para o volume por lipídio, SuAVE, e para os volumes das cadeias alquílicas dos lipídios. Vc 1 refere-se ao volume das cadeias alquílicas calculado através dos dados do trabalho de Nagle e Wilkinson (1978), Vc 2 refere-se aos dados advindos do trabalho de Weiner e White (1992) e Vc 3 refere-se aos dados extraídos do trabalho de Armen, Uitto e Feller (1998)	107
Tabela 5	Valor de RMSD médio calculado para as análises realizadas sobre os sistemas em estudo e o tempo de médio processamento dessas análises para os 120000 frames da trajetória.	122
Tabela 6	Valor de RMSD médio calculado para os últimos 50 ns das análises realizadas, número de átomos presentes nas trajetórias, espaço em disco ocupado pela trajetória e o tempo médio de processamento destas análises para toda a trajetória, 150000 frames. O tempo de processamento foi medido em uma máquina 64 bits com 2 processadores Intel Xeon E5-2650 de 2,30 GHz de clock interno, utilizando um valor máximo de 40 threads de processamento.	126

LISTA DE ABREVIATURAS

DRX	Difração de Raio-X
GROMACS	<i>Groningen Machine for Chemical Simulations</i>
GROMOS	<i>Groningen Molecular Simulation</i>
IDW	<i>Inverse Distance Weighting</i>
LINCS	<i>Linear Constraint Solver</i>
LPAT	<i>Lysophospholipid acyltransferase</i>
NLC	<i>Nanostructured Lipid Carriers</i>
PLA	<i>Phospholipase A</i>
RBF	<i>Radial Basis Function</i>
RMSD	<i>Root Mean Square Displacement</i>
SLN	<i>Solid Lipid Nanoparticles</i>
SPC	<i>Single Point Charge</i>
TCL	<i>Tool Command Language</i>
TIN	<i>Triangulated Irregular Network</i>
VMD	<i>Visual Molecular Dynamics</i>
POPG	<i>Palmitoyloleoyl Phosphatidylglycerol</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	UMA VISÃO GERAL: O DIÁLOGO ENTRE A MORFOLOGIA DE INTERAFCE E SUAS FUNÇÕES	19
1.2	DIFERENTES INTERFACES-ALVO E A RELAÇÃO ENTRE SUAS MORFOLOGIAS E FUNÇÕES	22
1.2.1	Interfaces Lipídicas: Bicamadas	22
1.2.2	Interfaces Lipídicas: Vesículas e Micelas	24
1.2.3	Interfaces Líquidas	25
1.2.4	Deformações estruturais elásticas e a equação de Helfrich	27
1.3	ALGORITMOS E PROGRAMAS DISPONÍVEIS NA LITERATURA	28
1.3.1	Métodos de interpolação de superfícies	29
1.3.1.1	<i>Tesselação de Voronoi e Triangulação de Delaunay</i>	29
1.3.1.2	<i>Interpolação bidimensional de Lagrange</i>	31
1.3.1.3	<i>Aproximação por funções de base radiais</i>	33
1.3.2	Programas desenvolvidos	34
1.4	A ALTERNATIVA SuAVE	37
2	METODOLOGIA	39
2.1	VISUALIZAÇÃO GERAL DO PROGRAMA	39
2.2	DEFINIÇÕES IMPORTANTES DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA	41
2.2.1	Construção do <i>grid</i>	42
2.2.1.1	<i>Coordenadas Cartesianas</i>	42
2.2.1.2	<i>Coordenadas Esféricas</i>	43
2.2.2	Função de ajuste	45
2.2.2.1	<i>Coordenadas Cartesianas (Superfícies abertas)</i>	45
2.2.2.2	<i>Coordenadas Esféricas (Superfícies fechadas)</i>	49
2.2.3	Raio de corte	50
2.3	AS ROTINAS COMPUTACIONAIS IMPLEMENTADAS	53

2.3.1	Área interfacial por lipídio	54
2.3.1.1	<i>Coordenadas Cartesianas</i>	55
2.3.1.2	<i>Coordenadas Esféricas: Limite de aplicação da equação de Heron para superfícies esféricas ou fechadas</i>	58
2.3.2	Perfil de densidade	61
2.3.2.1	<i>Coordenadas Cartesianas</i>	61
2.3.2.2	<i>Coordenadas Esféricas</i>	63
2.3.3	Espessura de interfaces	65
2.3.3.1	<i>Coordenadas Cartesianas</i>	65
2.3.3.2	<i>Coordenadas Esféricas</i>	67
2.3.4	Volume por lipídio	67
2.3.4.1	<i>Coordenadas Cartesianas</i>	67
2.3.4.2	<i>Coordenadas Esféricas</i>	68
2.3.5	Parâmetro de ordem de curvatura e desvio angular da superfície de ajuste	70
2.3.5.1	<i>Superfícies abertas</i>	70
2.3.5.2	<i>Superfícies fechadas</i>	74
2.3.6	Momento de inércia de superfícies fechadas	75
2.3.7	Curvatura Gaussiana e Média e Energia de deformação elástica de interfaces	76
2.3.8	Programas auxiliares	80
2.3.8.1	<i>Verificação do ajuste do grid gerado sobre a interface química</i>	80
2.3.8.2	<i>Avaliação da topografia da superfície ou interface</i>	80
2.4	DESCRIÇÃO DOS SISTEMAS SIMULADOS E PARÂMETROS DE SIMULAÇÃO	81
2.4.1	Sistemas simulados	81
2.4.1.1	<i>Superfícies abertas</i>	81
2.4.1.2	<i>Superfícies fechadas</i>	82
2.4.2	O protocolo de simulação computacional	84
2.4.2.1	<i>Superfícies abertas</i>	84

2.4.2.2	<i>Superfícies fechadas</i>	85
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
3.1	CONVERGÊNCIA E INCERTEZA DO CÁLCULO DE PROPRIEDADES ESTRUTURAIS EM FUNÇÃO DA RESOLUÇÃO DA SUPERFÍCIE DE AJUSTE	88
3.1.1	Superfícies abertas: Bicamadas lipídicas	88
3.1.2	Superfícies fechadas: Vesícula	91
3.2	PROPRIEDADES ESTRUTURAIS DAS SUPERFÍCIES ABERTAS	94
3.2.1	Avaliação da área interfacial por lipídio	94
3.2.2	Perfil de densidade	97
3.2.3	Espessura das bicamadas	101
3.2.4	Volume das bicamadas	105
3.2.5	Distribuição de desvio angular e parâmetro de ordem de curvatura	108
3.3	PROPRIEDADES ESTRUTURAIS DAS SUPERFÍCIES FECHADAS	113
3.3.1	Avaliação da área interfacial por lipídio, raio médio e esfericidade	113
3.3.2	Espessura média e volume por lipídio	115
3.3.3	Parâmetro de ordem de curvatura	116
3.3.4	Perfil de densidade	118
3.3.5	Momentos principais de inércia	121
3.4	CONSIDERAÇÕES ACERCA DOS AJUSTES REALIZADOS E TEMPO DE PROCESSAMENTO DAS ANÁLISES	122
3.4.1	Superfícies abertas: Bicamadas lipídicas	122
3.4.2	Superfícies fechadas: Vesícula	124
3.5	TRABALHOS QUE UTILIZARAM O SuAVE	128
3.5.1	Atividade de antimicrobianos sobre a estrutura de membranas externas de bactérias Gram-negativas	128
3.5.2	Efeito de diferentes modelos de água e tratamentos eletrostáticos de longa distância em membranas externas de bactérias Gram-negativas	129
3.5.3	Efeito de protocolos de equilibração sobre a construção de ensembles de estruturas de bicamadas de glicolipídios carregados	130
3.5.4	Estudo da lipofilicidade de moléculas de colesterol descritas por diferentes modelos Coarse-Grain	130

4	CONCLUSÕES	131
	REFERÊNCIAS	134
	APÊNDICE A - A ESCOLHA DO RAIOS DE CORTE	144
	APÊNDICE B - FUNÇÃO DE PESO DO $SuAVE$ E PARÂMETRO DE AJUSTE	159
	APÊNDICE C - CÁLCULO DO VOLUME ENTRE SUPERFÍCIES DISTINTAS	173
	APÊNDICE D - CÁLCULO AUXILIAR PARA ANÁLISE DE DENSIDADE	177
	APÊNDICE E - DERIVADAS ESPACIAIS E VETOR NORMAL À SUPERFÍCIE DE AJUSTE	181
	APÊNDICE F - MOMENTOS PRINCIPAIS DE INÉRCIA	183
	APÊNDICE G - DIFERENÇAS FINITAS PARA CÁLCULO DE CURVATURA GAUSSIANA E MÉDIA	186
	APÊNDICE H - ANÁLISE DESEMPENHO DAS FERRAMENTAS E OTIMIZAÇÃO DO CÓDIGO PARA EXECUÇÃO PARALELA	187
	ANEXO A - PUBLICAÇÕES	192
	ANEXO B - PRÊMIOS	200
	ANEXO C - PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS	201

1 INTRODUÇÃO

1.1 UMA VISÃO GERAL: O DIÁLOGO ENTRE A MORFOLOGIA DE INTERFACES E SUAS FUNÇÕES

A natureza vem surpreendendo o homem desde os primórdios da civilização. Há muito que se observar em termos de formatos e funções, quando se tratam das estruturas dos seus componentes, nas mais diversas escalas de tamanho. Cada componente da natureza tem uma estrutura específica ligada intimamente a sua função primordial. Não fosse isso, seria possível modificar aleatoriamente o formato de qualquer proteína sem que ela perdesse sua função estrutural, química, biológica ou enzimática (REDFERN, DESSAILY e ORENGO, 2008; DUNKER e OBRADOVIC, 2001; WU, 1931). Cada forma encontrada na natureza tem implicações físicas importantes. As bolhas de sabão, por exemplo, poderiam não ser esféricas se não fosse este o formato ideal para minimizar a razão entre área da sua superfície e volume por ela ocupado, e consequentemente, a energia de superfície da bolha.

Em rápida busca na literatura é possível encontrar milhares de trabalhos dedicados a mostrar a relação entre as estruturas encontradas na natureza e as suas funções. Esses conhecimentos podem ser aplicados em diversos ramos da ciência. Na engenharia química, a geometria de partículas sólidas pode influenciar a taxa de transferência de massa de certos componentes de interesse envolvidos em reações químicas (WELTY *et al.*, 2008). Na ciência dos materiais, esses conhecimentos possibilitam o desenvolvimento de metamateriais (PODDUBNY, 2013). Na bioquímica e biofísica, os mesmos levam a análises energético-conformacionais de estruturas biológicas.

Em relação às membranas lipídicas, um ótimo exemplo desse último tópico reside no trabalho de Zimmerberg e Kozlov (2006). Nele, os autores discutem o papel da estrutura de membranas lipídicas em sistemas biológicos e avaliam quais são os fatores físicos ou químicos responsáveis pela formação de curvatura nas membranas. Os autores também discutem como a curvatura de membranas pode influenciar na sua interação com proteínas e de como essa relação pode ser utilizada para desenvolver “sensores de curvatura” em membranas. Um outro exemplo pode ser encontrado no trabalho de Maechler *et al.* (2018), em que os autores avaliam o crescimento de células epiteliais restritas espacialmente ao interior de tubos cilíndricos de diferentes dimensões. Eles avaliaram como um conjunto de células epiteliais em crescimento distribuíam tensões impressas pela geometria do substrato

cilíndrico, ao qual estavam anexadas, e como a curvatura desse substrato podia influenciar no processo de separação entre as células e o substrato.

No trabalho de Svetina (2015), é destacada a relação entre as conformações de algumas proteínas, funcionando como canais iônicos, e as membranas lipídicas onde elas se encontram imersas. É possível observar, nesse trabalho, como a interação entre as proteínas e a membrana circundante são dependentes da conformação estrutural de ambas. É explicado, por exemplo, que as proteínas tendem a se acumular em regiões da membrana que apresentam uma curvatura natural favorável ao formato intrínseco da proteína. Deste modo, a localização das proteínas em membranas lipídicas não se dá aleatoriamente, mas sim por um fator energético relacionado com suas estruturas nativas.

Petrov e Furó (2006), através dos estudos de fluidos confinados em materiais porosos, mostraram como as temperaturas de fusão e solidificação de líquidos pode variar a depender do formato dos poros onde se encontram. A morfologia dos poros, como explicado pelos autores, atua na promoção de uma metaestabilidade da fase sólida, em equilíbrio com os fluidos confinados, de modo que a interface líquido-sólido dentro dos poros possua diferentes modos de propagação durante o processo de congelamento ou derretimento. O resultado disso é a observação de uma histerese que caracteriza a separação dos dois processos e que é dependente da curvatura e morfologia dos poros.

Ceretamente, existem inúmeros exemplos de como a geometria interfere diretamente em fenômenos naturais. Entretanto, as considerações experimentais a respeito desse tópico são limitadas com relação à descrição detalhada de como esses fenômenos ocorrem, ou como eles estão associados à morfologia dos sistemas de interesse. Para melhorar essa perspectiva, são necessários modelos que possam conectar as observações experimentais com as prováveis causas em estudo.

Simulações computacionais são uma ferramenta poderosa para interligar teoria e experimento, auxiliando assim, na validação de modelos, na estimativa de grandezas que não podem ser facilmente obtidas por medidas experimentais e para ultrapassar barreiras impostas seja pela natureza intrínseca de certos fenômenos ou pela limitação instrumental para acessar tais eventos (ALLEN, 2004). Hoje em dia, muitas são as metodologias matemáticas e modelos desenvolvidos para ultrapassar limitações experimentais. Técnicas como Dinâmica Molecular e Simulações Monte Carlo são exemplos muito comuns, e que podem ser aplicados com o auxílio de diversos códigos computacionais facilmente acessíveis, como GROMACS para dinâmica molecular e DICE para simulações estocásticas de Monte Carlo (HESS *et al.*, 2008; COUTINHO e CANUTO, 2003). Infelizmente, as rotinas de análise de dados para as

simulações computacionais nos mais diversos códigos existentes não levam em consideração a morfologia das interfaces químicas compondo os sistemas em estudo. Por esse motivo, apesar da grande quantidade de informações que podem ser geradas através de modelos matemáticos e computacionais, poucas conclusões podem ser extraídas sem levar em consideração a morfologia de um sistema de interesse. É, pois, essencial, o desenvolvimento de ferramentas capazes de superar essa limitação.

A análise de dados é um passo indispensável na engenharia de modelos preditivos para um sistema estudado. O sucesso do modelo depende diretamente de quão exatas, precisas e, de preferência, eficientes são as análises na medição de propriedades de interesse. O software SuAVE (*Surface Assessment Via grid Evaluation*) é uma suíte de programas, escritos em Fortran 90, e desenvolvidos para analisar as propriedades estruturais das superfícies e interfaces químicas levando em consideração a morfologia dos sistemas. O programa foi desenvolvido para lidar com qualquer sistema químico orgânico, inorgânico ou biológico que contenha uma superfície ou uma interface química, apresentando ou não curvatura e exibindo uma ampla gama de morfologias. Por este motivo, a utilização das ferramentas implementadas no SuAVE permite uma análise profunda da conexão existente entre alterações morfológicas observadas em diversos sistemas e os fenômenos que as causaram, superando as limitações das metodologias experimentais e das rotinas computacionais até então desenvolvidas.

Nesta tese, o pacote de programas SuAVE é descrito, juntamente com sua aplicação na caracterização de propriedades estruturais e dinâmicas de interfaces com ampla variação de curvatura. Esta funcionalidade não está presente nas ferramentas de análise de sistemas moleculares disponíveis na literatura. Na próxima seção serão descritas algumas interfaces de interesse utilizadas como alvo durante o desenvolvimento do programa, assim como uma breve descrição de outros programas disponíveis na literatura que, de forma mais simplificada, também analisam a relação entre a geometria de interfaces químicas e biológicas e suas propriedades estruturais.

1.2 DIFERENTES INTERFACES-ALVO E A RELAÇÃO ENTRE SUAS MORFOLOGIAS E FUNÇÕES

1.2.1 Interfaces Lipídicas: Bicamadas

De certo, as membranas lipídicas são sistemas muito importantes, aos quais devem ser dados especial atenção. Assim como explicado por Campelo *et al.* 2014, membranas biológicas são o palco de muitas reações bioquímicas fundamentais para a manutenção da vida, tanto em organismos uni como multicelulares. Constituem o mais importante meio de transporte de compostos químicos entre os meios extra e intracelular, sendo também uma barreira protetora para células vivas, delimitando as dimensões celulares e moldando suas estruturas espaciais. Este último fato é, de longe, o que mais chama atenção. Como discutido na seção 1.1, no trabalho de Zimmerberg e Kozlov (2006), a estrutura de membranas lipídicas é um fator de altíssima relevância em processos biológicos, sendo também responsável pela interação entre as membranas e proteínas presentes no meio celular. Trabalhos como os de Graham e Kozlov (2010) e Batenburg e Kruijff (1988) também complementam essa discussão, quando descrevem inúmeras formas pelas quais membranas e organelas celulares podem adquirir os mais distintos formatos geométricos.

Frequentemente, essas modificações de curvatura são advindas de inserções superficiais de proteínas hidrofóbicas ou anfipáticas que causam uma assimetria na estrutura das bicamadas, que por sua vez, é compensada pela formação de curvatura na membrana. Essa curvatura depende da estrutura da proteína, dos aminoácidos que a compõem, e da sua interação com os lipídios constituindo a membrana. Diversos exemplos de proteínas expressando esse tipo de função biológica podem ser encontrados nos trabalhos de Zimmerberg e Kozlov (2006) e Batenburg e Kruijff (1988).

Além desse mecanismo, diferentes enzimas apresentam a capacidade de modificar a estrutura de cada lipídio constituindo as membranas (GRAHAM e KOZLOV, 2010). São enzimas modificadoras de lipídios, transcritas do próprio código genético de seres uni ou multicelulares, e cuja produção é executada pelos seus próprios processos metabólicos. Exemplos típicos são as enzimas *phospholipase A* (PLA) e as *Lysophospholipid acyltransferases* (LPAT), discutidas no trabalho de Graham e Kozlov (2010). No primeiro exemplo, trata-se da enzima responsável por hidrolisar cadeias alquílicas nas posições sn1 e sn2 e produzir lisofosfolipídios. Esses são lipídios possuindo apenas uma cadeia alquílica, advindos de metabolismo de fosfolipídios e presentes em diversos processos metabólicos de

células biológicas (D'ARRIGO e SCOTTI, 2013). Os lisofosfolípidios apresentam curvatura espontânea positiva, fator que os tornam úteis no processo de modificação estrutural das membranas lipídicas ou organelas celulares. No segundo exemplo, trata-se da enzima que realiza o processo oposto da PLA. A LPAT catalisa a transferência de ácidos graxos de Acil-CoA para um lisofosfolípidio. Com isso, as cadeias do lipídio original são restauradas e a curvatura positiva do lisofosfolípidios é removida da membrana.

A formação de curvatura e modificação estrutural de membranas lipídicas por vezes é uma consequência da ação de agentes tóxicos às células. No trabalho de Santos *et al.* (2017), por exemplo, os autores mostraram como a curvatura de membranas externas de bactérias Gram-negativas se modifica em resposta à presença de agentes antimicrobianos. Neste trabalho é mostrado que quimiotipos de *P. aeruginosa*, resistentes ao peptídeo antimicrobiano, polimixina-B, sofrem pouca ou nenhuma alteração da estrutura espacial de suas membranas lipídicas, enquanto que quimiotipos suscetíveis ao antimicrobiano exibem grande alteração estrutural, resultando em variações intensas na curvatura, espessura de suas membranas e provável fragilização mecânica dessa barreira biológica.

Todos os exemplos supracitados exemplificam a relevância do estudo conformacional e funcional de membranas lipídicas. Através dos anos, diversos modelos matemáticos têm surgido com a finalidade de descrever a dinâmica estrutural de membranas lipídicas, e suas variações energéticas ligadas às deformações elásticas da sua estrutura, resultantes da sua composição lipídica e arranjo espacial. Trabalhos como o de Chen, Lubensky e MacKintosh (1995) e Campelo *et al.* (2014) detalham bem o formato geral dos modelos empregados nas últimas décadas para estudar essas características. Todos esses modelos têm uma origem em comum, o trabalho de pioneiro de Helfrich (1973) acerca das propriedades elásticas em membranas lipídicas. O modelo de Helfrich permite descrever como a energia elástica de curvatura (do inglês: *curvature elastic energy*) de membranas lipídicas varia de acordo com sua conformação e pode conduzir ao entendimento da dinâmica estrutural desses sistemas. Uma descrição matemática detalhada do modelo de Helfrich é apresentada na secção 1.2.4 .

As interfaces lipídicas são um exemplo dos sistemas alvo para o desenvolvimento de diversas ferramentas computacionais, assim como o SuAVE. Em especial, a secção 1.3.2 descreve brevemente as ferramentas desenvolvidas até o momento para o estudo estrutural de membranas lipídicas.

1.2.2 Interfaces Lipídicas: Vesículas e Micelas

Além do estudo de membranas lipídicas planas ou curvadas, vesículas e micelas lipídicas têm recebido atenção nos últimos anos devido à importância destes sistemas como carreadores lipídicos nanoestruturados (do inglês: *Nanostructured Lipid Carriers*, NLC) e nanopartículas de lipídios sólidos (do inglês: *Solid Lipid Nanoparticles*, SLN), largamente utilizados na área de carreamento de fármacos para diagnóstico e tratamentos médicos (MÜLLER, MÄDER e GOHLA, 2000; FANG, AL-SUWAYEH e FANG, 2013). Sistemas como esses levaram Südhof, Rothman e Sheckman a ganhar o prêmio Nobel de fisiologia em 2013 pela descrição do mecanismo pelo qual vesículas lipídicas são utilizadas para realizar o transporte de neurotransmissores entre células nervosas (KAISER e SHECKMAN, 1990; PERIN *et al.*, 1990; SOLLNER *et al.*, 1990). O conhecimento dessas funções biológicas e aplicações médicas importantes tem propiciado o crescimento do número de estudos computacionais que visam descrever a dinâmica conformacional das vesículas e suas propriedades elásticas. Alguns trabalhos, como o de Markvoort, van Santen e Hilbers (2006), também abordaram características estruturais como o impacto da composição lipídica das lamelas de vesículas sobre sua configuração espacial.

Como ressaltado pelos autores, quando em composições idênticas, as lamelas de uma bicamada geram uma conformação plana, ou vesículas perfeitamente esféricas. Entretanto, quando as composições são diferentes, há uma alteração da curvatura local em membranas planas e em vesículas, que passam a apresentar deformações superficiais. Com o intuito de melhor descrever estas deformações, Braun e Sachs (2014) utilizaram funções harmônicas esféricas para descrever a dinâmica conformacional de vesículas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), e desenvolveram modelos matemáticos para quantificar as variações energéticas associadas à dinâmica estrutural das vesículas, baseados nas expressões já definidas por Helfrich (1973), Canham (1970) e Evans (1974). Mikucki e Zhou (2017) utilizaram a decomposição da estrutura da vesícula em funções harmônicas esféricas para desenvolverem uma metodologia de simulação de deformações superficiais nesse sistema.

Apesar do desenvolvimento desses modelos matemáticos baseados em funções harmônicas esféricas, os mesmos não foram convertidos em ferramentas computacionais capazes de extrair informações estruturais mais completas das simulações de vesículas e micelas lipídicas. Cálculos de esfericidade, densidade parcial de grupos químicos, curvatura Gaussiana e média, área superficial e volume por lipídio são grandezas importantes tanto para a validação de modelos moleculares versus medidas experimentais, como também para a

descrição quantitativa da estrutura e dinâmica conformacional de agregados lipídicos, sejam estes bicamadas ou vesículas. Esse é um dos focos de desenvolvimento do pacote computacional SuAVE como será visto mais à frente na seção metodológica.

1.2.3 Interfaces Líquidas

Outra interface de interesse que foi levada em consideração durante a elaboração do pacote computacional SuAVE é aquela formada entre fases líquidas. Essas regiões limítrofes entre dois fluidos compondo um sistema heterogêneo ganharam especial destaque após o trabalho seminal de Gibbs acerca do equilíbrio termodinâmico entre fases (RADKE, 2015; GIBBS, 1961). Diversos estudos foram desenvolvidos aplicando seus conceitos para avaliar tensão superficial de interfaces líquidas, bem como seu papel em processos de adsorção. São trabalhos essencialmente experimentais, mas que nos últimos anos têm recebido uma maior abordagem através da perspectiva de simulações computacionais de dinâmica molecular. O SuAVE foi desenvolvido de modo a possibilitar análises de simulações computacionais dessas interfaces, em especial, quando apresentam curvatura Gaussiana não nula, ou seja, quando não são planas.

Em se tratando desse último tópico, Wang *et al.* (2018) e Wang e Li (2014) dão um ótimo exemplo de aplicação de interfaces líquidas curvadas. Nos seus trabalhos, os autores demonstram uma metodologia para desenvolver cristais de polímeros em formatos diferentes da convencional estrutura plana, ou como definido pelos autores, *non-flat polymer crystals*. Esses cristais são desenvolvidos em emulsões compostas por uma solução aquosa e uma fase orgânica, onde é inserido o polímero que se deseja cristalizar. A interface curvada presente nesses sistemas é obtida pela formação de nano gotas da fase orgânica contendo os polímeros, e é responsável por moldar o formato esférico dos cristais poliméricos. O tamanho dessas nano gotas, e conseqüentemente a sua curvatura, determina a dimensão do cristal de polímero, além de influenciar na cristalinidade e porosidade dos cristais.

Gibbs (1961) mostrou que uma interface líquida se acomoda espacialmente de modo a minimizar a sua área, e por conseguinte, a sua energia superficial. Por vezes, a configuração da interface vem a se apresentar na forma de um plano. Entretanto, a curvatura pode ser sempre introduzida quando no caso de gotas, como mostrado acima, ou de perturbações na interface plana causadas pela admissão de surfactantes ou moléculas que se aglomerem na fronteira entre as fases. O trabalho de Rey (2004) oferece um exemplo de como a interface formada entre uma fase aquosa e outra composta por cristais líquidos pode ser modificada

pela concentração de surfactantes na solução aquosa. Segundo este mesmo trabalho, a concentração do surfactante na interface atua diretamente sobre a fase estrutural do líquido cristalino, forçando-o a adotar diferentes conformações e organizações espaciais. Ora apresentam-se paralelos à interface, ora normais.

Infelizmente, as técnicas experimentais como as utilizadas nos trabalhos descritos, ainda apresentam limitações que as impedem de extrair informações mais detalhadas acerca da dinâmica estrutural dessas interfaces. O que se sabe é fruto de modelos matemáticos que conseguem descrever dados experimentais e prever resultados. Entretanto, como já explicitado, as simulações computacionais podem potencializar a aquisição de informação importantes a respeito desses sistemas e aperfeiçoar o entendimento dos resultados experimentais.

Como exemplos da aplicação de simulações computacionais ao estudo de interfaces líquidas podem ser mencionados os trabalhos desenvolvidos por Singh *et al.* (2018) e Chevrot, Schurhammer e Wipff (2006). Nestes trabalhos, a metodologia foi aplicada para avaliar propriedades de interfaces entre líquidos, sendo uma das interfaces constituída por líquidos iônicos. No estudo de Singh *et al.* (2018), a modelagem computacional foi utilizada para avaliar processos de purificação de óleos combustíveis pela remoção de compostos sulfurados. Nesse processo, os autores estudaram como esses compostos se distribuíram na interface formada entre a fase orgânica do óleo combustível e a fase composta pelos líquidos iônicos. De modo análogo, o estudo desenvolvido por Chevrot, Schurhammer e Wipff (2006) avalia propriedades estruturais da interface formada entre uma fase aquosa e outra composta por líquidos iônicos higroscópicos. Os autores discutem sobre a espessura da interface, orientação de íons, polaridade e potencial eletrostático calculado entre as fases líquidas.

Embora simulações computacionais possam fornecer um grande número de informações quantitativas acerca desses sistemas, não há atualmente programas que consigam tratá-las adequadamente, especialmente quando a conformação adotada pela interface química de interesse não é plana. Desta forma, estes sistemas tornam-se atrativos para o uso do programa SuAVE, pois ampliam o seu campo de atuação e demonstram a capacidade da metodologia computacional em realizar estudos estruturais e energéticos em uma ampla gama de interfaces químicas.

1.2.4 Deformações estruturais elásticas e a equação de Helfrich

Neste tópico não será abordado mais um exemplo de interface química de interesse para as aplicações do programa SuAVE. Será conjecturado um dos principais objetivos do trabalho que, embora ainda esteja em desenvolvimento, merece um especial destaque.

Como antecipado nos tópicos 1.2.1 e 1.2.2, nos últimos 50 anos houve um grande desenvolvimento da metodologia teórica capaz de descrever as propriedades elásticas de membranas lipídicas. Trabalhos seminais como os de Helfrich (1973), Canham (1970) e Evans (1974), foram pioneiros em estudos conformacionais e energéticos desses sistemas, como exemplificado por Chen, Lubensky e MacKintosh (1995), Zimmerberg (2006) e Campelo *et al.* (2014). Outros autores como Deserno (2015) e Guckenberger e Gekle (2017) também fizeram importantes contribuições neste tópico, demonstrando a aplicação do modelo proposto por Helfrich para diferentes superfícies e sistemas.

O modelo de Helfrich, amplamente utilizado nos trabalhos supracitados, possui a seguinte formulação matemática.

$$E(H, K) = \frac{1}{2}k(H - H_s)^2 + \bar{k}K \quad (1)$$

Em que E é a energia de deformação por unidade de área, H_s é a curvatura média natural da membrana lipídica, que depende apenas de sua composição. Os termos H e K são as curvaturas média e Gaussiana da superfície em uma determinada conformação, respectivamente, e k e $\bar{k}$ são os módulos de flexão e de curvatura Gaussiana, dependentes da composição química da interface em estudo. Esse modelo relaciona a configuração espacial de uma superfície ou interface com a sua energia de deformação. Para isso, o modelo faz uso de estruturas algébricas intrínsecas de qualquer superfície e advindas de estudos da geometria diferencial. São as curvaturas média e Gaussiana. Essas variáveis são responsáveis por caracterizar todas conformações que uma interface pode possuir e, portanto, permitem que o modelo seja aplicado irrestritamente às superfícies de interesse desse trabalho.

Por ser essa uma equação largamente estudada e validada, o presente trabalho não se deterá na elaboração de novos modelos por acreditar que aqueles já desenvolvidos são eficientes o bastante para descrever as variações de energia elástica das interfaces de interesse, causadas por deformações conformacionais nas suas estruturas.

A escolha da utilização das superfícies desenvolvidas pelo SuAVE para realizar essa análise energética não é ao acaso. Ocorre que, para avaliar a energia de deformação de

superfícies faz-se primeiramente necessário descrever essas estruturas com riqueza de detalhes de tal modo, que o resultado da análise seja fiel à configuração do sistema. Para obter tal riqueza de detalhes é necessário lançar mão da precisão estrutural obtida através das simulações computacionais. Entretanto, como já destacado, os programas existentes não foram elaborados para tratar de sistemas curvados ou com morfologias diferentes daquelas observadas em superfícies planas. Para contornar essa limitação, portanto, foi desenvolvido o SuAVE.

Nas seções seguintes, são discutidas algumas alternativas às limitações encontradas nas etapas de análises de simulações computacionais. São descritas as metodologias mais comumente utilizadas para tratar a morfologia de interfaces durante o processamento de análises de trajetórias, assim como os programas disponíveis na literatura para realizar esta tarefa.

1.3 ALGORITMOS E PROGRAMAS DISPONÍVEIS NA LITERATURA

Para poder capturar os fenômenos físico-químicos de interface e mudanças energéticas acontecendo nessa região é necessário descrever detalhadamente as alterações da sua morfologia. Em simulações computacionais, os sistemas são descritos por partículas individuais e não por meios contínuos. A avaliação precisa da morfologia da interface simulada, portanto, requer a utilização de ferramentas computacionais e numéricas que sejam capazes de delinear uma superfície contínua sobre os pontos amostrais discretos da interface, ou seja, sobre os átomos. Metodologias matemáticas apresentando essa capacidade vêm evoluindo desde a Grécia antiga, quando eram utilizados para delinear a posição de astros em dados de efemérides astronômicas. Hoje, após aproximadamente 2200 anos de evolução, e da fundamentação sólida dada por Newton no século XVII, muitos são os tratamentos matemáticos que conseguem definir funções contínuas em meio a dados discretos de interesse. Certamente, os mais utilizados são os baseados em interpolações e regressões lineares e não lineares (GONÇALVES, 2004; MEIJERING, 2002).

Para definir rapidamente essas metodologias, é necessário introduzir alguns conceitos. Primeiramente, uma vez que uma interface química é definida, é possível estabelecer um conjunto de átomos que possam ser utilizados para descrever a configuração espacial dessa superfície. Esses átomos atuam como pontos discretos da interface e passam a ser chamados de sementes, ou pontos amostrais, para as metodologias de interpolação ou regressão. Esses pontos definem a posição da interface apenas localmente e, portanto, para descrever como a

superfície se comporta nas suas proximidades, são necessárias aproximações de funções contínuas que passem pelos pontos amostrais da superfície, ou aproximem sua localização, e carreguem sua orientação espacial, mas que consigam descrever a configuração da interface no espaço definido entre os pontos amostrais (SANTOS e SILVA, 2010).

É dessa maneira que atuam as metodologias de interpolação e regressão. São procedimentos matemáticos que desenvolvem funções contínuas capazes de descrever, e explicar, a localização de um conjunto de pontos, ou dados discretos, mas que além disso, podem ser utilizadas para prever a localização de novos pontos não existentes no conjunto de dados original (SANTOS e SILVA, 2010). A seguir, alguns exemplos dessas ferramentas matemáticas serão brevemente descritos, permitindo uma melhor compreensão da metodologia utilizada pelo SuAVE. Logo após, serão também descritos alguns programas que fazem uso de metodologias de regressão ou ajuste para estudar interfaces de membranas lipídicas, levando em consideração a suas configurações espaciais.

1.3.1 Métodos de interpolação de superfícies

Partindo-se da descrição realizada acima, é possível classificar as funções construídas pelas metodologias de interpolação como contínuas nos pontos amostrais utilizados para seus desenvolvimentos. Em outras palavras, isso significa que funções interpoladoras obrigatoriamente passam por esses pontos e descrevem o espaço entre eles de forma contínua (MEIJERING, 2002; SANTOS e SILVA, 2010). São exemplos dessa filosofia, os métodos baseados em tesselação de Voronoi e interpolações bidimensionais de Lagrange, que serão descritos brevemente a seguir (AURENHAMMER, 1991; SHEWCHUCK, 2002, SANIEE, 2007; BOZORGMANESH, 2009). Outras metodologias podem ser encontradas no trabalho de Aurenhammer (1991).

1.3.1.1 Tesselação de Voronoi e Triangulação de Delaunay

A tesselação de Voronoi é uma interpolação discreta de uma superfície regular, realizada por polígonos convexos, cuja construção é baseada na localização dos pontos amostrais escolhidos para delinear a superfície. De acordo com Aurenhammer (1991), em termos gráficos, o diagrama de Voronoi, como é comumente chamado, apresenta uma relação de dualidade com a triangulação de Delaunay. Esta, é uma metodologia de partição irregular de superfícies através de triângulos (do inglês: *Triangulated Irregular Network*, TIN),

amplamente utilizada na construção de mapas e no desenvolvimento de malhas irregulares para simulações computacionais de fenômenos de transporte, nas áreas de engenharia (EVANS, KIRKPATRICK e TOWNSEND, 2001; SHEWCHUK, 2002; DELAUNAY, 1934). A relação entre o diagrama de Voronoi e a triangulação de Delaunay pode ser vista na Figura 1, onde é possível observar que os pontos amostrais que definem cada região poligonal do diagrama de Voronoi, também definem os vértices dos triângulos de Delaunay assim como as laterais dos triângulos sempre se orientam perpendicularmente às laterais dos polígonos de Voronoi. Deste modo, pode-se inferir que, uma vez definido o diagrama de Voronoi, o mesmo acontece para a triangulação de Delaunay. Possuem assim uma relação unívoca.

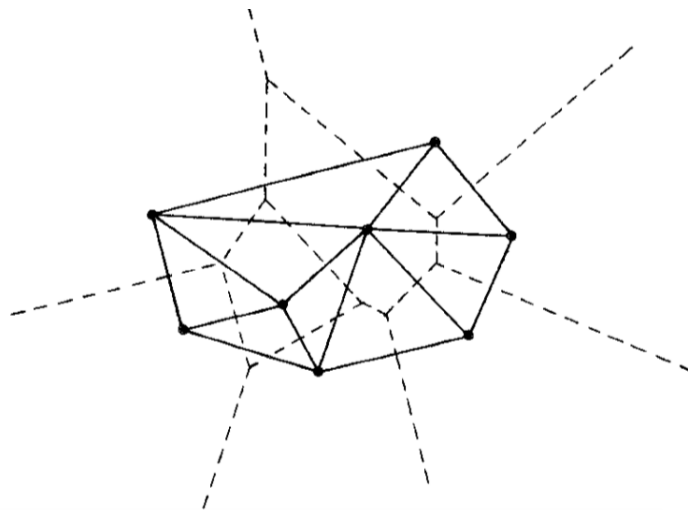


Figura 1. Exemplo de tesselação de Voronoi (linha pontilhada) para 8 pontos de uma superfície e sua relação com a triangulação de Delaunay (linha cheia) realizada sobre os mesmos pontos. **Fonte:** AURENHAMMER, 1991.

Diversas rotinas computacionais como as apresentadas nos trabalhos de Fortune (1987), Chazelle e Edelsbrunner (1987), Shamos e Hoey (1975) e Yap (1987), já foram concebidas para viabilizar a aplicação dessa interpolação discreta na análise de superfícies. Em consequência, essa metodologia sofreu uma rápida popularização, sendo atualmente, aplicada em várias frentes de pesquisa científica (LUKAT, KÜGER e SOMMER, 2013; GUIXAGONZALEZ *et al.*, 2014; BUCHOUX, 2017). Tornou-se amplamente popular devido à sua simplicidade, fácil implementação, e por não necessitar de uma distribuição uniforme dos pontos amostrais para a construção da superfície. Algumas metodologias de interpolação necessitam de um espaçamento uniforme entre os pontos amostrais da superfície interpolada

para que possam ser aplicadas, e por esse fato, têm suas aplicações restritas às superfícies amostrais que satisfaçam essa exigência.

Por outro lado, a imposição da continuidade da função interpoladora sobre cada ponto da superfície amostral, a faz sensível aos pontos ditos *outliers* na superfície. Esses são pontos da superfície localizados, insolitamente, fora da distribuição estabelecida por todos os pontos amostrais. Sua utilização imponderada para realizar aproximações da superfície e cálculos de propriedades estatísticas pode levar a erros indesejados e conclusões incorretas acerca dos resultados encontrados. Portanto, devem ser tratados adequadamente, ou até mesmo, excluídos do conjunto de dados amostrais (KWAK e KIM, 2017).

Além dessa desvantagem, a superfície desenvolvida pelas metodologias de interpolação é contínua por partes, o que lhe coloca em desvantagem em relação a metodologias que desenvolvem funções de aproximação contínuas e diferenciáveis sobre toda a extensão dos dados amostrais, capazes de serem integradas ou derivadas espacialmente. Essas últimas características são especialmente relevantes quando se objetiva extrair propriedades geométricas, como a curvatura Gaussiana e média de superfícies (interfaces) amostrais.

1.3.1.2 Interpolação bidimensional de Lagrange

A interpolação bidimensional de Lagrange pode ser classificada como uma modificação do polinômio interpolador de Newton, desenvolvido no século XVII. Diferentemente da interpolação superficial por polígonos, essa metodologia inicialmente descrita por Waring (1779), baseia-se na construção de curvas e superfícies regulares pela agregação de polinômios de ordem $N-1$ definidos sobre cada conjunto de N pontos de uma curva ou superfície amostral (MEIJERING, 2002). A fórmula geral da interpolação de Lagrange, para o caso bidimensional e de particular interesse a esse trabalho, pode ser escrita através das Equações 2, 3 e 4 (BARBOSU, 2008; SAUER e XU, 1995; HAKOPIAN, 1982; SANIEE, 2007).

$$L(x, y) = \sum_{i=0}^N \sum_{j=0}^M l_i(x) l_j(y) f(x_i, y_j) \quad (2)$$

$$l_i(x) = \prod_{k=0, k \neq i}^N \frac{(x - x_k)}{(x_i - x_k)} \quad (3)$$

$$l_j(y) = \prod_{k=0, k \neq j}^M \frac{(y - y_k)}{(y_j - y_k)} \quad (4)$$

Em que os termos l_i e l_j são chamados de polinômios de Lagrange, uma base polinomial cuja combinação linear é utilizada para delinear o polinômio interpolador do conjunto de dados amostrais. O termo $f(x_i, y_j)$ é o valor da superfície amostral cuja localização dos pontos, no plano xy , é dada por (x_i, y_j) (BOZORGMANESH, 2009; BARBOSU, 2008; SANIEE, 2007).

É possível perceber na Equação 2, que qualquer ponto pertencente a superfície construída pelo polinômio interpolador de Lagrange bidimensional é uma combinação linear dos pontos amostrais, $f(x_i, y_j)$, ponderada pelos valores atribuídos aos polinômios de Lagrange expostos nas Equações 3 e 4. Além disso, é possível perceber que essa ponderação é dependente da distância Euclidiana entre a localização dos pontos pertencentes à superfície interpoladora, (x, y) , e os pontos amostrais (x_i, y_j) . Essa contribuição baseada em métricas de distância merece especial destaque pela sua grande aplicabilidade em metodologias de aproximação e interpolação multivariada de dados, além de dar origem às conhecidas funções de base radial que são utilizadas na moderna teoria da aproximação (BUHMANN, 2003, MAJDISOVA e SKALA, 2017).

A metodologia de interpolação desenvolvida e implementada no SuAVE, deriva da interpolação de Lagrange e das metodologias baseadas em funções de base radiais, como será discutido na seção 2.2.2. Uma introdução às suas características será dada no tópico 1.4 e uma descrição detalhada da sua metodologia poderá ser encontrada no capítulo 2, assim como no Apêndice B. Maiores detalhes sobre a interpolação de Lagrange multivariada pode ser encontrada nos trabalhos de Barbosu (2008), Sauer e Xu (1995), Hakopian (1982) e Saniee (2007).

1.3.1.3 Aproximação por funções de base radiais

Muito utilizadas em algoritmos de descrição de superfícies através de dados discretos, na construção de modelos de redes neurais e resoluções de equações diferenciais parciais, a metodologia de aproximação de superfícies por funções de base radiais (do inglês: *Radial Basis Function*, RBF) é uma ferramenta que se baseia na construção de uma superfície, cuja localização dos pontos depende da distância entre estes e os dados amostrais. Em outras palavras, assim como na interpolação de Lagrange, cada ponto pertencente à superfície de aproximação é definido através de uma combinação linear da localização de cada dado amostral. Os coeficientes dessa combinação linear são funções da distância entre os dados amostrais e os pontos da superfície de aproximação (GONÇALVES, 2004; MAJDISOVA e SKALA, 2017).

Uma metodologia muito conhecida que exprime bem esse conceito é a aproximação por inverso da distância dos pontos (do inglês: *Inverse Distance Weighting*, IDW). Essa metodologia pode ser descrita pelas Equações 5 e 6, abaixo.

$$IDW(x) = \frac{\sum_{i=0}^N f(x_i) w_i}{\sum_{i=0}^N w_i} \quad (5)$$

$$w_i = \frac{1}{\delta_i^p} \quad (6)$$

Em que w_i é a função de ponderação da média expressa na Equação 5, e que depende da distância, δ_i , entre os dados amostrais e os pontos da superfície de aproximação, e p é um número real, chamado parâmetro de potência, que pode ser modificado de modo a melhorar o resultado do procedimento de interpolação (LUKASZYK, 2004). Outras aproximações por funções de base radial podem ser derivadas a partir dessa expressão, através da modificação da função de distância, w_i . A única condição necessária para isso é expressa pela Equação 7 (LUKASZYK, 2004; BUHMANN, 2003). Ela deve ser uma função par.

$$w(x) = w(-x) \quad (7)$$

Essa metodologia de interpolação é menos sensível a pontos *outliers* da superfície amostral, uma vez que os pontos da função de aproximação não necessariamente passam

sobre os dados amostrais e ponderam sobre as contribuições de todos os pontos do conjunto amostral. Portanto, como pontos *outliers* residem fora da distribuição média dos dados, eles carregam menor contribuição em relação a todos os outros dados e são naturalmente desvalorizados pela função interpoladora. Essa característica permite classificar a metodologia de aproximação por funções de base radiais como interpolante aproximada, diferenciando-se das outras descritas até o momento que, em consequência, passam a ser denominadas de interpolantes exatas, por conter obrigatoriamente os dados amostrais. Esse tipo de função interpoladora é particularmente importante, como pode-se imaginar, para aproximar dados amostrais que apresentem algum tipo de espalhamento em torno da sua média (LUKASZYK, 2004). Esse é o caso dos sistemas avaliados pelo programa SuAVE e descritos no tópico 1.2.

Para facilitar a discussão do trabalho e auxiliar na diferenciação entre essa metodologia e as classificadas como interpolações exatas, a partir desse momento, o termo ajuste será utilizado para classificar as interpolações aproximadas, ou aproximações. Não podendo ser, portanto, confundido com as metodologias de regressão, que por vezes, são coloquialmente chamadas de ajustes.

1.3.2 Programas desenvolvidos

Após a breve descrição das metodologias de interpolação mais comumente utilizadas para delinear uma superfície contínua sobre os pontos amostrais discretos em interfaces químicas, ou seja, sobre os átomos, torna-se importante mencionar alguns softwares já publicados e descritos na literatura, que implementam os conceitos descritos no tópico anterior com o objetivo de analisar a estrutura de interfaces lipídicas e suas propriedades.

Em 2009, Allen, Lemkul e Bevan publicaram o que pode se chamar de arcabouço dos programas de análise de propriedades estruturais de membranas lipídicas. O programa, chamado GridMAT-MD, foi escrito em linguagem Perl e serve como uma ferramenta de análise para os arquivos de trajetórias geradas a partir do programa de simulação de dinâmica molecular GROMACS (HESS *et al.*, 2008). No entanto, o GridMAT-MD não utiliza métodos de interpolação da superfície de membranas lipídicas, em vez disso, ele desenvolve um *grid* sobre a superfície da membrana que apenas serve para separar lipídios dentro de polígonos. Através dessa aproximação, a área por lipídio calculada para cada polígono é obtida pela razão entre o número de pontos do *grid* inscritos na região do polígono e o número total de pontos do *grid*. Além disso, a espessura da membrana lipídica é estimada apenas calculando a

distância entre os átomos de referência de cada monocamada que estão mais próximos em relação a suas posições no plano xy.

Embora limitado em suas aplicações, o GridMAT-MD inspirou diversos outros grupos de pesquisa a desenvolverem novas e mais completas ferramentas computacionais para alcançar o objetivo de descrever as propriedades estruturais de interfaces lipídicas. Em 2013, Lukat, Krüger e Sommer publicaram uma ferramenta melhorada para realizar as mesmas análises propostas pelo GridMAT-MD, mas também podendo ser aplicada a membranas compostas por diferentes lipídios. O APL@VORO, é um programa escrito em C++, também voltado para análise de simulações produzidas pelo pacote GROMACS. Essa ferramenta computacional introduziu a tesselação de Voronoi como metodologia para analisar separadamente a área de cada lipídio constituindo o sistema, além de ser utilizada para calcular a espessura das bicamadas lipídicas pela comparação entre a localização dos átomos ou pontos amostrais, definidos sobre cada polígono de Voronoi.

Uma outra ferramenta mais aprimorada foi publicada em 2014 por Guixà-Gonzalez *et al.* O MEMBPLUGIN é um módulo de extensão desenvolvido para ser adicionado ao conhecido programa de visualização de dinâmica molecular VMD (do inglês: *Visual Molecular Dynamics*), permitindo o cálculo de propriedades estruturais de membranas lipídicas. Por ser escrito em TCL (do inglês: *Tool Command Language*) e utilizado como módulo de extensão do VMD, esse programa é capaz de analisar dados advindos de diferentes metodologias de simulação computacional cujos arquivos podem ser interpretados pelo VMD. O MEMBPLUGIN é capaz de calcular diversas propriedades estruturais de interesse em membranas, como por exemplo, o parâmetro de ordem de deutério das cadeias lipídicas, a espessura de bicamadas, a área por lipídio, o ângulo de inclinação dos lipídios em relação ao eixo normal do sistema e a interdigitação das cadeias lipídicas. Embora apresente uma maior quantidade de análises quando comparado com os programas citados anteriormente, o MEMBPLUGIN não leva em consideração a curvatura da interface química e sempre utiliza o vetor normal da membrana como o vetor normal do sistema (*i.e.*, não observam o vetor local de cada ponto da membrana). A área é calculada através da tesselação de Voronoi e da sua projeção sobre o plano xy, sendo, portanto, uma área projetada que não reflete a configuração espacial do sistema. Assim, embora o MEMBPLUGIN seja um programa com maior número de funcionalidades, o mesmo assume que a membrana apresenta uma configuração plana ou lamelar. Deste modo, as análises resultantes são bastante aproximadas, ou mesmo incorretas, para membranas com curvatura de superfície acentuada.

Em 2015, Carr e MacPhee publicaram uma ferramenta computacional com um número ainda maior de funcionalidades que o MEMBPLUGIN. O MEMBRAINY é um programa escrito em Java que pode ser utilizado em qualquer sistema operacional sem necessidade de instalação. Foi desenvolvido para analisar os arquivos de trajetória originados pelo GROMACS, mas pode ser utilizado para analisar os arquivos de saída em formato PDB advindos de qualquer ferramenta de simulação computacional. Essa ferramenta pode, eficientemente, calcular o parâmetro de ordem de deutério das cadeias alquílicas de lipídios, pode desenvolver mapas bidimensionais da superfície e da variação espacial da espessura de membranas, calcular a orientação espacial das regiões polares dos lipídios, a espessura média de membranas, área por lipídio, entropia de mistura para membranas compostas por mais de um tipo de lipídio e potencial transmembranar.

Apesar do amplo espectro de análises, o MEMBRAINY utiliza em todas elas, a aproximação de que as membranas analisadas se distribuem sobre o plano xy e assumem uma conformação plana. O programa não

Esse impedimento para avaliar sistemas cuja configuração espacial da membrana lipídica não plana é encontrado em todas as ferramentas até agora citadas. Por essa razão, mesmo que os programas apresentados possuam um amplo leque de análises, são inadequados para estudar, por exemplo, a energia de deformação de membranas lipídicas, e alterações das propriedades estruturais quando as membranas são expostas a condições que lhe forcem a mudança conformacional.

Entretanto, em 2017, Buchoux publicou uma nova metodologia computacional para analisar membranas lipídicas e capaz de superar essa barreira. O FATSLiM, é um programa escrito em python, apto a calcular a área por lipídio e a espessura de uma bicamada plana ou curvada, ou mesmo de vesículas e micelas. Esse programa foi desenvolvido para funcionar como ferramenta de análise para os arquivos de configuração espacial advindos do GROMACS e por isso não é acessível a usuários de outras ferramentas de simulação computacional.

Todo seu protocolo está baseado no cálculo de planos tangentes ao longo da bicamada para conseguir avaliar sua topologia, permitindo que esse programa consiga estimar de forma melhorada a área por lipídio e a espessura de interfaces levando em consideração as suas curvaturas. Para realizar tal tarefa, o FATSLiM utiliza a metodologia de reconstrução de superfície descrita por Hoppe *et al.* (1992). O programa é capaz de particionar qualquer interface lipídica em um conjunto de polígonos da tesselação de Voronoi que, pela utilização da metodologia de reconstrução, passam a ter a orientação dos planos tangentes à interface.

Com esses planos tangentes, o programa fica habilitado a calcular as propriedades estruturais de interesse em membranas lipídicas, levando em conta sua morfologia. Um exemplo de como isso é realizado é mostrado na Figura 2.

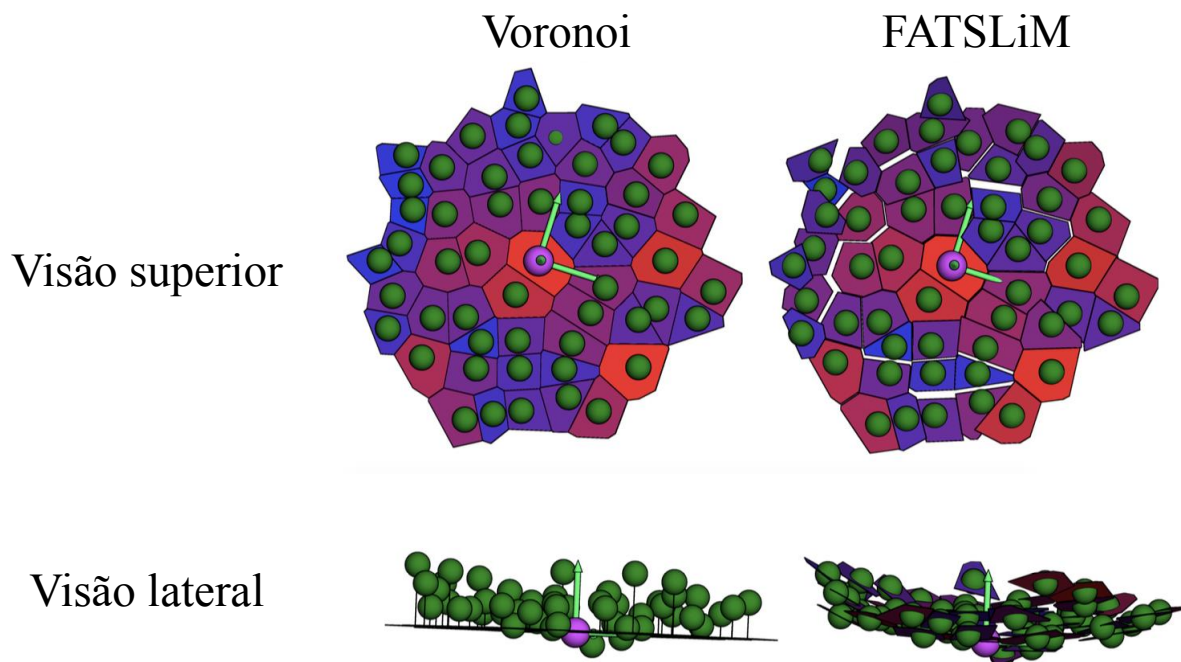


Figura 2. Comparação entre a tesselação de Voronoi realizada pelos programas APL@VORO e MEMBPLUGIN (à esquerda) e o programa FATSLiM (à direita). Em verde estão representados os pontos amostrais de uma superfície de interesse (átomos), e em vermelho estão os polígonos de Voronoi orientados de acordo com a metodologia de cada programa. **Fonte:** adaptado de BUCHOUX *et al.* (2017).

1.4 A ALTERNATIVA SuAVE

Uma alternativa às limitações das metodologias anteriores reside no ajuste, ou interpolação aproximada, de pontos amostrais ou átomos de uma superfície, que seja sensível o suficiente para descrever as interfaces de interesse em cada uma de suas características, mas robusto o suficiente para filtrar perturbações dos átomos da superfície (pontos amostrais).

Os cálculos realizados pelo SuAVE (*Surface Assesment Via grid Evaluation*) fazem uso de uma função de interpolação contínua aplicável sobre a superfície de qualquer tipo de interface química. Mais do que isso, essa função é derivada da metodologia de aproximação por funções de base radiais e é caracterizada por ser uma função suave, ou seja, possui derivadas parciais de qualquer ordem diferenciáveis. Um maior detalhamento acerca da aplicação da metodologia do SuAVE para ajuste de superfícies bidimensionais será apresentado na seção 2.2.2. A diferenciabilidade deste tipo de função permite avaliar propriedades geométricas através de operadores lineares de cálculo e geometria diferencial,

sem a necessidade de desenvolvimento de algoritmos especiais como os utilizados nos programas baseados no diagrama de Voronoi.

O programa SuAVE é capaz de descrever eficientemente a área interfacial por lipídio, volume por lipídio, curvatura da interface e espessura de membranas lipídicas, perfil de densidade parcial de cada componente químico compondo o sistema de interesse, orientação da interface através do parâmetro de ordem de curvatura e desvio angular entre o vetor normal da interface e o vetor normal do sistema. Pode ainda expressar a configuração de uma interface de interesse na forma de curvas de nível, além de apresentar mapas bidimensionais para os parâmetros de ordem de curvatura, espessura de membranas lipídicas e densidade de componentes químicos do sistema. É um programa escrito em linguagem Fortran, de fácil compilação e instalação, lendo, como arquivos de entrada, coordenadas atômicas no formato PDB a partir de arquivos contendo uma única estrutura ou uma coleção ou trajetória do sistema químico em consideração, podendo ser obtidos através de qualquer ferramenta de simulação molecular.

A principal vantagem do uso do SuAVE é a possibilidade de utilizar uma superfície diferenciável eficientemente ajustada sobre qualquer interface de interesse (orgânica, inorgânica ou biológica) de modo a ser possível calcular propriedades geométricas e físicas que sejam diretamente dependentes da morfologia do sistema. Essa característica ainda não foi bem explorada por nenhum dos programas já desenvolvidos. E por isso, as análises elaboradas pelo SuAVE são de aplicação mais geral que os programas até agora encontrados na literatura especializada.

2 METODOLOGIA

2.1. VISUALIZAÇÃO GERAL DO PROGRAMA

Antes de qualquer descrição detalhada acerca dos algoritmos numéricos implementados no programa, faz-se necessária uma explanação geral sobre o funcionamento do SuAVE, de como deve ser realizada a entrada de arquivos e de como a saída vai ser obtida. É igualmente interessante explicar como funcionam as diversas opções dadas pelo pacote para facilitar e ampliar as opções de análise dos sistemas para os quais o programa foi destinado. Esse tópico foi desenvolvido para cobrir toda a discussão a respeito destes pontos importantes, e que habilitam um usuário iniciante a utilizar com sabedoria as ferramentas encontradas no SuAVE.

A Figura 3 descreve a visão geral do funcionamento do código. Nela, é possível avaliar que o programa está dividido em quatro principais etapas, e que serão, mais à frente, explicadas em detalhes.

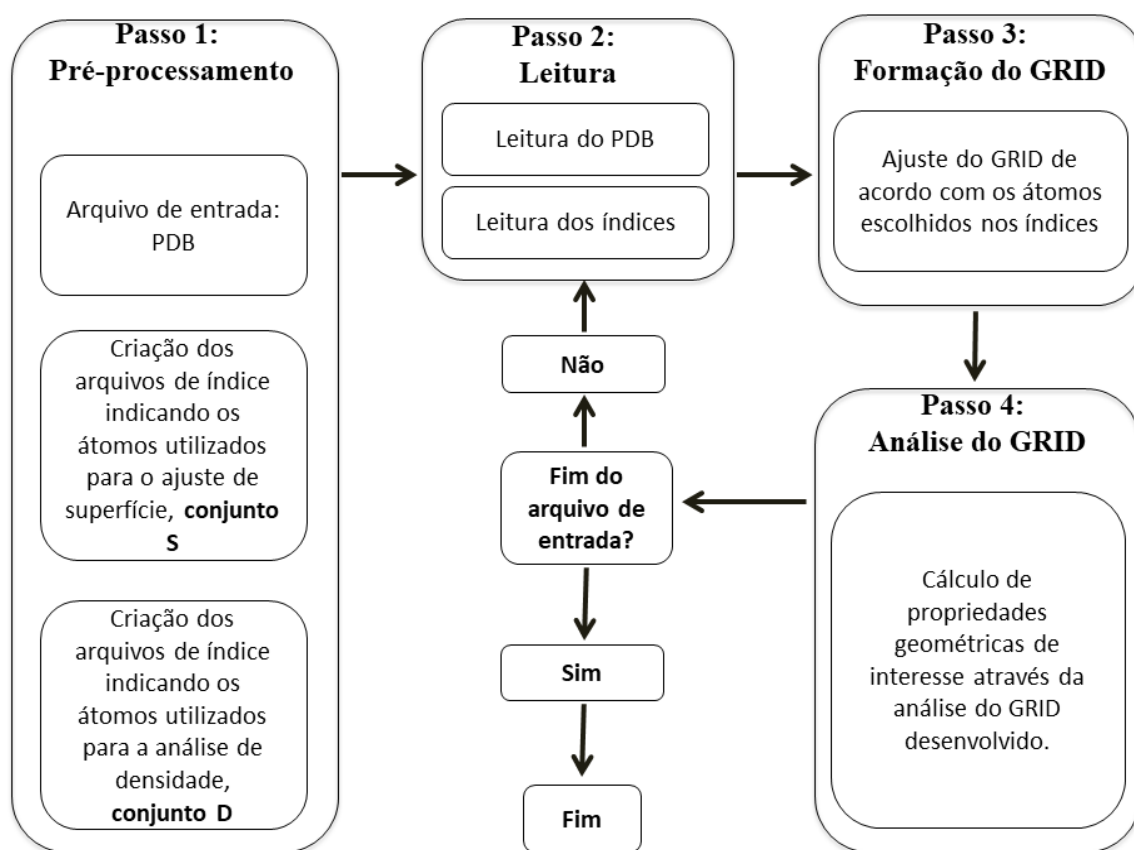


Figura 3. Visão geral do funcionamento do SuAVE, e sua divisão nas etapas principais.

A etapa do pré-processamento consiste na preparação dos arquivos de entrada para subsequente utilização no programa. Ao todo, podem ser necessários três tipos de arquivos. O primeiro arquivo contém a configuração do sistema, ou melhor, a localização espacial de cada átomo que o constitui. Esse arquivo pode ser de apenas uma estrutura, ou pode ser uma sequência de configurações instantâneas, que acabam por definir uma trajetória do sistema. Não é necessário que essa trajetória acompanhe a evolução temporal do sistema, visto que as análises do programa são diretamente relacionadas à estrutura do sistema em estudo e não às variações temporais das suas propriedades. Isso faz o programa particularmente atraente para analisar conjuntos de configurações, de um sistema em particular, que tenham sido geradas por algoritmos estocásticos, como no caso de estudos com Monte Carlo. Deste modo, a sequência de configurações definindo o arquivo de trajetória não necessita ter uma dependência temporal. A única restrição do arquivo de configuração, diz respeito a seu formato, que por questão de compatibilidade com o maior número de usuários e programas de simulação computacional, foi definido como sendo em PDB.

A conversão do arquivo de trajetória para esse formato é realizada pelo usuário, e não faz parte da implementação do código realizá-la, caso o usuário forneça o arquivo com formato errado. Neste caso, o programa mostrará uma mensagem de erro indicando problema no arquivo de leitura.

A etapa de pré-processamento, como visualizado na Figura 3, também é o momento onde o usuário desenvolve arquivos contendo a numeração dos átomos que serão utilizados pelo programa para gerar a superfície de ajuste e para realizar a análise do perfil de densidade de grupos químicos. Para realizar tal tarefa, faz-se necessária a utilização da ferramenta *s_index*, pertencente ao pacote SuAVE e desenvolvida especificamente para elaborar tais arquivos. O comando de linha utilizado para executar a rotina corretamente é facilmente encontrado apenas digitando o nome do programa no terminal, ou através do manual do programa.

As etapas 2, 3 e 4 são realizadas consecutivamente e em um ciclo que apenas finda quando o programa chega ao final do arquivo de entrada. Em cada ciclo, os dados do arquivo de trajetória são recebidos pelo programa, que logo seguem para a formação do *grid* de ajuste da interface química sendo analisada. Essa etapa consiste no coração do desenvolvimento do programa e, por isso, uma maior atenção será dada a ela no tópico seguinte. Após o ajuste da interface, o *grid* desenvolvido passa a representar a sua configuração espacial, e possibilita que análises de propriedades geométricas intrínsecas à superfície sejam realizadas facilmente, através de simples metodologias numéricas, como serão apresentadas no tópico 2.3.

Após essa breve descrição do desenvolvimento do programa, uma atenção especial deve ser dada aos átomos escolhidos para serem inseridos nos arquivos de índice. Como esses átomos serão utilizados para o ajuste da interface em estudo, a escolha dos mesmos não pode ser leviana e requer uma análise cuidadosa. As propriedades medidas pelo programa são altamente dependentes da configuração do sistema e, conseqüentemente, da superfície sendo ajustada. Se, por uma escolha errônea do usuário, os átomos que foram selecionados nos arquivos de índice não representarem adequadamente a configuração da superfície, então os resultados obtidos ao final das análises do programa podem não condizer com a realidade das propriedades sendo avaliadas.

Assim, para uma escolha adequada dos átomos que serão selecionados para representar a superfície, seguem alguns pontos importantes.

1. Os átomos escolhidos devem estar distribuídos sobre toda a extensão da interface sendo estudada;
2. Devem estar em quantidade suficiente para definir cada reentrância da superfície, que seja relevante nos cálculos a serem realizados;
3. Devem estar ligados a grupamentos químicos com pouca mobilidade ou flutuação. Grupos químicos muito solvatados ou que estejam envolvidos em interações fortes com outras moléculas, podem introduzir ruído às propriedades sendo analisadas.

2.2. DEFINIÇÕES IMPORTANTES DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA

Neste tópico será abordada a metodologia utilizada para desenvolvimento da superfície de ajuste do SuAVE. Por ser essa, a parte mais importante do desenvolvimento do programa, faz-se necessário um detalhamento maior, que requer uma descrição de como cada equação utilizada no programa foi elaborada. Essa extensa tarefa é realizada com auxílio do Apêndice B, sem o qual, o texto tornar-se-ia muito longo e cansativo.

Portanto, seguem neste tópico, as descrições de todas as equações fundamentais para execução do programa de forma concisa, mas mantendo os detalhes de suas elaborações no final do trabalho, para avaliação mais cuidadosa.

2.2.1 Construção do *grid*

2.2.1.1 Coordenadas Cartesianas

A construção do *grid* de ajuste das interfaces em estudo se dá após a leitura de cada configuração contida no arquivo de trajetória. Na etapa de leitura, algumas variáveis importantes são extraídas, como as dimensões do sistema e o número de partículas presentes na interface.

O *grid* é construído segundo especificações do usuário a respeito de quantas divisões ele deverá ter. Para que isso seja feito, o usuário do programa deve utilizar uma palavra-chave, *bin*, caso contrário, o programa calculará o número de divisões da malha que compõe o *grid* para que a densidade de pontos da superfície se aproxime o máximo possível da densidade superficial de átomos indicados no arquivo de índice. Com isso, é possível descrever o número de pontos que o *grid* vai possuir, n_g , em função do número partições, *bin*, definidas, sendo n_g e *bin*, números inteiros.

$$n_g = (bin + 1)^2 \quad (8)$$

Além disso, é necessário definir o espaço entre cada ponto da malha de modo que a sua distribuição seja uniforme sobre toda a extensão da interface em análise. Para isso, sejam os limites da interface nos eixos x e y, respectivamente, dados por x_{max} e x_{min} , e y_{max} e y_{min} . O espaçamento, entre os pontos, em cada eixo é dado por:

$$\Delta x = \frac{x_{max} - x_{min}}{bin} \quad (9)$$

$$\Delta y = \frac{y_{max} - y_{min}}{bin} \quad (10)$$

Com isso, cada ponto da malha (x_g, y_g, z_g) vai ter sua localização nos eixos coordenados expressa como segue:

$$x_g(i) = x_{min} + \Delta x(i - 1) \quad (11)$$

$$y_g(j) = y_{min} + \Delta y(j - 1) \quad (12)$$

Em que i e j são números inteiros que podem assumir valores dentro do intervalo $[1, bin+1]$ que correspondem necessariamente aos valores mínimos e máximos da interface nos eixos coordenados. Importante ressaltar que o termo “g” subscrito indica que a variável em questão é relativa aos pontos do *grid* de ajuste. Em contrapartida, para os pontos amostrais (átomos) da superfície química de interesse será adotado o suscrito “s”.

A distribuição dos pontos da malha sobre o plano xy configuram, à grosso modo, a construção do *grid*, faltando apenas caracterizar a quota de cada ponto no eixo coordenado z. Este será o assunto do próximo tópico, pois o valor da coordenada z_g revela-se um pouco mais complicado de estimar do que as localizações nos outros eixos, como mostrado.

2.2.1.2 Coordenadas esféricas

Para o caso onde o sistema em estudo assume uma geometria esférica, torna-se necessário uma mudança de variáveis, onde, no lugar de (x_s, y_s, z_s) , a localização dos átomos do sistema será apresentada pelas coordenadas (r_s, θ_s, ϕ_s) , cuja relação com os eixos cartesianos está descrita na Figura 4.

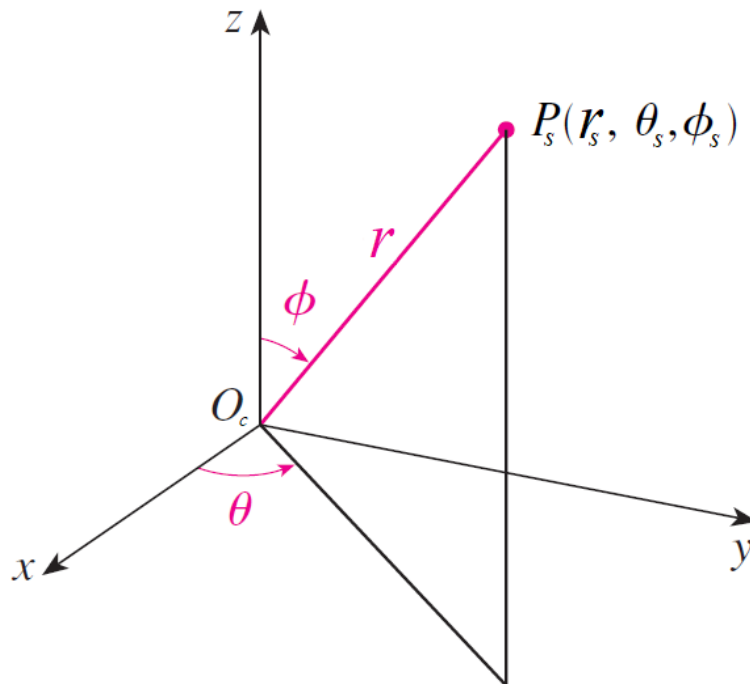


Figura 4. Descrição da relação entre a convenção de coordenadas esféricas utilizadas e os eixos cartesianos. P_s é o ponto referente a um átomo do sistema e que tem sua localização totalmente determinada pelo conjunto de variáveis (r_s, θ_s, ϕ_s) em relação ao centro de coordenadas, O_c , tomado como centroide do conjunto de átomos compondo o sistema. **Fonte:** adaptada de STEWART, 2013.

De acordo com a convenção adotada, as equações de mudança de variáveis podem ser definidas como segue.

$$r_s = \sqrt{(x_s^2 + y_s^2 + z_s^2)} \quad (13)$$

$$\varphi_s = \arctg \frac{\sqrt{(x_s^2 + y_s^2)}}{z_s} \quad (14)$$

$$\theta_s = \arctg \frac{x_s}{y_s} \quad (15)$$

Da mesma forma que em relação à base canônica, é imperativo que sejam calculados os espaçamentos entre os pontos da malha em termos das novas variáveis. Assim, os espaçamentos e as posições dos pontos da malha de ajuste, em termos das novas variáveis, são dados pelas seguintes equações:

$$\Delta\theta = \frac{2\pi}{bin} \quad (16)$$

$$\Delta\varphi = \frac{2\pi}{bin} \quad (17)$$

$$\theta_g(i) = \Delta\theta(i - 1) \quad 0 < \theta_g < 2\pi \quad (18)$$

$$\varphi_g(j) = \Delta\varphi(j - 1) \quad 0 < \varphi_g < \pi \quad (19)$$

Assim como z_g , r_g é uma variável que será avaliada pelo procedimento de ajuste numérico sobre os átomos da superfície amostral. Também como no tópico anterior, os valores de i e j devem ser inteiros e pertencer ao intervalo $[1, bin+1]$ e $[1, bin/2+1]$, respectivamente. Nestas expressões o valor do parâmetro bin , introduzido pelo usuário, necessita ser par, caso contrário, o programa calculará o valor inteiro mais próximo ao resultado da divisão e o utilizará em substituição.

2.2.2 Função de ajuste

2.2.2.1 Coordenadas cartesianas (Superfícies abertas)

Assim como brevemente descrito na introdução, o programa SuAVE traz uma metodologia numérica de ajuste de superfície que visa superar limitações nas metodologias já existentes. Essa metodologia é a responsável por introduzir os valores de z_g , r_g de cada ponto do *grid* de ajuste, como definido no tópico anterior. É, seguramente, o núcleo do desenvolvimento do programa SuAVE. Sua importância para a metodologia aqui apresentada é tamanha, que frequentes melhorias são implementadas nesse tópico, de modo a abranger a aplicabilidade do programa e introduzir novas variáveis importantes, inerentes a algumas superfícies em estudo. Por essa razão, três diferentes funções de ajuste já foram concebidas e implementadas em versões separadas do programa.

A primeira versão (03/15 – 05/16) deriva-se diretamente da ideia introduzida pelo polinômio interpolador de Lagrange para o caso bidimensional, e foi responsável por modificar o denominador deste polinômio, de modo que ele seja definido também como uma função da distância entre o ponto sendo ajustado e os átomos na superfície amostral. Essa modificação permite que o polinômio interpolador desenvolvido varie lentamente quando o ponto sendo ajustado se afasta dos átomos pertencentes à superfície amostral. Esse detalhe permite uma variação suave da superfície na região entre os pontos amostrais. Essa versão caracteriza-se pela equação descrita abaixo.

$$z_g(i, j, k) = \frac{\sum_{m=1}^4 (z_s(m) \prod_{k=1, k \neq m}^4 \delta(i, j, k))}{\sum_{m=1}^4 (\prod_{k=1, k \neq m}^4 \delta(i, j, k))} \quad (20)$$

$$\delta(i, j, k) = \sqrt{(x_g(i) - x_s(k))^2 + (y_g(j) - y_s(k))^2} \quad (21)$$

Em que z_g é a localização no eixo z de um ponto da malha sendo ajustada. Esse valor, juntamente com os valores de i e j, que fornecem sua localização nos eixos x e y respectivamente, determinam completamente a posição de cada ponto do *grid*.

Neste modelo o valor de z_g é definido como uma combinação da coordenada em z, z_s , dos quatro átomos pertencentes a superfície amostral, ou pontos da superfície amostral, mais próximos do ponto da malha sendo ajustada. A métrica de distância δ é a distância cartesiana

no plano xy entre o ponto da malha e o k-ésimo átomo da superfície, definido dentro do conjunto dos quatro átomos mais próximos do ponto do *grid*.

A segunda equação (05/16 – 08/18) é uma evolução da primeira no que diz respeito a não mais realizar uma interpolação exata, mas sim um ajuste de superfície que, inerentemente, é menos sensível a oscilações da interface química sendo analisada, pois que a malha de ajuste deve seguir a localização dos átomos da interface, mas não necessariamente passar por eles. Assim sendo, o objetivo do desenvolvimento desta metodologia de ajuste é tornar o programa capaz de descrever a localização dos átomos existentes na superfície amostral, mas evitar ou compensar a contribuição de *outliers* presentes nesta interface (KWAK e KIM, 2017). Também faz parte dessa segunda implementação, não mais necessitar da definição do número de vizinhos mais próximos para realizar o ajuste. Este passa a ser realizado com todos os átomos presentes na interface sendo ajustada. A equação que define a segunda função de ajuste segue descrita abaixo.

$$z_g(i, j; \alpha) = \frac{\sum_{k=1}^{Np} z_s(k) \cdot P(i, j, k; \alpha)}{\sum_{k=1}^{Np} P(i, j, k; \alpha)} \quad (22)$$

$$P(i, j, k; \alpha) = \frac{1}{\cosh(\alpha \cdot \delta(i, j, k))} \quad (23)$$

Em que δ já foi definido anteriormente, Np é o número de pontos amostrais (átomos) da superfície amostral e α é o chamado “parâmetro de ajuste” do programa, cuja parametrização é demasiada complicada para ser descrita nesse tópico. Por esta razão, a descrição detalhada do formato desse parâmetro e de como está implementado no programa é encontrada no Apêndice B.

Como pode ser visto, a função de ajuste foi definida como uma média ponderada da localização de cada átomo pertencente à interface sendo ajustada. Embora a média ponderada possa ser pensada como uma alternativa muito simples para uma primeira distribuição espacial dos pontos do *grid* de ajuste, há uma característica singular nesta expressão, que torna esse procedimento bastante robusto e que é revelada na função que pondera a contribuição de cada átomo da superfície amostral. A escolha desta função não foi aleatória e deve-se à necessidade do programa de dar maior importância, ou peso, aos átomos mais próximos, no plano xy, do ponto da malha sendo ajustado. Graças a isso, o formato geral da função de ponderação escolhida para o procedimento de ajuste deve delinear-se sobre as seguintes características:

1. $P(\alpha, \delta): \mathbb{R}^3 \rightarrow \mathbb{R}$;
2. Ser diferenciável para todo o $\mathbb{R}$, conjunto dos números reais;
3. Possuir apenas um máximo local, com valor 1, localizado sobre o ponto de ajuste;
4. Ser simétrica em relação ao ponto de máximo local;
5. Tender assintoticamente para zero quando $\delta \rightarrow \infty$ (ou δ muito grande)

Muitas são as funções que cumprem essas características e todas podem ser utilizadas para realizar o procedimento de ajuste, uma vez realizada a reparametrização do parâmetro de ajuste, já mencionado. Como exemplo, é possível mostrar o formato da função de ponderação escolhida para a segunda versão do programa e mais duas outras funções que também satisfazem as condições definidas acima, uma curva Gaussiana e uma curva Lorentziana (Figura 5).

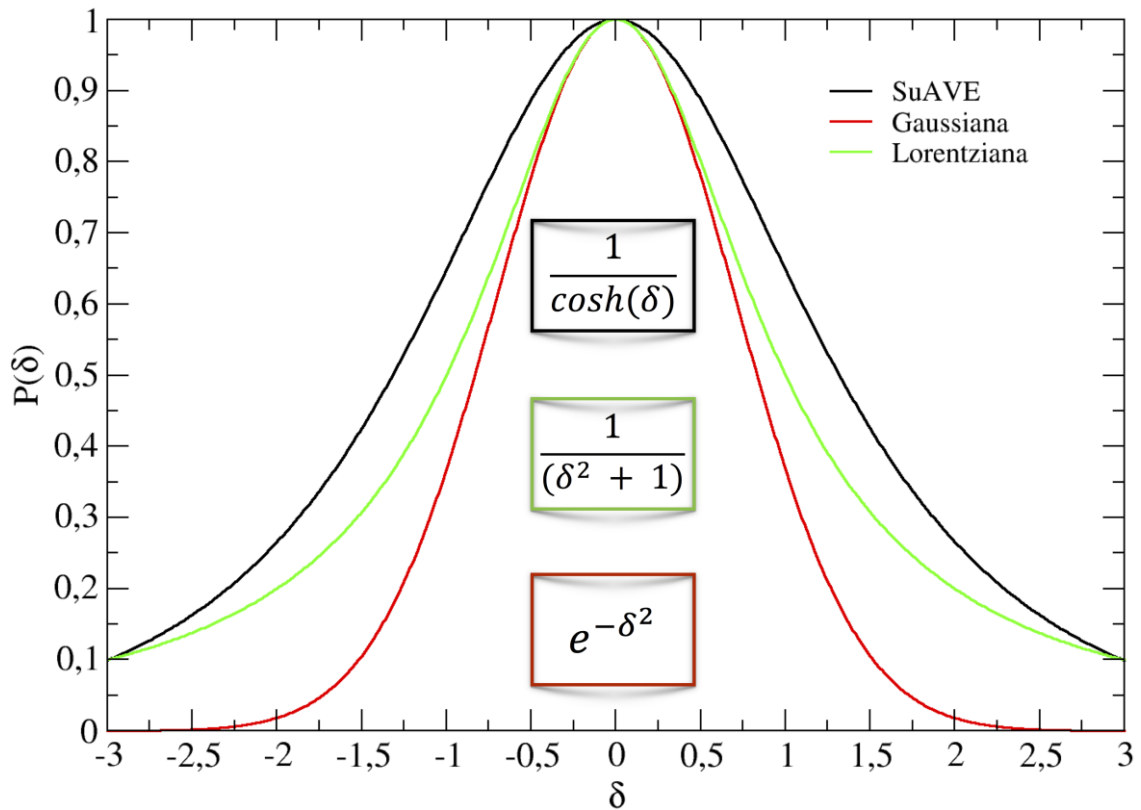


Figura 5. Comparação entre a função implementada na segunda versão do SuAVE e as curvas Gaussiana e Lorentziana.

A terceira versão do programa (08/18-atual) conta com uma pequena modificação da função de ponderação, onde o cosseno hiperbólico inverso, antes implementado, dá lugar a uma função Gaussiana dependente da densidade de átomos presentes na interface sendo ajustada, ρ . Esta relação é observada nas equações abaixo, mas pode ser verificada em

maiores detalhes no Apêndice B, onde está presente todo o estudo que levou ao seu desenvolvimento.

$$z_g(i, j; \sigma) = \frac{\sum_{k=1}^{Np} z_s(k) \cdot P(i, j, k; \sigma)}{\sum_{k=1}^{Np} P(i, j, k; \sigma)} \quad (24)$$

$$P(i, j, k; \sigma) = e^{-\frac{\delta(i, j, k)^2}{2\sigma^2}} \quad (25)$$

$$2\sigma^2 = 41,7845\rho^{-0,8296} \quad (26)$$

$$\frac{1}{2\sigma^2} = \frac{\alpha^2}{\pi} \quad (27)$$

A introdução da função Gaussiana na terceira versão do programa se deu pela necessidade de tornar a função de ajuste facilmente derivável, o que possibilita a avaliação de diversas propriedades geométricas das interfaces químicas sendo ajustadas.

Por fim, após toda a descrição dos pontos, torna-se útil avaliar o formato de uma superfície teste, ajustada com cada uma das funções já implementadas no SuAVE. Na Figura 6 são mostradas as superfícies ajustadas sobre os fosfatos de uma bicamada lipídica. É interessante notar que, embora todas consigam descrever a superfície constituída pelos fosfatos, a primeira função de ajuste desenvolve uma malha com alguns pontos descontínuos, que tendem a prejudicar a medição de alguns dos parâmetros geométricos que vão ser descritos mais à frente. É possível verificar que esse problema é totalmente corrigido pela segunda e terceira funções de ajuste implementadas no programa. Há pequena diferença entre a malha de ajuste realizada com a segunda e terceira funções implementadas, e ambas têm a característica de promover uma superfície de ajuste contínua e SUAVE, o que é mais que conveniente para o nome do programa.

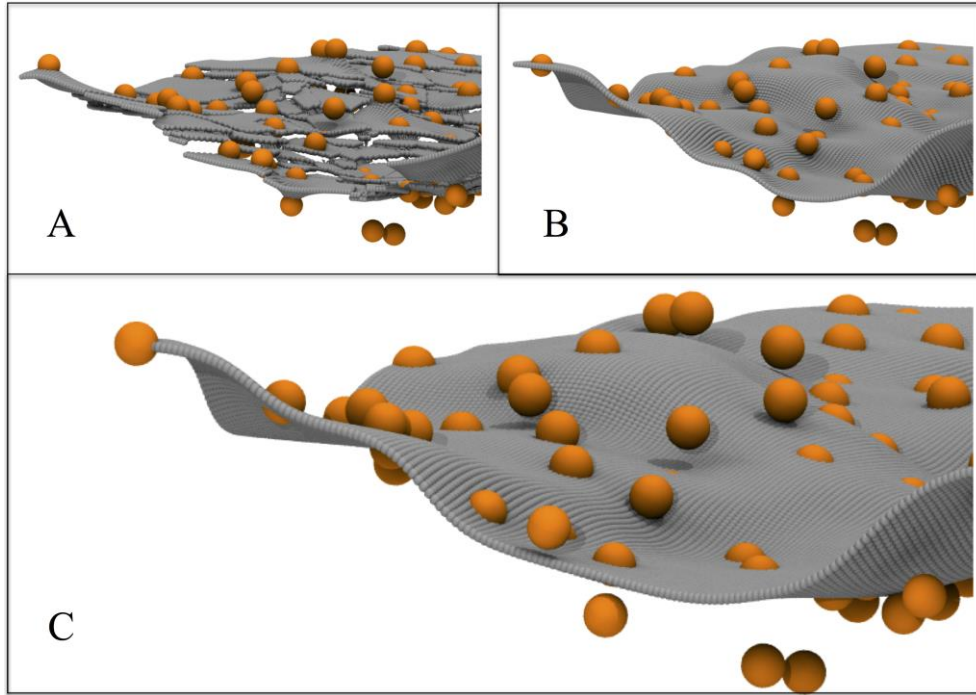


Figura 6. Malhas de ajuste (em cinza) construídas sobre os fosfatos (em laranja) de uma bicamada lipídica. A figura é apenas uma comparação entre as superfícies criadas por diferentes versões do SuAVE. A primeira versão do programa está representada na figura A, enquanto que a segunda e terceira são representadas pelas figuras B e C, respectivamente.

2.2.2.2 Coordenadas esféricas (*Superfícies fechadas*)

Quando em coordenadas esféricas, há algumas modificações que devem ser realizadas sobre a função de ajuste mostrada acima. Primeiramente, é necessário substituir a coordenada z_g por r_g . Além disso, a medida cartesiana de distância entre pontos da superfície amostral não é mais válida, uma vez que em geometria esférica a distância entre dois pontos é aquela que percorre a geodésica sobre a esfera, à qual os pontos pertencem (CHEN, 2016). Com isso, a equação de ajuste para superfícies esféricas ou fechadas pode ser descrita como segue.

$$r_g(i, j; \sigma) = \frac{\sum_{k=1}^{Np} r_s(k) \cdot P(i, j, k; \sigma)}{\sum_{k=1}^{Np} P(i, j, k; \sigma)} \quad (28)$$

$$P(i, j, k; \sigma) = e^{-\frac{\delta(i, j, k)^2}{2\sigma^2}} \quad (29)$$

$$\delta(i, j, k) = r_s(k) \cdot \text{acos} \left(\begin{array}{c} \cos(\varphi_g(j)) \cos(\varphi_s(k)) + \\ \sin(\varphi_g(j)) \sin(\varphi_s(k)) \cos(\theta_g(i) - \theta_s(k)) \end{array} \right) \quad (30)$$

Em que o parâmetro σ permanece como descrito no tópico anterior, apenas com modificações nas suas constantes, como relatado no Apêndice B. As coordenadas esféricas dos pontos do *grid* de ajuste e dos átomos da interface amostral são descritos pelas equações fornecidas no tópico 2.2.1.2.

2.2.3 Raio de corte

Uma vez realizada a descrição da função e parâmetro de ajuste, implementados no SuAVE, torna-se conveniente observar a consequência da sua utilização sobre superfícies amostrais com diferentes densidades de átomos. Desta forma, é possível avaliar quantos átomos, em média, possuem uma contribuição significativa para o posicionamento dos pontos da malha de ajuste. A Figura 7 mostra o gráfico da função de ponderação em relação à distância entre os átomos da superfície e os pontos de ajuste, para várias densidades de átomos nas superfícies amostrais.

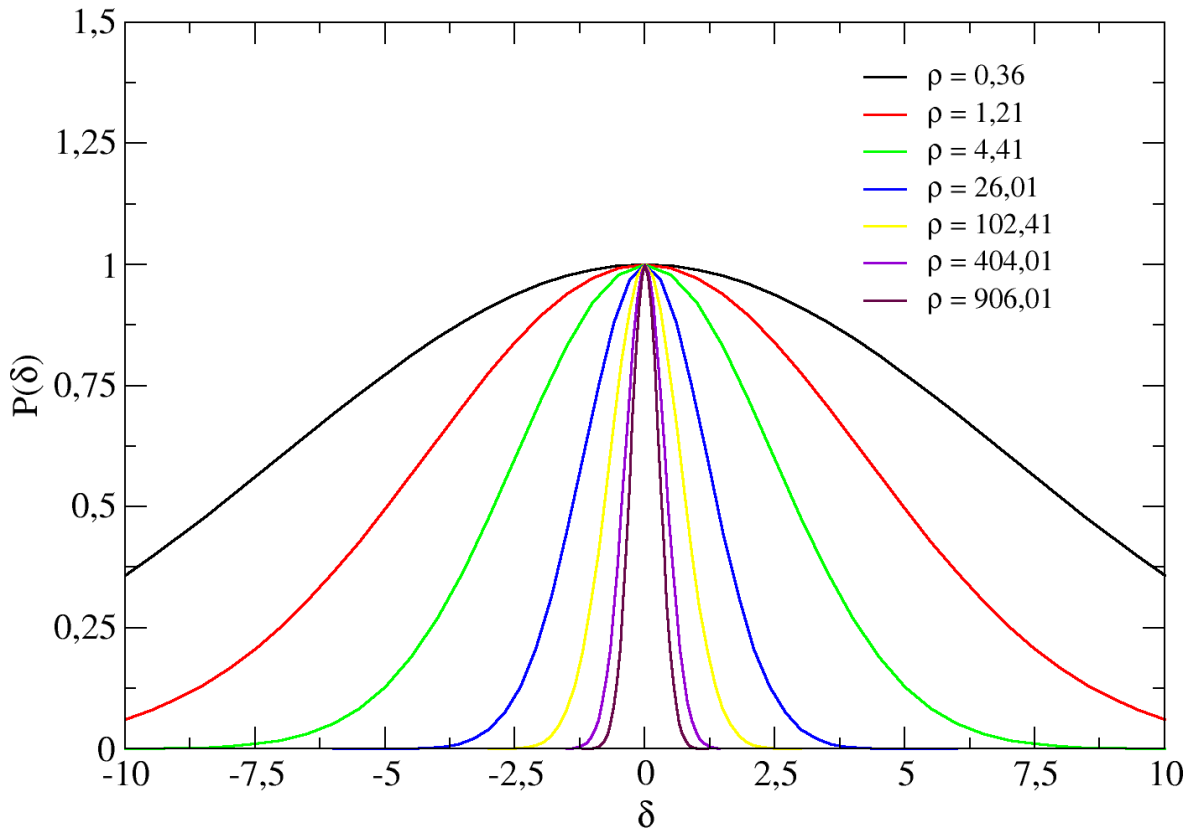


Figura 7. Gráfico da função de ponderação utilizada na terceira versão do SuAVE em função de diferentes densidades de átomos em uma interface amostral. As densidades estão em átomos/nm².

É fácil perceber que o desvio padrão da função de ponderação é inversamente proporcional à densidade de átomos na superfície amostral, assim como definida nas equações do tópico anterior. Sobre esse fato, pode-se deduzir que a distância máxima, δ_m , que um átomo deve assumir, em relação a um ponto de ajuste do *grid*, para que a função de ponderação, $P(i, j, k; \sigma)$, apresente um valor maior que 0,05, por exemplo, é dada pela equação abaixo.

$$\delta_m = \sqrt{-2\sigma^2 \ln(0,05)} \quad (31)$$

De onde pode-se calcular que o número de átomos, n , presentes dentro dessa distância, em relação a um ponto da malha de ajuste, é definido como segue abaixo.

$$n = \rho \pi \delta_m^2 \quad (32)$$

Em que ρ é a densidade de átomos na superfície amostral. A Figura 8 mostra o número de átomos que, para cada densidade amostral, se apresenta dentro do raio máximo determinado acima.

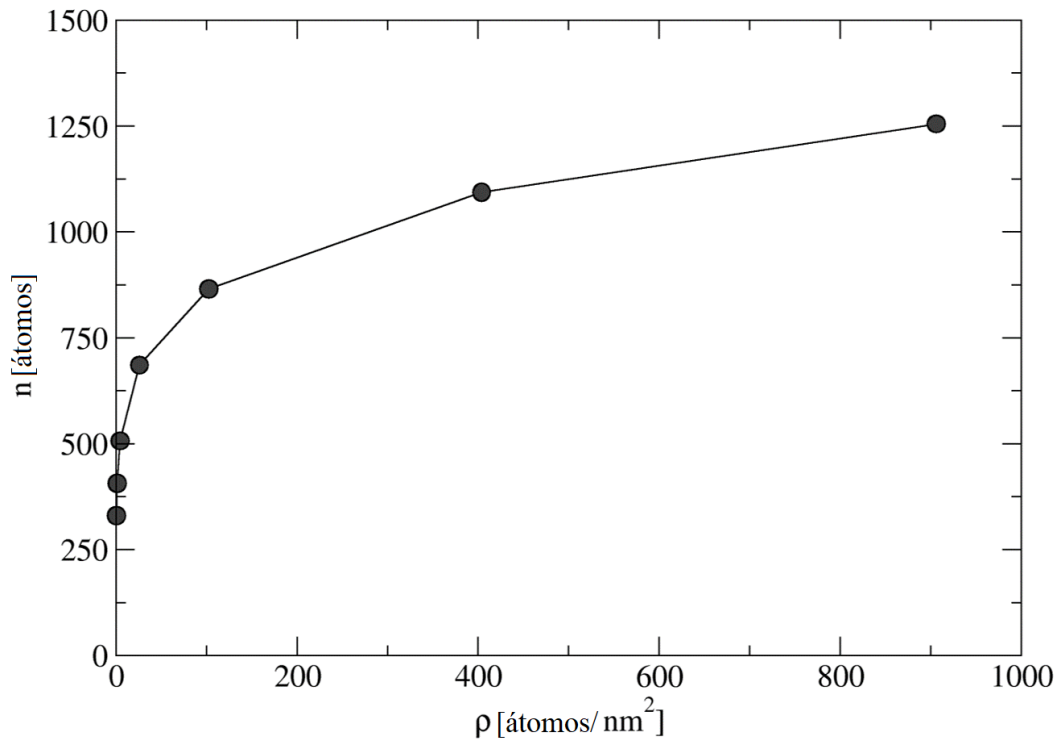


Figura 8. Número de átomos dentro do raio máximo, avaliado para cada densidade amostral.

Através desta imagem é fácil perceber que, para valores de densidade elevados, há uma super contribuição de átomos próximos do ponto sendo ajustado, que podem causar modificações no formato da superfície ajustada. Para corrigir essa contribuição excessiva sobre o ajuste dos pontos do *grid*, foi necessário inserir uma função que limitasse o número de átomos, pertencentes à superfície amostral, e que estivessem sendo utilizados para ajustar os pontos da malha gerada pelo programa. Surge, então, o raio de corte, R_c , que define o limite de distanciamento até o qual, um átomo da superfície pode contribuir, ou influenciar, o posicionamento de um ponto da malha de ajuste. Para superfícies abertas, sua função é dada pela equação abaixo.

$$R_c = \frac{3\sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}}{\sqrt{\rho\Delta x\Delta y}} \quad (33)$$

Em que Δx e Δy são como já definidos no tópico 2.2.1.1. Como consequência à existência do R_c , fica definida a região dentro do limite desse raio como sendo a “região de influência” de qualquer ponto da malha de ajuste, e CI, o conjunto dos átomos pertencentes a esta região. A dedução detalhada desta função pode ser encontrada no Apêndice A.

Uma consequência direta da utilização desta função é a diminuição do tempo de execução do programa, uma vez que o procedimento de ajuste não mais será realizado para todos os átomos da superfície amostral, mas apenas para os que estiverem dentro da região de influência de cada ponto da malha. Uma outra consequência, menos intuitiva, é que o número de átomos sendo utilizados no procedimento de ajuste torna-se constante para superfícies com distribuição uniforme, uma superfície amostral ideal. Essa consequência pode ser avaliada nas seguintes equações, onde se verifica que o número de átomos presentes na região de influência de cada ponto da malha de ajuste independe do valor da densidade amostral.

$$n = \rho\pi R_c^2 = \frac{9\rho\pi(\Delta x^2 + \Delta y^2)}{(\rho\Delta x\Delta y)} \quad (34)$$

$$n = \frac{9\pi(\Delta x^2 + \Delta y^2)}{(\Delta x\Delta y)} = \text{constante} \quad (35)$$

Com isso, o problema da super contribuição dos átomos da superfície amostral é resolvido e o raio de corte torna-se uma função da densidade amostral, adaptando-se durante a execução do programa de modo a assegurar as características descritas acima.

A função do raio de corte implementada para superfícies fechadas, por sua vez, segue a proposta mostrada na Equação 36.

$$R_c = \frac{6 r_s \pi}{\sqrt{N_p}} = \frac{3\sqrt{\pi}}{\sqrt{\rho}} \quad (36)$$

Em que r_s é o raio médio da superfície e N_p é o número de átomos sendo utilizados para realização do ajuste. É possível perceber que a função segue a mesma relação inversamente proporcional ao valor da raiz da densidade amostral de pontos, assim como na função das superfícies abertas. Da mesma forma, isto limita o número de átomos dentro da região de influência dos pontos da malha de ajuste, sendo este número, inclusive, constante para uma superfície com distribuição uniforme de átomos. A dedução detalhada desta função também pode ser encontrada no Apêndice A.

2.3. AS ROTINAS COMPUTACIONAIS IMPLEMENTADAS

Neste tópico serão descritas as metodologias de avaliação das propriedades geométricas das interfaces sobre as quais o SuAVE pode ser aplicado. De modo a melhor descrever como cada metodologia funciona, é necessário introduzir a nomenclatura utilizada a partir deste ponto.

Seja um ponto da malha de ajuste desenvolvida pelo SuAVE, simbolizado pela letra maiúscula G, esse ponto tem suas coordenadas cartesianas expressas como segue na expressão abaixo.

$$G(i, j; \sigma, R_c) = (x_g(i), y_g(j), z_g(i, j; \sigma, R_c)) \quad (37)$$

A mesma descrição pode ser dada em coordenadas esféricas para os pontos da malha desenvolvidos sobre essa geometria.

$$G(i, j; \sigma, R_c) = (\theta_g(i), \varphi_g(j), r_g(i, j; \sigma, R_c)) \quad (38)$$

Para facilitar a implementação computacional, cada uma das análises desenvolvidas pelo programa utiliza quatro pontos da malha de ajuste, representando uma seção retangular desta superfície. Através destes pontos são definidos os vetores que carregam toda informação necessária pelo SuAVE para extrair as propriedades geométricas de interesse. Esses vetores, assim como os pontos que os definem, são representados na Figura 9, abaixo, uma vez σ e R_c tenham sido definidos.

Após essa definição, seguem as apresentações das análises realizadas pelo programa.

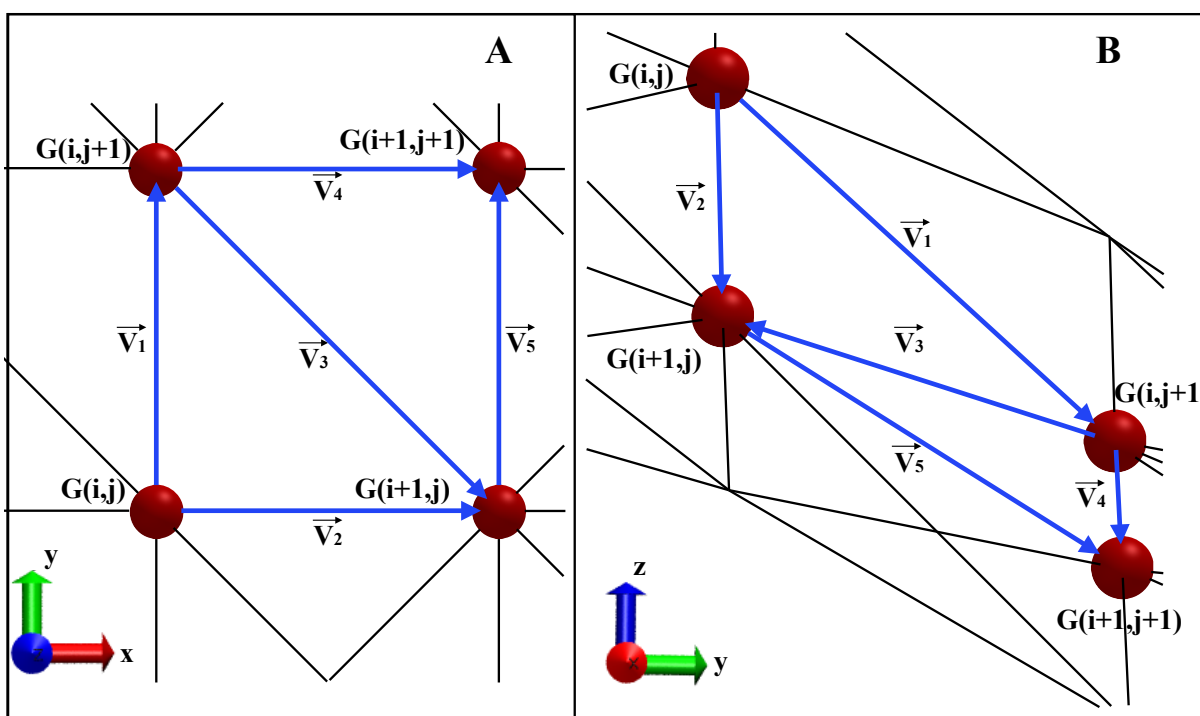


Figura 9. Projeção dos quatro pontos compondo a seção retangular da malha de ajuste sobre o plano xy (A) e sobre o plano yz (B). Em azul estão definidos os vetores que são utilizados pelo programa para calcular as propriedades de interesse. Figura realizada sobre a malha de ajuste de uma superfície aberta.

2.3.1 Área interfacial por lipídio

A área interfacial por lipídio é um nome usual para descrever o cálculo da razão entre a área superficial da interface química em estudo e o número de moléculas compondo essa interface. A descrição mais usual é utilizada para sistemas onde a interface em estudo é composta por lipídeos, caso que representa a aplicação do programa para o estudo de monocamadas e bicamadas, vesículas ou micelas lipídicas.

Segundo Petrache, Dodd e Brown (2000), essa propriedade é fundamental para investigar a microestrutura de bicamadas lipídicas, quando em conjunto com as medidas de espessura da bicamada e volume ocupado por cada lipídio que a constitui. Diversas técnicas experimentais

já foram desenvolvidas, até os dias atuais, de modo a acessar essas propriedades estruturais, como pode ser visto no trabalho de Nagle e Tristam-Nagle (2000). Exemplos dessas metodologias podem ser encontrados nos trabalhos de Snyder, Kim e McIntosh (1999) e Brandenburg *et al.* (1999), que utilizaram Difração de Raio X e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (do inglês: *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR) para extrair as propriedades estruturais elencadas acima.

Apesar do número razoável de metodologias experimentais disponíveis para avaliação estrutural de sistemas lipídicos, Nagle e Tristam-Nagle (2000) salientam no seu trabalho, que os resultados por elas encontrados não concordam entre si em termos de exatidão. Há uma distribuição de diferentes valores experimentais que deve ser levada em conta para fins de comparação com resultados computacionais.

Ao contrário das diferentes técnicas experimentais, em simulações computacionais de bicamadas lipídicas, essas propriedades são, em geral, extraídas através de uma metodologia muito simples, como pode ser observado nos trabalhos de Pereira *et al.* (2004), Pontes *et al.* (2012) e Dias *et al.* (2014). A área interfacial por lipídio é calculada como a área da membrana projetada sobre o plano xy, e dividida pelo número de lipídeos compondo a bicamada. Essa abordagem consegue obter valores residindo dentro dos limites de resultados experimentais, mas como visto acima, isso não garante que o resultado seja exato, principalmente para sistemas onde há formação de curvatura e essa metodologia passa a subestimar a área interfacial da bicamada.

Por esse motivo é que o SuAVE foi desenvolvido. Sua proposta é calcular a área de membranas lipídicas, ou de qualquer outra interface, através da avaliação da malha de ajuste que melhor representa a morfologia desta superfície lipídica. Com isso, os resultados são dependentes da morfologia do sistema em estudo e oferecem valores mais condizentes com a realidade do sistema em estudo.

2.3.1.1. Coordenadas Cartesianas

Para calcular a área superficial da malha de ajuste corretamente é necessário realizar uma integral de superfície da função de ajuste sobre toda a sua extensão. Entretanto, mesmo que essa solução forneça valores exatos para a área da interface ajustada, ela necessita de um desenvolvimento muito extenso e que se mostra desnecessário frente às alternativas numéricas existentes. Como já mencionado na introdução, atualmente diversos programas já foram desenvolvidos com o objetivo de calcular a área de interfaces lipídicas pela utilização da

triangulação de Voronoi (LUKAT, KÜGER e SOMMER, 2013; GUIXA-GONZALEZ *et al.*, 2014; BUCHOUX, 2017). Contudo, após descrever as limitações dessa abordagem, faz-se necessário introduzir uma metodologia capaz de as superar. A alternativa utilizada pelo SuAVE no programa *s_area*, é a combinação da metodologia de ajuste de superfície com a fórmula de Heron, para calcular área de triângulos. Nessa abordagem, cada seção retangular da malha de ajuste é dividida em dois triângulos sobre os quais é aplicada a fórmula de Heron, obtendo assim, a área de cada um deles. Essa fórmula segue abaixo, como exemplo, aplicada ao triângulo composto pelos vetores $\vec{V}_1$, $\vec{V}_2$ e $\vec{V}_3$ da Figura 9, cujos módulos são representados por v_1 , v_2 e v_3 .

$$A = \sqrt{s(s - v_1)(s - v_2)(s - v_3)} \quad (39)$$

Em que a variável “s” é o semi-perímetro do triângulo.

$$s = \frac{v_1 + v_2 + v_3}{2} \quad (40)$$

Segundo Kendig (2000), a fórmula de Heron já está muito bem estabelecida, pois que sua robustez e simplicidade tem sido estudada desde cerca de dois milênios atrás. Ainda hoje, muitos trabalhos de avaliação dessa metodologia, e mesmo de extensão da mesma, são publicados, como pode ser verificado nos trabalhos de Robins (1994) e Kaham (2014).

A limitação dessa metodologia foi eficientemente descrita no trabalho de Kaham (2014), onde foi mostrado que para aplicação em rotinas computacionais, utilizando aritmética de ponto flutuante, a área de triângulos em formato de agulha (muito pontiagudos) torna-se indefinida, como consequência de arredondamentos realizados pelas operações computacionais. Entretanto, como esse não é o caso dos triângulos definidos em cada seção retangular da malha de ajuste, essa limitação computacional não chega a ser um problema para o programa.

Como discutido há pouco, a aplicação dessa fórmula no protocolo computacional do SuAVE é observada no cálculo da área de cada um dos dois triângulos compondo cada seção retangular da malha de ajuste desenvolvida pelo programa. Essa aplicação está descrita nas equações abaixo, onde é mostrado o cálculo da área de uma seção da *grid* de ajuste, que inicia no ponto $G(i,j)$, da mesma forma que mostrada na Figura 9.

$$s_1 = \frac{v_1 + v_2 + v_3}{2} \quad (41)$$

$$s_2 = \frac{v_3 + v_4 + v_5}{2} \quad (42)$$

$$A(i, j) = \sqrt{s_1(s_1 - v_1)(s_1 - v_2)(s_1 - v_3)} + \sqrt{s_2(s_2 - v_3)(s_2 - v_4)(s_2 - v_5)} \quad (43)$$

A soma da área de cada uma das seções retangulares compondo a malha descreve a área total da interface sendo ajustada. Com isso, para obter o valor da área interfacial por lipídio, basta dividir esse valor pelo número de lipídios compondo a interface. Esse mesmo procedimento pode ser aplicado para qualquer outra molécula que componha a interface.

$$A = \sum_{i=1}^{bin} \sum_{j=1}^{bin} A(i, j) \quad (44)$$

Uma última consideração pode ser realizada acerca dessa metodologia, no tocante a sua capacidade de convergência para cálculo da área total de superfícies, descritas com malhas de diferentes resoluções. Ocorre que, a metodologia apresentada funciona como uma linearização da superfície sendo ajustada, e aproximação da mesma por planos, representados por cada triângulo sobre o qual utiliza-se a fórmula de Heron. É natural perceber que para uma malha de baixa resolução, construída com poucos pontos de ajuste, essa aproximação pode não ser suficientemente boa para representar a interface amostral sendo ajustada. Para, então, avaliar qual a resolução mínima que a malha deva possuir de modo a capturar detalhes importantes desta interface, faz-se necessário um estudo de convergência dos valores calculados para a propriedade geométrica em questão. Um exemplo desse procedimento é apresentado na Figura 10, onde foi calculada a área da função 3 apresentada no Apêndice B, com malhas de diferentes resoluções (diferentes valores de *bin*).

É possível verificar que valores do *bin* abaixo de 50, para essa superfície em questão, subestimam o valor da área superficial. No entanto, valores maiores que 100 não acrescentam nenhuma informação nova, pois a propriedade em questão já convergiu. O valor adequado do número de divisões da malha (resolução), que deve ser aplicado em análise, é o número mínimo, acima do qual, os valores da propriedade calculada não sofrem modificações significativas.

Portanto, neste exemplo, um *bin* igual a 100 é o mais adequado, pois que valores superiores não trariam nenhuma informação nova, no entanto, aumentariam o tempo de processamento do programa.

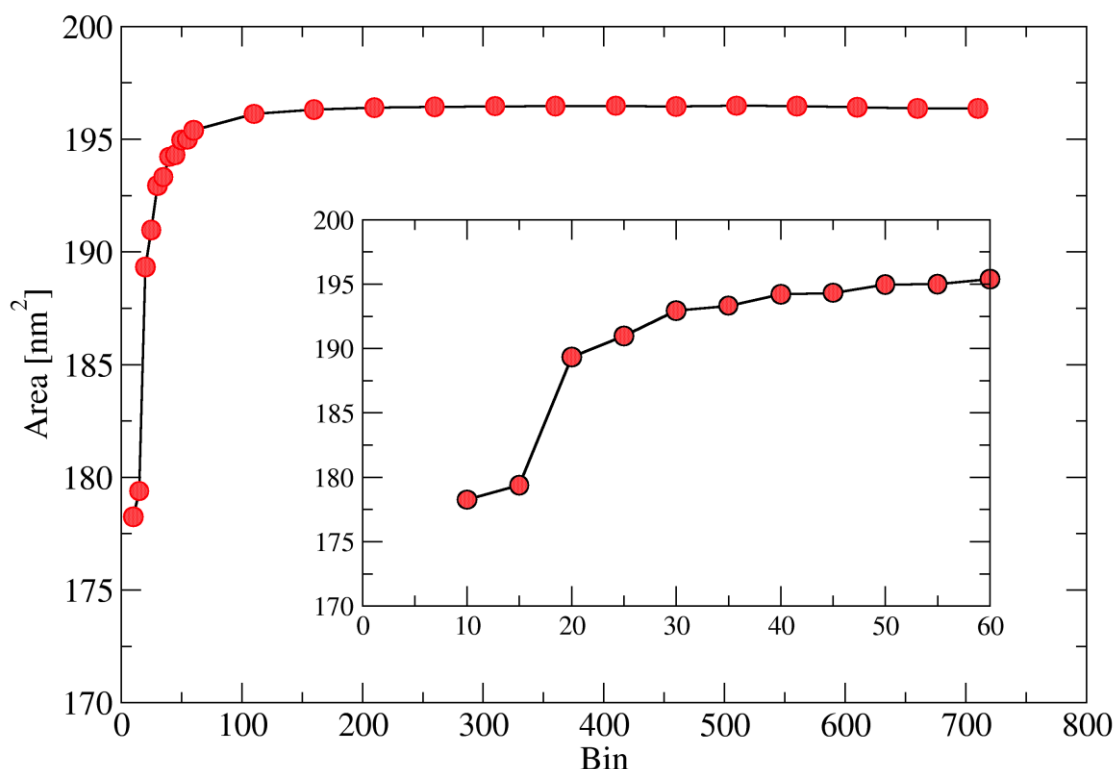


Figura 10. Estudo da convergência dos valores de área total da superfície 3 do Apêndice B.

É importante lembrar que o tempo de processamento desta análise é proporcional ao número de triângulos compondo a malha, que por definição, é proporcional ao quadrado do número de divisões da malha, *bin*.

Dada a importância desse estudo para a eficiência da utilização do programa, faz-se necessária, portanto, uma análise de convergência para cada propriedade sendo calculada pelo SuAVE. Essa análise deve ser realizada para cada diferente interface em estudo, uma vez que a curva de convergência pode mudar em função da sua morfologia.

2.3.1.2. Coordenadas Esféricas: Limite de aplicação da equação de Heron para superfícies esféricas ou fechadas.

Assim como no tópico 2.2.2.2, quando em geometria esférica, algumas observações devem ser realizadas a respeito da limitação das equações utilizadas até aqui. Em especial, a equação de Heron não pode ser aplicada levianamente para cálculo da área de superfícies

esféricas ou fechadas. Esse ponto é eficientemente esclarecido nos trabalhos de Kells, Kern e Bland (1940) e Brenke (1943), que descrevem as principais diferenças entre trigonometria plana e esférica, para figuras geométricas definidas sobre um plano e sobre uma esfera, respectivamente. Portanto, para calcular a área de triângulos sobre a esfera, há que se considerar uma extensão das equações até agora descritas. Há inúmeras formas de se realizar essa tarefa, entretanto elas podem ser pensadas como variações do Teorema de Girard, exposto no trabalho de Abreu (2015), Santos e Oliveira (2018), Downing (1950) e Frenkel (2018).

$$\alpha + \beta + \gamma = \pi + \frac{A_t}{r^2} \quad (45)$$

Em que os ângulos mostrados no primeiro membro da equação são definidos como na Figura 11, A_t é a área do triângulo, e r , o raio da esfera que o contém.

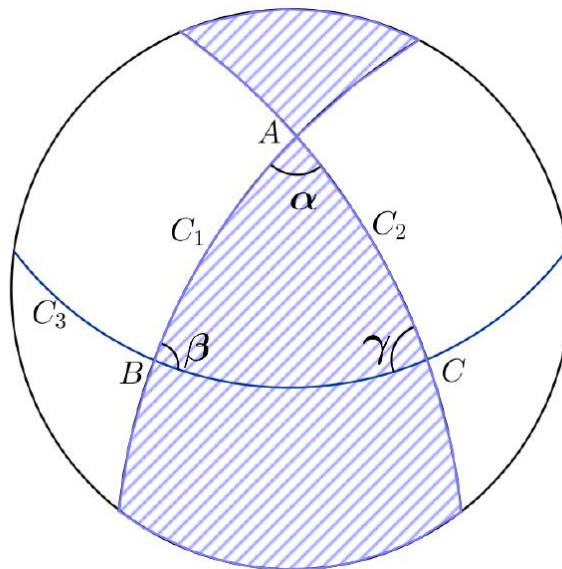


Figura 11. Definição dos ângulos de cada vértice do triângulo esférico. **Fonte:** SANTOS e OLIVEIRA, 2018.

Essa equação fornece os valores exatos para áreas de triângulos contidos em esferas e, naturalmente, é mais precisa que a equação de Heron quando em geometria esférica. Entretanto, para malhas com resolução suficientemente grande a área de cada triângulo esférico, constituindo a superfície de ajuste, tende a assumir valores muito pequenos, fazendo com que o último termo da equação de Girard se anule. Com isso, a soma dos ângulos internos do triângulo definido na superfície esférica se aproxima de π , que é um resultado

obtido apenas em geometria plana. Portanto, para malhas de ajuste com resoluções suficientemente altas, a equação de Heron pode ser aplicada como uma aproximação às superfícies esféricas ou fechadas.

Essa avaliação constitui uma generalização do procedimento descrito anteriormente, para qualquer superfície, uma vez verificado que a resolução da malha de ajuste utilizada é suficiente para tal aproximação. Para encontrar essa resolução mínima, acima da qual a aproximação é válida, basta realizar um estudo de convergência, assim como no caso anterior.

Segue um exemplo simples, onde a equação de Heron foi aplicada para calcular a área de uma esfera de raio 5 nm.

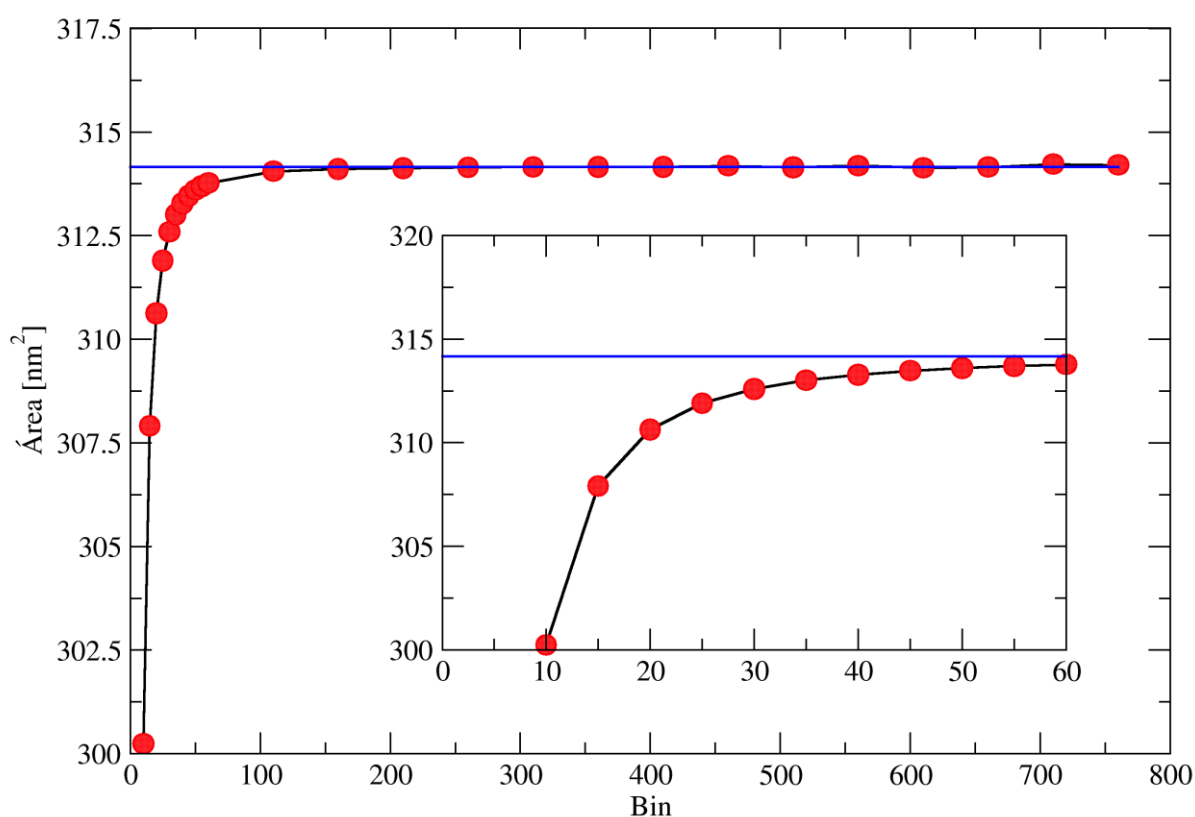


Figura 12. Convergência da área da esfera calculada pela fórmula de Heron para diferentes resoluções da malha de ajuste. Em azul está o valor calculado analiticamente, enquanto que em preto com círculos vermelhos estão os valores calculados para essa variável em diferentes valores de *bin*.

É possível verificar que para valores de *bin* maiores que 100, a área da esfera, calculada com auxílio da equação de Heron, converge para o valor analítico, mostrando o que acaba de ser descrito. Assim como anteriormente, esse procedimento deve sempre ser realizado antes que qualquer análise seja efetuada pelo programa, de modo a otimizar a resolução da malha de ajuste para cada interface em estudo.

2.3.2 Perfil de densidade

2.3.2.1 Coordenadas Cartesianas

Uma das análises mais importantes para avaliar a composição de sistemas heterogêneos constitui o perfil de densidade parcial dos componentes do sistema. Nele, é possível descrever a localização de cada componente do sistema separadamente, e inferir quais grupos interagem entre si, devido à sua proximidade espacial.

Para aplicação em sistemas compostos por membranas lipídicas, esse perfil de densidade pode ser acessado experimentalmente através de dados de Difração de Raio-X (DRX). Por exemplo, no trabalho de Snyder, Kim e McIntosh (1999), os autores utilizaram essa técnica em sistemas multilamelares de lipopolissacarídeos de diferentes quimiotipos de *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*, para realizar um estudo estrutural de suas bicamadas em termos de temperatura, contra-íons e mutações. Embora essa ferramenta seja muito útil para estudos como o citado acima, a DRX é mais sensível aos grupos fosfatos existentes nas superfícies das bicamadas e não oferece muita informação quanto a distribuição espacial das cadeias alquílicas no centro de cada bicamada. Para obter essa informação é necessário recorrer a outras técnicas. Como citado por Nagle e Tristram-Nagle (2000), a Difração de Nêutrons pode fornecer os dados restantes para completa elucidação do perfil de densidade de bicamadas lipídicas. Trabalhos como os de Buldt, Gally e Seelig (1979) e Weiner e White (1992) demonstram essa aplicação.

Em simulações computacionais de membranas lipídicas a metodologia para avaliação dessa propriedade é bem simples. Como exemplificado nos trabalhos de Pereira *et al.* (2004), Pontes *et al.* (2012) e Dias *et al.* (2014), a membrana lipídica é disposta sobre o plano xy de modo que o vetor normal à bicamada coincida com o eixo z do sistema. Com isso, o perfil de densidade é facilmente obtido apenas avaliando a densidade de cada grupo químico compondo o sistema em diferentes fatias ao longo do eixo z. Para o caso de sistemas que não apresentam curvatura pronunciada, esse protocolo é preciso e rápido. Entretanto, pode falhar na descrição relativa entre os componentes de um sistema com superfície curvada ou ondulada. Para esses casos, faz-se necessário analisar o sistema por um outro referencial. O programa *s_dens*, presente no SuAVE foi desenvolvido para essa finalidade.

Neste programa, quando aplicado sobre membranas lipídicas, uma superfície de ajuste é desenvolvida para cada uma das interfaces da bicamada, assim como mostrado na Figura 13. Através dessas malhas de ajuste, uma terceira é desenvolvida pela média das anteriores e

torna-se o referencial adequado para análise do perfil de densidade da bicamada, uma vez que segue sua morfologia.

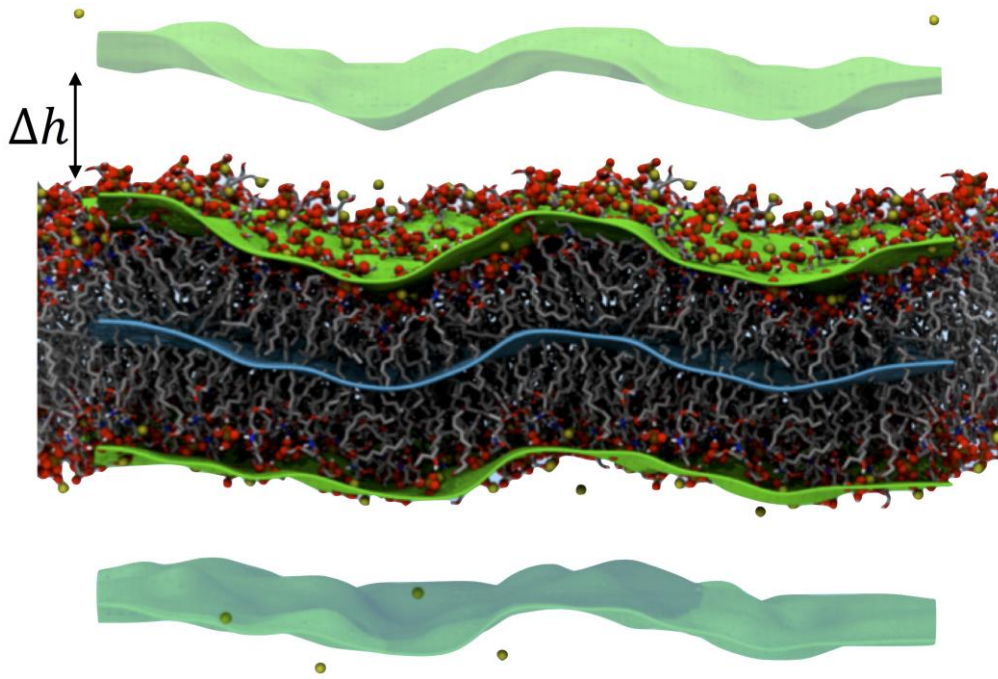


Figura 13. Descrição das superfícies desenvolvidas pelo s_dens para avaliação do perfil de densidade parcial de uma membrana lipídica com leve ondulação. Em verde, estão as superfícies de ajuste desenvolvidas tomando como referencial os fosfatos dos lipídios (em vermelho). Em azul está a superfície média tomada como referencial para o cálculo da distribuição espacial dos componentes do sistema. O símbolo (Δh) representa o espaçamento entre as fatias curvadas mostradas em verde.

O perfil de densidade, PD , é desenvolvido ao longo do eixo normal à bicamada, e as fatias sobre as quais será realizado o cálculo tomam a forma da superfície média descrita anteriormente. O cálculo da densidade de cada componente do sistema é simples, constituindo-se apenas da contagem do número de átomos de um grupo químico de interesse, que se apresentam dentro de cada fatia localizada ao longo do eixo normal à bicamada. Esse valor é dividido pelo volume de cada fatia, cuja fórmula segue descrita abaixo. O desenvolvimento dessa equação para fatias de formato genérico está descrito no Apêndice D.

$$\Delta V = \Delta x \Delta y (bin)^2 \Delta h \quad (46)$$

$$PD(z) = \frac{N\left(z - \frac{\Delta h}{2}, z + \frac{\Delta h}{2}\right)}{bin^2 \Delta x \Delta y \Delta h} \quad (47)$$

Em que N é o número de átomos de um certo grupo químico de interesse dentro da fatia que está centrada a uma distância z da superfície média, que é ponto de referência para a

distribuição. Nesta fórmula, o eixo normal da bicamada aparece como o eixo z, caso comum onde a membrana está disposta sobre o plano xy. Esta será a configuração adotada na seção de resultados.

Por fim, é útil avaliar a convergência dos resultados dessa análise para diferentes resoluções da malha de ajuste. Para isso, segue uma comparação entre o perfil de densidade do sistema mostrado na Figura 13 para duas resoluções distintas (número de pontos compondo a malha).

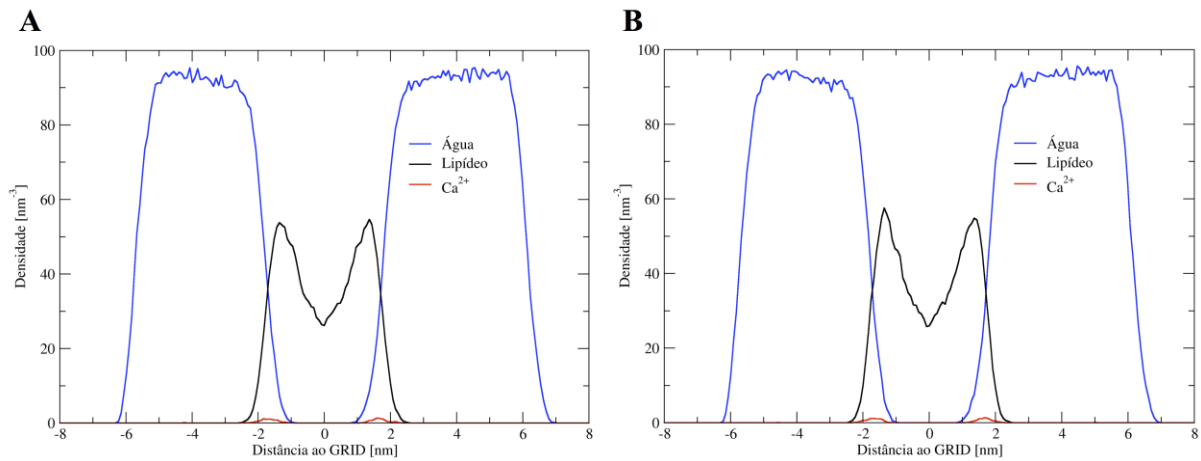


Figura 14. Comparação entre os perfis de densidade do sistema mostrado na Figura 13, realizados com malhas de ajuste com diferentes resoluções (número de pontos). O perfil A conta com uma malha de 11X11 pontos, enquanto que o perfil B foi desenvolvido com uma malha de 601X601 pontos.

É possível verificar que essa análise é pouco sensível à resolução da malha de ajuste, e deste modo, a resolução utilizada deve ser equivalente à empregada nas outras análises a fim de manter a consistência dos resultados das diferentes análises.

2.3.2.2 Coordenadas Esféricas

Com a finalidade de avaliar o perfil de densidades de vesículas, micelas e outras estruturas que devem ser ajustadas por superfícies fechadas, fazem-se necessárias algumas modificações nas Equações 46 e 47. Primeiramente, o elemento de volume de cada fatia é descrito pela Equação 48.

$$\Delta V = V_m(k_{sup}^3 - k_{inf}^3) \quad (48)$$

Em que V_m é o volume contido pela superfície média, calculada através das duas interfaces de ajuste fechadas descritas pelos arquivos de índice fornecidos pelo usuário. Os valores de k_{sup} e

k_{inf} são variáveis reais que representam os limites superior e inferior da fatia esférica cujo volume está sendo exposto como ΔV . Estas constantes que delimitam a região do volume discreto são obtidas, em termos de distância radial até o centróide da estrutura, pela razão entre os limites do volume discreto e o raio da superfície. Uma vez em posse da medida deste volume discreto, obter a densidade de átomos dentro do mesmo se torna tarefa trivial. Para isto, basta efetuar a razão entre o número de átomos contabilizados dentro da região delimitada, N , e dividir pelo volume ΔV , assim como na equação abaixo.

$$PD\left(\frac{R}{R_{med}}\right) = \frac{N(k_{inf}, k_{sup})}{V_m(k_{sup}^3 - k_{inf}^3)} \quad (49)$$

É importante ressaltar que os valores de k_{sup} e k_{inf} são tão grandes quanto o tamanho do sistema, mas seus valores mínimos são sempre zero, representando, assim, o centróide da estrutura. Maiores detalhes acerca do desenvolvimento destas equações podem ser encontrados no Apêndice D.

Um exemplo simples, mas altamente elucidativo, é fornecido pela Figura 15, onde são mostrados os perfis de densidade para os grupos químicos pertencentes a um sistema composto por uma vesícula lipídica imersa em água. O sistema foi modelado a nível *Coarse-Grain*, e serve também para explicitar que a metodologia aqui demonstrada não é aplicável apenas para sistemas descritos por modelos atômicos (VALENCIA, 2019).

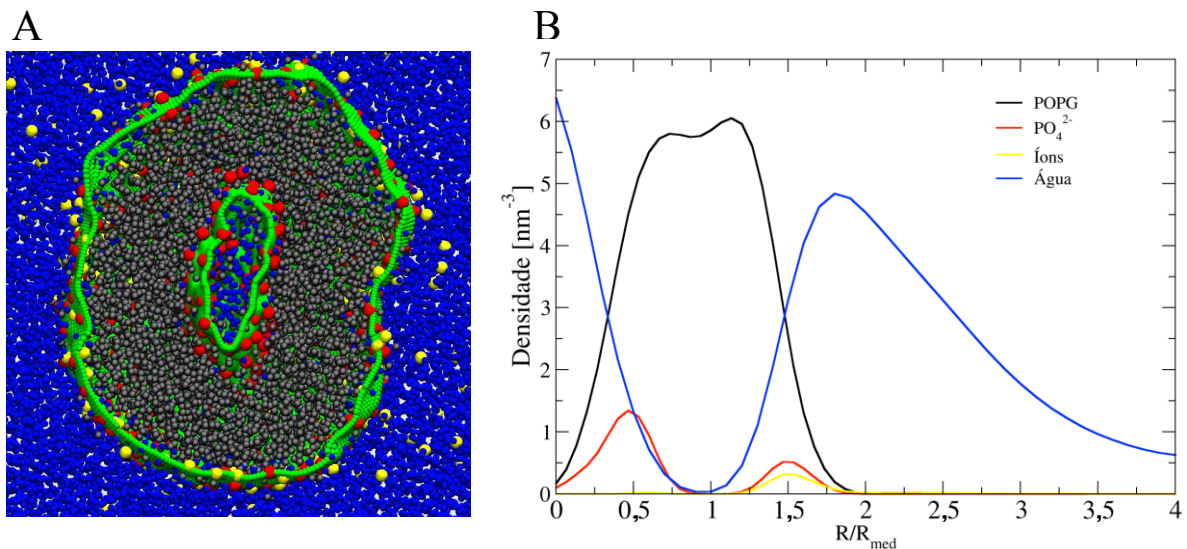


Figura 15. A Vesícula de POPG (do inglês: *palmitoyl-oleoyl phosphatidylglycerol*, POPG) a nível *Coarse-Grain* é mostrada à esquerda, enquanto que à direita, são mostrados os perfis de densidade para os grupos químicos que compõem o sistema. Em verde estão as superfícies de ajuste das camadas interna e externa da vesícula.

2.3.3 Espessura de interfaces

2.3.3.1 Coordenadas Cartesianas

Por vezes, em algumas aplicações do programa para bicamadas lipídicas, torna-se útil mensurar a espessura da bicamada, de modo a observar se há alguma variação temporal ou espacial sobre essa propriedade que esteja relacionada com algum fenômeno de interesse. Um exemplo disso se encontra no trabalho de Santos *et al.* (2017), onde os autores utilizaram o programa SuAVE para avaliar como a espessura de bicamadas compostas por diferentes moléculas de lipopolissacarídeos (LPS), constituindo diferentes quimiotipos da bactéria *P. aeruginosa*, se modificava na presença de antimicrobianos. Nesse estudo, foi possível observar como a presença de antimicrobianos afetava localmente a espessura das bicamadas, sendo um sinal da sua atividade frente aos diferentes quimiotipos bacterianos.

A espessura de bicamadas lipídicas, assim como a área interfacial por lipídio, é uma propriedade estrutural importante e que também pode ser extraída através de algumas técnicas experimentais, como mostrado nos trabalhos de Nagle e Tristram-Nagle (2000) e Nagle *et al.* (1996). Para realizar essa estimativa, os autores utilizaram a distância entre os picos pertencentes aos fosfatos, em perfis de densidade eletrônica, obtidos como resultado da aplicação de técnicas de Difração de Raio-X em sistemas multilamelares.

De forma similar, em simulações computacionais de membranas bacterianas ou bicamadas lipídicas é comum utilizar como procedimento para estimativa da espessura da interface hidrofóbica, a distância entre os picos referentes aos grupos fosfatos, no perfil de densidade parcial do sistema. Assim como no caso da área interfacial, essa metodologia consegue obter resultados condizentes com valores experimentais, mas apenas para sistemas onde não há presença significativa de curvatura na superfície da bicamada. Portanto, assim como nas propriedades anteriores, para realizar uma análise que leve em consideração a morfologia do sistema e possa ser utilizada para qualquer formato de interface, faz-se necessária a utilização da malha de ajuste desenvolvida pelo SuAVE.

A avaliação desta propriedade pelo SuAVE é muito simples. O programa desenvolve uma superfície de ajuste para cada interface amostral do sistema em estudo, ou seja, para cada lamela de uma bicamada lipídica, por exemplo. Com isso, o programa *s_thick* consegue calcular a espessura da bicamada como a distância entre os pontos de cada malha de ajuste criada sobre cada interface. A Figura 16 contém uma explicação visual do ajuste das duas interfaces de uma bicamada lipídica.

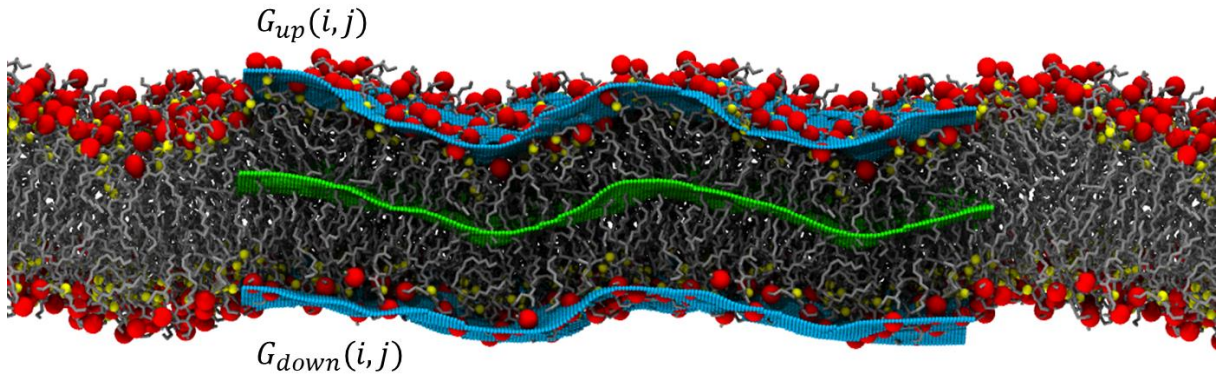


Figura 16. Descrição das superfícies de ajuste da interface superior e inferior da bicamada (em azul). Em verde, apresenta-se a superfície média que serve como ponto de referência para outras análises. Em vermelho estão os fosfatos de cada lipídio, em cinza estão as cadeias alquílicas

Nela é possível verificar a existência de um *grid* que foi denominado $G_{up}(i,j)$ e outro $G_{down}(i,j)$, que são respectivamente as malhas de ajuste para a interface superior e inferior da bicamada, de acordo com o eixo normal ao sistema, eixo z . Com essas duas malhas de ajuste o SuAVE consegue exprimir uma média espacial da espessura como função do tempo, ou de cada frame da trajetória, e uma média temporal como função da localização dos pontos superfície de ajuste. Seguem abaixo, respectivamente, as equações utilizadas para cada análise.

$$H(n) = \frac{\sum_{i=1}^{bin+1} \sum_{j=1}^{bin+1} (z_{up}^n(i,j) - z_{down}^n(i,j))}{(bin + 1)^2} \quad (50)$$

$$H(i,j) = \frac{\sum_{n=1}^{NF} (z_{up}^n(i,j) - z_{down}^n(i,j))}{NF} \quad (51)$$

Em que o z^n indica a posição em relação ao eixo z , dos pontos da malha que foram ajustados sobre o n -ésimo frame constituindo a trajetória temporal do sistema, e NF é o número total de frames dessa trajetória. Assim como no caso do perfil de densidade, essa análise é pouco sensível à resolução da malha de ajuste, deste modo, a resolução utilizada deve ser equivalente à empregada nas outras análises a fim de manter a consistência dos resultados das diferentes análises.

2.3.3.2 Coordenadas Esféricas

Em se tratando de superfícies esféricas, a metodologia descrita acima sofre alterações mínimas. A sua aplicação mais usual, realizada até o momento, para sistemas esféricos, se dá na análise de vesículas lipídicas. Para tal, as duas superfícies de ajuste, utilizadas pelo programa, são desenvolvidas sobre as interfaces interna e externa de uma vesícula em estudo.

Com essa abordagem, a espessura da bicamada esférica é calculada como sendo a diferença entre as componentes radiais dos pontos pertencentes a cada malha de ajuste, assim como mostrado nas equações abaixo.

$$H(n) = \frac{\sum_{i=1}^{bin+1} \sum_{j=1}^{bin+1} (r_{up}^n(i, j) - r_{down}^n(i, j))}{(bin + 1) \left(\frac{bin}{2} + 1 \right)} \quad (52)$$

$$H(i, j) = \frac{\sum_{n=1}^{NF} (r_{up}^n(i, j) - r_{down}^n(i, j))}{NF} \quad (53)$$

A localização dos pontos do mapa bidimensional, para esse caso, segue a descrição da construção da malha esférica, disponibilizada no tópico 2.2.1.2.

2.3.4 Volume por lipídio

2.3.4.1 Coordenadas Cartesianas

O volume por lipídio é a última propriedade, neste trabalho, que pode ser comparada com dados experimentais. Configura uma variável de fundamental importância para os cálculos de área por lipídio e espessura de bicamadas lipídicas extraídos de técnicas experimentais.

Segundo Nagle e Tristram-Nagle (2000) existem diversas metodologias experimentais, utilizadas atualmente para obter valores de volume por lipídio em bicamadas. Muitas delas são baseadas em comparações entre a densidade de uma bicamada lipídica e a de algum fluido de referência, como no trabalho de Nagle e Wilkinson (1978). Neste trabalho os autores observaram a flutuação de bicamadas de lecitina (fosfatidilcolina) sobre proporções variáveis de uma mistura de H₂O-D₂O. Nesta metodologia, a densidade da bicamada é definida como a

densidade da mistura de H₂O-D₂O que não proporciona força de empuxo sobre a membrana, fazendo com que a mesma não flutue sobre a mistura, nem afunde.

Em simulações computacionais é possível estimar os valores de volume por lipídeo de uma bicamada como a diferença entre o volume total da caixa de simulação do sistema e o volume proporcionado pelo número de moléculas de água presentes. Embora esta estimativa seja genérica e não dependa do formato da bicamada, ela torna-se imprecisa à medida que outras moléculas são adicionadas ao sistema, ou quando os lipídeos apresentam cadeias de oligossacarídeos, que contribuem no volume total do sistema simulado.

No pacote SuAVE, o volume por lipídeo é avaliado pelo programa *s_thick* e é calculado como sendo o volume entre as malhas de ajuste desenvolvidas sobre cada uma das interfaces de uma bicamada. Para isso, o programa calcula o volume de cada fatia retangular do *grid* de ajuste, através da fórmula descrita abaixo, e soma a contribuição de cada fatia ao longo de toda a extensão das malhas de ajuste. O volume total da bicamada é a diferença entre o volume calculado para cada malha, e por conseguinte, o volume por lipídeo é obtido dividindo esse valor pelo número de lipídeos constituindo a bicamada.

$$V(x_c, y_c) = z_c \Delta x \Delta y \quad (54)$$

Em que x_c , y_c e z_c são as coordenadas do centro de uma fatia retangular da malha de ajuste. O desenvolvimento dessa equação é demasiado longo para ser descrito neste tópico, entretanto, um melhor detalhamento pode ser encontrado no Apêndice C.

A convergência das medidas de volume por lipídeo desenvolvidas por malhas de ajuste com diferentes resoluções segue o mesmo perfil apresentado para o cálculo de área por lipídeo. Portanto, para manter a mesma metodologia em todas as análises, torna-se conveniente utilizar a mesma resolução do *grid* de ajuste para realizar os cálculos.

2.3.4.2 Coordenadas Esféricas

Em se tratando de superfícies esféricas, a metodologia descrita necessita de modificações no tocante ao cálculo do volume compreendido por cada partição da malha de ajuste. A fórmula apresentada anteriormente não é mais válida, uma vez que foi desenvolvida sobre a consideração de que o sistema em estudo estivesse sendo descrito por geometria plana.

Para, então, superar essa limitação, faz-se novamente necessária a aplicação da fórmula de Heron sobre as partições retangulares da superfície amostral. Como foi mostrado acima,

essa fórmula pode ser aplicada como aproximação linear de superfícies esféricas, uma vez que tenha sido garantida a resolução mínima da malha de ajuste para que os erros de aproximação sejam desprezíveis. Sendo essa condição satisfeita, então o volume compreendido pela superfície pode ser calculado.

Para realizar tal tarefa, cada fatia retangular da superfície de ajuste é considerada como a base de uma pirâmide que vai até o centroide da superfície fechada, O_c . Sabendo que o volume de uma pirâmide é dado pela equação a seguir, o volume compreendido pela interface amostral é calculado como o somatório dos volumes sob cada fatia retangular da malha.

$$V = \frac{A_b h}{3} \cos(\theta) \quad (55)$$

Em que A_b é a área da base da pirâmide e h é a sua altura, ou seja, a distância média entre os pontos da malha compondo a fatia retangular e o centróide da superfície fechada. O ângulo θ é definido como o ângulo entre o vetor normal à base da pirâmide e o vetor normal à superfície esférica ideal com raio igual à altura h , assim como será melhor explicado no tópico a seguir.

Como a fórmula de Heron calcula a área de triângulos, então, o volume de cada fatia retangular da malha é calculado através de cada triângulo que a compõe. Ou seja, o volume é calculado para cada pirâmide de base triangular que compõe a fatia retangular, assim como mostrado na Figura 17. O somatório do volume dessas pirâmides representa o volume compreendido pela interface amostral.

Portanto, o volume entre diferentes interfaces é definido como a diferença entre o volume calculado para cada uma delas. E o volume por lipídio, assim como anteriormente, é definido como o volume entre as interfaces de uma bicamada esférica, uma vesícula, dividido pelo número de lipídios que compõem essa bicamada.

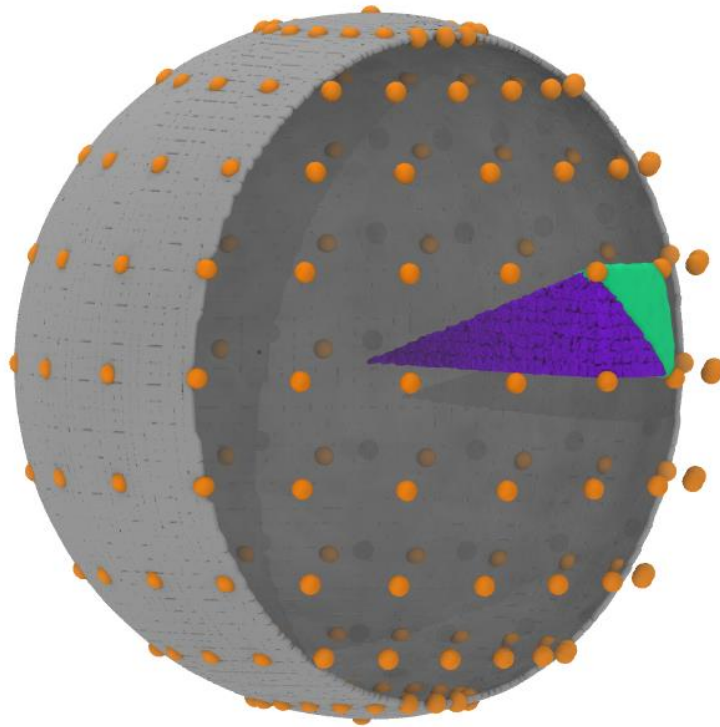


Figura 17. Visualização da pirâmide utilizada no cálculo do volume de cada fatia retangular da malha de ajuste em coordenadas esféricas. A pirâmide de base retangular é particionada em duas pirâmides de base triangular (uma em roxo e a outra em verde). Em laranja, estão alguns dos pontos da malha mostrada em cinza, com maior resolução, e que apresenta um corte transversal, para melhor visualização de sua estrutura.

2.3.5 Parâmetro de ordem de curvatura e desvio angular da superfície de ajuste

2.3.5.1 Superfícies abertas

Além das medidas descritas nos tópicos acima, o SuAVE é capaz de avaliar propriedades que não conseguem ser acessadas experimentalmente. Essas propriedades dizem respeito à distribuição do campo de vetores normais a uma superfície de interesse e à transformação dessa distribuição em um parâmetro de ordem que facilite a comparação entre a configuração espacial de diferentes interfaces em estudo.

O trabalho de Santos *et al.* (2017), mostra como o programa *s_order* foi utilizado para avaliar o quanto que a ação de antimicrobianos foi responsável pela formação de curvatura na superfície de diferentes quimiotipos bacterianos de *P. aeruginosa*. Para realizar tal verificação, essa aplicação do SuAVE descreve todo o campo de vetores normais à superfície em estudo e calcula o desvio angular definido entre cada vetor e o eixo normal ao sistema, assim como mostrado na Figura 18.

Para calcular o vetor normal à interface amostral em estudo, o programa pode calcular diretamente o vetor gradiente da malha de ajuste desenvolvida pelo SuAVE. Esse detalhamento pode ser encontrado no Apêndice E. Entretanto, mesmo sendo o caminho mais exato e elegante, do ponto de vista matemático, essa abordagem mostra-se muito cara computacionalmente, por necessitar de somatórios sobre todos os pontos amostrais da superfície para calcular cada um dos vetores normais. Uma alternativa, também muito exata, mas significativamente mais simples é calcular os vetores normais à interface amostral através do produto vetorial entre dois vetores quaisquer da malha de ajuste do SuAVE. Para essa tarefa foram escolhidos os vetores $\vec{V}_3(v_{3x}, v_{3y}, v_{3z})$ e $\vec{V}_6(v_{6x}, v_{6y}, v_{6z})$, mostrados na Figura 9.

Realizando o produto vetorial entre esses vetores, é possível, então, obter o vetor normal à malha de ajuste, $\vec{n} (n_x, n_y, n_z)$, em cada seção retangular que a compõe. Definindo o eixo z como sendo normal ao sistema, como exemplo, o ângulo entre esse eixo e o vetor normal ao *grid* de ajuste é definido como segue abaixo.

$$\cos(\theta) = \frac{\vec{n} \cdot \hat{k}}{\|\vec{n}\|} = \frac{n_z}{n} \quad (56)$$

$$\theta = \arccos \left(\frac{v_{3x}v_{6y} - v_{3y}v_{6x}}{n} \right) \quad (57)$$

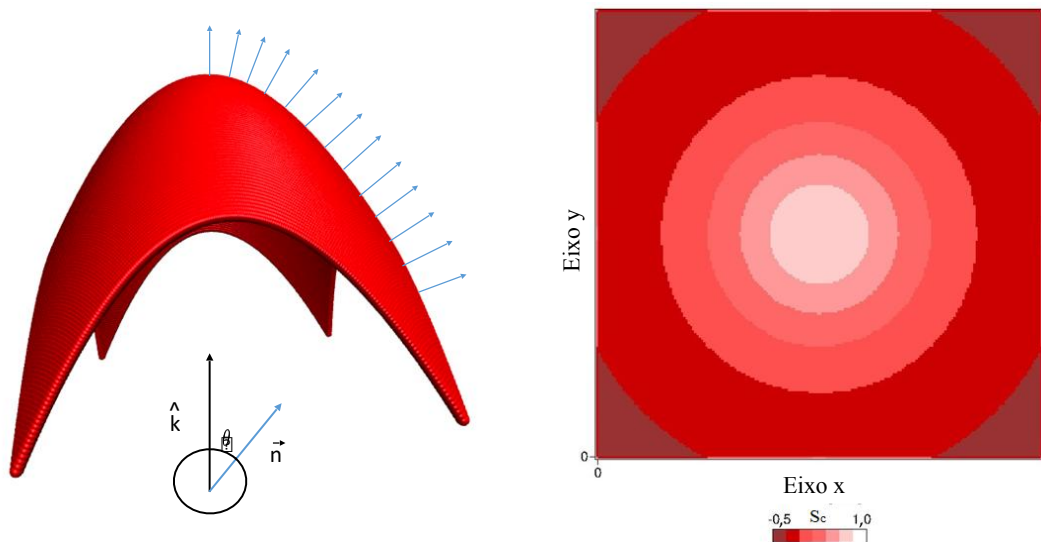


Figura 18. Descrição dos vetores normais à superfície parabólica utilizada como exemplo, à esquerda, e descrição do parâmetro de ordem de curvatura para cada ponto desta superfície, à direita. O vetor normal à superfície está representado pelo versor $\hat{k}$, e o ângulo entre esse eixo e o vetor normal à superfície parabólica é definido por θ .

Em que n é o módulo do vetor normal à malha de ajuste, $\vec{n}$, que descreve a interface amostral. O valor do ângulo de desvio está definido no intervalo entre 0° e 90° , sendo o primeiro caso, quando o vetor normal ao *grid* é paralelo ao eixo normal do sistema, e o segundo caso quando o vetor é ortogonal ao eixo normal do sistema.

Uma vez que seja possível calcular o ângulo de desvio entre o vetor normal à superfície de ajuste da interface amostral e o eixo normal ao sistema em estudo, é possível expressar a distribuição de ângulos de desvio calculados sobre toda a extensão da superfície de ajuste. Essa distribuição não é única para cada formato de superfície, mas está diretamente relacionada à configuração da malha de ajuste, e consequentemente, com a da interface. Sendo assim, ela é uma ferramenta útil para avaliar modificações estruturais que venham a ocorrer na interface química em estudo, ao analisar todas as configurações contidas no arquivo de trajetória inserido no programa. A Figura 19 mostra um exemplo comparativo entre as curvas de distribuição do ângulo de desvio (ou deflexão) para um conjunto de superfícies apresentando diferentes graus de curvatura, e por sua vez, diferentes distribuições do ângulo de deflexão.

Superfícies completamente planas, embora não exemplificadas aqui, representam os casos extremos desta distribuição. Por apresentarem um único vetor normal, devem ser representadas no gráfico através de um único pico, delatando o ângulo de inclinação da superfície em relação ao vetor normal do sistema, eixo z.

Com a distribuição dos ângulos de desvio para toda a extensão da superfície ajustada, pode-se então calcular o parâmetro de ordem de curvatura, definido pela equação abaixo, derivada da expressão do polinômio de Legendre de segundo tipo, com o cosseno do ângulo de desvio ocupando o lugar da variável independente na expressão original (BOAS, 2006)

$$S_c(\theta) = \frac{1}{2}(3\cos^2(\theta) - 1) \quad (58)$$

Em que S_c é o parâmetro de ordem de curvatura. Neste tipo de medida, o parâmetro de curvatura assume um valor de 1 sempre quando a superfície de ajuste é ortogonal ao eixo z do sistema, isto é, $\theta = 0^\circ$, e admite um valor de -0,5 quando essa superfície é paralela ao eixo z, ocasião em que $\theta = 90^\circ$.

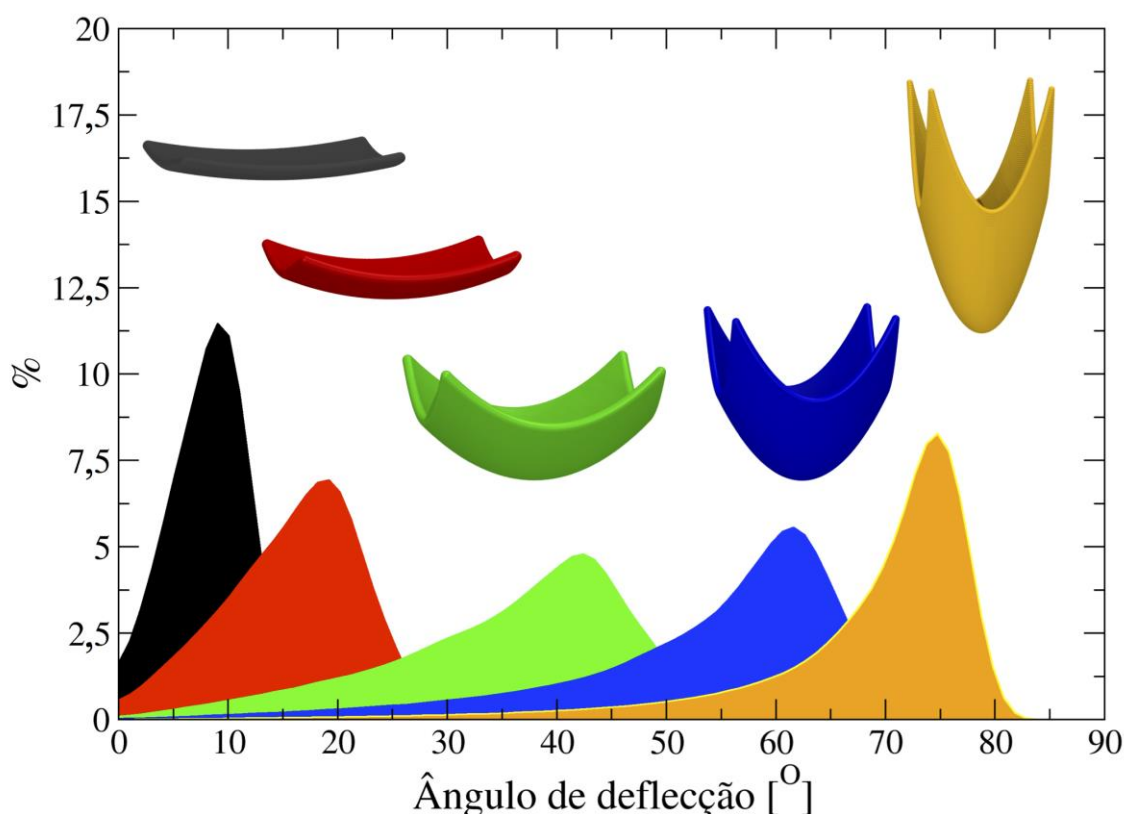


Figura 19. Distribuição dos ângulos de desvio do vetor normal às superfícies em relação ao eixo z.

O programa *s_order* imprime o parâmetro de ordem de curvatura como uma média dos valores obtidos sobre toda a superfície de ajuste, ao longo do tempo de simulação. Além disso, também desenvolve uma distribuição bidimensional do valor médio de S_c , obtido pelos valores calculados em cada seção retangular da malha de ajuste ao longo de toda a simulação, assim como no exemplo mostrado na Figura 18.

Em termos de convergência, a distribuição de ângulos de desvio mostra-se pouco sensível a variações na resolução da malha. Por outro lado, o mesmo não acontece com a distribuição bidimensional dos valores do parâmetro de ordem de curvatura. Esse fato pode ser observado na Figura 20, onde é comparada a distribuição bidimensional do parâmetro de ordem de curvatura de uma bicamada lipídica utilizada no trabalho de Santos *et al.* (2017), analisada por malhas de ajuste de diferentes resoluções.

Seguindo a regra geral para qualquer análise que dependa da resolução da malha, faz-se necessária a realização de uma avaliação da convergência da propriedade sendo mensurada em diferentes níveis de resolução. Em cada análise mostrada na seção de resultados, mais à frente, foi realizado um estudo de convergência que será brevemente descrito no início do tópico.

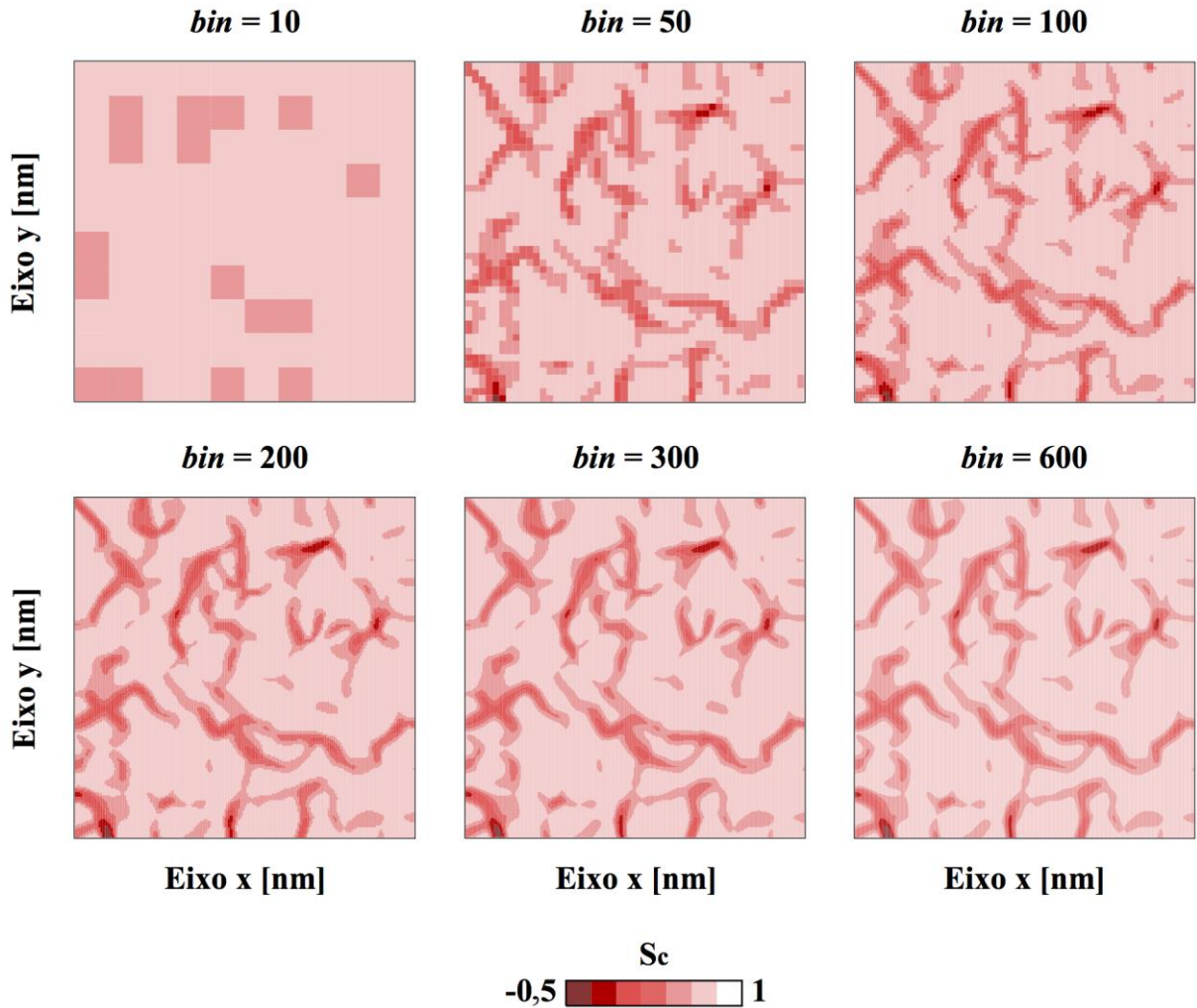


Figura 20. Avaliação do impacto da resolução da malha de ajuste na distribuição bidimensional do parâmetro de ordem de curvatura.

2.3.5.2 Superfícies fechadas

Poucas modificações são necessárias para avaliar o mesmo parâmetro em superfícies fechadas. A primeira modificação, a mais importante, é que o vetor normal do sistema, tomado como comparação para os vetores normais à superfície, não pode mais ser o vetor cartesiano definido pelo eixo Z do sistema de coordenadas. Em vez disso, sobre cada ponto do *grid* de ajuste é definida uma esfera com mesmo raio, sobre a qual será tomado o vetor normal. Desta forma, a comparação do ângulo de desvio será entre o vetor normal da superfície de ajuste e o vetor normal à esfera ideal que a envolve (também chamado de vetor radial). Quando a superfície de ajuste for uma esfera ideal, então, segundo esta definição, o perfil de desvio angular será igual ao perfil em preto na Figura 21.

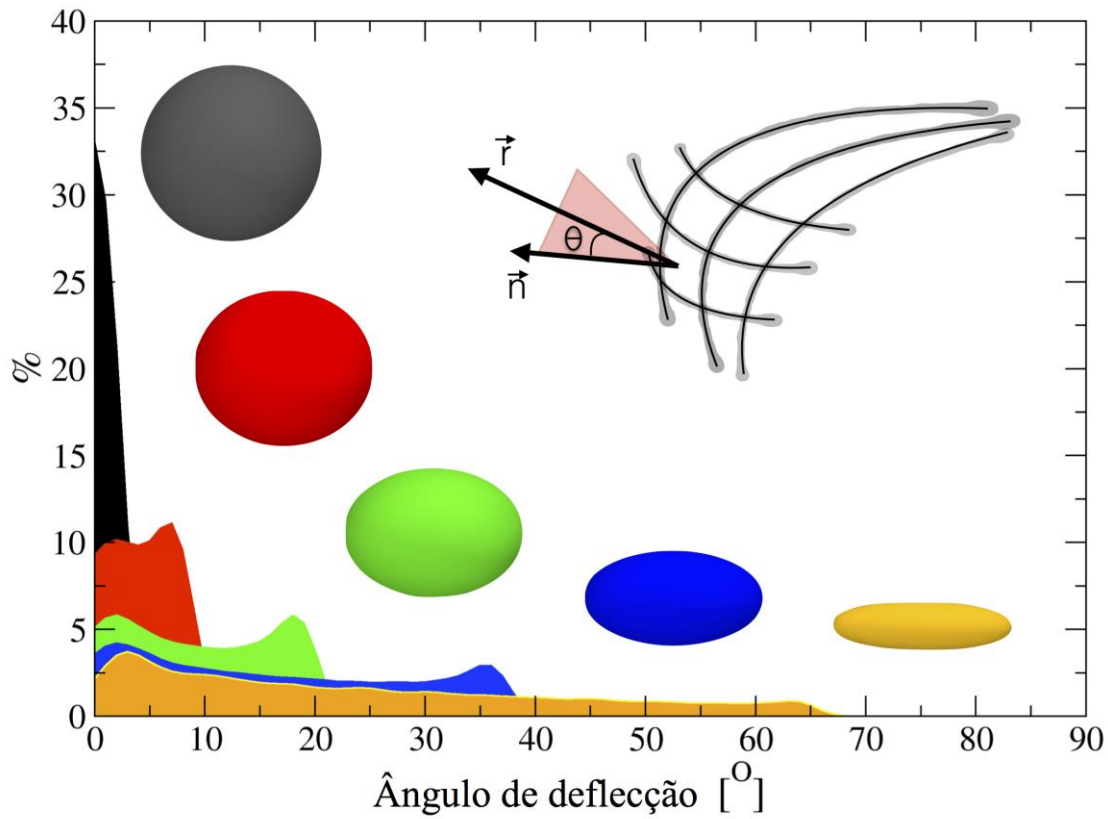


Figura 21. Distribuição dos ângulos de desvio do vetor normal às superfícies em relação ao vetor radial.

2.3.6 Momento de inércia de superfícies fechadas

Uma das propriedades de relevância para estudar a morfologia de superfícies fechadas, assim como vesículas e micelas, é o momento de inércia da sua estrutura tridimensional. Quando os eixos principais de inércia de uma vesícula ou micela são calculados, torna-se possível inferir seu formato e calcular a razão entre o maior e o menor eixo principal de inércia. Esta razão, assim como a esfericidade, fornece uma medida geral da semelhança estrutural do sistema sendo avaliado e uma esfera ideal.

Matematicamente, para que os eixos principais de inércia de uma estrutura tridimensional sejam calculados, faz-se necessário, primeiramente, calcular o tensor de inércia desta estrutura.

$$I = \begin{bmatrix} I_{xx} & -I_{xy} & -I_{xz} \\ -I_{yx} & I_{yy} & -I_{yz} \\ -I_{zx} & -I_{zy} & I_{zz} \end{bmatrix} \quad (59)$$

Os elementos da matriz descrita acima são os produtos de inércia calculados para a estrutura em questão.

Com a diagonalização do tensor de inércia é possível obter os eixos principais de inércia, representados pelos autovetores do tensor de inércia. Para cada autovetor, evidentemente, deve haver um autovalor, correspondendo aqui, a um momento principal de inércia. Ou seja, os momentos principais de inércia encontrados para a estrutura tridimensional em análise, nada mais são que os autovalores correspondentes aos eixos principais de inércia.

O processo de diagonalização que faz parte desta análise foi realizado através da utilização da rotina desenvolvida por Kopp (2008). Maiores detalhes acerca da implementação e da álgebra necessária para adaptação desta análise ao código do SuAVE podem ser encontrados no Apêndice F.

2.3.7 Curvatura Gaussiana e Média e Energia de deformação elástica de interfaces

Talvez o mais importante objetivo do desenvolvimento do algoritmo implementado no SuAVE seja possibilitar a análise da energia de deformação elástica de membranas lipídicas. Como descrito no tópico 1.2.4, diversos modelos matemáticos estão disponíveis na literatura especializada para relacionar a energia de deformação de membranas lipídicas com sua configuração espacial. Dentre estes modelos, o mais conhecido e amplamente utilizado é o de Helfrich (1973) como discutido na introdução. Para avaliar essa energia de deformação faz-se primeiramente necessário descrever de modo preciso a estrutura das membranas lipídicas. Desta forma, é possível garantir que a superfície de ajuste é uma representação precisa da superfície química em consideração. Assim, é possível relacionar a função de energia de Helfrich com a estrutura das membranas lipídicas amostradas por meio de simulações computacionais. Neste tópico, é descrito como esta conexão será implementada.

Para iniciar a discussão, é necessário utilizar a definição da função bidimensional de ajuste do SuAVE (Apêndice B). Esta função bidimensional permite calcular o vetor normal à superfície de ajuste (Apêndice E). Além disso, pode-se também obter os vetores tangentes à superfície nas direções x e y , a saber, os vetores $\vec{T}_1$ e $\vec{T}_2$. Utilizando a definição da superfície de ajuste do SuAVE (tópico 2.2.2), esses vetores podem ser facilmente obtidos.

$$\vec{G} = (x, y, f(x, y)) \quad (60)$$

$$\vec{T}_1 = \frac{\partial \vec{G}}{\partial x} = \left(1, 0, \frac{\partial f(x, y)}{\partial x} \right) \quad (61)$$

$$\vec{T}_2 = \frac{\partial \vec{G}}{\partial y} = \left(0, 1, \frac{\partial f(x, y)}{\partial y} \right) \quad (62)$$

O vetor normal unitário da superfície de ajuste pode ser calculado através do produto vetorial entre $\vec{T}_1$ e $\vec{T}_2$.

$$\vec{N} = \frac{\vec{T}_1 \wedge \vec{T}_2}{\|\vec{T}_1\| \|\vec{T}_2\|} = \left(-\frac{\partial f(x,y)}{\partial x}, -\frac{\partial f(x,y)}{\partial x}, 1 \right) \frac{1}{\|\vec{T}_1\| \|\vec{T}_2\|} \quad (63)$$

$$\vec{N} = (-f_x, -f_y, 1) \frac{1}{\|\vec{T}_1\| \|\vec{T}_2\|} \quad (64)$$

Os vetores tangentes e o vetor normal, juntos, compõem uma base ortogonal do espaço R^3 utilizada para descrever qualquer vetor que pertença à superfície de ajuste ou aos planos tangentes definidos sobre ela. Além disso, com esta base é possível obter toda informação necessária para descrever as propriedades intrínsecas da superfície de ajuste calculada pelo SuAVE. Para isto, são necessárias as definições dos coeficientes da primeira forma fundamental (E , F e G) e da segunda forma fundamental (L , M e N) da superfície de ajuste. Esses coeficientes adquirem as formas mostradas abaixo quando aplicados à superfície de ajuste do programa. Uma descrição detalhada desses operadores lineares e dos seus significados geométricos podem ser encontradas em Do Carmo (1976). Recomenda-se fortemente a leitura desta referência.

$$E = \langle \vec{T}_1, \vec{T}_1 \rangle = 1 + f_x^2 \quad (65)$$

$$F = \langle \vec{T}_1, \vec{T}_2 \rangle = f_x f_y \quad (66)$$

$$G = \langle \vec{T}_2, \vec{T}_2 \rangle = 1 + f_y^2 \quad (67)$$

$$L = \langle \frac{\partial \vec{T}_1}{\partial x}, \vec{N} \rangle = \langle \vec{T}_{1x}, \vec{N} \rangle = \frac{\partial^2 f(x,y)}{\partial x^2} = f_{xx} \quad (68)$$

$$M = \langle \frac{\partial \vec{T}_1}{\partial y}, \vec{N} \rangle = \langle \vec{T}_{1y}, \vec{N} \rangle = \frac{\partial^2 f(x,y)}{\partial x \partial y} = f_{xy} \quad (69)$$

$$N = \langle \frac{\partial \vec{T}_2}{\partial y}, \vec{N} \rangle = \langle \vec{T}_{2y}, \vec{N} \rangle = \frac{\partial^2 f(x,y)}{\partial y^2} = f_{yy} \quad (70)$$

Uma vez definidos estes coeficientes, as curvaturas Gaussiana (K) e média (H) da superfície de ajuste do SuAVE podem ser calculadas. Ambas são formas de medir a curvatura de uma superfície bidimensional e relacionam-se diretamente com as curvaturas principais desta (κ_1 e κ_2). Uma descrição simplificada para as curvaturas Gaussiana e média pode ser encontrada no trabalho de Zimmerberg e Kozlov (2006), e é demonstrada na Figura 22.

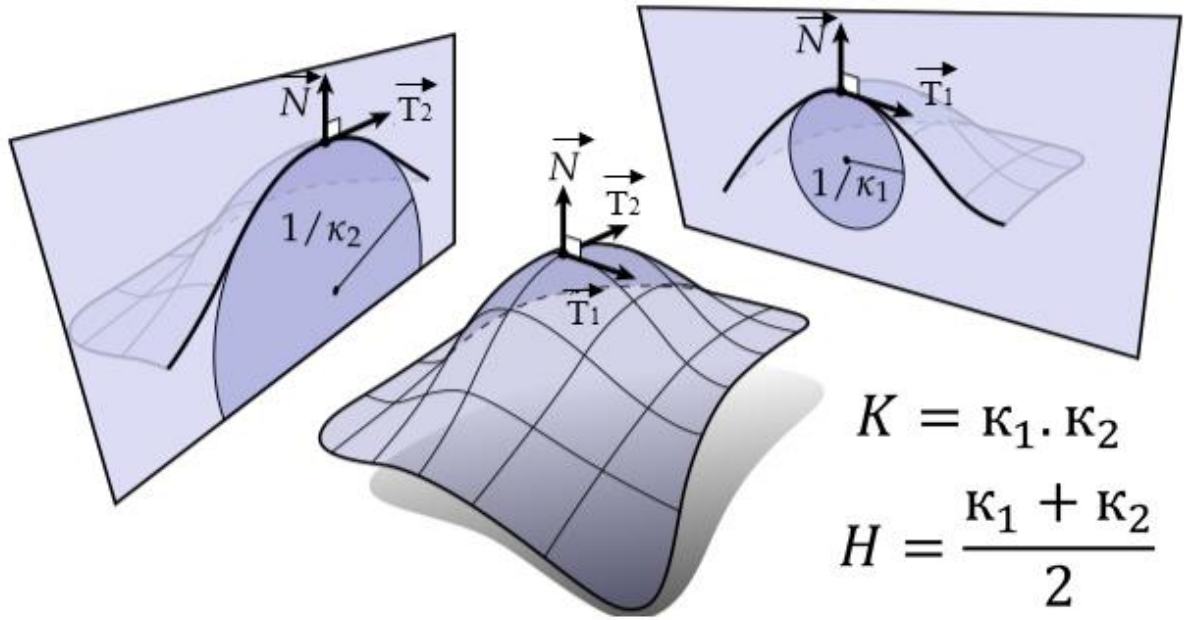


Figura 22. Representação gráfica dos vetores tangentes e normal à uma superfície bidimensional, classificação das curvaturas principais (κ_1 e κ_2) da superfície e sua relação com as Curvaturas Gaussiana, K , e média, H . **Fonte:** adaptado de Crane *et al.* (2013).

Embora a figura descreva uma relação direta entre as curvaturas mencionadas, o trabalho envolvido no processo de determinação das curvaturas principais de uma superfície, como a mostrada na imagem, é oneroso e complexo. Por este motivo, sem que haja alteração no resultado esperado e nas conclusões a serem extraídas, o presente trabalho utilizará a definição trazida por Do Carmo (1976), que faz uso dos coeficientes da primeira e segunda forma fundamental da superfície de ajuste, já descritos, e que pode ser expressa como segue:

$$K = \frac{LN - M^2}{EG - F^2} \quad (71)$$

$$H = \frac{GL - FM + EN}{2(EG - F^2)} \quad (72)$$

Entretanto, mesmo que estas equações representem um procedimento de fácil implementação computacional, quando observada a expressão para as derivadas de primeira ordem da superfície de ajuste desenvolvida pelo SuAVE, há de se convir que o custo computacional pode ser elevado, pela necessidade dos somatórios duplos sobre todos os pontos da superfície (Apêndice E). Para aliviar este problema de implementação, algumas alternativas são encontradas na literatura especializada. Trabalhos como os de Fraternali, Lorenz e Marcelli (2012), Yesylevskyy e Ramseyer (2014), Guckenberger e Gekle (2017), Meyer *et al.* (2002) e Xu e Xu (2009) fornecem exemplos práticos e precisos de metodologias numéricas, extraídas das equações acima e utilizadas para estimar o valor das curvaturas Gaussiana e média de superfícies discretas.

A metodologia escolhida para ser utilizada nesta tarefa foi a da discretização das derivadas parciais, encontradas nos coeficientes da primeira e segunda forma fundamental, através de diferenças finitas centradas. A descrição mais detalhada desta implementação e das equações envolvidas pode ser encontrada no Apêndice G.

Com a obtenção dos valores de curvatura Gaussiana e média, o cálculo da energia de deformação elástica das membranas lipídicas torna-se simples, necessitando apenas da substituição desses parâmetros geométricos na equação de Helfrich (1973).

2.3.8 Programas auxiliares

Além dos programas que constituem as análises descritas acima, o SuAVE também fornece opções para avaliar a correspondência estrutural entre a malha de ajuste desenvolvida e a superfície amostral em estudo.

2.3.8.1 Verificação do ajuste do grid gerado sobre a interface química

O programa *s_grid* é responsável por produzir um arquivo de trajetória da superfície de ajuste desenvolvida pelo SuAVE. Nesse arquivo são escritas as malhas de ajuste desenvolvidas em cada um dos frames compondo o arquivo de trajetória do sistema em estudo. Essa ferramenta é útil, pois possibilita direta comparação entre as modificações estruturais que estejam ocorrendo em um sistema de estudo e a malha de ajuste que foi utilizada para coletar informações importantes acerca desse fenômeno.

2.3.8.2 Avaliação da topografia da superfície ou interface

A análise da topografia da interface amostral em estudo se dá pelo programa *s_topog*, que desenvolve um mapa bidimensional de curvas de nível dessa superfície. Essa ferramenta é útil para encontrar a distribuição de máximos e mínimos locais sobre toda a interface amostral e, por conseguinte, quantificar a distância entre esses pontos. A Figura 23 mostra a aplicação dessa análise à uma superfície rugosa apresentando diversos pontos de máximo e mínimo locais.

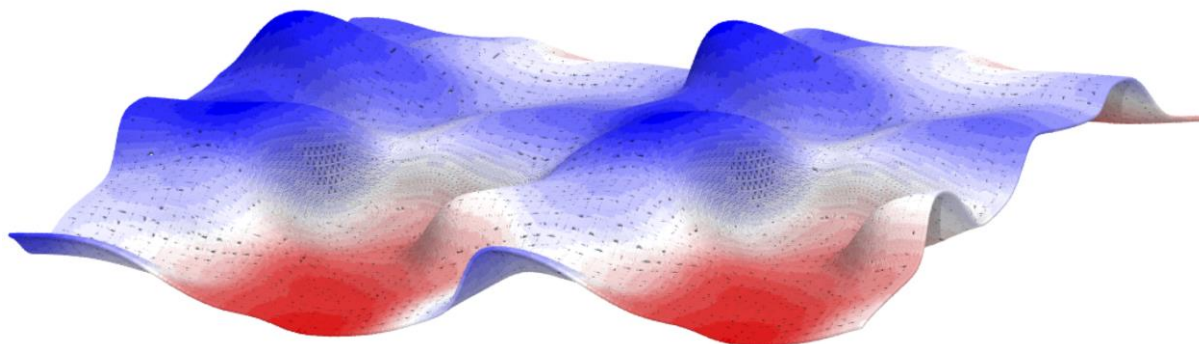


Figura 23. Demonstração da imagem topográfica e curvas de nível da superfície utilizada. Em azul estão os pontos com maior valor da coordenada Z (máximos locais) e, em vermelho, estão os pontos com os menores valores desta coordenada (mínimos locais).

2.4 DESCRIÇÃO DOS SISTEMAS SIMULADOS E PARÂMETROS DE SIMULAÇÃO

2.4.1 Sistemas simulados

2.4.1.1 Superfícies abertas

Para validar todo o trabalho metodológico descrito até aqui, são necessários estudos comparativos entre os resultados obtidos através do SuAVE, para todas as propriedades mencionadas na seção de metodologia, e os resultados obtidos através da utilização de outras metodologias computacionais. Além disso, faz-se também necessária uma validação entre os resultados calculados pelo programa e os dados obtidos por medidas experimentais para os sistemas de interesse. Com essa finalidade, um estudo de caso foi realizado com sistemas compostos por bicamadas lipídicas apresentando diferentes configurações espaciais. A existência das diferentes configurações é intencional e vai ser utilizada para testar os limites de aplicabilidade e a precisão da metodologia do SuAVE e as implementadas em outros programas.

Uma descrição dos sistemas utilizados para realizar esse estudo comparativo, bem como alguns dos parâmetros aplicados em cada uma das simulações são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos sistemas utilizados para validação da metodologia computacional implementada no SuAVE. O índice “a” indica que o contraíon utilizado no sistema foi Mg^{2+} , enquanto que o índice “b” indica que o contraíon foi Ca^{2+} .

Sistema	Arranjo	Nº Lipídeos	Nº cadeias alquílicas	Comp. das cadeias	Tempo de simul.	Temperatura
C_H_C14_343 ^a	Curvado Lamelar	144	Hexa-acilado	14	400	343 K
C_T_C10_300 ^a	Curvado Lamelar	128	Tetra-acilado	10	400	300 K
P_H_C10_315 ^b	Plano Lamelar	128	Hexa-acilado	10	400	315 K
P_H_C10_328 ^b	Plano Lamelar	128	Hexa-acilado	10	400	328 K

Todos os sistemas simulados são compostos por moléculas de Lipídio A de diferentes quimiotipos bacterianos em um arranjo de 8X8 ou 8X9 moléculas lipídicas em cada lamela da bicamada. Cada quimiotipo foi definido de acordo com o número de cadeias alquílicas compondo o lipídio, assim como o tamanho de cada cadeia e a disposição das mesmas na

molécula. Por exemplo, o sistema C_H_C14_343 é formado por lipídios hexa-acilados, ou seja, que contém seis cadeias alquílicas ligadas aos seus grupos glucosamina ((3R,4R,5S,6R)-3-Amino-6-(hidroximetil)oxane-2,4,5-triol). A cadeia alquílica mais longa, presente nos lipídios deste sistema, possui 14 carbonos. Os sistemas P_H_C10_315 e P_H_C10_328 são compostos por lipídios hexa-acilados cuja cadeia mais longa contém 10 átomos de carbono. Por fim, o Sistema, C_T_C10_300 é composto por lipídios tetra-acilados cuja cadeia mais longa possui 10 carbonos.

A escolha desses sistemas é conveniente para avaliar como o SuAVE ou outras metodologias computacionais são capazes de analisar as diferentes morfologias apresentadas por cada quimiotipo escolhido. Dependendo da estrutura do lipídio A, a bicamada pode adotar uma conformação plana (P) ou curvada (C), sendo que esta última pode ser expressa em um amplo espectro de intensidades, como será exemplificado na seção de resultados. Cada uma dessas características é importante no estudo comparativo.

2.4.1.2 Superfícies fechadas

A avaliação das metodologias computacionais para cálculo de propriedades geométricas de superfícies fechadas foi realizada através da análise da simulação de uma vesícula composta exclusivamente por lipídeos A de *P. aeruginosa* (Figura 24). Este sistema é constituído por um leaflet interno contendo 204 lipídios e um leaflet externo contendo 440 lipídios. Todos são hexaacilados, difosforilados e com cadeias alquílicas contendo 12 átomos de carbono. Os parâmetros atomísticos utilizados para modelar este sistema são descritos no trabalho de Santos *et al.* (2017).

Neste sistema, a vesícula encontra-se rodeada por 204592 moléculas de água em contato com a superfície externa, enquanto que a superfície interna encapsula um total de 5707 moléculas de água. Foram adicionados 644 íons Ca^{2+} com a finalidade de neutralizar a carga dos lipídios presentes no sistema. Destes, 440 encontram-se em contato com a superfície externa da vesícula, restando 204 que estão neutralizando sua camada interna. No total o sistema é composto por 707969 átomos, arranjados em uma caixa de simulação cúbica com cada aresta compreendendo 20 nm de comprimento.

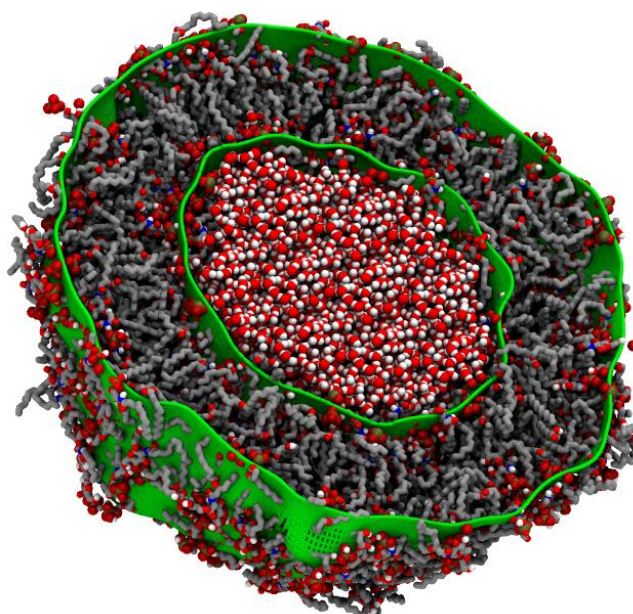


Figura 24. Corte transversal da vesícula utilizada para estudo das propriedades geométricas de superfícies fechadas. Configuração inicial, após equilíbrio da vesícula em água. Em verde, estão representadas as superfícies de ajuste geradas pelo SuAVE sobre os fosfatos (em vermelho) dos lipídios (em cinza) compondo a vesícula. No centro, podem ser observadas as moléculas de água encapsuladas pela superfície interna da estrutura.

2.4.2 Protocolo de simulação computacional

2.4.2.1 Superfícies abertas

A fim de entender o comportamento de cada sistema utilizado no estudo, faz-se necessária uma descrição do protocolo empregado na simulação de dinâmica molecular de cada sistema. Segue, portanto, a descrição dos passos utilizados na dinâmica de cada sistema, desde a montagem até a aquisição de dados.

Todas as simulações foram realizadas com o programa GROMACS, versão 4.5.6 (HESS *et al.*, 2008). A representação atômica dos Lipídios A é feita através de uma extensão do campo de força GROMOS. Nessa versão, as cadeias alquílicas são descritas pelo conjunto de parâmetros GROMOS 53A6, enquanto que as glucosaminas fosforiladas foram descritas pelo conjunto de parâmetros GROMOS 45A4 (LINS e HÜNENBERGER, 2005; CHANDRASEKHAR *et al.*, 2003; OOSTENBRINK *et al.*, 2004; OOSTENBRINK *et al.*, 2005). Foram utilizadas moléculas de água do modelo SPC para solvatar o sistema (GATTLI, DAURA e VAN GUNSTEREN, 2002).

Para iniciar as simulações, todos os sistemas passaram por uma etapa de relaxamento, ou otimização de geometria, visando minimizar a energia potencial agindo sobre as partículas que os compõem. A consequência dessa etapa é a obtenção de estruturas estacionárias para cada sistema, ou seja, estruturas onde a força agindo sobre cada partícula compondo os sistemas tende a se anular e a energia potencial total se aproxima de um mínimo local na superfície de energia potencial de cada sistema (ADCOCK e McCAMMOM, 2006). Para realizar esse procedimento, foram aplicados 10000 passos do algoritmo *Steepest Descent* (VAN DER SPOEL *et al.*, 2010). Cada passo de dinâmica molecular foi calculado através da integração das equações de movimento utilizando o algoritmo *leap-frog*, descrito por Hockney e Eastwood (1981). O passo de integração utilizado foi de 2 fs. A geometria das moléculas de água e o tamanho das ligações entre os átomos compondo o soluto foram restringidas de modo a permanecerem constantes durante toda a simulação. Para isso foi empregado o algoritmo LINCS, desenvolvido por Hess *et al.* (1997).

Para permitir a comparação entre os resultados obtidos nas simulações e os dados experimentais obtidos da literatura, as simulações foram desenvolvidas empregando o ensemble NPT. Para cumprir essa especificação fez-se necessária a utilização de um barostato e um termostato, de modo a manter, respectivamente, a pressão e a temperatura médias dos sistemas nas proximidades dos valores estabelecidos na Tabela 1. O termostato utilizado foi o

algoritmo *v-rescale*, desenvolvido por Bussi, Donadio e Parrinello (2007), com uma constante de acoplamento de 0,4 ps. A pressão média do sistema foi mantida constante através da utilização do barostato de Berendsen com o valor de 1 bar e uma constante de acoplamento de 1 ps (BERENDSEN *et al.*, 1984). O acoplamento de pressão para os sistemas foi semi-isotrópico, ou seja, o acoplamento no eixo “z” é desacoplado dos demais eixos. A compressibilidade isotérmica foi mantida em $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$, correspondendo ao valor próprio para o solvente escolhido.

O raio de corte utilizado para otimizar o cálculo das interações eletrostáticas e de van der Waals foi de 1,4 nm. Além dessa distância, as interações eletrostáticas foram tratadas através da aproximação do Generalized Reaction Field, com uma constante dielétrica do campo de reação no valor de 66 (GATTLI, DAURA e VAN GUNSTEREN, 2002; TIRONI *et al.*, 1995; ESSEX, 1998). A lista de vizinhos para os átomos afastados por uma distância maior que o raio de corte escolhido, foi atualizada a cada passo de simulação utilizando um esquema *single cutoff* (VAN DER SPOEL *et al.*, 2010). As posições dos átomos, bem como as energias potenciais e cinéticas, e as velocidades de cada átomo do sistema foram armazenados, em arquivos, a cada 1000 passos de simulação.

Foram analisadas 120000 configurações de cada um dos sistemas, correspondendo à evolução temporal de cada bicamada. Em vez de expressar as análises obtidas em função do tempo de simulação, foram utilizados os *frames*, ou número de configurações, presentes nas trajetórias de cada sistema, para realizar a comparação entre os valores calculados.

2.4.2.2 Superfícies fechadas

O protocolo utilizado na montagem e aquisição de dados da simulação da vesícula não distoou significativamente daquele utilizado para os sistemas lamelares descritos na seção 2.4.2.1. A simulação foi realizada com o programa GROMACS, versão 5.0.7 (HESS *et al.*, 2008) e a mesma versão do campo de força GROMOS foi utilizada para modelar o Lipídio A deste sistema. Portanto, as cadeias alquílicas foram descritas pelo conjunto de parâmetros do GROMOS 53A6, enquanto que as glucosaminas fosforiladas foram descritas pelo conjunto de parâmetros do GROMOS 45A4 (LINS e HÜNENBERGER, 2005; CHANDRASEKHAR *et al.*, 2003; OOSTENBRINK *et al.*, 2004; OOSTENBRINK *et al.*, 2005). Também foram utilizadas moléculas de água no modelo SPC para solvatar o sistema (GATTLI, DAURA e VAN GUNSTEREN, 2002).

A estrutura da vesícula, pela sua complexa organização espacial, teve que ser montada com o auxílio do pacote computacional Packmol (MARTÍNEZ *et al.*, 2009), que permitiu a geração de uma vesícula idealmente esférica, utilizada como ponto de partida para os passos de equilíbrio. Por sua vez, a primeira etapa executada durante o processo de equilíbrio da vesícula tratou da acomodação espacial dos lipídios com a finalidade de maximizar as interações entre cada molécula. Para chegar a este fim, foram aplicados 2500000 passos do algoritmo *Steepest Descent* (VAN DER SPOEL *et al.*, 2010) com um *step-size* inicial de 0,001 nm e uma tolerância de 0,1 kJ/mol. Durante essa primeira etapa, as cargas dos lipídios foram retiradas, de tal modo que as forças observadas entre moléculas distintas foram apenas advindas do potencial de van der Waals.

Na segunda etapa de equilíbrio e relaxamento da estrutura espacial da vesícula, foram adicionadas as cargas dos lipídios, assim como íons de cálcio em quantidade suficiente para neutralizar a carga total do sistema. A distribuição espacial destes íons foi previamente mencionada no tópico 2.4.1.2. O protocolo de equilíbrio contou com 2500000 passos do algoritmo *Steepest Descent* (VAN DER SPOEL *et al.*, 2010) com um *step-size* inicial de 0,001 nm e uma tolerância de 0,1 kJ/mol.

Este mesmo protocolo foi utilizado em um novo passo de equilíbrio, onde foram inseridas as moléculas de água que ocuparam os espaços, até então vazios, da caixa de simulação. Foram necessárias 204592 moléculas de água em contato com a superfície externa, enquanto que a superfície interna encapsulou um total de 5707 moléculas, totalizando 210299 moléculas de solvente. Após o relaxamento da estrutura, foi executada uma longa etapa de equilíbrio composta por 5 simulações no *ensemble* NVT, à 100 K, 150 K, 200 K, 250 K e 300 K, cada uma contando com 5000000 passos. O termostato utilizado nestas simulações foi o algoritmo *v-rescale*, desenvolvido por Bussi, Donadio e Parrinello (2007), utilizando uma constante de acoplamento de 0,4 ps.

Cada uma das etapas de equilíbrio foi realizada com a utilização do integrador *leap-frog*, descrito por Hockney e Eastwood (1981). O passo de integração utilizado foi de 1 fs. A geometria das moléculas de água e o tamanho das ligações entre os átomos compondo o soluto foram restringidas de modo a se manterem constantes durante toda a simulação. Para isso foi empregado o algoritmo LINCS, desenvolvido por Hess *et al.* (1997). O raio de corte utilizado para otimizar o cálculo das interações eletrostáticas e de van der Waals foi de 1,2 nm. Além dessa distância, as interações eletrostáticas foram tratadas através da aproximação do *Particle Mesh Ewald* (DARDEN, YORK e PEDERSEN, 1993). A lista de vizinhos para os átomos afastados por uma distância maior que o raio de corte escolhido, foi atualizada a cada

40 passos de simulação utilizando um esquema single cutoff (VAN DER SPOEL *et al.*, 2010). As posições dos átomos, bem como as energias potenciais e cinéticas, e as velocidades de cada átomo do sistema foram armazenados, em arquivos, a cada 1000 passos de simulação.

Com a finalização da etapa de termalização do sistema no *ensemble* NVT, seguiu-se uma última etapa de equilíbrio, à 300 K, antecedendo a etapa de produção de dados. Nesta última etapa foi realizada uma simulação no *ensemble* NPT, aplicando os mesmos parâmetros definidos para as simulações anteriores, mas agora adotando o barostato de Berendsen *et al.* (1984) para controlar a pressão observada ao longo da simulação. O acoplamento de pressão para essa simulação seguiu um esquema isotrópico, com uma constante de acoplamento de 0,4 ps, um valor de referência de 1,0 bar e a compressibilidade isotérmica definida como $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$, correspondendo ao valor próprio para o solvente escolhido.

Com a finalização da etapa de equilíbrio, seguiu-se, então, com a etapa de produção da simulação de dinâmica molecular da vesícula. Foram utilizados todos os parâmetros destacados acima, com a ligeira modificação do passo de integração para o valor de 2 fs (alterado de 1 fs) e um aumento no número total de passos suficiente para compreender 300 ns de simulação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CONVERGÊNCIA E INCERTEZA DO CÁLCULO DE PROPRIEDADES ESTRUTURAIS EM FUNÇÃO DA RESOLUÇÃO DA SUPERFÍCIE DE AJUSTE

3.1.1 Superfícies abertas: Bicamadas lipídicas

Antes de descrever os resultados das análises estruturais obtidas com o programa SuAVE, faz-se necessária a avaliação da convergência e eficiência dos valores calculados em função da resolução da superfície ou *grid* de ajuste, capaz de representar precisamente a superfície química dos sistemas em consideração. Além disso, é também necessário avaliar o grau de incertezas associadas ao algoritmo implementado no programa SuAVE durante o cálculo de diferentes propriedades estruturais. Há que se perceber sobre esse aspecto que existem duas fontes principais de erro contribuindo para a incerteza dos cálculos realizados pelo programa. Estas fontes de erro estão associadas às duas principais aproximações do programa. Primeiramente, há uma incerteza associada à construção de uma superfície contínua (superfície de ajuste) sobre pontos (*ou seja*, átomos ou *beads*) discretamente distribuídos sobre a interface amostral (superfície química). Esta incerteza resulta da possibilidade dos pontos da superfície de ajuste calculada não corresponderem precisamente à posição dos átomos ou *beads* na superfície química. Essa possibilidade aumenta quanto menor for o número de átomos ou *beads* utilizados como referência para realizar a etapa de ajuste da superfície química. Entretanto, para densidades de pontos amostrais da ordem de 20 pontos por nm², o erro na construção da superfície de ajuste a partir da superfície química tende a ser desprezível para a maioria das superfícies já estudadas com o programa. Uma discussão mais detalhada sobre esse ponto pode ser encontrada no Apêndice B.

Nos sistemas estudados, os átomos utilizados como referência na construção da superfície de ajuste pelo SuAVE foram os átomos de fósforo do grupo acetilglucosamina do Lipídio-A. Este é, em geral, o átomo também utilizado por programas na literatura especializada, realizando cálculos similares para fosfolipídios (LUKAT, KÜGER e SOMMER, 2013; GUIXA-GONZALEZ *et al.*, 2014; BUCHOUX, 2017; ALLEN, LEMKUL e BEVAN, 2008). Para as bicamadas de Lipídio-A, este procedimento resulta em uma densidade de 1,20 átomos por nm² utilizados como referência para a construção da superfície de ajuste, correspondente ao sistema C_H_C14_343, e uma densidade de 1,32 átomos por nm² para os demais sistemas. Embora essa densidade esteja muito abaixo do valor previamente sugerido, i.e., 20 pontos por

nm², a mesma mostrou-se suficiente para a construção de uma superfície de ajuste que reproduz precisamente as superfícies químicas dos sistemas em consideração. Isto é demonstrado pelo cálculo da distância média quadrática (do inglês: *Root Mean Square Deviation*, RMSD) entre os átomos de fósforo pertencentes aos lipídios e os pontos da superfície de ajuste calculada pelo programa, observado na Figura 47 da seção 3.4.1.

A segunda fonte de incerteza para o cálculo das propriedades avaliadas pelo programa deve-se à aproximação de superfícies com morfologia genérica por planos, definidos por triângulos sobre os quais é utilizada a fórmula de Heron. Essa fonte de incerteza já foi brevemente discutida na apresentação de cada análise realizada pelo programa e, ao contrário da incerteza causada pela baixa densidade de pontos amostrais ou átomos nas superfícies químicas, esta segunda incerteza pode ser controlada pelo usuário através da definição da resolução da superfície de ajuste utilizada em cada análise, e para diferentes sistemas químicos. Portanto, é altamente recomendado que antes do cálculo das propriedades geométricas de interesse, seja realizada uma análise da convergência de cada uma destas propriedades em função da resolução da superfície de ajuste. Entretanto, dentre as análises de propriedades estruturais testadas para membranas, a área por lipídio mostrou-se a mais sensível à aproximação da superfície amostral por planos. Isto é demonstrado durante a apresentação de cada análise na seção 2.3.

Desta forma, a análise de convergência dos valores de área por lipídio é melhor indicador da menor resolução da superfície de ajuste necessária para a reprodução precisa da superfície química. A convergência da área por lipídio para as bicamadas de Lipídio-A em função do número de divisões ou bin da superfície de ajuste é descrita na Figura 25. Para estes sistemas, os valores de área por lipídio calculados rapidamente atingem a convergência em torno de 100X100 divisões, ou 10201 pontos. Após esta densidade, o incremento no valor da área calculada em função da resolução da malha passa a ser desprezível. Quando esse resultado é complementado pelo tempo de processamento necessário para realizar as análises de área por lipídio (Figura 26), é demonstrada a dependência quadrática entre o tempo de processamento de uma trajetória e a resolução da superfície de ajuste correspondente à superfície química do sistema em consideração. Assim, dobrar o número de divisões da malha significa aumentar, proporcionalmente, em quatro vezes o tempo necessário para realizar a análise. Com isso, não é vantajoso aumentar a resolução da malha para valores maiores que 10201 pontos. Isso porque, enquanto o tempo de análise seria aumentado significativamente, as modificações realizadas nos valores das propriedades calculadas em cada análise seriam mínimas. É também importante salientar que nessa resolução, a incerteza das medidas geradas pela

aproximação da superfície de ajuste por planos torna-se desprezível, uma vez que a propriedade em análise já convergiu.

Portanto, neste trabalho foi utilizada uma resolução de 10201 pontos da superfície de ajuste nas análises de todas as demais propriedades estruturais. As exceções foram as análises geradas como distribuições bidimensionais, como no caso das análises de espessura, distribuição do parâmetro de ordem de curvatura e mapas topográficos de superfícies de nível cuja superfície de ajuste continha 90601 pontos, utilizados com a finalidade de melhorar a resolução das figuras obtidas.

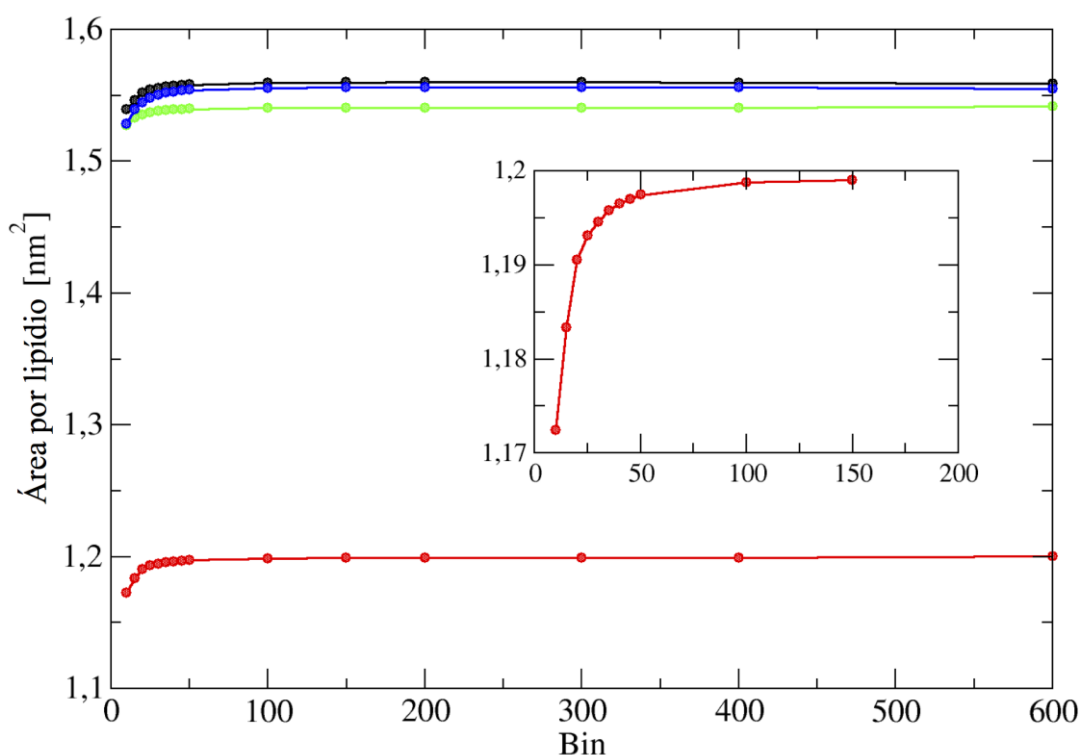


Figura 25. Análise da convergência dos valores de área interfacial por lipídio para os sistemas apresentados na Tabela 1. Em preto está o sistema C_H_C14_343, em vermelho está o sistema C_T_C10_300, em verde está o sistema P_H_C10_315 e em azul está representado o sistema P_H_C10_328. O gráfico no interior corresponde de uma ampliação dos primeiros pontos para a curva em vermelho. O número de pontos da malha está relacionado com o valor do *bin* através da Equação 8, na seção 2.2.1.1.

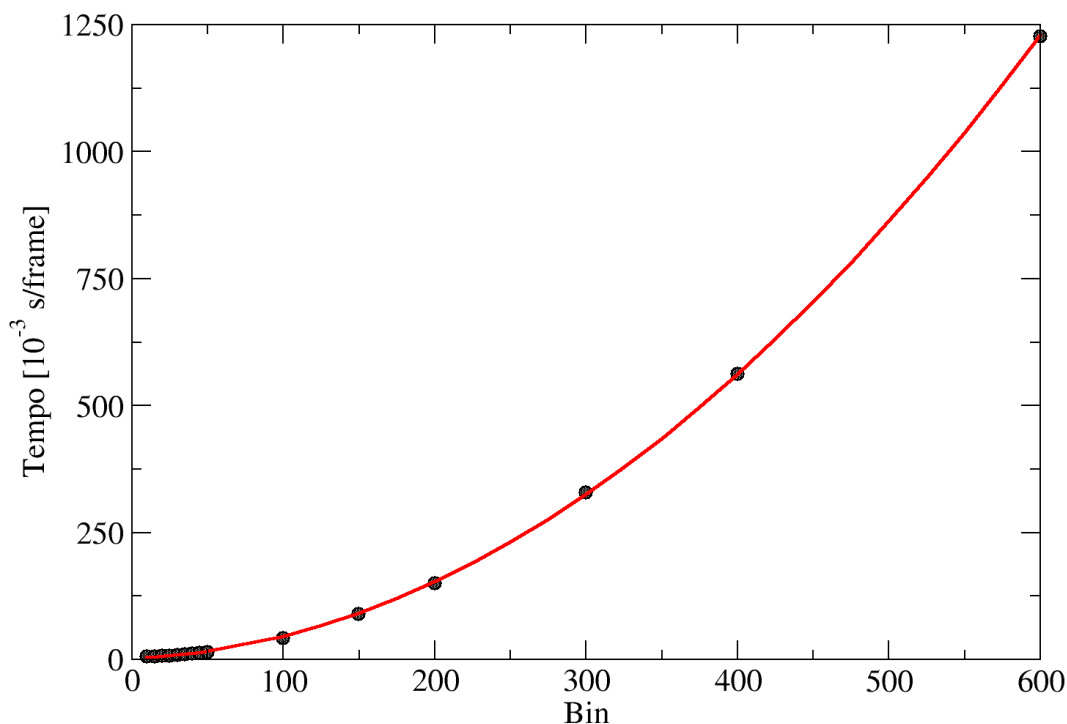


Figura 26. Tempo de processamento dos cálculos realizados na análise de área interfacial por lipídio em função do número de divisões da malha de ajuste utilizada. A análise foi realizada com a versão serial, sequencial, do programa.

3.1.2 Superfícies fechadas: Vesícula

Seguindo a proposta de análise de convergência descrita no tópico acima, foi realizada uma sequência de medições da área das superfícies da vesícula com a finalidade de definir qual a resolução mínima do *grid*, a partir da qual, não há incremento significativo da propriedade sendo mensurada.

Na Figura 27, é possível perceber que a área total de cada superfície possui um perfil de convergência particular. Observando, por exemplo, a taxa de variação da área total das superfícies externa e interna da vesícula em função da resolução da malha de ajuste, é possível verificar que há um rápido decaimento desta função à medida que a malha se torna mais refinada. As maiores variações da área são observadas entre 10 e 100 partições para a camada interna e entre 10 e 200 partições para a camada externa. A partir destas resoluções da malha de ajuste, o incremento de área resultante do acréscimo de mais uma partição representa 0,0483 nm² para a camada externa e 0,0497 nm² para a camada interna da vesícula.

Comparando este resultado com a Figura 28, onde são mostrados os tempos de processamento necessários para conclusão da análise da área total das superfícies externa e interna da vesícula, pode-se verificar que, a partir de uma resolução de 200 partições, ou *bins*, da malha de ajuste, o tempo de processamento aumenta de 0,0098 s/frame para cada partição

adicional. Contudo, a simulação da vesícula é constituída de 150000 frames, representando 300 ns. Significa dizer que, a partir do valor de 200 partições, o acréscimo de mais uma partição à malha de ajuste levaria a um incremento de aproximadamente 24,5 min de processamento. Esse tempo adicional, entretanto, apenas contribuiria com uma variação pífia de apenas $0,0497 \text{ nm}^2$ e $0,0483 \text{ nm}^2$ para as camadas interna e externa da vesícula, respectivamente. Logo, não se faz atraente a proposta de aumentar a resolução da malha de ajuste para além do valor de 200 partições. Este, portanto, será o valor utilizado em todas as análises de propriedades geométricas da vesícula.

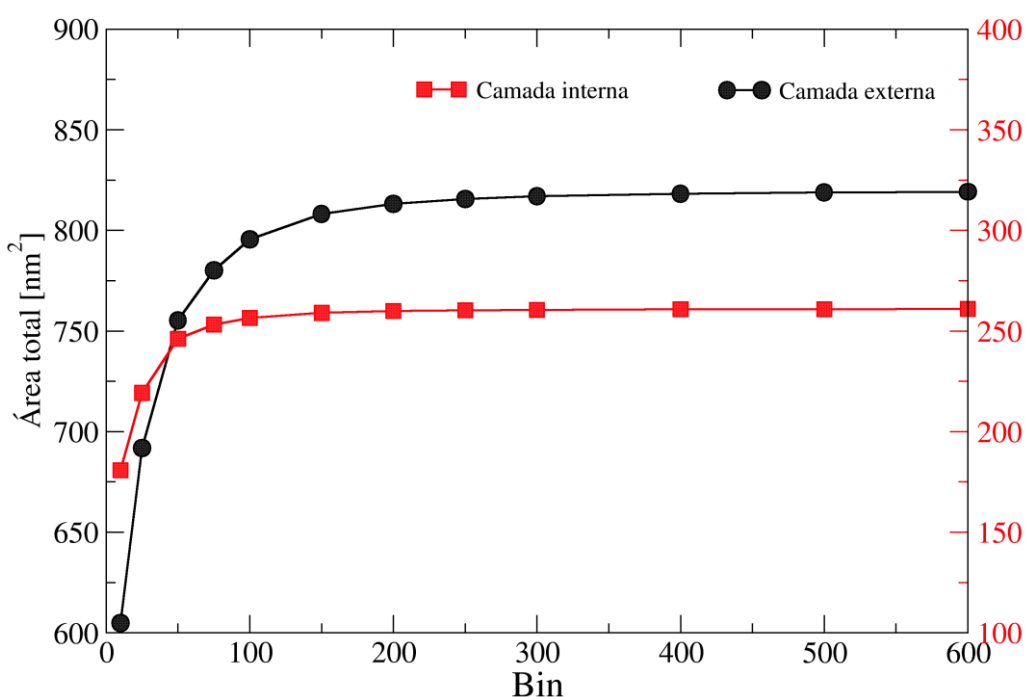


Figura 27. Análise da convergência dos valores de área total calculados para as camadas interna e externa da vesícula. Os dados foram obtidos em uma análise com os primeiros 50 frames da simulação da vesícula de lipídio A. Os valores mostrados correspondem à área calculada para o último frame, o de número 50.

Um último ponto que merece destaque nesta discussão é o valor absoluto do tempo de processamento. Comparando as Figuras 24 e 26, torna-se evidente que o tempo de processamento do sistema formado pela vesícula é aproximadamente 7 vezes maior que o tempo necessário para as mesmas análises dos sistemas formados pelas membranas lipídicas (superfícies abertas). Esta diferença reside principalmente na dimensão dos sistemas, em outras palavras, no número de átomos utilizados durante as análises para gerar as superfícies de ajuste do SuAVE.

Com a finalidade de superar este problema, o programa SuAVE passou por um processo de atualização que o permitiu trabalhar com processamento paralelo. Este resultado foi obtido graças a utilização do OpenMP para gerenciar o processo de paralelização do programa durante a sua execução. Como pode ser observado na Figura 28, a paralelização do código promoveu um aumento líquido da velocidade de processamento do programa de cerca de 3 vezes, em uma máquina com 4 *threads* de processamento, em comparação com seu processamento na versão serial, sequencial, para quase todas as resoluções da malha de ajuste mostradas. Este resultado, obviamente, depende das características físicas da máquina sendo utilizada e, portanto, uma discussão mais detalhada, levando em conta esta variável, faz-se necessária. No Apêndice H podem ser encontrados maiores detalhes acerca do processo de paralelização do loop principal do programa e do ganho de velocidade observado em diferentes máquinas.

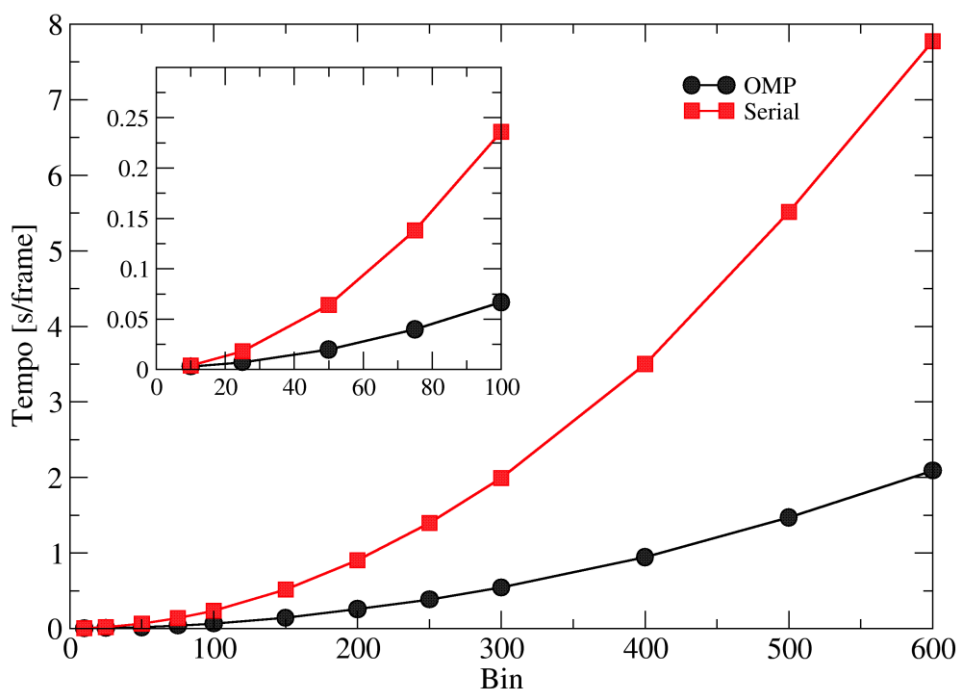


Figura 28. Tempo de processamento para o cálculo de área interfacial da vesícula em função do número de divisões da malha de ajuste utilizada. Os dados foram obtidos em uma análise com os primeiros 50 frames da simulação da vesícula de lipídio A, utilizando uma máquina 64-bits com processador Intel Core i3 com 2,10 GHz de *clock* interno, SSD de 500 Gb e 8Gb de memória RAM.

3.2 PROPRIEDADES ESTRUTURAIS DAS SUPERFÍCIES ABERTAS

3.2.1 Avaliação da área interfacial por lipídio.

Para fins de comparação com as medidas experimentais e com os dados de trabalhos previamente publicados na literatura especializada, a estimativa da área interfacial por lipídio para membranas foi realizada através da utilização de dois procedimentos diferentes. O primeiro procedimento utiliza a convenção descrita na metodologia que define a área da interface como a área da membrana projetada sobre o plano xy. Nessa abordagem, utilizada em inúmeros trabalhos, inclusive os de Pereira *et al.* (2004), Pontes *et al.* (2012) e Dias *et al.* (2014), Hills e McGlinchey (2016) e Liu e Qi (2012), não há dependência direta entre a área calculada e qualquer curvatura existente na interface amostral. A consequência da formação de curvatura pelas bicamadas é avaliada como sendo a diminuição das dimensões da caixa de simulação, fazendo com que a área projetada sobre o plano xy diminua, como observado no trabalho de Pereira *et al.* (2004). Entretanto, essa abordagem pode levar a conclusões errôneas para superfícies muito curvadas. Nesses casos, a diminuição da área por lipídio para valores muito baixos, pode sugerir a existência de uma compressão lateral na membrana e maior compactação das cadeias alquílicas, dentre outras possibilidades, que não condizem com a realidade do fenômeno em consideração. O segundo procedimento utilizado nesse estudo refere-se à aplicação da metodologia implementada no programa SuAVE, e descrita na seção 2.3.1. Uma comparação dos dois procedimentos para as bicamadas de Lipídio-A é apresentada na Figura 29.

Com a finalidade de facilitar o trabalho de comparação entre os resultados apresentados na Figura 29, valores médios extraídos a partir do frame 20000 são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados médios para o intervalo entre os frames 20000 e 120000 das trajetórias apresentadas.

Sistema	Área projetada (nm ²)	Área SuAVE (nm ²)	Erro percentual
C_H_C14_343	1,49 (0,03)	1,55 (0,04)	3,87 %
C_T_C10_300	1,07 (0,03)	1,21 (0,03)	11,57 %
P_H_C10_315	1,44 (0,02)	1,45 (0,02)	0,69 %
P_H_C10_328	1,51 (0,02)	1,56 (0,02)	3,21 %

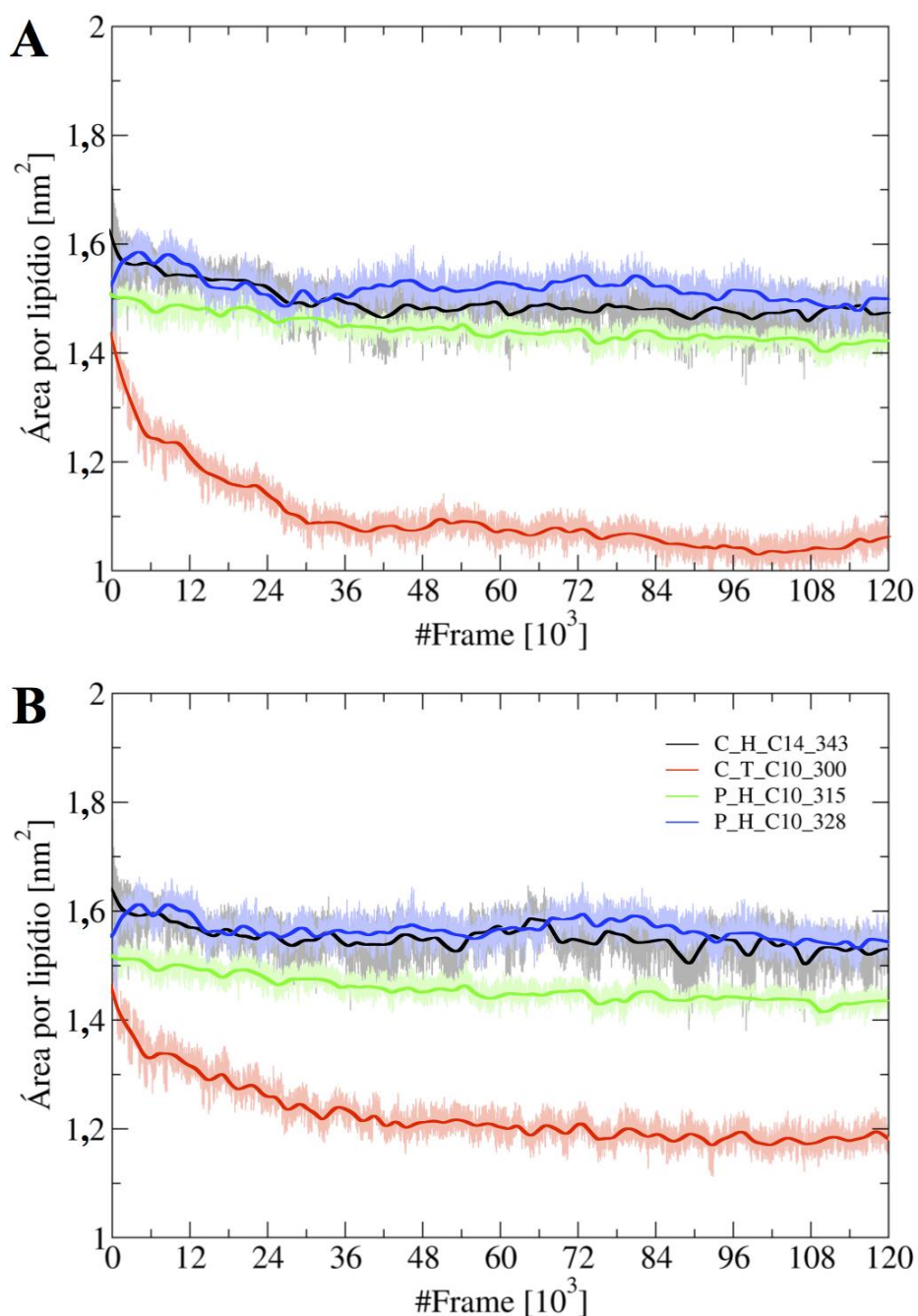


Figura 29. Valores de área interfacial por lipídio para os sistemas descritos na Tabela 1 segundo cada um dos protocolos computacionais utilizados. Em A estão os resultados adquiridos pela área da bicamada projetada no plano xy, enquanto que em B estão os resultados calculados pelo procedimento do SuAVE. As análises foram realizadas para sistemas previamente equilibrados.

Estimativas experimentais para os valores de área por lipídio para membranas compostas por moléculas de lipopolissacarídeos na fase líquido cristalino foram realizadas por Snyder, Kim e McIntosh (1999). Nesse trabalho, os autores mostram que para moléculas hexa ou

hepta-aciladas cada cadeia alquílica contribui, em média, com $0,26 \text{ nm}^2$ para a área do lipopolissacarídeo. Com isso, os valores de área interfacial por lipídio para membranas compostas por lipopolissacarídeos hexa-acilados correspondem a $1,56 \text{ nm}^2$, consistente com os resultados expressos acima (Figura 29 e Tabela 2). Os valores calculados são também consistentes com os valores obtidos a partir de simulações de Lipídeo-A usando diferentes campos de força (DIAS *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2016).

A área por lipídio de uma membrana é uma propriedade que depende da temperatura do sistema, do número de cadeias alquílicas presentes em cada lipídio e do comprimento de cada cadeia (PONTES *et al.*, 2012; PETRACHE, DODD e BROWN, 2000; SZEKELY *et al.*, 2011; CHABAN, 2014; STEVENS, 2004). Deste modo, a tendência esperada para os resultados apresentados seria um aumento do valor da área por lipídio para os sistemas hexa-acilados em relação aos tetra-acilados, e da mesma forma, aumento da área por lipídio com o aumento da temperatura do sistema. Este efeito deve-se ao fato de cadeias alquílicas mais longas apresentarem uma maior superfície de contato entre os lipídios e, portanto, uma maior interação de van der Waals, sendo necessário uma maior temperatura para induzir variação conformacional das cadeias alquílicas e por conseguinte aumento da área por lipídeo. Este efeito é capturado corretamente por ambos os protocolos utilizados no cálculo da área por lipídio para os sistemas simulados (Figura 29, Tabela 2). É também possível observar que o número de cadeias por Lipídeo-A é o parâmetro que mais influencia os valores medidos. De fato, para ambas metodologias de cálculo, a diferença entre os valores de área por lipídio para os sistemas hexa-acilados em relação ao sistema tetra-acilado C_T_C10_300 é no mínimo da ordem de $0,2 \text{ nm}^2$, sendo 81,2% maior que as diferenças existentes entre os sistemas hexa-acilados em diferentes temperaturas, que é da ordem de $0,11 \text{ nm}^2$ entre os sistemas P_H_C10_315 e P_H_C10_315, por exemplo, quando avaliados pelo protocolo do SuAVE.

Em relação à temperatura, os sistemas P_H_C10_328 e C_H_C14_343 expressam os maiores valores de área por lipídio, quando calculados com ambas as metodologias, como esperado. A similaridade entre os valores calculados para esses sistemas, mesmo em diferentes temperaturas se deve às interações de van der Waals que aumentam com o comprimento das cadeias alquílicas, opondo-se ao efeito do aumento da temperatura para o sistema C_H_C14_343. Comparando os resultados obtidos pelas duas metodologias para os mesmos sistemas, é possível verificar uma similaridade entre os valores adquiridos por ambas as metodologias no caso de bicamadas com pouca curvatura (P), ou seja, para sistemas majoritariamente planos. Entretanto, essa relação não se mantém para os sistemas curvados,

como pode ser observado na Tabela 2, em especial para o sistema C_T_C10_300, onde a diferença entre os resultados de ambas metodologias difere em aproximadamente 0,14 nm².

É importante ressaltar que ao negligenciar o efeito da curvatura da superfície das bicamadas durante o cálculo da área por lipídio, a metodologia que utiliza projeções das membranas sobre o plano xy subestima sistematicamente o valor da área interfacial por lipídio de cada sistema em comparação aos valores calculados pelo SuAVE. Essa tendência torna-se mais pronunciada para os sistemas curvados, como esperado, nos quais os valores de área projetada chegam a ser 3.87% e 11.57% menores em relação aos valores medidos pela metodologia do SuAVE, respectivamente.

Em resumo, o método implementado no SuAVE oferece uma estimativa do valor de área interfacial por lipídio mais consistente com os resultados experimentais e computacionais presentes na literatura especializada. Entretanto, esta ferramenta é fundamentalmente importante para avaliar a área interfacial por lipídio em membranas cuja morfologia foge de uma estrutura plana. Nesses sistemas, a área por lipídio projetada sobre o plano xy torna-se uma escolha equivocada, e que deve ser analisada cuidadosamente para não direcionar as conclusões de um trabalho por uma direção contrária a que seria extraída se a curvatura da interface da membrana fosse levada em consideração.

3.2.2 Perfil de densidade

Assim como no estudo da área interfacial por lipídio, é conveniente comparar os resultados obtidos pela metodologia implementada no SuAVE com outras já existentes na literatura especializada. Como pode ser visto nos trabalhos de Pereira *et al.* (2004), Pontes *et al.* (2012) e Dias *et al.* (2014), Nascimento *et al.* (2014) e Liu e Qi (2012), o perfil de densidade comumente utilizado baseia-se em dividir o sistema em fatias planas, distribuídas ao longo do eixo normal à membrana lipídica em estudo, e avaliar a densidade de cada grupo químico de interesse dentro dessas fatias. Essa abordagem, brevemente discutida na seção de metodologia, é de fácil implementação computacional e produz resultados consistentes com as estruturas adotadas por membranas planas. Entretanto, assim como no cálculo de área por lipídio, esse tratamento está limitado às interfaces que possuam uma configuração espacial aproximadamente plana. Por essa razão, é desejável a sua substituição por metodologias que possam levar em consideração a curvatura da interface, quando o sistema químico em consideração apresenta superfícies curvadas. Esse é o caso do programa SuAVE (Figura 30).

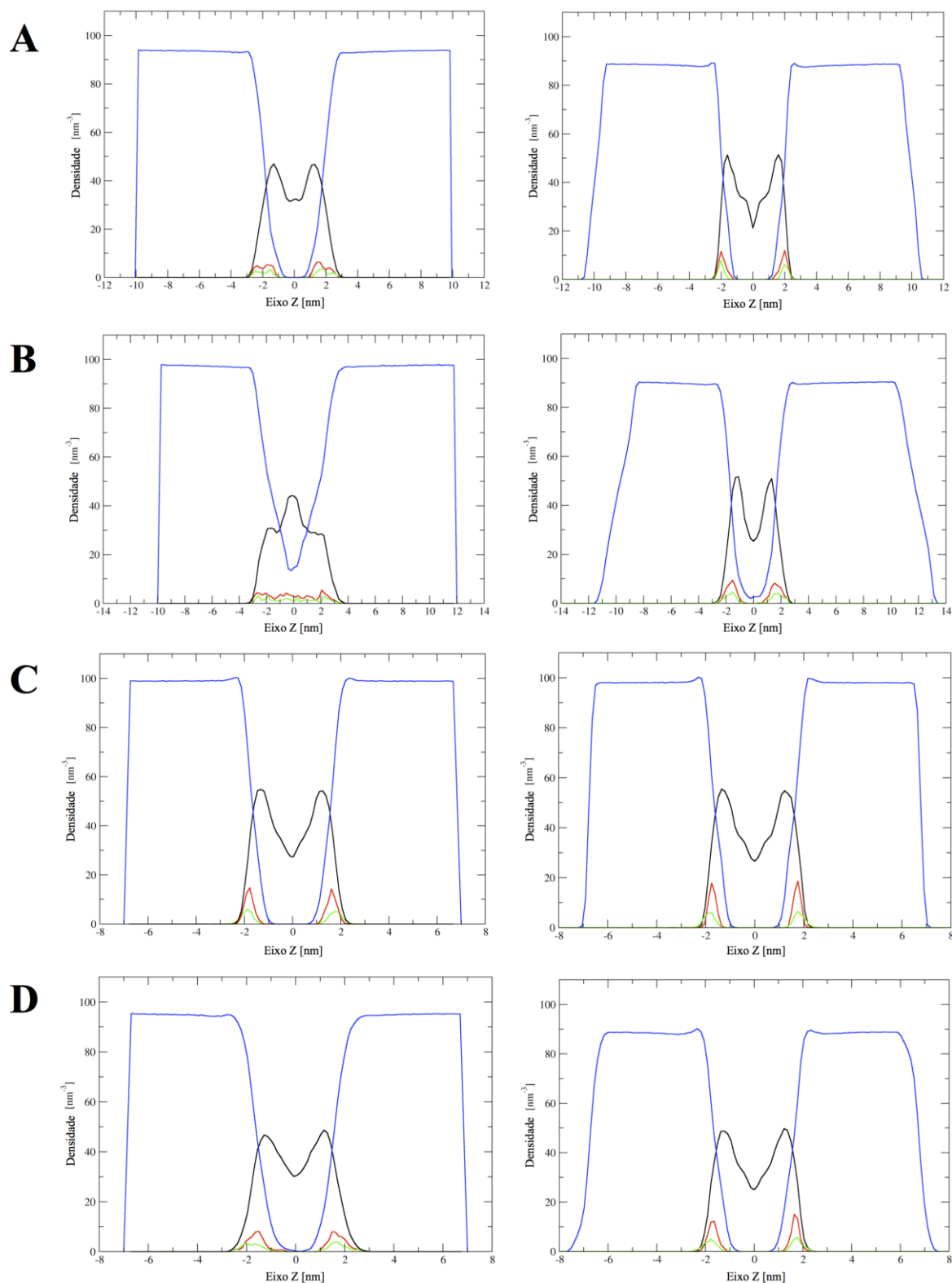


Figura 30. Perfil de densidade para os sistemas descritos na Tabela 1, calculados através das duas metodologias analisadas. A, B, C, e D são relativos aos sistemas C_H_C14_343, C_T_C10_300, P_H_C10_315 e P_H_C10_328, respectivamente. Os perfis à esquerda foram obtidos através da metodologia das fatias planas, enquanto que os perfis à direita foram calculados com auxílio da metodologia implementada no SuAVE. Em azul está o solvente, em preto, as cadeias alquílicas, em vermelho estão os fosfatos dos lipídios e em verde estão os contra-íons. Os fosfatos e contra-íons tiveram os perfis aumentados em 5 vezes para melhorar a visibilidade.

Como esperado, os perfis calculados pela metodologia de fatiamento do sistema ao longo do eixo normal à bicamada, produzem resultados qualitativamente e quantitativamente similares aos resultados desenvolvidos pela metodologia implementada no SuAVE para bicamadas planas P_H_C10_315 e P_H_C10_328 (Figura 30). Este resultado é previsível, pois para tais sistemas, as superfícies de ajuste desenvolvidas pelo SuAVE se aproximam de planos perpendiculares ao eixo normal das membranas (Figura 31). Para bicamadas planas, ambas as metodologias realizam a divisão dos sistemas através de fatias planas ao longo do eixo normal às bicamadas.

Um resultado diferente pode ser encontrado na análise dos sistemas que apresentam curvatura ou ondulações ao longo da extensão da interface das membranas. Para esses sistemas, a saber C_H_C14_343 e C_T_C10_300, os perfis de densidade calculados pela metodologia das fatias planas apresenta incongruências em relação aos resultados extraídos através do SuAVE. Para o sistema C_H_C14_343, a principal diferença entre os resultados extraídos de ambas as metodologias está no formato dos perfis de cada grupo químico.

É evidente que os perfis obtidos pelas fatias planas mostram uma maior distribuição espacial ao longo do eixo normal da membrana (Figura 30). Esse fato é constatado principalmente nos perfis referentes aos contra-íons e aos grupos fosfato presentes nos lipídios, e é uma consequência da ondulação da superfície da membrana. Além desse fato, a metodologia das fatias planas também descreve erroneamente a interdigitação das cadeias alquílicas constituindo os lipídios (Figura 30).

É também imediato perceber que o programa SuAVE descreve uma menor interdigitação e melhor definição dos picos pertencentes ao perfil de distribuição das cadeias alquílicas. Essa variável é de fundamental importância para avaliar a interação entre as lamelas formando a bicamada, assim como exposto no trabalho de Kranenburg, Vlaar e Smit (2004) e Simon e McIntosh (1984), onde essa variável é utilizada para avaliar mudanças de fase estrutural nas bicamadas quando em diferentes condições de interdigitação das suas cadeias lipídicas.

Para o sistema C_T_C10_300, é fácil verificar os significativos desacordos entre os perfis de densidade obtidos pelas duas metodologias apresentadas. A conclusão extraída a partir de cada perfil é completamente diferente. Pela metodologia do SuAVE, a membrana se encontra ainda em formato lamelar, com distribuição simétrica de moléculas nas duas monocamadas. Os contra-íons se localizam nas proximidades dos fosfatos e garantem hidratação dessa região da bicamada. Ao contrário dessa avaliação, pela metodologia das fatias planas, seria possível inferir que o sistema perdeu o arranjo lamelar, permitindo a presença de moléculas de água na região hidrofóbica compreendida pelas caudas lipídicas e com uma distribuição bastante

ampla dos fosfatos e contra-íons do sistema. Entretanto, como pode ser verificado na Figura 31, esse sistema encontra-se perfeitamente estruturado em formato lamelar, apenas apresentando curvatura acentuada, que é responsável pela impossibilidade desse sistema ser avaliado pela metodologia das fatias planas.

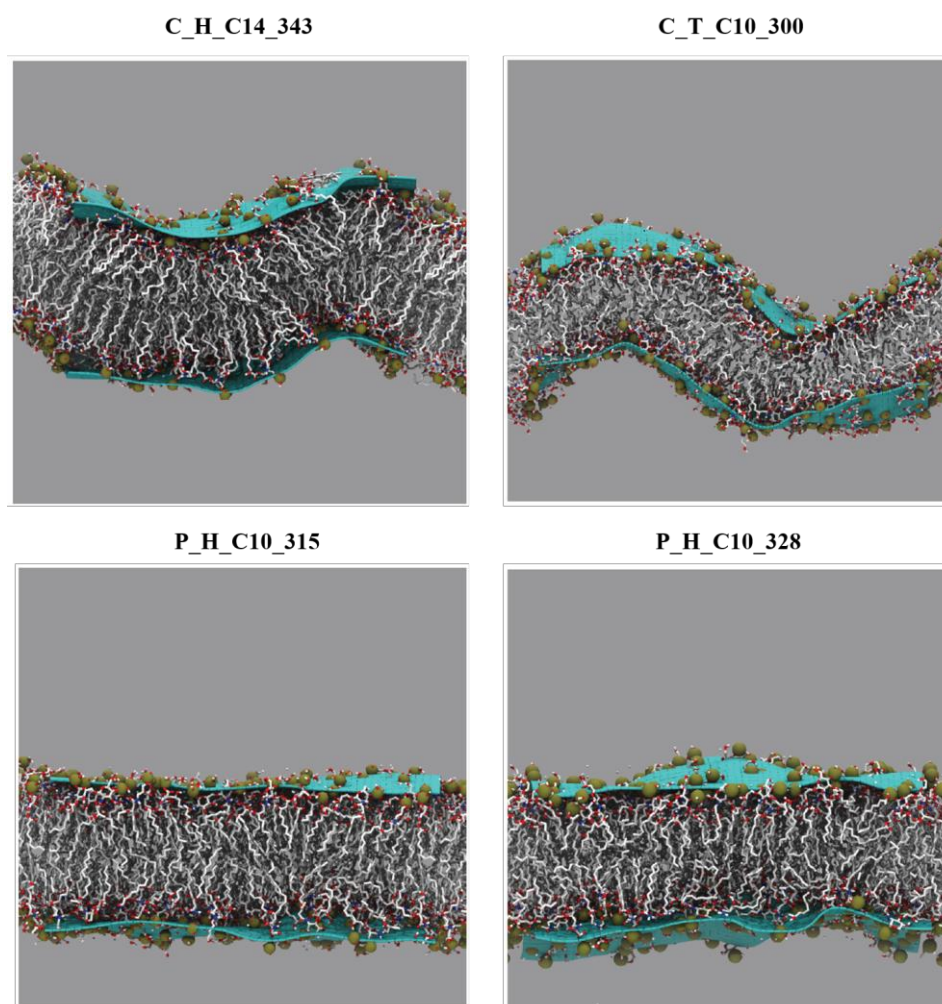


Figura 31. Estrutura final para cada um dos sistemas descritos na Tabela 1. Em branco, estão representadas as cadeias alquílicas, em azul estão as superfícies de ajuste a cada superfície e em cor palha estão os átomos de fósforo utilizados para realizar o procedimento de ajuste.

Portanto, o protocolo utilizado pelo SuAVE para o cálculo do perfil de densidade é compatível com metodologias que não levam em consideração a curvatura da membrana para sistemas planos ou de baixa curvatura, mas é capaz de ultrapassar as limitações existentes nessas metodologias quando na análise de sistemas curvados.

3.2.3 Espessura das bicamadas

Uma vez constatada a importância de incluir o efeito da curvatura no cálculo de propriedades fundamentais para a correta descrição de membranas, serão descritas as análises de outras propriedades estruturais de membranas lipídicas calculadas pelo programa SuAVE. Como descrito na seção metodológica, a espessura de bicamadas lipídicas é uma propriedade importante por estar relacionada às medidas da área e volume por lipídio, que também será avaliada nesta seção. A espessura, Figura 32, está também diretamente relacionada com a interdigitação das cadeias alquílicas presentes nos lipídios, como ressaltado no trabalho de Kranenburg, Vlaar e Smit (2004) e Simon e McIntosh (1984), e pode auxiliar na descrição de diferentes fases estruturais em membranas lipídicas, bem como indicar a energia de interação de van der Waals existentes entre as cadeias alquílicas constituindo as membranas.

Como já mencionado, os átomos de fósforo presentes nos grupos acetilglucosamina do Lipídeo-A foram utilizados como pontos amostrais para a construção da superfície de ajuste, pelo SuAVE. Esta escolha é consistente com outros programas de análise de propriedades de membranas fosfolipídicas discutidas por Allen, Lemkul e Bevan (2008), Buchoux (2017), Lukat, Sommer e Kruger (2013) e Guixà-González *et al.* (2014). Além disso, esta seleção dos átomos de fósforo permite uma comparação entre resultados calculados e medidas experimentais, as quais utilizam a distância entre os picos referentes aos fosfatos em perfis de densidade obtidos por DRX e espalhamento de nêutrons como estimativa da espessura da bicamada (NAGLE e TRISTAM-NAGLE, (2000); NAGLE *et al.*, (1996); SNYDER, KIM e MCINTOSH, 1999).

Uma outra consequência é que essa quantidade passa a ser diretamente proporcional ao número de carbonos constituindo as cadeias alquílicas dos lipídios presentes nas membranas. Essa dependência foi relatada por Lewis e Engelman (1983) através do estudo da espessura de vesículas de fosfatidilcolina apresentando cadeias com comprimentos distintos. Além dessa dependência, estudos como o de Kucerka, Nieh e Katsaras (2011) demonstraram que a espessura de membranas lipídicas é inversamente relacionada com a área interfacial por lipídio da superfície e, de forma análoga, à temperatura na qual os sistemas foram submetidos.

Após essas considerações, os valores da espessura das bicamadas lipídicas para os sistemas simulados (Tabela 1) podem ser expressos pelo SuAVE de duas formas complementares (Figuras 30 e 31). A primeira é através de uma média espacial, avaliada para cada um dos frames contidos nas trajetórias de cada sistema, e a segunda, é uma média temporal distribuída espacialmente sobre a superfície de cada interface em estudo.

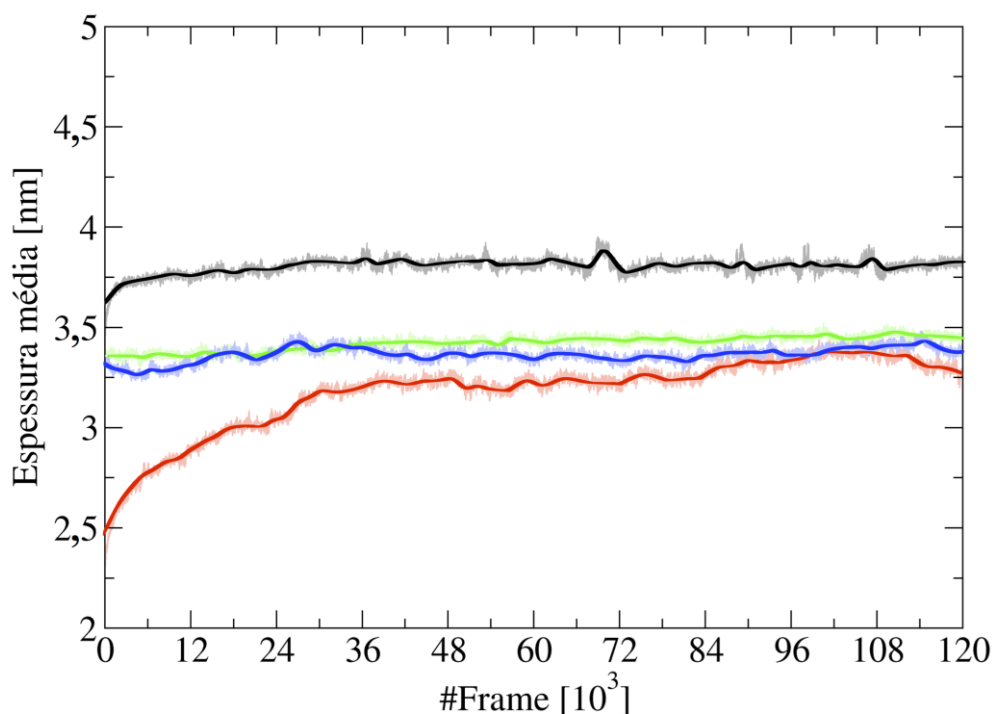


Figura 32. Espessura das membranas descritas na Tabela 1. As cores seguem a sequência utilizada na Figura 29, onde o sistema C_H_C14_343 está em preto, o sistema C_T_C10_300 está em vermelho, o sistema P_H_C10_315 está em verde e o sistema P_H_C10_328 está em azul.

Com a finalidade de comparar os resultados medidos para cada sistema em estudo, foram tomados os valores médios dos perfis apresentados acima, a partir do frame 20000. Deste modo, não foram contabilizados os valores correspondentes às etapas de equilíbrio dos sistemas. É possível separar os sistemas em estudo em dois grupos bem definidos com relação à espessura das bicamadas (Figura 32, Tabela 3). Essa separação é proporcional ao número de carbonos presentes nas cadeias mais longas de cada lipídio, assim como no estudo de Kucerka, Nieh e Katsaras (2011). O primeiro grupo é definido pelo sistema C_H_C14_343 com uma espessura média de 3,81 nm, e o segundo grupo é constituído pelo conjunto dos sistemas C_T_C10_300, P_H_C10_315 e P_H_C10_328 com espessuras médias de aproximadamente 3,25 nm, 3,43 nm e 3,37 nm respectivamente.

Os valores calculados estão em acordo com as medidas experimentais de Snyder, Kim e McIntosh (1999) para membranas formadas por lipopolissacarídeos possuindo de 12 a 16 carbonos nas suas cadeias alquílicas. São também consistentes com as estimativas computacionais realizadas por Dias *et al.* (2014) para o Lipídio-A de *P. aeruginosa*, contendo 12 carbonos nas suas cadeias alquílicas mais longas.

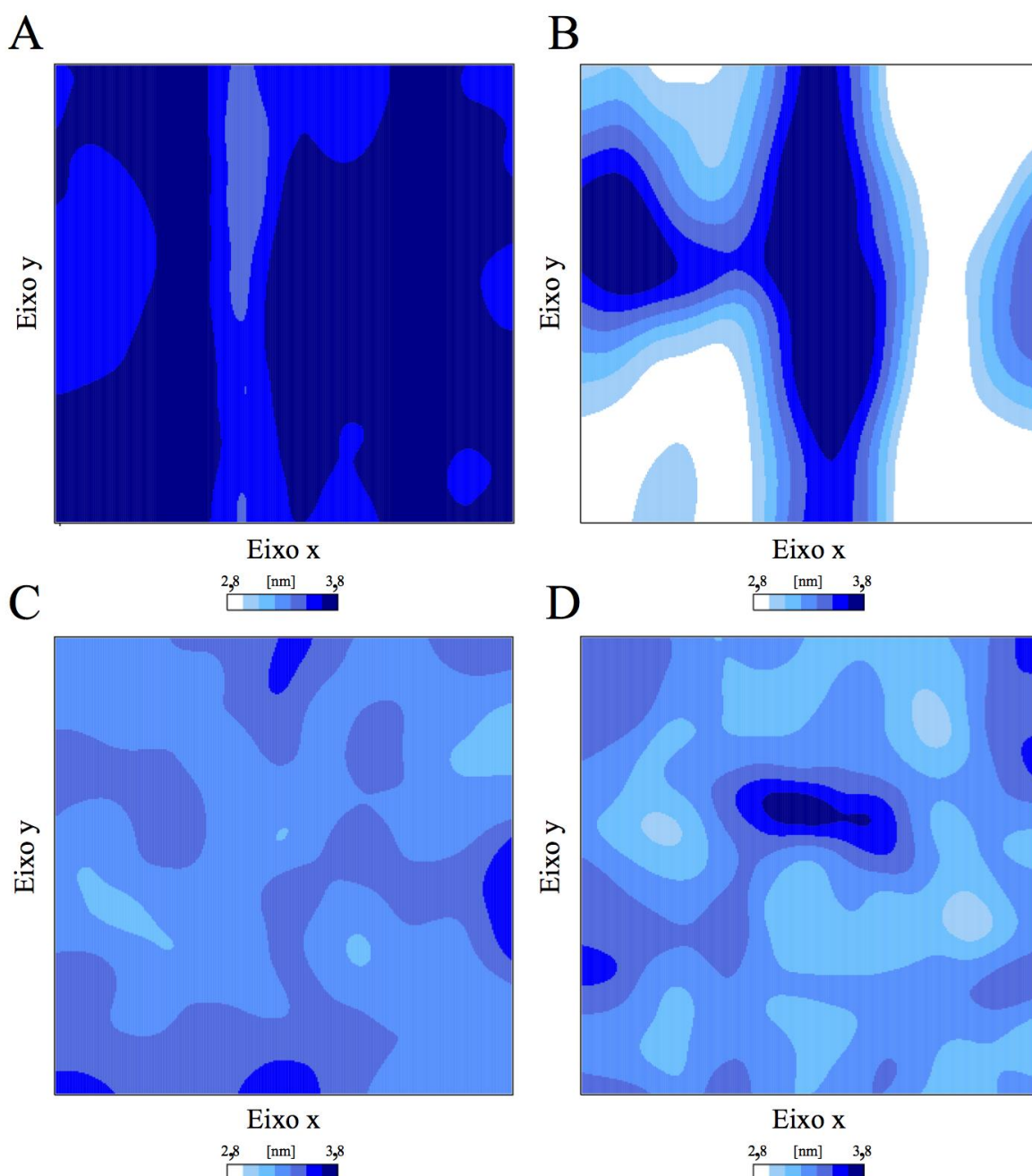


Figura 33. Distribuição bidimensional da espessura das bicamadas descritas na Tabela 1. A, B, C, e D são relativos aos sistemas C_H_C14_343, C_T_C10_300, P_H_C10_315 e P_H_C10_328, respectivamente. Essa distribuição foi calculada como a média sobre os últimos 20000 frames da trajetória de cada sistema

A diferença entre os valores calculados para a espessura das bicamadas dos sistemas P_H_C10_315 e P_H_C10_328 é da ordem de $6 \cdot 10^{-2}$ nm para uma diferença de temperatura de 13 °C. Esse valor mostra a pequena sensibilidade da espessura das bicamadas em resposta a variações na temperatura dos sistemas.

Tabela 3. Valores da espessura das bicamadas para cada sistema em estudo.

Sistema	Espessura (nm)	Variação da espess. (nm)
C_H_C14_343	3,81 (0,03)	2,963 – 4,410
C_T_C10_300	3,25 (0,09)	2,286 – 4,801
P_H_C10_315	3,43 (0,03)	2,987 – 3,933
P_H_C10_328	3,37 (0,03)	2,700 – 4,125

Por outro lado, uma maior variação é observada entre os sistemas C_T_C10_300 e P_H_C10_315, que é consequência do formato da superfície. Essa característica pode ser melhor analisada através da Figura 33, onde pode ser percebida uma variação significativa da espessura da bicamada do sistema C_T_C10_300 quando comparada com a distribuição calculada para o sistema P_H_C10_315. Nessa figura a espessura das bicamadas é avaliada ao longo da extensão das suas superfícies. O desenvolvimento das curvas de nível desdobra a distribuição em sete valores de espessura separados igualmente por um valor de aproximadamente 0,143 nm. Os valores máximos e mínimos da espessura admitida em cada bicamada, para os últimos 20000 frames das trajetórias, podem ser avaliados na Tabela 3. É possível constatar que os valores mostrados na tabela são diferentes do intervalo utilizado nas legendas da Figura 33. Essa escolha foi realizada de modo que o intervalo de espessura avaliado na distribuição bidimensional estivesse contido na variação de cada um dos sistemas, e que o mesmo fosse constante entre os sistemas comparados, permitindo a comparação direta entre as distribuições dos diferentes sistemas.

A partir desses valores é possível concluir que a maior variação de espessura é encontrada no sistema C_T_C10_300 que, não por acaso, é o sistema que apresenta uma maior modificação da curvatura da superfície. Na sequência, as variações da espessura diminuem gradativamente para os sistemas C_H_C14_343, P_H_C10_328 e P_H_C10_315 que apresentam 57,5%, 56,7% e 37,6% da variação observada para o sistema C_T_C10_300. É possível verificar que os maiores valores de espessura presente na bicamada do sistema C_T_C10_300 ocorrem em regiões onde há maior inclinação da superfície em relação ao eixo normal do sistema, ou modificação na sua orientação espacial (Figuras 29 e 31).

Embora essa observação seja melhor analisada no próximo tópico, a mesma pode ser verificada pela comparação dos sistemas C_T_C10_300 e P_H_C10_315, que apresentam as

conformações mais discordantes dentre as superfícies em estudo. No sistema P_H_C10_315 a superfície de ajuste encontra-se majoritariamente em uma conformação plana e perpendicular ao vetor normal do sistema, eixo z. Ao avaliar a sua distribuição bidimensional de espessura, é possível verificar que há apenas uma pequena variação dos valores apresentados sobre a extensão da superfície. Além disso, a variação encontrada não descreve nenhum padrão que possa assinalar algum fenômeno que esteja ocorrendo na superfície deste sistema. O contrário, no entanto, é constatado no sistema com maior curvatura de superfície, C_T_C10_300, onde há um padrão bem localizado da variação da espessura, e que corresponde à região com maior inclinação da superfície.

Conclusão semelhante foi obtida por Santos *et al.* (2017), onde a maior variação na espessura das bicamadas estudadas pelos autores se localizava em regiões onde havia interação entre as membranas externas bacterianas e peptídios antimicrobianos. Nessas regiões, houve formação de curvatura na superfície das membranas que levou ao aumento gradativo da espessura das bicamadas. Assim, além da espessura de uma membrana ser uma função da temperatura do sistema, da área por lipídio e do comprimento das cadeias alquílicas de cada lipídio, a mesma é também uma função da estrutura local da superfície. Por esse motivo, analisar apenas o valor médio da espessura de uma membrana significa perder informação, em termos da influência da configuração espacial da superfície na distribuição local da espessura da membrana.

3.2.4 Volume das bicamadas

É possível comparar os valores calculados de volume por lipídio (Tabela 4) e sua evolução temporal com medidas experimentais (Figura 34).

Como discutido brevemente na metodologia, uma das maneiras de estimar o valor do volume de um lipídio em uma bicamada, é através de medidas de densitometria (NAGLE e WILKINSON, 1978). Infelizmente, o número de trabalhos na literatura especializada que apresentam medições do volume de lipídios em membranas é reduzido. Além disso, o valor do volume por lipídio é dependente do tipo de lipídio, dificultando uma comparação direta entre valores calculados e experimentais para as variantes químicas do Lipídeo-A.

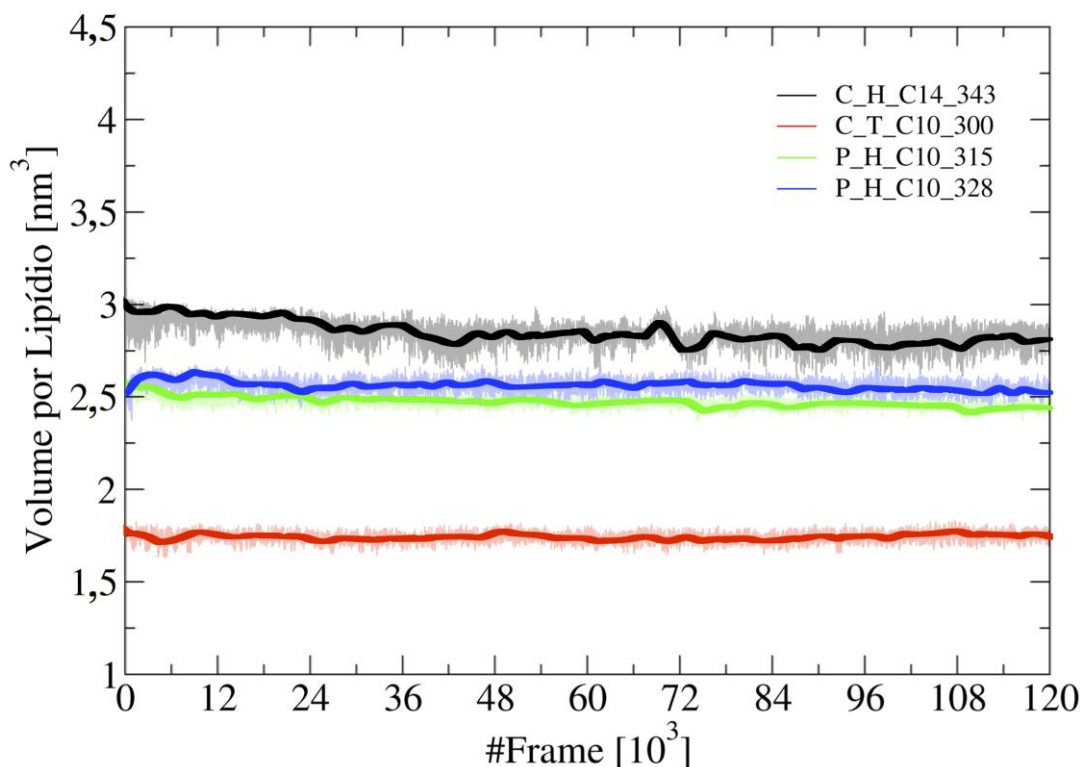


Figura 34. Volume por lipídio calculado para os sistemas descritos na Tabela 1.

Entretanto, um método que parece ser largamente aplicado em muitos estudos estruturais de membranas lipídicas consiste na utilização de valores pré-estabelecidos para os volumes dos grupos metil e metileno, de modo a estimar o volume das cadeias alquílicas que compõem os lipídios.

Essa metodologia foi utilizada nos estudos de Leftin *et al.* (2014) e Kinnun *et al.* (2015), por exemplo. Felizmente, os valores estabelecidos para os volumes desses grupos químicos foram estudados e validados por diferentes metodologias. Nagle e Wilkinson (1978) estimaram, por densitometria, os volumes dos grupos metil e metileno como sendo aproximadamente $24,4 \text{ \AA}^3$ e $58,8 \text{ \AA}^3$, respectivamente. Weiner e White (1992), através de medidas de difração de nêutrons e raio-X, conseguiram estimar esses valores como sendo aproximadamente $27 \text{ \AA}^3$ e $57,2 \text{ \AA}^3$. Também, através de estudos de dinâmica molecular, Armen, Uitto e Feller (1998) estimaram esses valores como aproximadamente $28,1 \text{ \AA}^3$ e $52,7 \text{ \AA}^3$.

Com esses valores é possível estimar o volume ocupado pelas cadeias alquílicas dos lipídios estudados, de modo a comparar com os resultados obtidos pelo SuAVE. Essa

comparação é necessária, uma vez que não há programas atualmente disponíveis que calculem essa propriedade estrutural para membranas lipídicas.

Os valores dos volumes ocupados pelas cadeias alquílicas, extraídos das estimativas experimentais para os grupos metil e metileno, são apresentados na Tabela 4. Esses valores não contemplam o volume ocupado pela parte polar dos lipídios e, portanto, não fornece o valor total do volume de cada lipídio compondo os sistemas em estudo.

Tabela 4. Valores medidos para o volume por lipídio, SuAVE, e para os volumes das cadeias alquílicas dos lipídios. Vc 1 refere-se ao volume das cadeias alquílicas calculado através dos dados do trabalho de Nagle e Wilkinson (1978), Vc 2 refere-se aos dados advindos do trabalho de Weiner e White (1992) e Vc 3 refere-se aos dados extraídos do trabalho de Armen, Uitto e Feller (1998).

Sistema	Volume (nm ³)			
	Suave	Vc 1	Vc 2	Vc 3
C_H_C14_343	2,83 (0,06)	1,8656	2,0172	2,0584
C_T_C10_300	1,74 (0,02)	0,9184	0,9848	0,9976
P_H_C10_315	2,47 (0,02)	1,524	1,6392	1,665
P_H_C10_328	2,56 (0,03)	1,524	1,6392	1,665

Entretanto, como mostrado por Nagle e Wilkinson (1978), o volume da parte polar dos lipídios deve se manter constante frente a modificações nas cadeias alquílicas e em diferentes temperaturas. Com isso, as variações nos volumes medidos pelo SuAVE devem ser, também, devidas às variações de número e comprimento das cadeias alquílicas de cada sistema, bem como na desordem das cadeias causadas por variações de temperatura nos sistemas. Portanto, a avaliação da Tabela 4 deve ser realizada em termos de tendência observada para os resultados advindos do SuAVE e dos dados extraídos da literatura. É possível perceber que os resultados obtidos através da metodologia aplicada pelo SuAVE, estão em acordo com a tendência esperada para o volume ocupado pelas cadeias alquílicas dos lipídios, extraídos dos dados da literatura. A única divergência está nos últimos dois sistemas, que diferem apenas com relação às temperaturas das simulações. Isso é esperado, uma vez que o método de cálculo do volume das cadeias alquílicas não leva em conta a temperatura. Essa variável é apenas avaliada no SuAVE, pelo fato do volume ser extraído diretamente da estrutura dos sistemas.

Uma última consideração a ser realizada a respeito dos valores calculados para o volume dos lipídios reflete-se no perfil mostrado na Figura 34. É interessante observar que o valor

calculado para cada sistema não varia ao longo do tempo. Existem oscilações advindas de flutuações atômicas na superfície das membranas e que conseqüentemente modificam a estrutura da superfície de ajuste. Entretanto, o valor médio de cada perfil mantém-se constante. Isso é esperado a partir do momento em que os sistemas alcançam uma convergência estrutural, mas, de certo, não é intuitivo o fato disso ocorrer para sistemas que ainda não estejam equilibrados. A explicação para esta observação reside na comparação das Figuras 23, 26 e 28. Sendo o volume ocupado por cada lipídio, uma função da sua área interfacial e da espessura da bicamada, deve variar segundo alterações existente nos valores dessas propriedades. Entretanto, como exposto acima, essas propriedades são inversamente proporcionais, de modo que o aumento da espessura observado para o sistema C_T_C10_300 está interligado com a diminuição do valor da área ocupada por cada lipídio nesse sistema. Assim, as alterações sofridas nos valores de área por lipídio e espessura da bicamada concorrem de tal sorte que promovem uma conservação do volume ocupado por cada lipídio, assim como observado na Figura 34.

3.2.5 Distribuição de desvio angular e parâmetro de ordem de curvatura

De certo, o estudo morfológico iniciado através da distribuição de desvio angular da superfície da membrana em relação ao eixo normal do sistema, e do parâmetro de ordem de curvatura, é um dos mais importantes para complementar os resultados apresentados até o momento, bem como, trazer os rudimentos para a posterior análise energética via Equação de Helfrich, apresentada na introdução. Como esta propriedade não é calculada por nenhum outro programa disponível na literatura, não é possível tecermos comparações como as realizadas para as propriedades descritas anteriormente. Portanto, apenas será discutido como esses resultados explicam, ou influenciam, os dados das análises anteriores.

O primeiro resultado, a distribuição de desvio angular do vetor normal às superfícies em relação ao vetor normal do sistema, foi realizado para os últimos 20000 frames presentes nas trajetórias de cada sistema em estudo.

Intuitivamente, essa distribuição guarda uma relação direta com a configuração espacial dos sistemas, e a partir da mesma, é possível estabelecer o grau de deformação espacial apresentado pelas membranas, ou o quanto elas se distanciam de um perfil plano (Figura 35).

Como esperado, os sistemas que admitem uma conformação plana, possuem o valor médio de desvio angular abaixo de 15° , como no caso dos sistemas P_H_C10_315 e P_H_C10_328 que admitem um valor de $8,54^\circ$ e $12,88^\circ$, respectivamente. Por outro lado,

sistemas que apresentem curvatura suave também podem se encaixar nesse limite. Esse é o caso do sistema C_H_C14_343 que apresenta um valor médio de desvio angular de aproximadamente 14.65°.

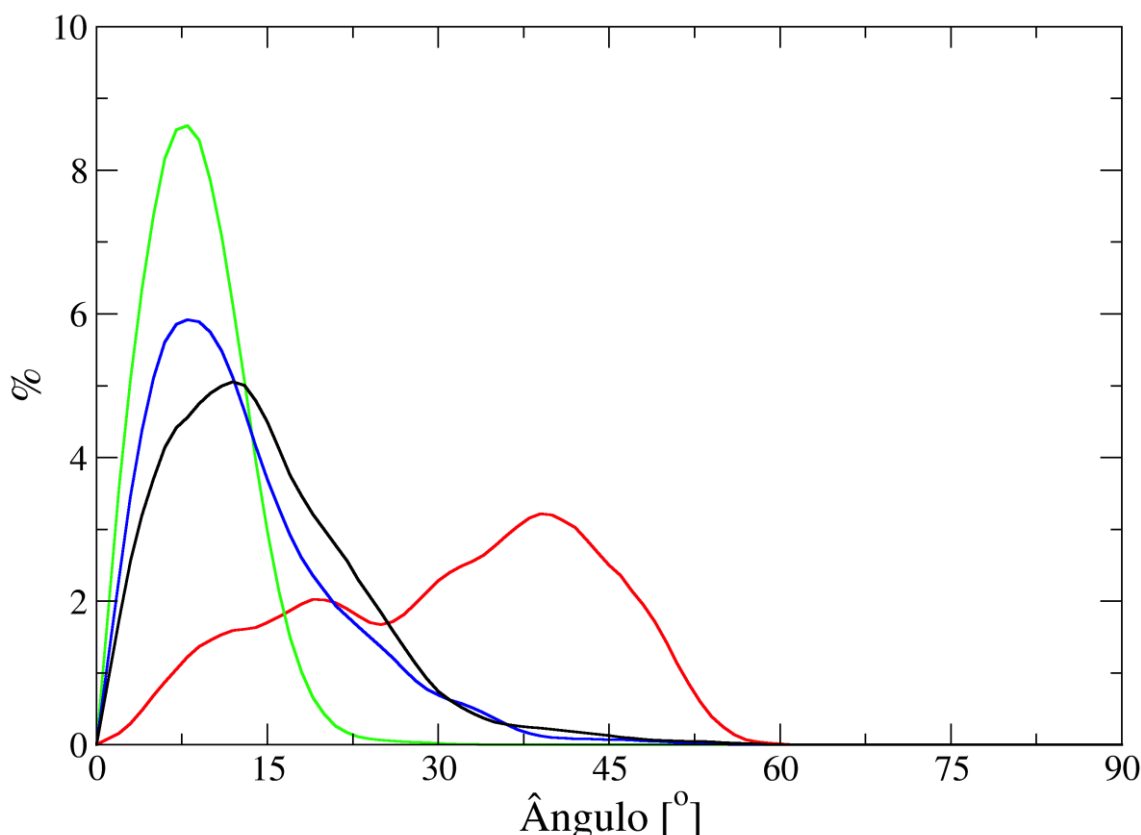


Figura 35. Distribuição do desvio angular das superfícies em estudo em relação ao eixo normal dos sistemas, eixo z. O sistema C_H_C14_343 está em preto, o sistema C_T_C10_300 está em vermelho, o sistema P_H_C10_315 está em verde e o sistema P_H_C10_328 está em azul.

Essa ocorrência é possível, uma vez que a distribuição é uma média sobre toda a superfície, de modo que superfícies possuindo ondulações suaves ou poucas regiões curvadas vão apresentar maior parte de sua superfície desviando menos de 15° em relação a normal dos sistemas. Por outro lado, superfícies apresentando ondulações accentuadas e, ou, regiões apresentando curvaturas também muito acentuadas, tendem a apresentar um ângulo de desvio médio maior que 30° em relação a normal. Um exemplo desse tipo de superfície é mostrado pelo sistema C_T_C10_300 que apresenta um ângulo de desvio médio de 30,87° e um valor máximo próximo de 40°.

O perfil do parâmetro médio de curvatura ao longo do tempo complementa as observações realizadas até aqui (Figura 36). Através desse resultado é possível verificar, em termos de formação de curvatura ou ondulação da superfície, como as membranas se

modificaram ao longo do tempo. Estes resultados permitem verificar que todos os sistemas partiram de conformações planas (S_c próximo de 1), as quais correspondem às configurações iniciais das bicamadas simuladas. Ao longo do tempo, cada sistema apresentou uma evolução diferente em função da temperatura simulada e estrutura química representada pelo número de cadeias alquílicas do Lipídio-A constituinte da bicamada. É possível perceber que sistemas que apresentem distribuições de desvio angular semelhantes, também apresentarão parâmetros médios de curvaturas congêneres. Esse fato é demonstrado pela comparação entre os resultados obtidos para os sistemas C_H_C14_343 e P_H_C10_315 (Figuras 27 e 28).

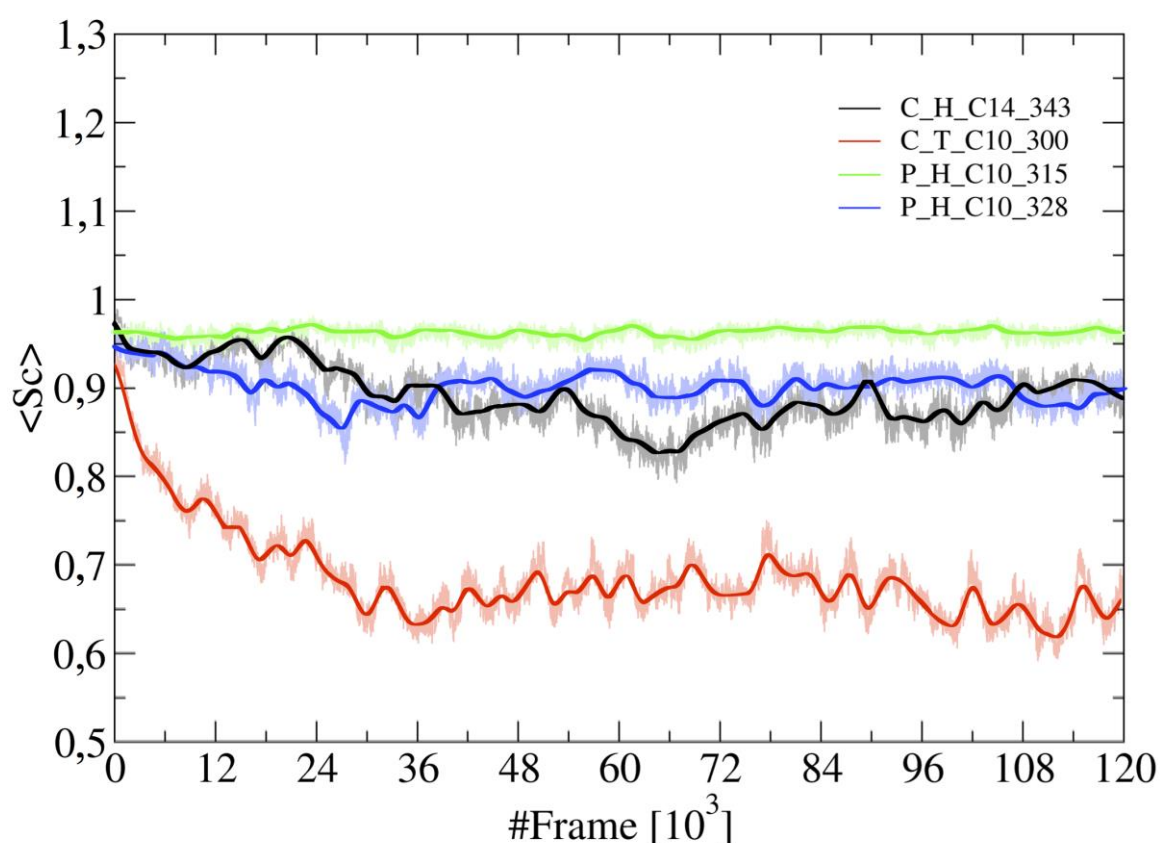


Figura 36. Perfil temporal para o parâmetro de ordem de curvatura calculado para os sistemas descritos na Tabela 1. Valores próximos de 1 são referentes a superfícies planas.

O parâmetro de ordem estabelecido para o sistema P_H_C10_315 tem valor médio de 0,96, o qual corresponde a uma superfície essencialmente plana. O sistema C_T_C10_300 sofre a maior modificação do parâmetro de curvatura, demonstrando que ao longo de aproximadamente 30000 frames o sistema abandona uma configuração plana e adota gradualmente uma conformação ondulada com parâmetro médio de curvatura de aproximadamente 0,65, sendo, portanto, 25,6% menor que o apresentado pelos outros

sistemas. Como percebido, a avaliação realizada aqui é em como o SuAVE e o seu protocolo computacional podem ser utilizados para quantificar essas modificações e oferecer uma comparação adequada entre as configurações espaciais de diferentes interfaces químicas.

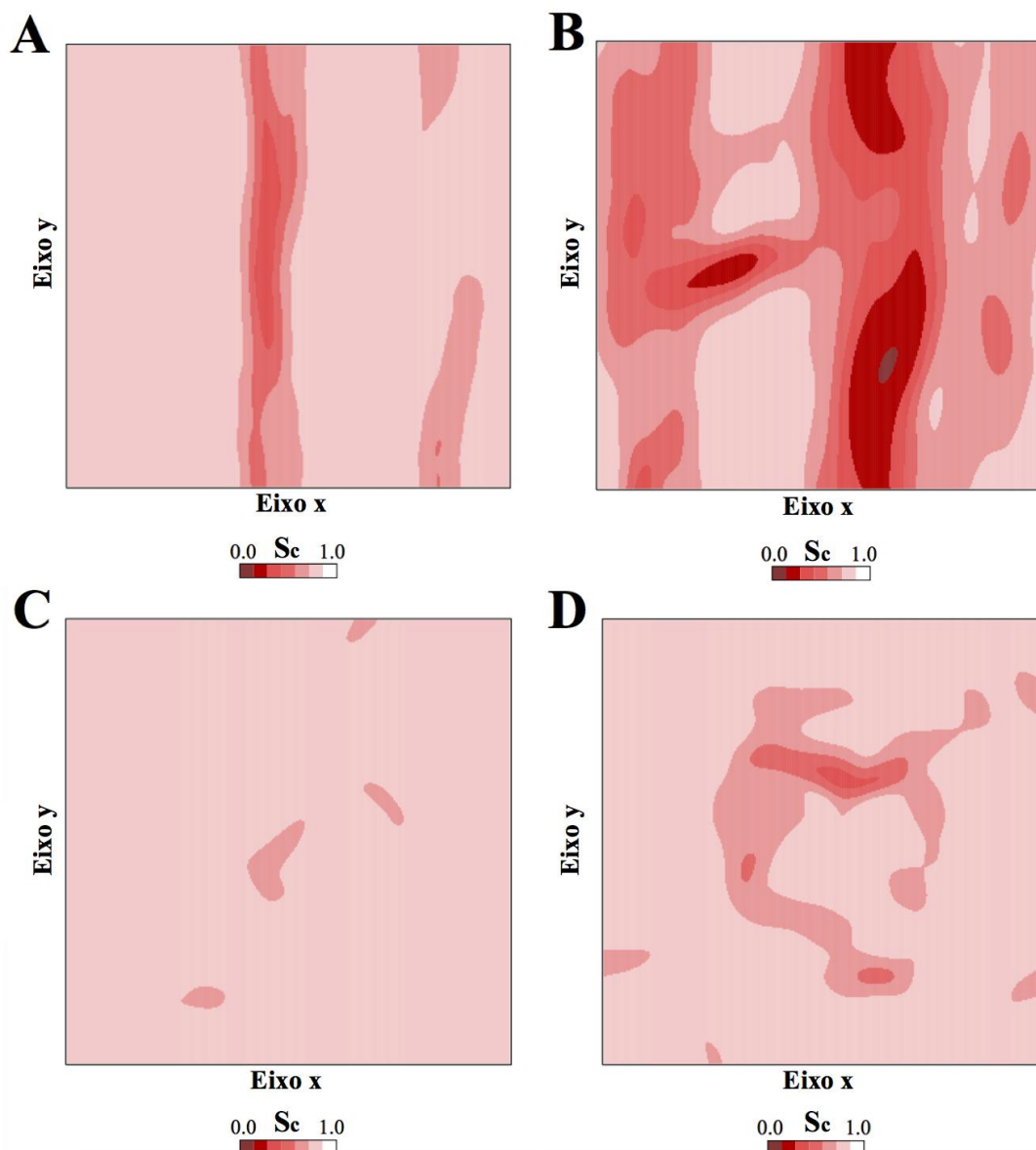


Figura 37. Distribuição bidimensional do parâmetro de ordem de curvatura para os sistemas descritos na Tabela 1. A, B, C, e D são relativos aos sistemas C_H_C14_343, C_T_C10_300, P_H_C10_315 e P_H_C10_328, respectivamente. O valor 1,0 corresponde a um desvio angular de 0° em relação ao eixo normal do sistema. O valor de 0,0 corresponde a um desvio angular de $54,74^\circ$.

Assim como discutido na análise da espessura da bicamada, o valor médio do parâmetro de curvatura pode ser melhor avaliado através de superfícies de nível distribuídas ao longo da extensão das bicamadas. Desta forma, é possível estimar a variação deste parâmetro ao longo da superfície da membrana e relacionar os valores locais de parâmetro de ordem de curvatura com a configuração das interfaces do sistema. Estas representações permitem observar

distribuições bidimensionais do parâmetro de ordem de curvatura para os sistemas em estudo (Figura 37).

As distribuições bidimensionais do parâmetro de ordem possuem valores que variam entre 0,0 e 1,0 (Figura 37). O desenvolvimento das curvas de nível desdobra a distribuição em 7 valores de parâmetro de ordem de curvatura separados igualmente por um valor de aproximadamente 0,143. É possível perceber que os sistemas caracterizados anteriormente como planos ou apresentando ondulações leves são aqueles que apresentam uma distribuição do parâmetro de ordem de curvatura mais uniforme. Possuem algumas variações que contribuem para que o valor médio do parâmetro seja inferior a 1,0, correspondendo a sistemas perfeitamente planos. Vale ressaltar que os perfis bidimensionais do parâmetro de ordem de curvatura confirmam o que foi exposto no estudo da espessura das bicamadas (Figura 37). As regiões exibindo um aumento da espessura das bicamadas correspondem às regiões com os menores valores do parâmetro de ordem de curvatura. Isso indica que nessas regiões há uma inclinação da superfície das membranas ou até mesmo formação de curvatura. Essa relação pode ser facilmente percebida nas distribuições de espessura e do parâmetro de ordem de curvatura para o sistema C_T_C10_300, que apresenta as maiores variações dos dois parâmetros, dentro do conjunto de sistemas considerados.

Em resumo, esses resultados detalham o quanto a conformação das membranas pode afetar suas propriedades estruturais. É necessário saber descrever como essa dependência opera sobre as características físicas, químicas e energéticas das superfícies em estudo, e ser capaz de avaliar essas variáveis em superfícies que se apresentem em diferentes conformações. Foi com esse objetivo que o SuAVE foi desenvolvido.

3.3 PROPRIEDADES ESTRUTURAIS DAS SUPERFÍCIES FECHADAS

Nesta subseção serão apresentados os resultados de análises estruturais obtidos com o SuAVE para fechadas. No entanto, medidas experimentais para o sistema em consideração são escassas, o que dificulta uma comparação direta entre os valores calculados com o SuAVE e aqueles medidos experimentalmente.

Entretanto, após a devida validação dos algoritmos numéricos implementados, realizada no tópico anterior, os dados que serão apresentados não servem de comparação, mas de demonstração da capacidade analítica da ferramenta para elucidar alterações morfológicas em superfícies diversas.

3.3.1 Avaliação da área interfacial por lipídio, raio médio e esfericidade

Seguindo uma ordem similar à subseção anterior para a apresentação das análises estruturais da superfície em estudo, a primeira propriedade a ser exposta é a área interfacial por lipídio, acompanhada de análises complementares que enriquecem a descrição das alterações morfológicas observadas no estudo. A Figura 38 mostra os valores das áreas calculadas para as interfaces interna e externa da vesícula de Lipídio A, utilizada na simulação.

Uma rápida avaliação do perfil mostrado na Figura 38 revela que houve uma rápida expansão da lamela externa da vesícula, acompanhada em menor escala pela lamela interna, durante o intervalo entre 0 e 50 ns de simulação. Após este intervalo, os valores das áreas por lipídio, calculados para cada lamela, apenas oscilam em torno das suas respectivas médias. Este comportamento sugere que o parâmetro da área por lipídio atinge um regime estacionário após 50 ns de simulação. Entretanto, esta análise não significa que a estrutura da vesícula se manteve em uma configuração de mínima energia, mas apenas que as modificações ocorridas após 50 ns, não interferiram significativamente na área global da vesícula.

As observações realizadas podem, e devem, ser complementadas com a análise dos valores do raio médio e esfericidade para cada uma das lamelas da vesícula, Figura 39. Nesta figura, é possível inferir que a estrutura da vesícula continua sofrendo alterações estruturais que conferem um aumento contínuo e gradual do raio médio da sua camada externa, enquanto que o valor de esfericidade para esta mesma camada denuncia uma transição estrutural para uma morfologia menos condizente com a esfera utilizada para iniciar a simulação. As

conclusões para a camada interna da vesícula são muito similares, embora não haja um aumento do raio médio, mas sim uma flutuação em torno do valor médio.

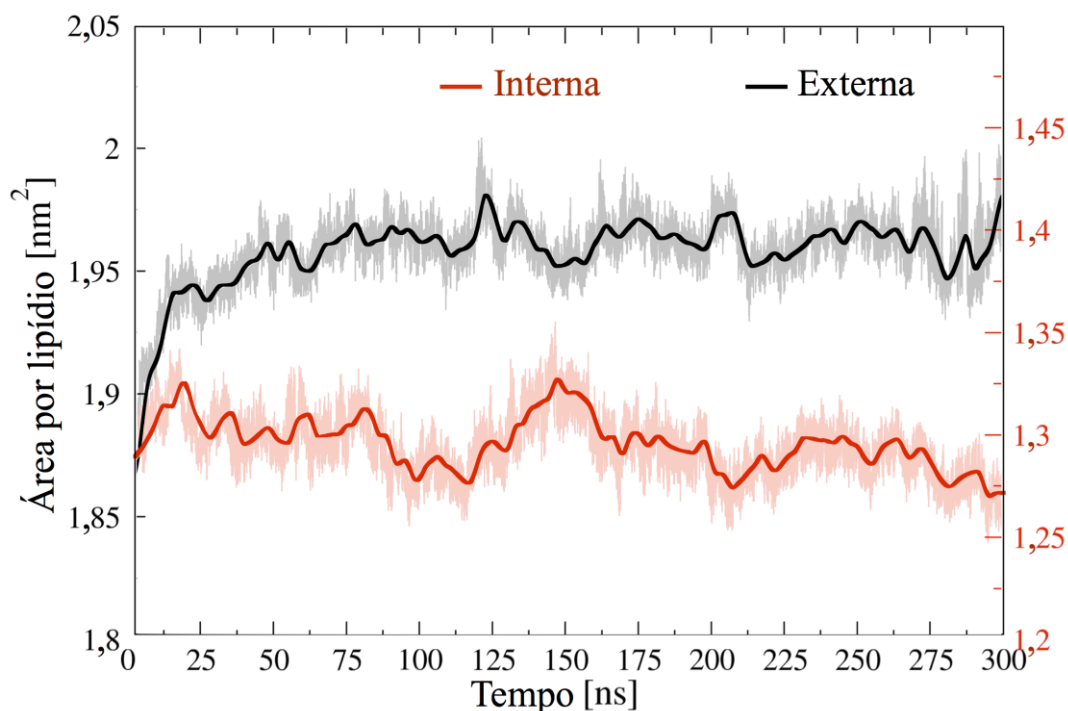


Figura 38. Área por lipídio para cada lamela compondo a vesícula de lipídio A. O perfil com linha mais forte corresponde ao resultado da aplicação do filtro implementado no SuAVE, com parâmetro de filtragem de 0,001.

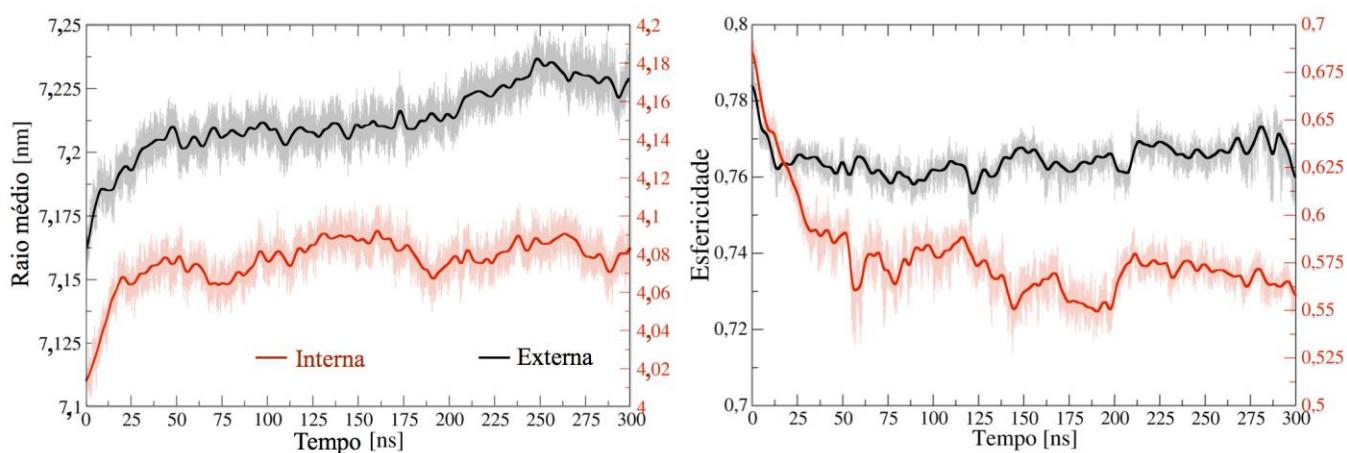


Figura 39. Raio médio e esfericidade, calculados para cada uma das lamelas compondo a vesícula de Lipídio A. O perfil com linha mais forte corresponde ao resultado da aplicação do filtro implementado no SuAVE, com parâmetro de filtragem de 0,001.

3.3.2 Espessura média e volume por lipídio

A aplicação da metodologia apresentada nas subseções 2.3.3 e 2.3.4 resulta nos dados mostrados na Figura 40. Nela, é possível avaliar como a espessura média e o volume por lipídio variam ao longo do tempo, na simulação da vesícula.

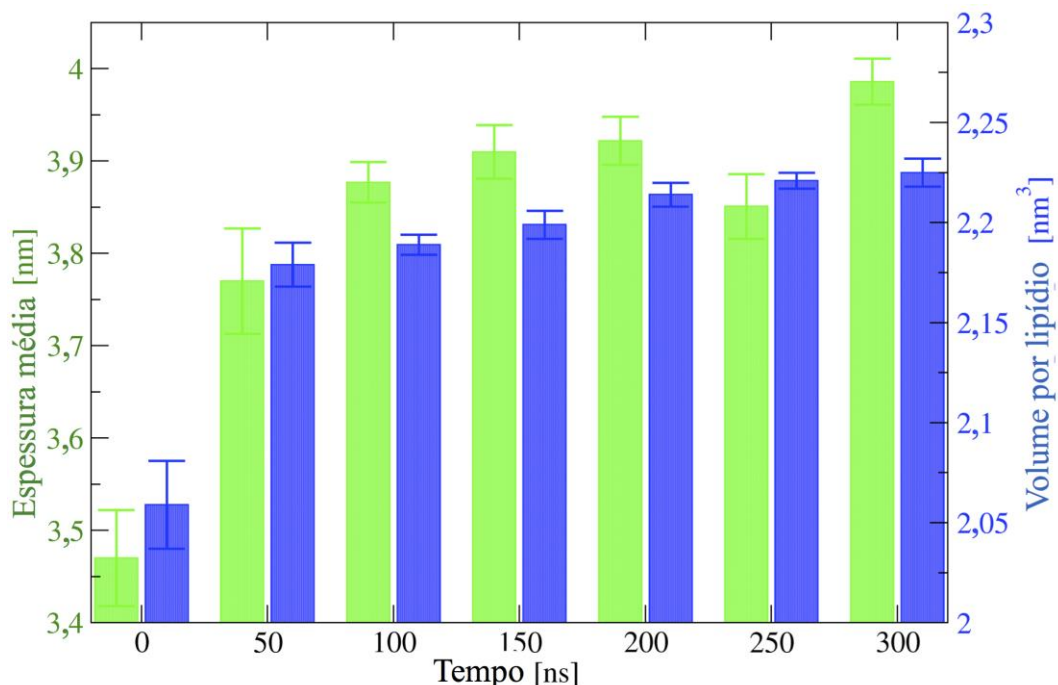


Figura 40. Espessura média e volume por lipídio calculados em intervalos de 50 ns, à exceção do primeiro e último valor apresentado, que foram obtidos durante os primeiros e últimos 25 ns de simulação.

Uma rápida análise do perfil acima revela uma concordância com os resultados apresentados na subseção anterior, para o raio médio. Como é de se esperar, o aumento do raio médio da estrutura, culmina no aumento do volume compreendido por esta. Além disso, a diferença entre o aumento proporcional entre o raio médio da camada externa e interna da vesícula explicam o incremento da espessura da estrutura lipídica, marcadamente nos primeiros 50 ns da simulação.

A metodologia descrita na subseção 2.3.3 também permite expressar a distribuição espacial da média temporal da espessura da vesícula. Esta distribuição é exibida na Figura 41, na forma de um gradiente de coloração que denuncia os locais, na vesícula, onde a espessura é mínima e máxima.

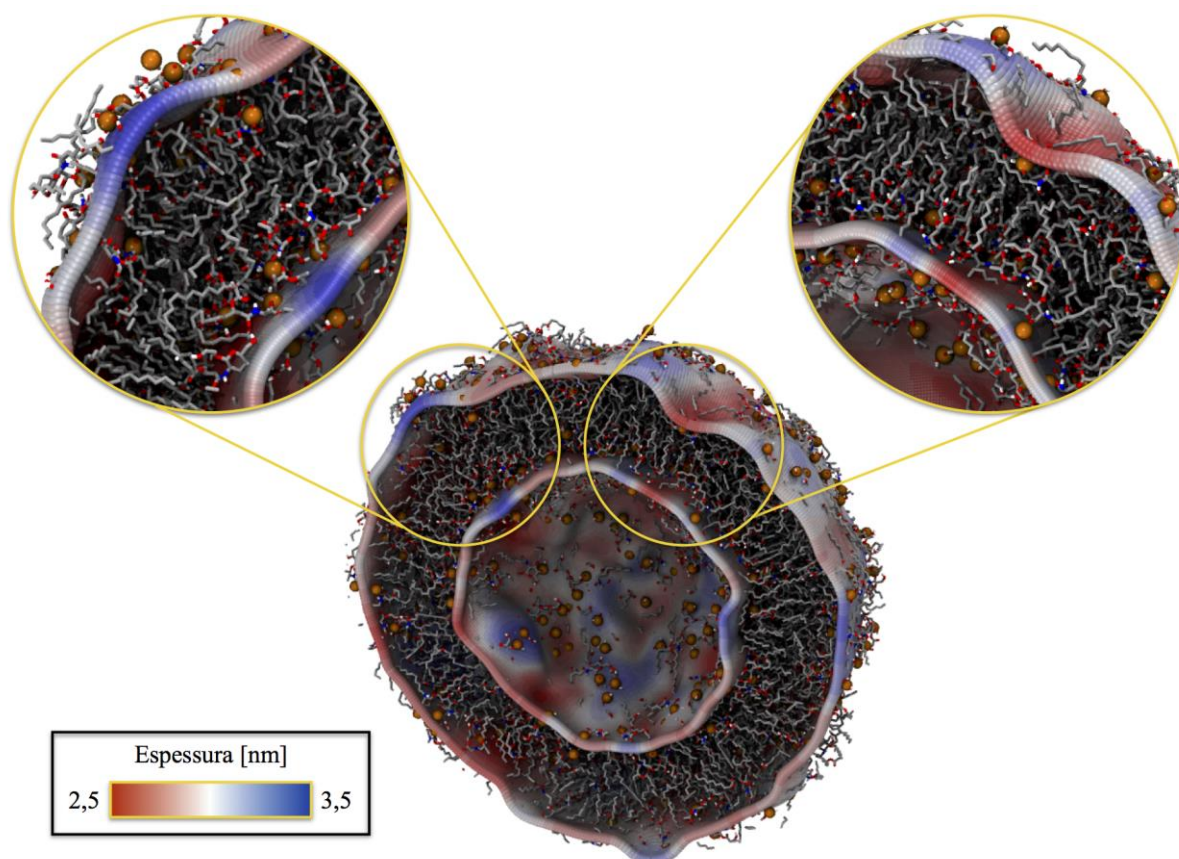


Figura 41. Distribuição espacial da média temporal da espessura da vesícula. Em destaque é possível avaliar pontos onde a espessura é máxima e mínima, com as colorações sendo, azul e vermelho, respectivamente. Estrutura corresponde ao primeiro frame da trajetória, após a estabilização.

Como é possível observar, esta metodologia permite avaliar como a espessura média varia em toda a extensão da vesícula, sendo particularmente útil quando há a necessidade de avaliar como a espessura de uma estrutura varia em função de perturbações inseridas na sua superfície.

Na Figura 41, não é possível observar um padrão bem definido de variação da espessura que relate o envolvimento de qualquer perturbação específica. Este resultado seria o esperado para uma simulação da vesícula em meio aquoso e sem adição de qualquer molécula de atue na superfície da vesícula, ou variação de condições termodinâmicas que a possam perturbar.

3.3.3 Parâmetro de ordem de curvatura

A metodologia descrita no tópico 2.3.5, quando aplicada a superfícies compactas, permite expressar a distribuição do parâmetro de ordem de curvatura sobre toda a extensão da interface em estudo. Utilizando, como no tópico anterior, o primeiro frame da trajetória da

vesícula, após a equilibração, como arquivo de entrada, é possível desenvolver o padrão exposto na Figura 42.

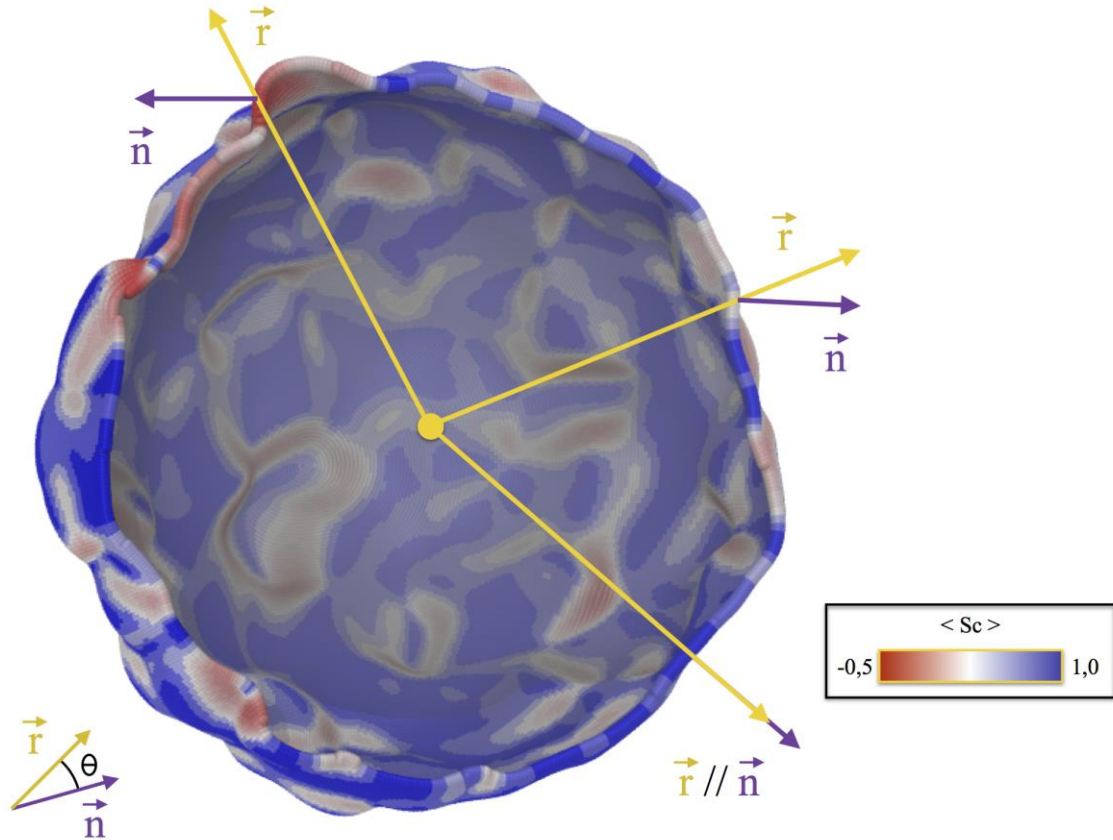


Figura 42. Distribuição do parâmetro de ordem de curvatura, Sc , para a superfície externa da vesícula. Os vetores em amarelo são vetores radiais, utilizados como referência para o cálculo de deflexão angular, enquanto que os vetores em roxo são os vetores normais à superfície de ajuste. A coloração é uma indicação visual do valor do parâmetro Sc .

Assim como no caso da espessura, não há um padrão bem definido sendo expresso nesta análise. Embora este comportamento seja esperado para o sistema, um único frame da trajetória não é capaz de transmitir todas as modificações estruturais que ocorreram durante a simulação. Estas modificações podem ser melhor compreendidas através do perfil dos valores médios do parâmetro de ordem de curvatura, calculados para todos os frames pertencentes à trajetória da simulação (Figura 43).

É evidente que a informação trazida por estes dados está em sintonia com a conclusão principal transmitida no gráfico do perfil de esfericidade (Figura 39). No início da simulação, a estrutura da vesícula se apresenta em formato mais esférico, denotando valores altos para a esfericidade e para o parâmetro de ordem de curvatura.

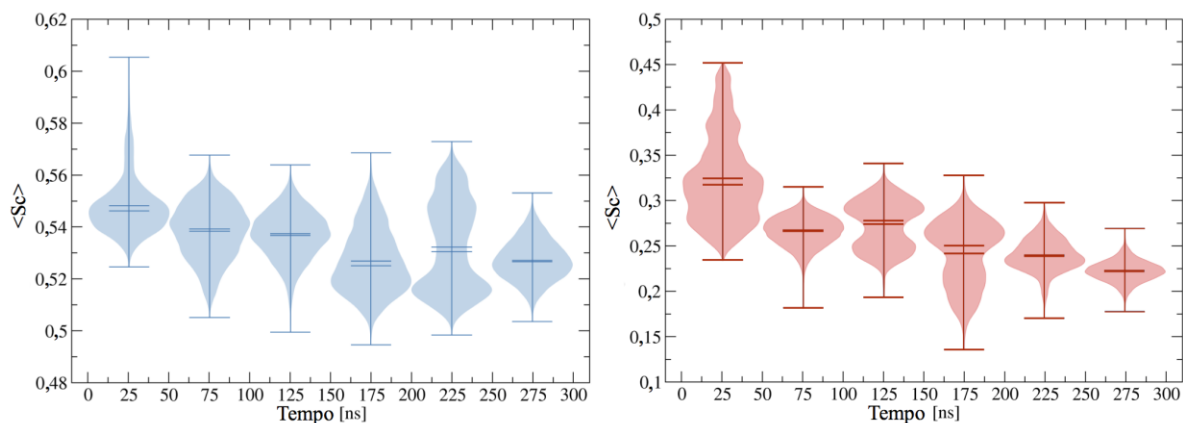


Figura 43. Gráfico de violino expressando os valores médios do parâmetro de ordem de curvatura, S_c , para intervalos de 50 ns da simulação. O gráfico à esquerda se refere à camada mais externa da vesícula, enquanto que o gráfico à direita se refere à camada mais interna.

Entretanto, durante a simulação, o intercâmbio estrutural da vesícula para morfologias menos análogas a uma esfera, pode ser observado. Este fenômeno é bem descrito pela diminuição do valor do parâmetro de ordem de curvatura médio e da esfericidade (Figura 42 e 39), e pode ser apreciado em ambas as camadas, interna e externa, da vesícula.

3.3.4 Perfil de densidade

Os perfis de densidade expostos na Figura 44, trazem informações relevantes acerca da distribuição espacial dos grupos químicos pertencentes ao sistema simulado, em função da distância destes grupos ao centro geométrico da vesícula.

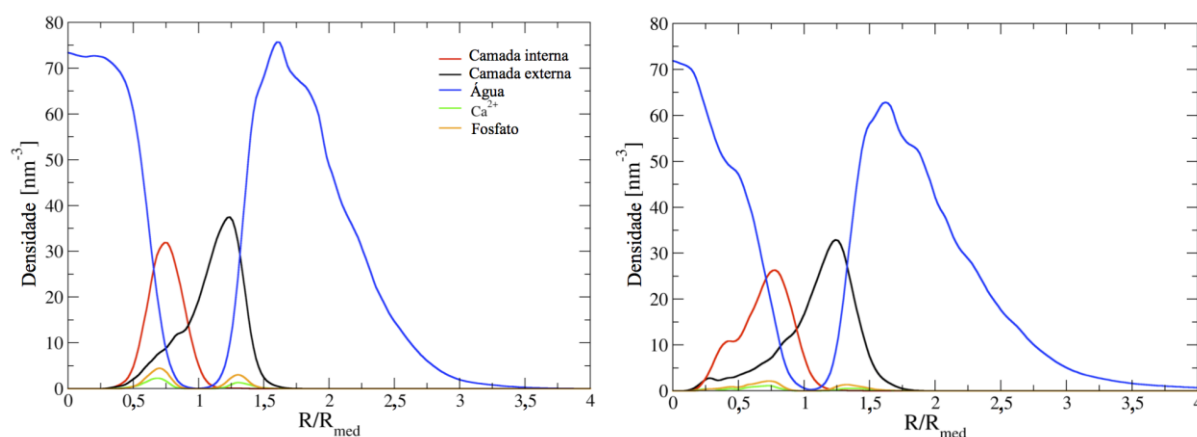


Figura 44. Perfil de densidade para os grupos químicos compondo o sistema em estudo. À esquerda está o perfil extraído no primeiro nanossegundo da simulação, enquanto que o perfil à direita apresenta o perfil extraído no último nanossegundo da simulação.

Com este tipo de avaliação, o eixo das abscissas se torna uma razão entre a posição radial de um grupo químico qualquer, em relação ao centro geométrico da vesícula, e o valor do raio da superfície intermediária entre a interface externa e interna da vesícula. Deste modo, quando um grupo químico qualquer estiver posicionado sobre o valor 1, no eixo das abscissas, indica que o grupo químico está na superfície média entre as interfaces interna e externa da estrutura. Caso o grupo químico esteja posicionado em um valor de 0,5, no eixo das abscissas, indica que ele está em uma camada interna da vesícula, enquanto que o valor de 1,5 indica que o grupo químico está posicionado na camada externa ou fora da vesícula.

Após esta rápida explanação, é possível ponderar que como as superfícies de ajuste utilizadas na avaliação deste sistema foram desenvolvidas sobre os fosfatos dos lipídios, então a região lipídica claramente deve se posicionar nas proximidades do valor 1, no eixo das abscissas. Esta afirmação é verificada sem maiores problemas, no perfil à esquerda, na Figura 44. Na realidade, para o perfil que descreve a configuração da vesícula no primeiro nanossegundo de simulação, os átomos pertencentes aos lipídios se estendem desde o valor de 0,5 até 1,5, sendo estes, portanto, os limites geométricos iniciais da camada lipídica da vesícula. É possível também verificar que não há presença significativa de moléculas de solvente na região lipídica da vesícula, mas sim nas suas interfaces, onde se apresentam os fosfatos e os íons de cálcio que neutralizam o sistema. Esta observação é comum a este tipo de sistema e apenas descreve a hidratação dos contraíons que neutralizam a carga negativa dos fosfatos pertencentes aos lipídios. Estes últimos também contribuem com parte da hidratação dos lipídios na região da interface com o solvente.

Em geral, o gráfico que descreve o perfil de densidade do primeiro nanossegundo de simulação, exemplifica o caso de uma vesícula que apresenta uma conformação aproximadamente esférica, e com uma distribuição sequencial de cada grupo químico que a compõe. Esta última observação é condizente com o início de uma simulação, onde não houve amostragem suficiente para verificar mudanças morfológicas da estrutura. Em contrapartida, o gráfico à direita, na Figura 44, exibe a distribuição espacial dos grupos químicos compondo o sistema ao final de 300 ns de simulação. A perturbação na distribuição dos perfis, em relação ao perfil inicial, advinda das mudanças morfológicas que ocorreram durante a simulação, é patente.

Ainda não se observam moléculas de solvente na região lipídica, entretanto, o perfil mais amplo de distribuição dos lipídios no sistema, demonstra que há uma maior presença de cadeias lipídicas na cavidade da vesícula, onde há o confinamento de moléculas de água. Esta presença é consequência da adoção de uma morfologia muito distinta da inicial, e que

apresenta curvaturas locais acentuadas. Esta conclusão é confirmada pela diminuição dos valores de parâmetro de ordem de curvatura, Sc , na Figura 43, da esfericidade, na Figura 39, e através de uma análise visual, na Figura 45.

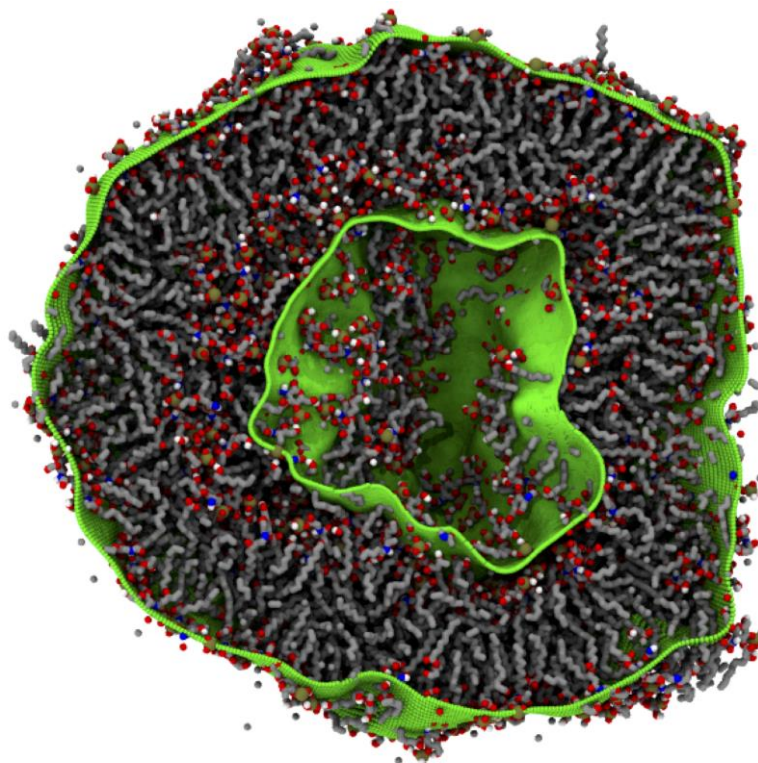


Figura 45. Corte transversal da estrutura final da vesícula. Em verde, estão representadas as superfícies de ajuste geradas pelo SuAVE sobre os fosfatos (oxigênios em vermelho e fósforo em amarelo palha) dos lipídios (em cinza) compondo a vesícula. Para a fabricação da figura, a ondulação da superfície de ajuste foi atenuada em 30% através da utilização do parâmetro de rugosidade (flag *-rough*, utilizada na linha de comando) igual a 0,7.

Uma rápida análise desta imagem indica a presença de cadeias lipídicas dentro da cavidade da vesícula. A adoção de uma estrutura eminentemente deformada, em comparação com uma esfera, causa desorganização das cadeias lipídicas, como pode ser observado na figura, e favorece a entrada de cadeias alquílicas na cavidade interna onde há presença de moléculas do solvente, explicando assim, o perfil de densidade apresentado. Avaliações mais complexas acerca da composição química do lipídio presente na vesícula e das propriedades físico-químicas que impactam diretamente o fenômeno sendo observado podem ser de valiosa contribuição para pesquisas acerca do comportamento deste tipo de estrutura. Entretanto, o objetivo deste trabalho desdobra-se apenas sobre a avaliação estrutural de sistemas biológicos apresentando interfaces abertas ou fechadas, através da aplicação da metodologia, aqui, pormenorizada.

3.3.5 Momentos principais de inércia

Neste último tópico de resultados das análises estruturais da vesícula de lipídio A, é apresentada a avaliação dos momentos principais de inércia para as interfaces de ajuste da vesícula, durante toda a trajetória da simulação.

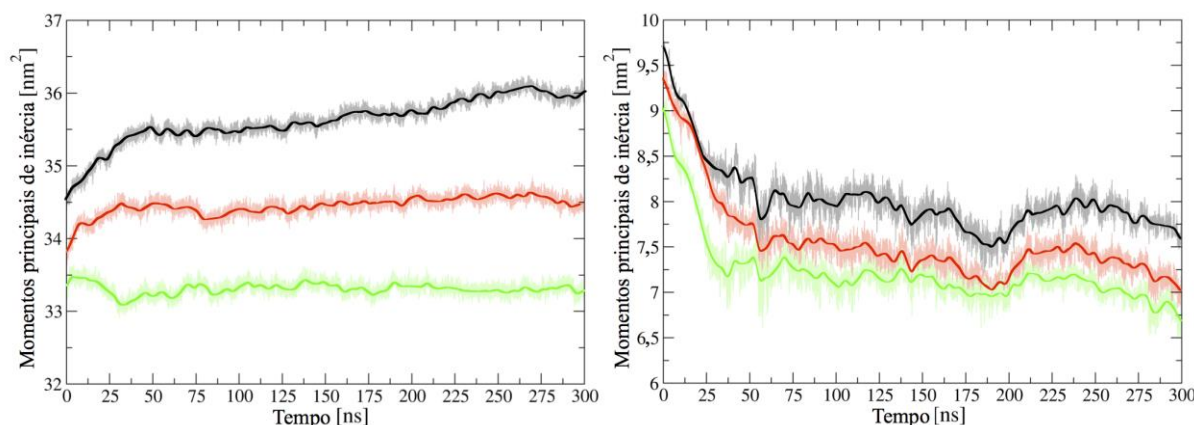


Figura 46. Momentos principais de inércia calculados a partir das interfaces externa (à esquerda) e interna (à direita) da vesícula.

Nestes perfis, os valores absolutos dos momentos principais de inércia não trazem consigo informações tão úteis quanto a sua variação. Em geral, a razão entre os valores dos momentos principais de inércia fornece indicativo do formato adotado pela vesícula ao longo da simulação. Entretanto, como observado nos trabalhos de Zhang *et al.* (2016) e Germain, Maysinger e Glavinovic (2006), não há definição acertada para o caso exposto na Figura 46. É possível avaliar que os valores dos três momentos de inércia são próximos, mas não o suficiente para definir uma estrutura perfeitamente esférica. Além disso, cada momento de inércia adota um valor diferente, excluindo a possibilidade da estrutura ser classificada como oblata ou discoidal.

O perfil dos momentos principais de inércia da superfície externa da vesícula revela influência do raio médio da estrutura (Figura 46). Como o momento de inércia é uma propriedade que depende da coordenada radial dos pontos da superfície, é intuitivo verificar que quanto maior o raio médio da superfície, maior o momento de inércia calculado. O mesmo raciocínio pode ser aplicado ao perfil apresentado pela estrutura interna da vesícula. Entretanto, há uma contribuição da morfologia desta estrutura que ocasiona a diminuição gradativa do momento de inércia da superfície à medida que a esfericidade da diminui. Em outras palavras, mesmo que o raio médio da interface interna da vesícula aumente lentamente, a alteração da sua morfologia faz com que o momento de inércia calculado diminua.

Este tipo de avaliação é particularmente útil para verificar a rigidez da estrutura e, conseqüentemente, para estudar o tipo e intensidade das interações existentes entre as moléculas compondo a vesícula. Trabalhos como o de Zhang *et al.* (2016) servem como ponto de partida para este tipo de avaliação.

3.4 CONSIDERAÇÕES ACERCA DOS AJUSTES REALIZADOS E TEMPO DE PROCESSAMENTO DAS ANÁLISES

3.4.1 Superfícies abertas: Bicamadas lipídicas

Neste tópico, serão brevemente descritos alguns detalhes acerca da construção da superfície de ajuste realizada pelo programa SuAVE sobre as superfícies químicas estudadas. Como descrito rapidamente no tópico 3.1, além de avaliar a convergência dos resultados em relação a resolução da malha sempre é necessário discutir a representatividade dos átomos da superfície em estudo em termos da configuração da malha de ajuste. Como a densidade dos átomos pertencentes às superfícies amostrais e utilizados nos procedimentos de ajuste foi baixa, é possível que alguns dos pontos não se encontrem sobre a malha de ajuste desenvolvida pelo SuAVE. Por esse motivo é necessária a avaliação da distância média quadrada (RMSD) entre os átomos das superfícies amostrais e os pontos das malhas de ajuste.

Tabela 5. Valor de RMSD médio calculado para as análises realizadas para os sistemas simulados e o tempo médio de processamento destas análises para os 120000 frames da trajetória.

Análise	RMSD (nm)				Tempo (h)
	C_H_C14_343	C_T_C10_300	P_H_C10_315	P_H_C10_328	
<i>s_area</i>	0,12 (0,01)	0,19 (0,02)	0,112 (0,005)	0,135 (0,007)	2,227
<i>s_dens</i>	0,124 (0,003)	0,206 (0,003)	0,106 (0,002)	0,143 (0,003)	16,567
<i>s_thick</i>	0,12 (0,01)	0,19 (0,02)	0,112 (0,005)	0,135 (0,007)	2,100
<i>s_order</i>	0,13 (0,02)	0,19 (0,03)	0,100 (0,005)	0,13 (0,01)	1,517

A Figura 47 descreve o valor do RMSD calculado para a análise de área interfacial por lipídio de cada um dos sistemas. Os valores calculados para as demais análises encontram-se

na Tabela 5, assim como o tempo médio de processamento necessário para a realização de cada uma.

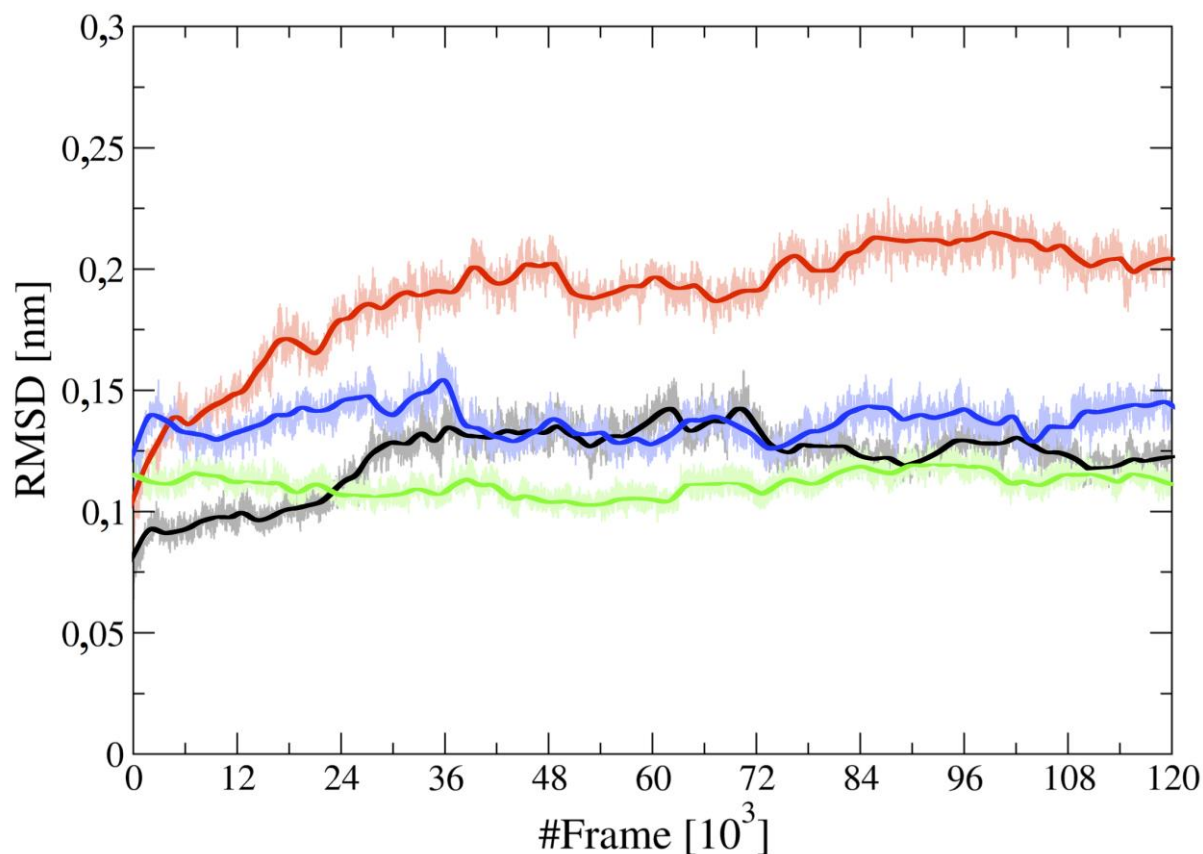


Figura 47. Evolução do RMSD calculado para a análise de área interfacial por lipídio para cada um dos sistemas descritos na Tabela 1. O sistema C_H_C14_343 está em preto, o sistema C_T_C10_300 está em vermelho, o sistema P_H_C10_315 está em verde e o sistema P_H_C10_328 está em azul.

É possível constatar que os valores de RMSD calculados para cada uma das análises são muito baixos, o que significa que as superfícies de ajuste construídas a partir das superfícies químicas dos diferentes sistemas simulados reproduzem precisamente as configurações espaciais dessas interfaces ao longo do tempo (Figura 47). Isto pode ser também constatado pela sobreposição da superfície de ajuste sobre cada uma das bicamadas lipídicas simuladas (Figura 31). A evolução do valor de RMSD para os sistemas simulados pode ser relacionada ao cálculo do parâmetro de ordem de curvatura (Figura 36). Em ambas as quantidades há uma separação entre os valores atribuídos aos sistemas planos ou suavemente curvados, e o sistema C_T_C10_300 que possui uma curvatura acentuada (Figuras 25 e 30). Essa relação demonstra que a distância média entre os átomos da superfície química e os pontos da superfície de ajuste aumenta concomitantemente com o aumento da curvatura presente em uma superfície. Esse aumento, entretanto, é muito pequeno e pode ser facilmente corrigido

pela utilização de mais pontos amostrais para desenvolvimento da superfície de ajuste. Para os sistemas estudados, os valores de RMSD calculados mostram que os procedimentos de ajuste foram satisfatórios também para o sistema exibindo uma curvatura acentuada.

Uma última consideração deve ser feita em relação ao tempo de processamento das análises. Como os programas compondo o SuAVE para superfícies abertas apresentam funcionamento em série, quer dizer, não possuem execução paralela dividida entre diferentes núcleos de processamento, o tempo requerido por cada análise é significativo. Em especial, para a análise de densidade, que por necessitar de trajetórias que contenham todos os átomos do sistema, tem velocidade de execução 8 vezes menor que o dos demais programas. Devido a isso, as análises de densidade foram realizadas para os primeiros e últimos 1000 frames das trajetórias estudadas.

3.4.2 Superfícies fechadas: Vesícula

Com a finalidade de realizar as mesmas considerações delineadas no tópico anterior, se faz necessária a avaliação do resultado do processo de preparação da superfície de ajuste de cada uma das interfaces da vesícula, interna e externa. Essa separação é necessária, uma vez que os formatos destas interfaces, ao contrário das interfaces abertas, se diferenciam sensivelmente ao longo da simulação, chegando a apresentar valores de RMSD excepcionalmente discrepantes.

Como pode ser observado na Figura 48, os valores de RMSD calculados entre as superfícies de ajuste e as interfaces lipídicas da vesícula demonstram que o protocolo de ajuste foi mais bem sucedido na montagem da superfície externa do que na montagem da superfície interna. De fato, os perfis observados na figura denunciam que a distância média entre os fosfatos, utilizados como pontos amostrais das interfaces lipídicas, e os pontos do *grid* de ajuste de cada interface, é significativamente maior no caso da camada interna da vesícula, chegando a um valor médio de $0,59 \pm 0,01$ nm para os últimos 50 ns da simulação. Por outro lado, o processo de ajuste da superfície externa apresenta $0,24 \pm 0,01$ nm de RMSD médio, extraído dos últimos 50 ns da simulação. Apenas 40,7 % do distanciamento médio observado para a camada interna.

Esses dados, quando complementados com o parâmetro de ordem de curvatura, esfericidade e momentos principais de inércia de cada superfície de ajuste, evidenciam a limitação da metodologia apresentada neste trabalho. É incontestável a influência da morfologia da interface e da densidade de pontos amostrais, durante o processo de ajuste.

Embora a metodologia apresentada tenha sido desenvolvida para lidar com as mais diversas morfologias, é necessário que haja uma compensação entre a rugosidade da superfície e a densidade de pontos amostrais utilizados no processo de ajuste. Quanto maior a rugosidade da superfície amostral, ou flutuação dos pontos amostrais, maior deve ser a densidade de pontos fornecidos ao programa, para realização do processo de ajuste. Desta forma, o elevado valor médio do RMSD entre a superfície de ajuste e a interface interna da vesícula, juntamente com o baixo valor da esfericidade e parâmetro de ordem de curvatura desta mesma superfície, indicam que a alteração estrutural desta interface, observada ao longo da simulação, prejudica o processo de elaboração da superfície de ajuste.

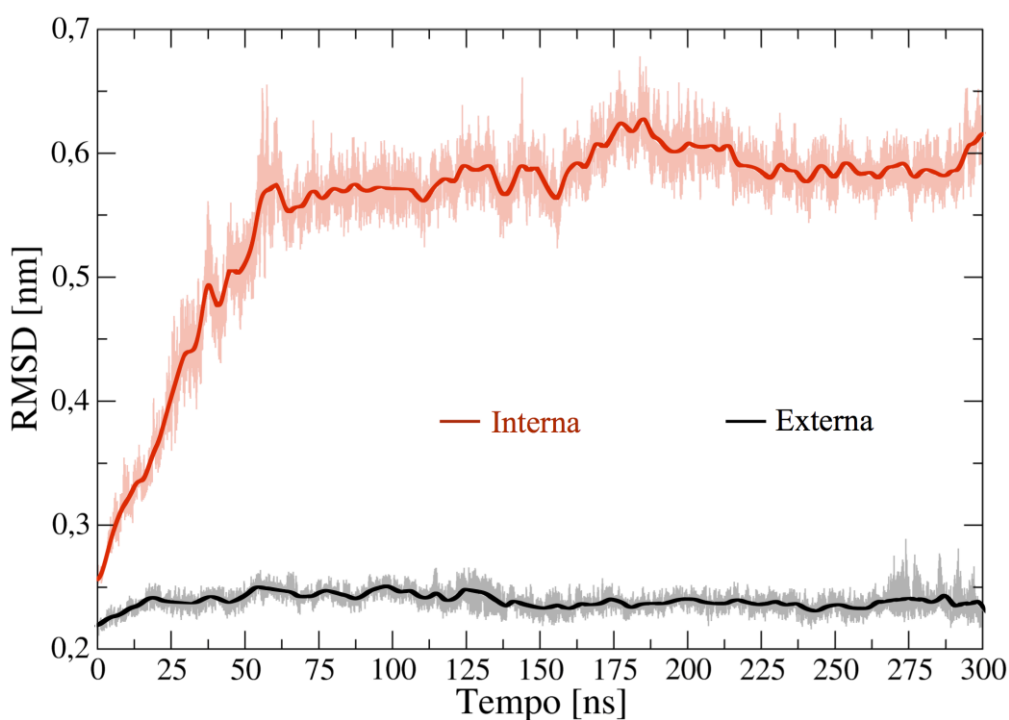


Figura 48. Evolução do RMSD calculado para a análise de área interfacial por lipídio para cada um dos sistemas descritos na Tabela 1.

O aumento do distanciamento médio entre os pontos amostrais e a superfície de ajuste poderia ser interrompido, caso fosse fornecido ao algoritmo de ajuste, uma maior densidade de pontos amostrais. Este procedimento seria capaz de promover uma melhor adequação da superfície de ajuste em relação a interface lipídica, diminuindo o valor de RMSD, e refinando o valor das propriedades geométricas mensuradas ao longo da simulação. Uma síntese desta proposta pode ser observada na Figura A8 do Apêndice B.

Após as considerações acerca da dependência entre a rugosidade da superfície amostral e da densidade de pontos utilizados para realizar o processo de ajuste, e das inferências

descritas a respeito dos valores de RMSD calculados ao longo da simulação, é possível avaliar com maior prudência os dados apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Valor de RMSD médio calculado para os últimos 50 ns das análises realizadas, número de átomos presentes nas trajetórias, espaço em disco ocupado pela trajetória e o tempo médio de processamento destas análises para toda a trajetória, 150000 frames. O tempo de processamento foi medido em uma máquina 64 bits com 2 processadores Intel Xeon E5-2650 de 2,30 GHz de *clock* interno, utilizando um valor máximo de 40 threads de processamento.

Análise	RMSD (nm)	Nº átomos	Tamanho	Tempo (h)
<i>s_spher</i>	0,388 (0,008)	1288	14,4 Gb	16,00
<i>s_densph</i>	0,388 (0,008)	707696	8.100,0 Gb	58,33
<i>s_shell</i>	0,388 (0,008)	1288	14,4 Gb	15,33
<i>s_bend</i>	0,237 (0,007)	1288	14,4 Gb	11,58
<i>s_inertia</i>	0,237 (0,007)	1288	14,4 Gb	15,33

Duas conclusões principais podem ser extraídas a partir dos dados da tabela. A primeira diz respeito aos valores médios de RMSD, calculados para os últimos 50 ns de simulação. Das análises apresentadas, a *s_spher*, *s_densph* e a *s_shell* utilizam dois *grids* de ajuste, um para cada interface da vesícula e, portanto, o valor médio de RMSD apresentado possui uma contribuição de cada *grid* de ajuste. Por outro lado, a *s_bend* e *s_inertia* apenas realizam o ajuste sobre uma interface química, que no caso da Tabela 6, foi a camada externa da vesícula. Esta informação explica o porquê dos valores de RMSD serem maiores nas três primeiras ferramentas apresentadas do que nas últimas.

A segunda consideração a ser feita diz respeito ao tempo de processamento das ferramentas. Como pode ser constatado na Tabela 6, o tempo de processamento da ferramenta *s_densph* é significativamente maior do que o necessário pelas demais ferramentas para analisar completamente a trajetória de 150000 frames, compondo os 300 ns de simulação. Esta diferença é advinda do fato de apenas a ferramenta *s_densph* necessitar de uma trajetória onde cada frame é composto por todos os átomos do sistema. Nas demais ferramentas apenas a posição dos átomos que serão utilizados como referência no processo de ajuste se faz necessária. No caso do sistema em investigação, apenas os átomos de fósforo são descritos em cada frame da trajetória.

Embora as ferramentas utilizadas no estudo morfológico da vesícula tenham sido atualizadas para executarem um processamento paralelo durante os *loops* de desenvolvimento

dos *grids* de ajuste e durante as análises propriamente ditas, a tarefa de leitura de cada frame da trajetória é realizada de forma sequencial, permitindo que o número de átomos descritos impacte diretamente o tempo de processamento do programa. Por esta razão as análises de densidade apresentadas no tópico 3.3.4 representam apenas 1 nanossegundo da trajetória, de modo a compensar o tempo demasiado para a finalização da análise. Além disso, um outro aspecto equivalente ao tempo de processamento da ferramenta de análise é o espaço em disco necessário para armazenar toda a informação a ser utilizada por cada análise do SuAVE. Como pode ser avaliado na tabela, caso todos os frames da trajetória fossem utilizados na análise de densidade, seria necessário um espaço em disco equivalente a 8,1 Tb. Este cenário é obviamente contraprodutivo, uma vez que o perfil de densidade é uma propriedade que apresenta pequena variação ao longo da simulação, não necessitando mais do que alguns nanossegundos da trajetória para extrair uma composição espacial representativa, com pequenas flutuações e que seja capaz de exprimir, satisfatoriamente, um “instante” da simulação. Por este motivo, apenas um nanossegundo da trajetória foi utilizado para extrair os perfis de densidade apresentados no tópico 3.3.4. Uma descrição mais detalhada acerca do tempo requerido para completa execução de cada etapa de processamento das ferramentas do SuAVE é apresentada no Apêndice H.

3.5 TRABALHOS QUE UTILIZARAM O SuAVE

Neste tópico seguem alguns estudos de caso, onde o SuAVE já foi utilizado. Como não são resultados pertencentes ao trabalho aqui descrito, será realizado um breve resumo de como a ferramenta foi utilizada e com que finalidade, além de mostrar como a metodologia computacional desenvolvida foi útil para resolver o problema de cada estudo.

3.5.1 Atividade de antimicrobianos sobre a estrutura de membranas externas de bactérias Gram-negativas

O foco do trabalho de Santos *et al.* (2017) foi em realizar um estudo comparativo entre a interação de peptídeos antimicrobianos e membranas externas de diferentes quimiotipos de *P. aeruginosa*. Para avaliar como a presença do antimicrobiano afetava a conformação espacial das membranas dos diferentes quimiotipos, foram realizados estudos estruturais com auxílio das ferramentas do SuAVE.

Através desses estudos foi possível verificar que a presença dos antimicrobianos induzia formação de curvatura positiva nas membranas de quimiotipos suscetíveis a esses agentes. Nos quimiotipos resistentes nenhuma alteração da conformação das membranas pôde ser verificada. Foi também mostrado que a formação da curvatura alterava a espessura local das bicamadas, de modo que, ela apresentava-se maior nas regiões próximas aos antimicrobianos e onde havia variação da curvatura da membrana, assim como também foi exposto no tópico 3.2.3 deste trabalho.

No trabalho de Santos *et al.* (2017) os átomos de fósforo do grupo diacetilglucosamina de diferentes variantes químicos de lipopolissacarídeo (LPS) foram utilizados para a construção da superfície de ajuste. Foi utilizada uma malha com resolução de 10201 pontos (100X100 divisões) a qual resultou em um RMSD máximo de até 0,16 nm entre os átomos de fósforo e os pontos da superfície de ajuste. A densidade amostral de átomos de fósforo variou de 1,2121 até 1,4815 átomos por nm², sendo suficiente para capturar as flutuações atômicas das membranas simuladas tanto na presença como na ausência dos antimicrobianos.

3.5.2 Efeito de diferentes modelos de água e tratamentos eletrostáticos de longa distância em membranas externas de bactérias Gram-negativas

O foco do trabalho de Lima *et al.* (2019) foi a análise do efeito de diferentes tipos de modelo de água, a saber SPC e SPC/E, e de tratamentos eletrostáticos de longa distância, a saber *Reaction Field* versus *Particle Mesh-Ewald*, no ensemble estrutural de modelos computacionais de membranas externas bacterianas de *P. aeruginosa*. Assim como no trabalho anterior, para avaliar quantitativamente essas modificações, foram utilizadas as ferramentas que fazem parte do SuAVE.

No trabalho de Lima *et al.* (2019) foi reportado que não houveram modificações significativas na estrutura das membranas simuladas em resposta aos diferentes modelos de água e tratamento eletrostático de longa distância descritos acima. Esta conclusão baseiou-se na comparação de propriedades estruturais como área por lipídio, espessura das bicamadas, volume por lipídio, distribuição de desvio angular das superfícies em relação ao vetor normal aos sistemas e distribuição do parâmetro de ordem. Em todas as análises, os valores calculados estavam dentro de um erro aproximado de 4% em relação a média dos valores. Algumas pequenas diferenças foram observadas apenas nos valores de área por lipídio entre os sistemas utilizando modelo de água SPC e SPC/E. Essas modificações foram mostradas serem devidas a maior penetração de moléculas do solvente no núcleo hidrofóbico das membranas e diminuindo o empacotamento das moléculas de lipídio.

Nestas análises, átomos de fósforo foram utilizados para a construção da superfície de ajuste pelo SuAVE. Foram utilizadas malhas de ajuste com resolução de 10201 pontos (101X101 divisões), gerando um RMSD máximo de aproximadamente 0,112 nm entre os átomos de fósforo e os pontos da superfície de ajuste. A densidade amostral média de átomos de fósforo na superfície das membranas foi de 0,6595 átomos por nm², e foi suficiente para capturar as modulações estruturais das membranas estudadas, uma vez que todas se encontravam em uma configuração aproximadamente plana.

3.5.3 Efeito de protocolos de equilibração sobre a construção de *ensembles* de estruturas de bicamadas de glicolipídios carregados

No trabalho de Messias *et. al* (2020) foram estudados os efeitos estruturais em membranas de glicolipídios carregados, causados por modificações nos protocolos de equilibração da simulação. Foram realizadas diferentes simulações em diversas alternativas do protocolo de equilibração das bicamadas e os resultados foram comparados através de análises estruturais, em sua maioria, extraídas com auxílio das ferramentas implementadas no SuAVE.

No artigo foram utilizadas as ferramentas para o cálculo de volume da camada lipídica, área interfacial por lipídio e ângulo de deflexão, com a finalidade de discriminar ondulações promovidas nas bicamadas, causadas pelas modificações nos protocolos de equilibração. Estas medidas foram capazes de demonstrar que em protocolos que não possuíam etapas de equilibração no ensemble NVT possuíam maior probabilidade de promover estruturas excêntricas, geralmente caracterizadas pela formação de bolhas sem a presença de qualquer átomo no seu interior, ou estruturas onde era possível observar a entrada exagerada de moléculas de água no interior da camada lipídica.

3.5.4 Estudo da lipofilicidade de moléculas de colesterol descritas por diferentes modelos Coarse-Grain

No trabalho de Fornasier *et al.* (2020) os autores utilizam o SuAVE para comparar diferentes modelos Coarse-Grain para moléculas de colesterol através de estudos de lipofilicidade e da interação destas moléculas com bicamadas compostas por POPC.

Neste estudo o SuAVE foi utilizado para calcular a área por lipídio da membrana de POPC quando na presença de diferentes concentrações de moléculas de colesterol. Foi possível constatar que o aumento da concentração de colesterol na membrana promoveu um aumento na sua espessura, e uma consequente diminuição da área por lipídio. Os dados obtidos através do SuAVE foram comparados com outra ferramenta desenvolvida para calcular a área por lipídio da membrana de POPC, a saber, o GridMAT-MD, já descrito na introdução. Os autores observaram que os resultados obtidos por ambos programas foram estatisticamente idênticos, fornecendo uma comparação direta entre as duas metodologias e mais uma validação dos resultados obtidos com a metodologia do SuAVE.

4 CONCLUSÕES

O trabalho mostrou, através de todos os resultados, como a metodologia apresentada é capaz de descrever detalhadamente a configuração espacial de superfícies de membranas e vesículas lipídicas. Essa descrição não só supera os problemas e limitações encontrados nas ferramentas computacionais disponíveis na literatura, como apresenta características especiais. A diferenciabilidade da superfície de ajuste desenvolvida pelo SuAVE, sobre as interfaces estudadas, garante à ferramenta a possibilidade de avaliar propriedades geométricas intrínsecas das superfícies ajustadas. Com ajuda de operadores lineares utilizados no campo da Geometria Diferencial é possível computar o valor das curvaturas Gaussiana e média das superfícies de ajuste. Essas, por sua vez, capacitam o programa a descrever variações na energia de deformação elástica dos sistemas em estudo, pela utilização do modelo de Helfrich.

Em relação ao ajuste realizado para execução das etapas de análise estrutural das membranas lipídicas estudadas, foi possível constatar, através dos baixos valores de RMSD entre os pontos da superfície ajustada e os átomos da interface amostral, que as malhas desenvolvidas sobre cada uma das superfícies estudadas conseguem explicar eficientemente as configurações espaciais dessas interfaces. Essa afirmação, também justificada pela Figura 31, mostra quão eficiente foi o procedimento de ajuste realizado pelo programa e validam os resultados obtidos através dessa metodologia. Uma vez cumprida essa exigência para a correta utilização do programa, é possível deliberar acerca dos resultados encontrados para cada uma das análises mostradas no trabalho.

Os cálculos de área interfacial por lipídio foram capazes de estimar, para cada sistema em estudo, valores condizentes com os dados apresentados nos trabalhos de Nascimento *et al.* (2014) e Kim *et al.* (2016). Foi possível mostrar que para sistemas apresentando uma configuração plana, as estimativas da área interfacial por lipídio calculadas pela projeção da membrana sobre o plano xy e pela abordagem do SuAVE são muito similares, como seria de se esperar, uma vez que não há incremento da área interfacial pela presença de curvatura na superfície da membrana. Entretanto, como pôde ser visto, os resultados advindos da área projetada sobre o plano xy subestimam sistematicamente o parâmetro de empacotamento das membranas. Os valores calculados por essa abordagem chegam a ser 3.87% e 11.57% menores que os resultados apresentados pelo SuAVE para os sistemas C_H_C14_343 e C_T_C10_300, respectivamente.

Os perfis de densidade calculado para os sistemas em estudo corroboram com as conclusões da análise de área. É possível verificar que para sistemas apresentando uma

configuração plana, os perfis calculados pela metodologia das fatias planas se equivalem aos elaborados pela abordagem do SuAVE. Entretanto, isso não se verifica quando na análise dos sistemas apresentando uma superfície não plana. Como verificado na Figura 30, os perfis de densidade obtidos para os sistemas C_T_C10_300 e C_H_C14_343 pela utilização das duas metodologias são significativamente diferentes. Os perfis obtidos através da análise do SuAVE explicam a estrutura visualizada na Figura 31, o que sugere a incoerência dos resultados obtidos pela metodologia mais simples, utilizada nas ferramentas atuais.

As outras rotinas apresentadas não podem ser comparadas com os resultados apresentados nos programas encontrados na literatura especializada. Entretanto, dão um testemunho das capacidades da ferramenta em descrever detalhadamente as modificações estruturais sofridas nas superfícies em estudo. Através do parâmetro de ordem de curvatura e da espessura das bicamadas, foi possível entender como a configuração espacial da membrana lipídica modifica suas propriedades estruturais. Ao observar os mapas bidimensionais dessas análises, o usuário do programa rapidamente pode constatar como a curvatura afeta a espessura das membranas e de como isso pode afetar na função biológica desses sistemas. Esse, por exemplo, foi o caso apresentado no trabalho de Santos *et al.* (2017), onde a formação de curvatura por parte de uma membrana externa de *P. aeruginosa* estava relacionada com sua suscetibilidade à classe de antimicrobianos derivados das polimixinas.

As análises realizadas sobre as superfícies fechadas presentes na vesícula lipídica estudada mostram, com riqueza de detalhes, como a metodologia implementada no SuAVE é capaz de auxiliar o correto entendimento acerca das mudanças morfológicas que esta estrutura sofre ao longo da simulação. Embora os valores absolutos de cada propriedade geométrica mensurada não possam ser diretamente comparados com dados disponíveis na literatura, a relação entre as propriedades medidas revela como a alteração morfológica afeta os parâmetros de área por lipídio, espessura, volume por lipídio e a distribuição espacial dos grupos químicos compondo o sistema, através dos perfis de densidade. Estas relações cuja aplicabilidade foi demonstrada na análise estrutural da vesícula, são inteiramente desdobradas para o estudo de outras superfícies fechadas, não apenas compostas por lipídios, mas qualquer interface química capaz de ser representada, em toda a sua extensão, por um grupo químico que a componha.

Além da análise dos resultados extraídos do programa é possível deliberar sobre seu custo de execução quando comparado com os outros programas disponíveis na literatura. O SuAVE já apresenta execução paralela, obtida com auxílio da Interface de Programação de Aplicativo (API) OpenMP, o que lhe torna um algoritmo competitivo frente às ferramentas encontradas

na literatura. Não fosse esta implementação, as análises realizadas sobre o sistema da vesícula lipídica tornar-se-iam impraticáveis, com os recursos computacionais à nossa disposição. Além disso, sua utilização de memória RAM não passou de 40 Mb durante as análises que compuseram esse trabalho, mostrando sua significativa leveza, comparada aos 100 Mb do FATSLiM e principalmente dos muitos gigabytes necessários para execução do APL@VORO (BUCHOUX, 2017).

Buchoux (2017), no seu trabalho afirma que o FATSLiM é o primeiro programa a poder analisar área por lipídio e espessura de membranas lipídicas distorcidas ou curvadas, além de micelas e vesículas. Entretanto, é possível afirmar ao final desse trabalho, que o SuAVE não só é capaz de realizar as mesmas análises, como traz muitas outras. Parafraseando respeitosamente o autor dessa ferramenta, o SuAVE é o primeiro programa a utilizar superfícies de ajuste diferenciáveis, possibilitando a análise de propriedades geométricas e energéticas de interfaces sem necessidade de algoritmos aproximados. É o primeiro programa capaz de avaliar a morfologia de diversas interfaces químicas, não apenas membranas lipídicas, como no caso de todos os programas citados, mas também de interfaces entre líquidos distintos. Pode ser utilizado para avaliar propriedades de quaisquer superfícies de interesse com a única exigência de lhe ser fornecido um arquivo de configuração em formato PDB. Possui instalação simples e pode ser utilizado em qualquer sistema operacional. Não requer programas que lhe façam intermédio de comunicação com o usuário, como é o caso do MEMBPLUGIN (GUIXA- GONZALEZ *et al.*, 2014).

Através de todas essas características, o SuAVE demonstrou maior versatilidade e potencial para lidar com a análise estrutural de um mais amplo conjunto de sistemas, podendo contribuir significativamente na análise de simulações computacionais e no estudo energético de interfaces.

REFERÊNCIAS

- ABREU, S. M. **Geometria esférica e trigonometria esférica aplicadas à astronomia de posição**. UFSJ, Trabalho de Conclusão de Curso do Mestrado Profissional PROFMAT, São João del-Rei, 2015.
- 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, W. J.; LEMKUL, J. A.; BEVAN, D. R. GridMAT-MD: A Grid-Based Membrane Analysis Tool for Use With Molecular Dynamics. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30(12), p. 1952-1958, 2008.
- ARMEN, R. S.; UITTO, O. D.; FELLER, S. E. Phospholipid Component Volumes: Determination and Application to Bilayer Structure Calculations. **Biophysical Journal**, v. 75, p. 734–744, 1998.
- AURENHAMMER, F. Voronoi Diagrams — A Survey of a Fundamental Geometric Data Structure. **ACM Computing Surveys**, v. 23(3), p. 345-405, 1991.
- BATENBURG, A. M.; KRUIJFF, B. Modulation of Membrane Surface Curvature by Peptide-Lipid Interactions. **Bioscience Reports**, v. 8(4), p. 299-307, 1988.
- BARBOSU, D. A Note on the Bivariate Lagrange Interpolation Polynomials. **American Journal of Applied Sciences**, v. 5(12), p. 1750-1753, 2008.
- 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.
- BOAS, M. L. **Mathematical Methods in the Physical Sciences**. DePaul University. 3ª Edição, John Wiley & Sons, 2006, p. 1-859
- BOZORGMANESH, A. R.; OTADI, M.; KORDI, A. A. S.; ZABIHI, F.; AHMADI, M. B. Lagrange Two-Dimensional Interpolation Method for Modeling Nanoparticle Formation During RESS Process. **International Journal of Industrial Mathematics**, v. 1(2), p.175-181, 2009.
- 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.; SACHS, J. N. Determining Structural and Mechanical Properties from Molecular Dynamics Simulations of Lipid Vesicles. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v.10, p. 4160–4168, 2014.

BRENKE, W. C. **Plane and Spherical Trigonometry**. 2^o impressão, THE DRYDEN PRESS, Nova Iorque, 1943.

BUCHOUX, S. FATSlim: a fast and robust software to analyse MD simulations of membranes. **Structural bioinformatics**, v. 33(1), p. 133-134, 2017.

BUHMANN, M. D. **Radial Basis Functions**. Cambridge Monographs on Applied and Computational Mathematics. Cambridge University Press. 1^a Edição, 2003.

BÜLDT, G.; GALLY, H. U.; SEELIG, J. Neutron Diffraction Studies on Phosphatidylcholine Model Membranes. **Journal of Molecular Biology**, v. 134, p. 673-691, 1979.

CAMPELO, F.; ARNAREZ, C.; MARRINK, S. J.; KOZLOV, M. M. Helfrich model of membrane bending: From Gibbs theory of liquid interfaces to membranes as thick anisotropic elastic layers. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 208, p. 25–33, 2014.

CANHAM, P. B. The Minimum Energy of Bending as a Possible Explanation of the Biconcave Shape of the Human Red Blood Cell. **Journal of Theoretical Biology**, v. 26, p. 61-81, 1970.

CARR, M.; MACPHEE, C. E. Membrainy: a ‘smart’, unified membrane analysis tool. **Source Code for Biology and Medicine**, v. 10(3), p. 1-10, 2015.

CHABAN, V. Computationally efficient prediction of area per lipid. **Chemical Physics Letters**, v. 616-617, p. 25–29, 2014.

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

CHAZELLE, B.; EDELSBRUNNER, H. An Improved Algorithm for Constructing kth-Order Voronoi Diagrams. **IEEE Transactions on Computers**, v. c-36(11), p. 1349-1354, 1987.

CHEN, CHIH-LI. A systematic approach for solving the great circle track problems based on vector algebra. **Polish Maritime Research**, v. 2(90), p. 3-13, 2016.

CHEN, C. M.; LUBENSKY, T. C.; MACKINTOSH, F. C. Phase Transitions and Modulated phases in Lipid Bilayers. **Physica Reviews E**, v. 51(1), p. 504-513, 1995.

CHEVROT, G.; SCHURHAMMER, R.; WIPFF, G. Molecular dynamics simulations of the aqueous interface with the [BMI][PF₆] ionic liquid: comparison of different solvent models. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 8, p. 4166–4174, 2006.

COUTINHO, K.; CANUTO, S. **DICE: A Monte Carlo program for molecular liquid simulation**, Universidade de São Paulo, Brasil, version 2.9, 2003.

CRANE, K.; GOES, F.; DESBRUN, M.; SCHRÖDER, P. Digital geometry processing with discrete exterior calculus. **SIGGRAPH Proceedings**, artigo 7, p. 1-126, 2013.

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

D'ARRIGO, P.; SCOTTI, M. Lysophospholipids: Synthesis and Biological Aspects. **Current Organic Chemistry**, v. 17(8), p. 811-830, 2013.

DELAUNAY, B. "Sur la sphère vide. A la mémoire de Georges Voronoï", **Bulletin de l'Académie des Sciences de l'URSS. Classe des sciences mathématiques et na**, v. 6, p. 793-800, 1934.

DESERNO, M. Fluid lipid membranes: From differential geometry to curvature stresses. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 185, p. 11-45, 2015.

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.

DOWNING, H. H. From Spherical Trigonometry to Plane Trigonometry. **The American Mathematical Monthly**, v. 57(4), p. 251-254, 1950.

DUNKER, A. K.; OBRADOVIC, Z. The protein trinity—linking function and disorder. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 805-806, 2001.

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

EVANS, E. A. Bending Resistance and Chemically Induced Moments in Membrane Bilayers. **Biophysical Journal**, v. 14, 923-931, 1974.

EVANS, W.; KIRKPATRICK, D.; TOWNSEND, G. Right-Triangulated Irregular Networks. **Algorithmica**, v. 30, p. 264-286, 2001.

FANG, CHIA-LANG; AL-SUWAYEH, S. A.; JIA-YOU, FANG. Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) for Drug Delivery and Targeting. **Recent Patents on Nanotechnology**, v. 7, p. 41-55, 2013.

FORNASIER, F.; SOUZA, L. M. P.; SOUZA, F. R.; REYNAUD, F.; PIMENTEL, A. S. Lipophilicity of Coarse-Grained Cholesterol Models. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, p. 569-577, 2020.

FORTUNE, S. A Sweepline Algorithm for Voronoi Diagrams. **Algorithmica**, v. 2, p. 153-174, 1987.

FRATERNALI, F.; LORENZ, C. D.; MARCELLI, G. On the estimation of the curvatures and bending rigidity of membrane networks via a local maximum-entropy approach. **Journal of Computational Physics**, v. 231, p. 528-540, 2012.

FRENKEL, E. **On area and volume in spherical and hyperbolic geometry**. Differential Geometry. INSTITUT DE RECHERCHE MATHÉMATIQUE AVANCÉE, Université de Strasbourg. Tese de Doutorado. Estrasburgo, França, 2018.

GAPSYS, V.; DE GROOT, B. L.; BRIONES, R. Computational analysis of local membrane properties. **Journal of Computer-Aided Molecular Desing**, v. 27, p. 845-858, 2013.

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

GIBBS, J. W. **Collected works, Vol. 1**. New Haven, Yale University Press, 219–314, 1961.

GONÇALVES, J. L. **Introdução à Aproximação de Funções**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004

GOODFELLOW, D. **Differential Geometry and General Relativity**. Investigations in Physics. University of Hertfordshire. 2014.

GRAHAM, T. R.; KOZLOV, M. M. Interplay of proteins and lipids in generating membrane curvature. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, p. 430–436, 2010.

GUCKENBERGER, A.; GEKLE, S. Theory and algorithms to compute Helfrich bending forces: A review. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 29(20), p. 1-34, 2017.

GUIXÀ-GONZÁLEZ, R.; RODRIGUEZ-ESPIGARES, I.; RAMÍREZ-ANGUITA, J. M.; CARRIÓ-GASPAR, P.; MARTINEZ-SEARA, H.; GIORGINO, T.; SELENT, J. MEMBPLUGIN: studying membrane complexity in VMD. **Bioinformatics**, v. 30(10), p. 1478-1480, 2014.

HAKOPIAN, H. A. Multivariate Divided Differences and Multivariate Interpolation of Lagrange and Hermite Type. **Journal of Approximation Theory**, v. 34, p. 286-305, 1982.

HELFRICH, W. Elastic Properties of Lipid Bilayers: Theory and Possible Experiments. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 28c, p. 693-703, 1973.

HESS, B.; KUTZNER, C.; VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4(3), p. 435-447, 2008.

HILLS Jr., R. D.; McGLINCHEY, N. Model Parameters for Simulations of Physiological Lipids. **Journal of Computational Chemistry**, v. 37, p. 1112-1118, 2016.

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

HOPPE, H.; DEROSE, T.; DUCHAMP, T.; MCDONALD, J.; STUETZLE, W. Surface Reconstruction from Unorganized Points. Proceedings of the 19th Annual Conference on Computer Graphics and Interactive Techniques, **ACM SIGGRAPH Computer Graphics**, v. 26(2), p. 71-78, 1992.

KAISER, C.A.; SCHECKMAN, R. Distinct sets of SEC genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. **Cell**, v. 61, p. 723-733, 1990.

KELLS, L. M.; KERN, W. F.; BLAND, J. R. **Plane and Spherical Trigonometry**. 2º Edição, MCGRAW-HILL BOOK COMPANY, Nova Iorque e Londres, 1940.

KENDIG, K. Is a 2000-Year-Old Formula Still Keeping Some Secrets? **The Mathematical Association of America**, Revista mensal, edição de Maio, p. 402-415, 2000.

KIM, S.; PATEL, D. S.; PARK, S.; SLUSKY, J.; KLAUDA, J. B.; WIDMALM, G.; IM, W. Bilayer Properties of Lipid A from various Gram-Negative Bacteria. **Biophysical Journal**, v. 111, p. 1750-1760, 2016.

KINNUN, J. J.; MALLIKARJUNAIAH, K. J.; PETRACHE, H. I.; BROWN, M. F. Area Per Lipid and Elastic Deformation of Membranes: Atomistic View From Solid-State Deuterium NMR Spectroscopy. **Biochim Biophys Acta**, v. 1848, p. 246-259, 2015.

KOPP, J. Efficient numerical diagonalization of hermitian 3X3 matrices. **Cornell University**, arXiv:physics/0610206v3, 2008.

KRANENBURG, M.; VLAAR, M.; SMIT, B. Simulating Induced Interdigitation in Membranes. **Biophysical Journal**, v. 87, p. 1596-1605, 2004.

KUCERKA, N.; NIEH, MU-PING; KATSARAS, J. Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1808, p. 2761-2771, 2011.

KWAK, S. K.; KIM, J. H. Statistical data preparation: management of missing values and outliers. **Korean Journal of Anesthesiology**, v. 70(4), p. 407-411, 2017.

LEFTIN, A.; MULUGU, T. R.; JOB, C.; BEYER, K.; BROWN, M. F. Area per Lipid and Cholesterol Interactions in Membranes from Separated Local-Field ¹³C NMR Spectroscopy. **Biophysical Journal**, v. 107, p. 2274-2286, 2014.

LEWIS, B. A.; ENGELMAN, D. M. Lipid Bilayer Thickness Varies Linearly with Acyl Chain Length in Fluid Phosphatidylcholine Vesicles **Journal of Molecular Biology**, v. 166, p. 211-217, 1983.

LIMA, M. P. M.; NADER, M.; SANTOS, D. E. S.; SOARES, T. A. Compatibility of GROMOS-derived atomic parameters for lipopolysaccharide membranes with the SPC/E water model and alternative long-range electrostatic treatments using single nonbonded cutoff and atom-based charge schemes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 0, p. 1-12, 2019.

LIMA, F. S.; CUCCOVIA, I. M.; BUCHNER, R.; ANTUNES, F. E.; LINDMAN, B.; MIGUEL, M. G.; HORINEK, D.; CHAIMOVICH, H. Sodium Triflate Decreases Interaggregate Repulsion and Induces Phase Separation in Cationic Micelles. **Langmuir**, v. 31, p. 2609-2614, 2015.

- LIU, A.; QI, X. Molecular Dynamics Simulations of DOPC Lipid Bilayers: The effect of Lennard-Jones Parameters of Hydrocarbon Chains. **Computational Molecular Bioscience**, v. 2(3), p. 78-82, 2012.
- LUKASZYK, S. A new concept of probability metric and its applications in approximation of scattered data sets. **Computational Mechanics**, v. 33, p. 299–304, 2004.
- LUKAT, G.; KRUGER, J.; SOMMER, B. APL@Voro: A Voronoi-Based Membrane Analysis Tool for GROMACS Trajectories. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, p. 2908-2925, 2013.
- MAECHLER, F. A.; ALLIER, C.; ROUX, A.; TOMBA, C. Curvature dependent constraints drive remodeling of epithelia. **Journal of Cell Science**, publicado online, p. 1-21, 2018.
- MAJDISOVA, Z.; SKALA, V. Radial basis function approximations: comparison and applications. **Applied Mathematical Modelling**, v. 51, p. 728–743, 2017.
- MARTÍNEZ, L.; ANDRADE, R.; BIRGIN, E. G.; MARTÍNEZ, J. M. Packmol: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30(13), p. 2157-2164, 2009.
- MARKVOORT, A. J.; SANTEN, R. A.; HILBERS, P. A. Vesicle Shapes from Molecular Dynamics Simulations. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110(45), p. 22780-22785, 2006.
- MEIJERING, E. A Chronology of Interpolation: From Ancient Astronomy to Modern Signal and Image Processing. **Proceedings of The IEEE**, v. 90(3), 319-342, 2002.
- MESSIAS, A.; SANTOS, D. E. S.; PONTES, F. J. S.; LIMA, F. S.; SOARES, T. A. Out of Sight, Out of Mind: The Effect of the Equilibration Protocol on the Structural Ensembles of Charged Glycolipid Bilayers. **Molecules**, v. 25, p. 5120, 2020.
- MEYER, M.; DESBURN, M.; SCHRÖDER, P.; BARR, A. H. Discrete Differential-Geometry Operators for 'Triangulated 2-Manifolds. Springer. **Visualization and Mathematics III**, p. 35-57, 2003.
- MIKUCKI, M.; ZHOU, Y. Fast Simulation of Lipid Vesicle Deformation Using Spherical Harmonic Approximation. **Communications in Computational Physics**, v. 21(1), p. 40–64, 2017.
- MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery ± a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 161-177, 2000.
- 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.
- NAGLE, J. F.; TRISTAM-NAGLE, S. Structure of lipid bilayers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p. 159-195, 2000.

NAGLE, J. F.; ZHANG, R.; TRISTAM-NAGLE, S.; SUN, W.; PETRACHE, H. I; SUTER, R. M. X-ray Structure Determination of Fully Hydrated $L\alpha$ Phase Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayers. **Biophysical Journal**, v. 70, p. 1419-1431, 1996.

NAGLE, J. F.; WILKINSON, D. A. Lecithin Bilayers. Density Measurements and Molecular Interactions. **Biophysical Journal**, v. 23, p. 159-175, 1978.

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.

PEREIRA, C. S.; LINS, R. D.; CHANDRASEKHAR, I.; FREITAS, L. C. G.; HÜNENBERGER, P. H. Interaction of the Disaccharide Trehalose with a Phospholipid Bilayer: A Molecular Dynamics Study. **Biophysical Journal**, v. 86, p. 2273-2285, 2004.

PERIN, M. S.; FRIED, V.A.; MIGNERY, G.A.; JAHN, R.; SÜDHOF, T.C. Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. **Nature**, v. 345, p. 260-263, 1990.

PETRACHE, H. I.; DODD, S. W.; BROWN, M. F. Area per Lipid and Acyl Length Distributions in Fluid Phosphatidylcholines Determined by ^2H NMR Spectroscopy. **Biophysical Journal**, v. 79, p. 3172-3192, 2000.

PETROV, O.; FURÓ, I. Curvature-dependent metastability of the solid phase and the freezing-melting hysteresis in pores. **Physical Review E**, v. 73, p. 011608, 2006.

PODDUBNY, A.; IORSH, I.; BELOV, P.; KIVSHAR, Y. Hyperbolic Metamaterials. **Nature Photonics**, v. 7, p. 958-967, 2013.

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.

RADKE, C. J. Gibbs adsorption equation for planar fluid–fluid interfaces: Invariant formalism. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 222, p. 600–614, 2015.

REDFERN, O, C.; DESSAILY, B.; ORENGO, C. A. Exploring the structure and function paradigm. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 18, p. 394–402, 2008.

REY, A. D. Thermodynamic Model of Surfactant Adsorption on Soft Liquid Crystal Interfaces. **Langmuir**, v. 20, p. 11473-11479, 2004.

ROBBINS, D. P. Areas of polygons inscribed in a circle. **Discrete Computational Geometry**, v. 12, p. 223-236, 1994.

SANIEE, K. A Simple Expression for Multivariate Lagrange Interpolation. **SIAM Undergraduate Research Online**, p. 1-9, 2007.

SANTOS, D. E. S.; POL-FACCHIN, 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 Lipopolysaccharide Chemotypes. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 57(9), p. 2181–2193, 2017.

SANTOS, R. A.; OLIVEIRA, J. Trigonometria triangular esférica. **Revista de Ciência e Tecnologia**, v. 4(6), 2018.

SANTOS, J. D.; SILVA, Z. C. **Métodos numéricos**. 4ª edição, Editora UFPE, Recife, 2010.

SAUER, T.; XU, Y. ON MULTIVARIATELAGRANGEINTERPOLATION. **Mathematics of Computation**, v. 64(211), p. 1147-1170, 1995.

SHAMOS, M. I.; HOEY, D. Closest-Point Problems. **16th Annual Symposium on Foundations of Computer Science**, v. 1, p. 151-162, 1975.

SHEWCHUCK, J. R. Delaunay refinement algorithms for triangular mesh generation. **Computational Geometry**, v. 22, p. 21–74, 2002.

SIMON, S. A.; MCINTOSH, T. J.; Interdigitated Hydrocarbon Chain Packing Causes The Biphasic Transition Behavior in Lipid/Alcohol Suspensions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 773, p. 169-172, 1984.

SINGH, M. B.; CHHEDA, S. P.; REDDY, R. D.; HARIA, L. K.; VAIDYA, S. M.; GAIKAR, V. G. Interfacial behaviour of substituted dibenzothiophenes for their extraction in biphasic dodecane-ionic liquid systems. **Chemical Physics**, v. 511, p. 54-62, 2018.

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

SOLLNER, T.; WHITEHEART, W.; BRUNNER, M.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; GEROMANOS, S.; TEMPST, P.; ROTHMAN, J. E. SNAP receptor implicated in vesicle targeting and fusion. **Nature**, v. 362, p. 318-324, 1993.

STEVENS, M. J. Coarse-grained simulations of lipid bilayers. **The Journal of Chemical Physics**, v. 121, p. 11942-11948, 2004.

STWEART, J. **Cálculo – Volume II**. Tradução da 7ª ed. americana. São Paulo: Cengage Learning, 2013. 664p.

SVETINA, S. Curvature-dependent protein–lipid bilayer interaction and cell mechanosensitivity. **European Biophysical Journal**, v. 44, p. 513-519, 2015.

SZEKELY, P.; DVIR, T.; ASOR, R.; RESH, R.; STEINER, A.; SZEKELY, O.; GINSBURG, A.; MOSENKIS, J.; GURALNICK, V.; DAN, Y.; WOLF, T.; TAMBURU, C.; RAVIV, U. Effect of Temperature on the Structure of Charged Membranes. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, p. 14501–14506, 2011.

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.

VALENCIA, Y. Y. P. **Simulações computacionais de agregados de 1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicerol-3-[Fosfo-rac-(1-glicerol)] (POPG) na presença de peptídeos antimicrobianos LL-37**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil, 2019.

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

WANG, W.; LI, C. Y. Single-Walled Carbon Nanotube-Induced Orthogonal Growth of Polyethylene Single Crystals at a Curved Liquid/Liquid Interface. **ACS Macro Letters**, v. 3, p. 175–179, 2014.

WANG, W.; STAUB, M. C.; ZHOU, T.; SMITH, D. M.; QI, H.; LAIRD, E. D.; CHENG, S.; LI, C. Y. Polyethylene nano crystalsomes formed at a curved liquid/liquid interface. **Nanoscale**, v. 10, p. 268–276, 2018.

WARING, E. VII. Problems Concerning Interpolations. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 69, p. 59-67, 1779.

WEINER, M. C.; WHITE, S. H. Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data III. Complete structure. **Biophysical Journal**, v. 61, p. 434-447, 1992.

WELTY, J. R.; WICKS, C. E.; WILSON, R. E.; RORRER, G. L. **Fundamentals of Momentum, Heat and Mass Transfer**. 5ª Edição, John Wiley & Sons, Inc., Oregon State University, USA, 2008.

WU, H. Studies on denaturation of proteins XIII. A theory of denaturation. **Advances in Protein Chemistry**, v. 46, p. 6-26, 1931.

XU, Z.; XU, G. Discrete schemes for Gaussian curvature and their convergence. **Computers and Mathematics with Applications**, v. 57, p. 1187–1195, 2009.

YAP, C. K. An $O(n \log n)$ Algorithm for the Voronoi Diagram of a Set of Simple Curve Segments. **Discrete and Computational Geometry**, v. 2, p. 365-393, 1987.

YESYLEVSKYY, S. O.; RAMSEYER, C. Determination of mean and Gaussian curvatures of highly curved asymmetric lipid bilayers: the case study of the influence of cholesterol on the membrane shape. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, p. 17052-17061, 2014.

ZIMMERBERG, J.; KOZLOV, M. M. How proteins produce cellular membrane curvature. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, p. 9-18, 2006.

APÊNDICE A - A ESCOLHA DO RAIÃO DE CORTE

Superfícies abertas

Esta adaptação, como já descrita (tópico 2.2.3), surge da observação da influência significativa de pontos amostrais distantes em relação ao local de ajuste quando em densidades amostrais muito altas. Essa contribuição para a função de ajuste leva a desvios nas bordas da superfície de ajuste que inviabiliza a correta construção da malha de ajuste sobre a superfície química a ser utilizada para análise de propriedades dependentes de curvatura. Para resolver esse problema foi desenvolvida uma função que se adapta a diferentes densidades amostrais e que limita o número de pontos sendo utilizados para o ajuste. Essa função determina um raio de corte que delimita quantos pontos amostrais pertencem a zona de influência do ponto de ajuste. Dessa forma, o cálculo do ajuste superficial será realizado apenas com os pontos amostrais que estiverem a uma distância menor que o raio de corte do ponto de ajuste, ou seja, que estiverem dentro da sua zona de influência.

Para uma descrição completa da aplicação dessa função, faz-se necessária a elucidação do seu desenvolvimento. Para isso, suponha uma superfície regular de pontos amostrais. Ou melhor, uma superfície com densidade de pontos constante ao longo de sua extensão, de modo que os pontos nela distribuídos encontrem-se igualmente espaçados e seguindo uma geometria específica. Assim sendo, suponha uma superfície retangular e regular com pontos amostrais cujo fatia pode, sem perda de informação, descrever completamente as propriedades da mesma (Figura A.1). Os pontos 1, 2, 3 e 4 são os pontos amostrais da superfície sobre a qual se deseja desenvolver um grid de ajuste e as regiões em azul, próximas a esses pontos, são as regiões sobre as quais o ponto de ajuste, P, deveria estar localizado de modo aos pontos amostrais pertencerem a sua zona de influência, considerando um raio de corte dado por R_c .

Nesta fatia, pode-se imaginar um ponto de ajuste que se localize dentro da região retangular e que se posicione de forma aleatória dentro dessa região, como na Figura A.1. A escolha do R_c desejada é aquela que permite uma probabilidade de 100% de algum ponto amostral estar dentro da região de influência do ponto ajuste, onde quer que ele se encontre dentro da fatia. Com isso, é possível garantir que os pontos do grid de ajuste sempre poderão utilizar as coordenadas de pelo menos um dos pontos amostrais da partição retangular da superfície amostral. Após essas considerações, é útil estabelecer alguns eventos.

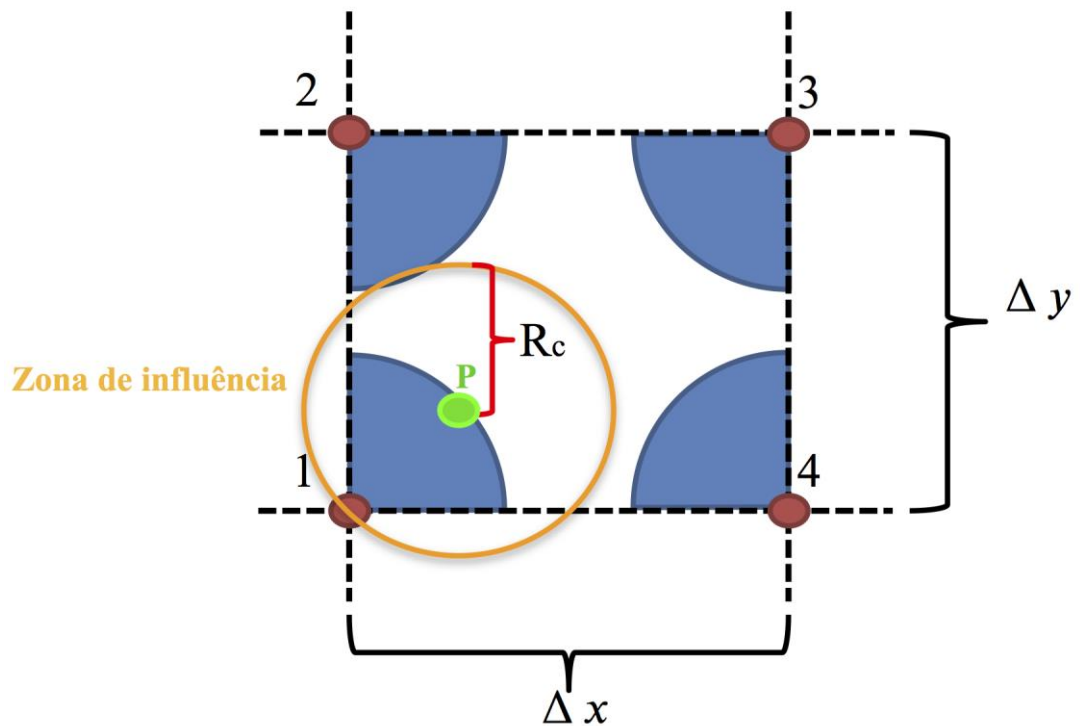


Figura A.1. Descrição espacial da zona de influência e do raio de corte sobre o qual ela está definida. Fatia da superfície retangular regular de pontos amostrais.

A_1 : o ponto 1 está dentro da região de influência

A_2 : o ponto 2 está dentro da região de influência

A_3 : o ponto 3 está dentro da região de influência

A_4 : o ponto 4 está dentro da região de influência

B : ao menos um ponto está dentro da região de influência

É possível avaliar que o evento B é a união dos eventos A_N e que, portanto o número de elementos no conjunto B é dado pela fórmula a seguir.

$$n(B) = n(A_1 \cup A_2 \cup A_3 \cup A_4)$$

Após algum trabalho algébrico com propriedades de conjuntos, é possível avaliar que o número de elementos no evento B é dado por:

$$\begin{aligned} n(B) = & n(A_1) + n(A_2) + n(A_3) + n(A_4) - n(A_1 \cap A_2) - n(A_1 \cap A_3) - n(A_1 \cap A_4) \\ & - n(A_2 \cap A_3) - n(A_2 \cap A_4) - n(A_3 \cap A_4) + n(A_1 \cap A_2 \cap A_3) + n(A_1 \\ & \cap A_2 \cap A_4) + n(A_1 \cap A_3 \cap A_4) + n(A_2 \cap A_3 \cap A_4) - n(A_1 \cap A_2 \cap A_3 \cap A_4) \end{aligned}$$

Cada elemento pertencente a esse evento é uma posição que o ponto de ajuste pode apresentar dentro da fatia retangular de modo a conter ao menos um dos pontos amostrais. Com isso, o número de elementos dentro do evento é proporcional a área das regiões hachuradas na Figura A1. Desta forma, a probabilidade de satisfazermos o evento B é dada pela razão entre a área das regiões hachuradas, seguindo a descrição dos conjuntos exibida na equação acima, e a área da fatia retangular. A área dos quatro primeiros eventos da equação acima são calculadas diretamente como a quarta parte da área de uma circunferência de raio R_c , como pode ser avaliado na Figura A1.

$$n(A_N) = \frac{\pi R_c^2}{4}$$

$$P(A_N) = \frac{\pi R_c^2}{4\Delta x \Delta y}$$

A fim de calcular a área dos eventos subsequentes na equação, se faz necessário encontrar a interseção entre as curvas que delimitam as regiões hachuradas na Figura A1. Como exemplo, seguem, abaixo, as curvas relacionadas aos pontos 1 e 2.

$$y_1(x_1) = \sqrt{R_c^2 - x_1^2}$$

$$y_2(x_2) = \Delta y - \sqrt{R_c^2 - x_2^2}$$

A interseção dessas duas curvas se dá no ponto L, dado na equação abaixo.

$$L = \sqrt{R_c^2 - \frac{\Delta y^2}{4}}, \quad R_c \geq \frac{\Delta y}{2}$$

Deste modo, a área da interseção do evento A_1 e A_2 pode ser calculada como a integral entre as curvas, acima descritas, no intervalo entre $x=0$ e $x=D$.

$$\begin{aligned}
n(A_1 \cap A_2) &= \int_0^L (y_1(x) - y_2(x)) dx \\
n(A_1 \cap A_2) &= \int_0^L \left(\sqrt{R_c^2 - x^2} - \Delta y + \sqrt{R_c^2 - x^2} \right) dx \\
n(A_1 \cap A_2) &= 2 \int_0^L \left(\sqrt{R_c^2 - x^2} \right) dx - \int_0^L (\Delta y) dx
\end{aligned}$$

Fazendo uma modificação de variáveis conveniente, é possível encontrar o resultado da primeira integral como segue.

$$\begin{aligned}
x &= R_c \sin(\theta) \\
dx &= R_c \cos(\theta) d\theta
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
2 \int_0^L \left(\sqrt{R_c^2 - x^2} \right) dx &= 2 \int_0^L R_c \cos(\theta) R_c \cos(\theta) d\theta = 2 R_c^2 \int_0^L \cos^2(\theta) d\theta \\
2 \int_0^L \left(\sqrt{R_c^2 - x^2} \right) dx &= R_c^2 \left(\theta + \frac{1}{2} \sin(2\theta) \right) \\
2 \int_0^L \left(\sqrt{R_c^2 - x^2} \right) dx &= R_c^2 \left(\arcsen\left(\frac{L}{R_c}\right) + \frac{1}{2} \sin\left(2 \arcsen\left(\frac{L}{R_c}\right)\right) \right)
\end{aligned}$$

Desta forma, a área do evento $A_1 \cap A_2$ é descrita pela equação abaixo.

$$n(A_1 \cap A_2) = R_c^2 \left(\arcsen\left(\frac{L}{R_c}\right) + \frac{1}{2} \sin\left(2 \arcsen\left(\frac{L}{R_c}\right)\right) \right) - \Delta y L$$

Realizando o mesmo procedimento para as todas as interseções entre dois eventos distintos, é possível avaliar que o formato da equação, obtida acima, não se modifica, sendo apenas alterado o interior da função L, de modo que seu formato mais geral é definido como segue.

$$L = \sqrt{R_c^2 - \frac{D^2}{4}}$$

Em que D representa a distância entre os pontos cujos eventos estão sendo avaliados. No caso mostrado acima, entre os eventos A_1 e A_2 por exemplo, essa distância foi de Δy , como pode ser visto na Figura A1. Agora é possível avaliar como a probabilidade do evento B varia em relação ao valor de R_c . Não é difícil observar que quando esse parâmetro é definido como a diagonal da partição retangular mostrada na Figura A1, as interseções entre três eventos distintos são nulas, assim como a interseção entre os quatro eventos A_1, A_2, A_3 e A_4 . Além disso, nessa condição apenas os eventos $A_1 \cap A_2$, $A_1 \cap A_4$, $A_2 \cap A_3$ e $A_3 \cap A_4$ são não nulos. Esta condição simplifica a equação do número de elementos do evento B, que passa a ser dada pela equação abaixo.

$$\begin{aligned} n(B) = & n(A_1) + n(A_2) + n(A_3) + n(A_4) - n(A_1 \cap A_2) - n(A_1 \cap A_4) - n(A_2 \cap A_3) \\ & - n(A_3 \cap A_4) \end{aligned}$$

Também na condição acima, o número de elementos nos eventos das interseções pode ser descrito como segue o exemplo do evento $A_1 \cap A_2$.

$$\begin{aligned} n(A_1 \cap A_2) = & \left(\frac{\Delta x^2 + \Delta y^2}{4} \right) \left(\arcsen \left(\frac{\sqrt{\frac{\Delta x^2 + \Delta y^2}{4} - \frac{\Delta y^2}{4}}}{\frac{\sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}}{2}} \right) \right. \\ & \left. + \frac{1}{2} \sen \left(2 \arcsen \left(\frac{\sqrt{\frac{\Delta x^2 + \Delta y^2}{4} - \frac{\Delta y^2}{4}}}{\frac{\sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}}{2}} \right) \right) \right) - \Delta y \sqrt{\frac{\Delta x^2 + \Delta y^2}{4} - \frac{\Delta y^2}{4}} \\ n(A_1 \cap A_2) = & \left(\frac{\Delta x^2 + \Delta y^2}{4} \right) \left(\arcsen \left(\frac{\Delta x}{\sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}} \right) \right. \\ & \left. + \frac{1}{2} \sen \left(2 \arcsen \left(\frac{\Delta x}{\sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}} \right) \right) \right) - \frac{\Delta y \Delta x}{2} \end{aligned}$$

Da mesma forma, para o evento $A_2 \cap A_3$ é possível verificar que o número de eventos, quando o raio de corte é metade da diagonal da partição retangular, é descrita como segue abaixo.

$$n(A_2 \cap A_3) = \left(\frac{\Delta x^2 + \Delta y^2}{4} \right) \left(\arcsen \left(\frac{\Delta y}{\sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}} \right) + \frac{1}{2} \sin \left(2 \arcsen \left(\frac{\Delta y}{\sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}} \right) \right) \right) - \frac{\Delta y \Delta x}{2}$$

Para simplificar essas expressões, é possível utilizar a convenção mostrada na Figura A2.

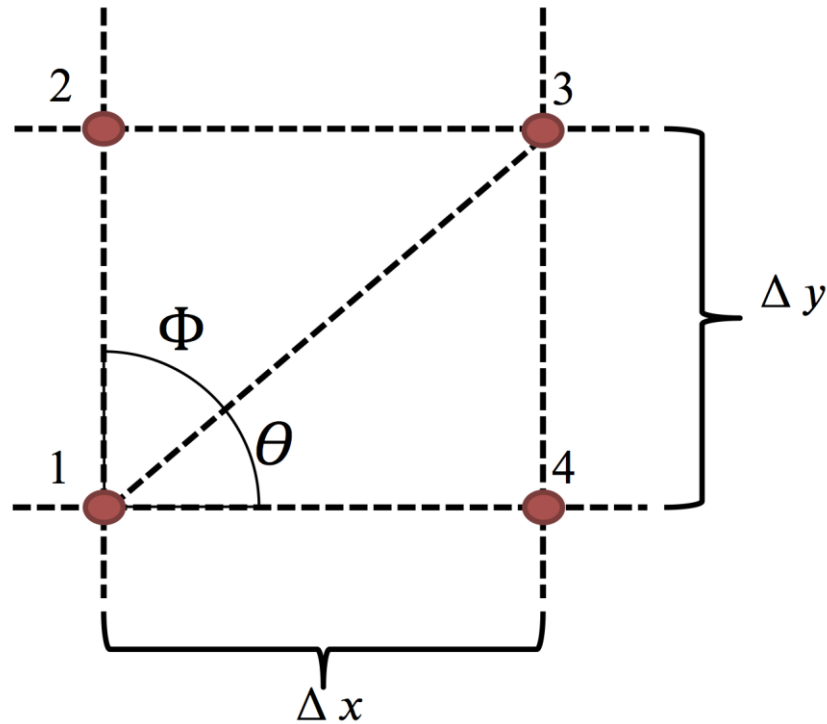


Figura A2. Descrição espacial da convenção dos ângulos utilizados no desenvolvimento matemático do raio de corte.

Com essa convenção é possível simplificar as expressões anteriores, chegando a um resultado de mais fácil entendimento e manipulação matemática. Para realizar a simplificação, faz-se necessária a junção dos eventos colocados acima.

$$\begin{aligned}
& n(A_1 \cap A_2) + n(A_2 \cap A_3) \\
&= \left(\frac{\Delta x^2 + \Delta y^2}{4} \right) \left(\theta + \frac{1}{2} \text{sen}(2\theta) \right) - \frac{\Delta y \Delta x}{2} \\
&+ \left(\frac{\Delta x^2 + \Delta y^2}{4} \right) \left(\varphi + \frac{1}{2} \text{sen}(2\varphi) \right) - \frac{\Delta y \Delta x}{2}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& n(A_1 \cap A_2) + n(A_2 \cap A_3) \\
&= \left(\frac{\Delta x^2 + \Delta y^2}{4} \right) (\theta + \varphi) + \frac{1}{2} \left(\frac{\Delta x^2 + \Delta y^2}{4} \right) (\text{sen}(2\theta) + \text{sen}(2\varphi)) \\
&- \Delta y \Delta x
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& n(A_1 \cap A_2) + n(A_2 \cap A_3) \\
&= \left(\frac{\Delta x^2 + \Delta y^2}{4} \right) \frac{\pi}{2} \\
&+ \frac{1}{2} \left(\frac{\Delta x^2 + \Delta y^2}{4} \right) 2 \left(\text{sen} \left(\frac{2\theta + 2\varphi}{2} \right) \cos \left(\frac{2\theta - 2\varphi}{2} \right) \right) - \Delta y \Delta x
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& n(A_1 \cap A_2) + n(A_2 \cap A_3) \\
&= \left(\frac{\Delta x^2 + \Delta y^2}{4} \right) \frac{\pi}{2} + \left(\frac{\Delta x^2 + \Delta y^2}{4} \right) (\text{sen}(\theta + \varphi) \cos(\theta - \varphi)) - \Delta y \Delta x
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& n(A_1 \cap A_2) + n(A_2 \cap A_3) \\
&= \left(\frac{\Delta x^2 + \Delta y^2}{4} \right) \frac{\pi}{2} \\
&+ \left(\frac{\Delta x^2 + \Delta y^2}{4} \right) (\cos(\theta) \cos(\varphi) + \text{sen}(\theta) \text{sen}(\varphi)) - \Delta y \Delta x
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& n(A_1 \cap A_2) + n(A_2 \cap A_3) \\
&= \left(\frac{\Delta x^2 + \Delta y^2}{4} \right) \frac{\pi}{2} + \left(\frac{\Delta x^2 + \Delta y^2}{4} \right) \left(\frac{\Delta y \Delta x}{\Delta x^2 + \Delta y^2} + \frac{\Delta y \Delta x}{\Delta x^2 + \Delta y^2} \right) - \Delta y \Delta x
\end{aligned}$$

$$n(A_1 \cap A_2) + n(A_2 \cap A_3) = \left(\frac{\Delta x^2 + \Delta y^2}{4} \right) \frac{\pi}{2} + \frac{\Delta y \Delta x}{2} - \Delta y \Delta x$$

$$n(A_1 \cap A_2) + n(A_2 \cap A_3) = \left(\frac{\Delta x^2 + \Delta y^2}{8} \right) \pi - \frac{\Delta y \Delta x}{2}$$

O mesmo procedimento pode ser realizado para a soma dos eventos $A_3 \cap A_4$ e $A_1 \cap A_4$, fazendo com que a soma do número de elementos em todas as interseções, quando o raio de corte é definido como metade da diagonal da partição retangular, seja dada pela equação abaixo.

$$n(A_1 \cap A_2) + n(A_2 \cap A_3) + n(A_3 \cap A_4) + n(A_1 \cap A_4) = \left(\frac{\Delta x^2 + \Delta y^2}{4} \right) \pi - \Delta y \Delta x$$

Uma vez em posse dessa equação é possível avaliar o número de elementos do evento B, como já foi descrito acima, para o caso onde o raio de corte é definido como a metade da diagonal da partição retangular.

$$n(B) = 4 \left(\frac{\pi}{4} \right) \left(\frac{\Delta x^2 + \Delta y^2}{4} \right) - \left(\frac{\Delta x^2 + \Delta y^2}{4} \right) \pi + \Delta y \Delta x$$

$$n(B) = \Delta y \Delta x$$

Portanto, é possível avaliar a que para a definição do raio de corte dada acima, a probabilidade do evento B de acontecer é de 100%, como é mostrado na equação abaixo.

$$P(B) = \frac{n(B)}{\Delta x \Delta y} = \frac{\Delta x \Delta y}{\Delta x \Delta y} = 1$$

Na realidade, pode-se mostrar que o valor de raio de corte avaliado é o valor mínimo para o qual o evento B seja sempre possível. Como exemplo, segue uma tabela com os valores calculados para o número de elementos de cada evento e suas interseções para uma partição retangular de lados unitários, cuja metade da diagonal tem o valor de aproximadamente 0,707.

Tabela A1. Valores dos números de elementos para cada evento de interesse e a probabilidade de ocorrência do evento B em cada raio de corte definido.

R_c	n(A_N)	n(A_N ∩ A_M)	n(A_N) - n(A_N ∩ A_M)	P(B)
0,530	0,884	0,029	0,855	85,5%
0,566	1,005	0,094	0,911	91,1%
0,601	1,135	0,183	0,952	95,2%
0,636	1,272	0,293	0,979	97,9%
0,672	1,418	0,423	0,995	99,5%
0,707	1,571	0,571	1,000	100,0%

É possível observar que a probabilidade do evento B ser contemplado aumenta com o aumento do raio de corte, mas que apenas chega a ser totalmente provável quando o raio de corte alcança o valor da metade da diagonal da partição retangular (Tabela A1). Portanto, esse deve ser o valor mínimo do raio de corte utilizado para realizar a busca por pontos amostrais próximos ao ponto de ajuste para que o procedimento de ajuste seja executado sem falhas.

Um último ponto a ser considerado diz respeito à possibilidade da superfície de pontos amostrais não ser regular, como a definida acima e utilizada para calcular o valor mínimo de raio de corte. É necessária, portanto, uma adaptação do valor do raio de corte em relação a densidade de pontos amostrais e um estudo com diferentes superfícies de modo a desenvolver uma função de raio de corte, e não apenas uma constante. Para realizar esta modificação, é necessário partir do valor mínimo do raio de corte, definido acima, considerando um reticulado retangular e regular.

$$R_c \geq \frac{\sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}}{2}$$

Os espaçamentos dos reticulados nos eixos “x” e “y” estão relacionados com o número de divisões especificadas para a construção do grid.

$$\Delta x = \frac{x_{max} - x_{min}}{bin}$$

$$\Delta y = \frac{y_{max} - y_{min}}{bin}$$

Aplicando os termos acima na equação do raio de corte é possível verificar a relação abaixo.

$$R_c \geq \frac{\sqrt{(x_{max} - x_{min})^2 + (y_{max} - y_{min})^2}}{2(bin)} = \frac{Diagonal}{2(bin)}$$

O parâmetro “bin” é uma escolha do usuário, mas tem um valor padrão que está relacionado ao número de pontos amostrais na superfície sendo ajustada. Para tal condição, o número de pontos de ajuste se aproxima do número de pontos amostrais na superfície.

$$(bin + 1)^2 = N_p$$

Em que N_p é o número de pontos amostrais da superfície que está sendo ajustada. Essa equação pode ser substituída na anterior gerando a relação abaixo.

$$R_c \geq \frac{Diagonal}{2(\sqrt{N_p} - 1)}$$

Sabendo que a densidade de pontos amostrais da superfície sendo ajustada é definida como segue.

$$\rho = \frac{N_p}{(x_{max} - x_{min})(y_{max} - y_{min})} = \frac{N_p}{(área da superfície)}$$

Portanto, a função do raio de corte pode ser expressa como mostrado abaixo.

$$R_c \geq \frac{\sqrt{(x_{max} - x_{min})^2 + (y_{max} - y_{min})^2}}{2(\sqrt{\rho(x_{max} - x_{min})(y_{max} - y_{min})} - 1)} \approx \frac{\sqrt{(x_{max} - x_{min})^2 + (y_{max} - y_{min})^2}}{2\sqrt{\rho(x_{max} - x_{min})(y_{max} - y_{min})}}$$

Retomando a definição dos espaçamentos dos reticulados do grid expressa acima, esta equação pode ser simplificada.

$$R_c \geq \frac{\sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}}{2\sqrt{\rho\Delta x\Delta y}} \propto \frac{\beta\sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}}{\sqrt{\rho\Delta x\Delta y}}$$

Como os pontos da superfície sendo ajustada podem não se encontrar em uma distribuição uniforme sobre o seu domínio, foram necessários testes com várias superfícies e distribuições randômicas de pontos para definir um valor mínimo de β que conseguisse garantir que todos os pontos de ajuste tivessem ao menos um ponto amostral dentro do seu raio de corte. Foi mostrado nos testes que um valor de 3 é suficiente para cumprir essa especificação. Portanto:

$$R_c = \frac{3\sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}}{\sqrt{\rho\Delta x\Delta y}}$$

Superfícies fechadas

Utilizando o resultado obtido nas avaliações das superfícies abertas, onde o raio de corte deve ser pelo menos a metade da diagonal da partição retangular da superfície, podemos desenvolver uma resolução para o raio de corte para superfícies fechadas. A principal diferença entre as análises dessas duas estruturas topológicas deve-se à definição de distância entre os seus pontos. A distância entre dois pontos distintos imersos em uma superfície descrita por coordenadas esféricas foi avaliada na Equação 30 e segue aqui re-escrita.

$$\delta(\varphi_1, \varphi_3, \theta_1, \theta_3) = r_s \cdot \text{acos} \left(\frac{\cos(\varphi_1) \cos(\varphi_3) + \sin(\varphi_1) \sin(\varphi_3) \cos(\theta_1 - \theta_3)}{1} \right)$$

Em que os ângulos φ_1 , φ_3 , θ_1 e θ_3 , por exemplo, são as coordenadas dos pontos 1 e 3 que serão utilizados para avaliar a distância diagonal, δ , da partição retangular mostrada na Figura A3. A variável r_s é o valor médio do raio dos 4 pontos mostrados na Figura A3.

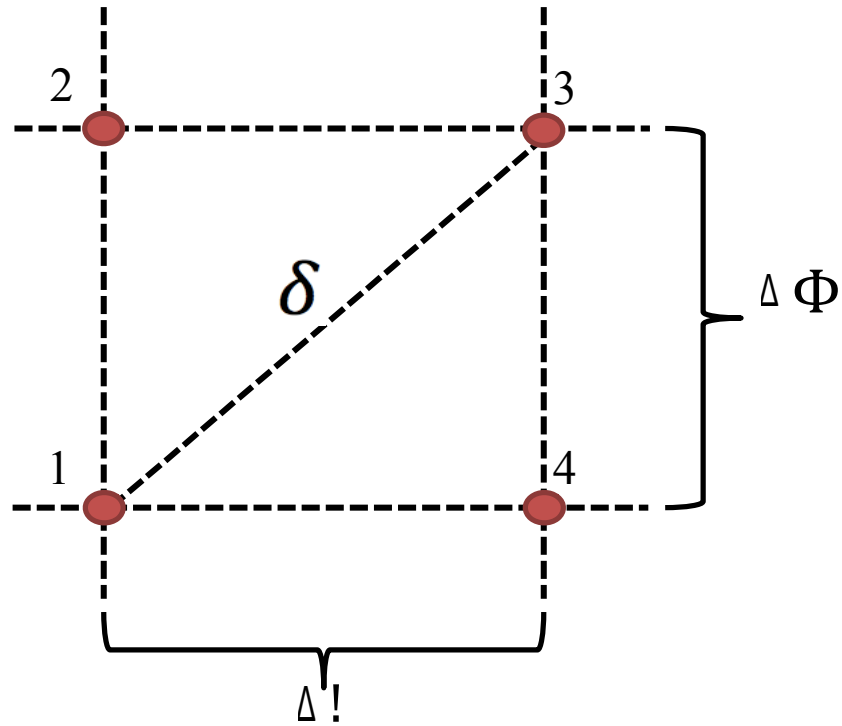


Figura A3. Descrição espacial da convenção dos ângulos utilizados no desenvolvimento matemático do raio de corte de superfícies fechadas.

É possível modificar a equação acima através da relação entre as coordenadas do ponto 1 e 3.

$$\delta(\varphi_1, \Delta\varphi, \Delta\theta) = r_s \cdot \text{acos} \left(\frac{\cos(\varphi_1) \cos(\varphi_1 + \Delta\varphi) + \sin(\varphi_1) \sin(\varphi_1 + \Delta\varphi) \cos(\Delta\theta)}{1} \right)$$

Realizando a expansão do $\cos(\Delta\theta)$ em uma série de potência, é possível observar que:

$$\cos(\Delta\theta) = 1 - \frac{(\Delta\theta)^2}{2!} + \frac{(\Delta\theta)^4}{4!} - \frac{(\Delta\theta)^6}{6!} + \frac{(\Delta\theta)^8}{8!} - \dots$$

É importante salientar que os valores dos termos de ordem maior que 2 na equação acima tendem a zero à medida que o valor de $\Delta\theta$ diminui. No algoritmo implementado no SuAVE, isto corresponde ao aumento da resolução da malha de ajuste. A Tabela A2 mostra a magnitude dos valores de cada potência contida na equação acima até o termo de ordem 6.

Tabela A2. Valores para $\Delta\theta$ obtidos para diferentes resoluções de malha. Os valores foram expressos com 4 casas de precisão.

Bin	$\Delta\theta$	$(\Delta\theta)^2$	$(\Delta\theta)^4$	$(\Delta\theta)^6$
10	0,6283	0,3948	0,1559	0,0615
20	0,3142	0,0987	0,0097	0,0010
50	0,1257	0,0158	0,0002	0,0000
100	0,0628	0,0040	0,0000	0,0000

É fácil perceber que o $\cos(\Delta\theta)$, para resoluções de malha com mais de 20 divisões nos ângulos φ e θ , pode satisfatoriamente ser aproximado pelo somatório acima, até o segundo termo, que contém $(\Delta\theta)^2$. Isto acontece pelo fato dos termos com potência maior que 2 tenderem muito rapidamente para zero. Com isto, a equação anterior pode ser remodelada como segue.

$$\delta(\varphi_1, \Delta\varphi, \Delta\theta) = r_s \cdot \text{acos} \left(\frac{\cos(\varphi_1) \cos(\varphi_1 + \Delta\varphi) + \sin(\varphi_1) \sin(\varphi_1 + \Delta\varphi) \left(1 - \frac{(\Delta\theta)^2}{2!} \right)}{\cos(\Delta\varphi) - \sin(\varphi_1) \sin(\varphi_1 + \Delta\varphi) \frac{(\Delta\theta)^2}{2!}} \right)$$

$$\delta(\varphi_1, \Delta\varphi, \Delta\theta) = r_s \cdot \text{acos} \left(\frac{\cos(\Delta\varphi) - \sin(\varphi_1) \sin(\varphi_1 + \Delta\varphi) \frac{(\Delta\theta)^2}{2!}}{\cos(\Delta\varphi) - \sin(\varphi_1) \sin(\varphi_1 + \Delta\varphi) \frac{(\Delta\theta)^2}{2!}} \right)$$

A última equação traz uma relação indireta entre a diagonal da partição retangular e a resolução da malha, que é traduzida nos valores de $\Delta\varphi$ e $\Delta\theta$. Entretanto, a mesma relação é dependente de um ângulo φ . Por isto, com o intuito de maximizar o valor de δ , faz-se necessário maximizar o valor do segundo termo do somatório, introduzido no arco cosseno. Com isto, é possível eliminar a dependência do ângulo φ e chegar a uma expressão apenas dependente de $\Delta\varphi$ e $\Delta\theta$.

Assim, derivando os termos dependentes de φ_1 e igualando-os a zero, chega-se na seguinte expressão:

$$\cos(\varphi) \sin(\varphi + \Delta\varphi) = -\sin(\varphi) \cos(\varphi + \Delta\varphi)$$

Essa equação é satisfeita sempre que:

$$\varphi = -\frac{\Delta\varphi}{2} + \frac{n\pi}{2}$$

Os pontos de máximo da função são caracterizados com valores ímpares de n , e os mínimos caracterizados pelos valores pares. Como a função é periódica, o valor dos máximos são idênticos e podem ser expressos, como função de $\Delta\varphi$, pela seguinte equação de ajuste.

$$\text{sen}(\varphi_{\max}) \text{sen}(\varphi_{\max} + \Delta\varphi) = 1,0002 - 0,0037\Delta\varphi - 0,2382(\Delta\varphi)^2$$

Para pequenos valores de $\Delta\varphi$, essa expressão pode ser aproximada pelo valor 1. Sendo assim, a função que mede o valor da diagonal da partição retangular da superfície pode ser, finalmente, expressa como mostrado abaixo.

$$\delta(\Delta\varphi, \Delta\theta) = r_s \cdot \text{acos} \left(\cos(\Delta\varphi) - \frac{(\Delta\theta)^2}{2!} \right)$$

$$\delta(\Delta\varphi, \Delta\theta) = r_s \cdot \text{acos} \left(1 - \frac{(\Delta\varphi)^2}{2!} - \frac{(\Delta\theta)^2}{2!} \right)$$

$$\delta(\Delta\varphi, \Delta\theta) = r_s \cdot \text{acos} \left(1 - \frac{(\Delta\varphi)^2 + (\Delta\theta)^2}{2!} \right)$$

Sabendo que na implementação do SuAVE os valores de $\Delta\varphi$ e $\Delta\theta$ são definidos com o mesmo valor, então a expressão pode ser simplificada como segue.

$$\delta(\Delta\varphi, \Delta\theta) = r_s \cdot \text{acos}(1 - (\Delta\varphi)^2)$$

$$\delta(\Delta\varphi, \Delta\theta) = r_s \cdot \text{acos} \left(1 - \frac{(\sqrt{2}\Delta\varphi)^2}{2!} \right)$$

$$\delta(\Delta\varphi, \Delta\theta) = r_s \sqrt{2} \Delta\varphi = \frac{r_s \sqrt{2} (\Delta\varphi + \Delta\theta)}{2}$$

Assim como definido na implementação dos estudos de superfícies abertas, o raio de corte mínimo deve ser metade da diagonal que foi calculada e expressa na equação acima. Prosseguindo da mesma forma que na implementação das superfícies abertas, faz-se necesseria uma relação entre o ângulo $\Delta\varphi$ e o número de pontos utilizados para realizar o ajuste.

Escolhendo um valor para o “*bin*” que promova um número de pontos de ajuste similar ao número de pontos amostrais da superfície, pode-se ver que, no caso das superfícies fechadas:

$$N_p = \left(\frac{bin}{2} + 1\right) bin$$

Com isto, é possível aproximar o valor de “*bin*” como descrito na equação abaixo.

$$bin = \sqrt{1 + 2N_p} - 1 \approx \sqrt{2N_p} - 1$$

Por fim, o raio de corte utilizado para o ajuste de superfícies fechadas pode ser expresso como mostrado na equação abaixo.

$$R_c = \frac{\beta r_s \sqrt{2} \Delta\varphi}{2} = \frac{\beta r_s \sqrt{2} (2\pi)}{2 (\sqrt{2N_p} - 1)} \approx \frac{\beta r_s \pi}{\sqrt{N_p}}$$

O parâmetro β , assim como no caso das superfícies abertas, é empírico e otimizado de modo a ampliar suficientemente o raio de corte para que ele possa cobrir densidades superficiais baixas e distribuições randômicas dos pontos amostrais sobre as superfícies. Com estas considerações, foi verificado que o valor de β deve ser no mínimo 6 para permitir o ajuste das superfícies testadas até o momento.

APÊNDICE B - FUNÇÃO PESO DO SuAVE E PARÂMETRO DE AJUSTE

Superfícies abertas

Para realizar o procedimento de ajuste de superfícies no programa, foi desenvolvida uma metodologia baseada na média ponderada das posições dos pontos amostrais (dos átomos) pertencentes à superfície. A função de peso utilizada na média ponderada avalia a distância, no plano xy, entre cada ponto do grid de ajuste e os átomos da superfície. O formato geral da média ponderada utilizada na metodologia segue a descrição abaixo.

$$z_g(i, j; \alpha, R_c) = \frac{\sum_{k \in CI} z_s(k) \cdot P(i, j, k; \alpha, R_c)}{\sum_{k \in CI} P(i, j, k; \alpha, R_c)}$$

Em que z_g é a localização, no eixo z, do ponto do grid de ajuste que está sendo definido, z_s é a localização, no eixo z, dos átomos pertencentes a região de influência de z_g , constituindo o conjunto de átomos na região de influência, CI, e P é a função peso que pondera as contribuições de cada átomo, baseado na distância, no plano xy, entre eles e os pontos do grid de ajuste. A função de ponderação utilizada no SuAVE é uma Gaussiana com um parâmetro empírico, α , e responsável por atribuir peso estatístico diferenciado a cada ponto amostral.

$$P(i, j, k; \alpha, R_c) = e^{-\frac{\delta(i, j, k; \alpha, R_c)^2}{\pi}}$$

Em que o termo elevado a segunda potência é a distância entre o átomo e o ponto do grid cujos índices são i e j, e R_c é o raio de corte como já definido anteriormente.

$$\delta(i, j, k; \alpha, R_c)^2 = \alpha^2 \left(\left(x_g(i) - x_s(k) \right)^2 + \left(y_g(j) - y_s(k) \right)^2 \right), k \in CI$$

O parâmetro α é adimensional, empírico, e foi obtido através de um estudo com quatro diferentes superfícies contínuas escolhidas como exemplos comuns ou extremos de formatos de algumas interfaces químicas de interesse para aplicações do programa. Estas superfícies não se apresentam exatamente como são as interfaces de interesse, mas apresentam variações

de curvatura que possibilitam o programa a estar apto ao ajuste de diferentes conformações que algumas interfaces químicas venham a possuir. As funções seguem as descrições abaixo:

$$f_1(x, y) = \cos(x) \cos(y) \quad -5 \leq x, y \leq 5$$

$$f_2(x, y) = \cos(5x) \cos(5y) \quad -5 \leq x, y \leq 5$$

$$f_3(x, y) = \frac{10\cos(2x) \cos(2y)}{x^2 + y^2 + 1} \quad -5 \leq x, y \leq 5$$

$$f_4(x, y) = e^{(0,1x^2)} \cos(y) + \sin(x) y \quad -5 \leq x, y \leq 5$$

Para cada função de superfície foram realizadas coletas aleatórias de pontos, de modo a que fossem construídos conjuntos amostrais que não obedecessem a nenhum padrão de organização e, que desta forma, não viessem a dirigir o estudo do parâmetro de ajuste para melhor descrever configurações específicas de pontos, sobre as superfícies. Foram realizadas, com cada exemplo de superfície, sete amostragens com número variado de pontos, de modo a cobrir diferentes densidades de pontos amostrais. Neste caso os pontos amostrais não são efetivamente átomos, mas pontos pertencentes às imagens das funções descritas.

Os valores do parâmetro de ajuste foram avaliados dentro de um intervalo que vai de 0,1 até 6,0. Este intervalo foi verificado suficientemente amplo para cobrir os valores de densidade amostral utilizados no procedimento de parametrização. O valor de α para cada exemplo de superfície e para cada valor de densidade de pontos foi definido como aquele que promoveu o menor desvio médio quadrado entre o grid de ajuste desenvolvido e a superfície amostral de pontos. A Figura A4 mostra o perfil destas curvas, como exemplo, para a superfície f_1 .

É importante notar nesses gráficos que, embora os valores tomados como corretos para o parâmetro de ajuste, são aqueles que fornecem os valores mínimos de RMSD em relação a cada densidade amostral de pontos, algumas densidades amostrais não são capazes de descrever com perfeição as superfícies sendo amostradas. Deste modo, os valores de RMSD obtidos ainda são altos e a superfície desenvolvida com o SuAVE pode não ser compatível, ou não seguir a tendência esperada da interface química sendo amostrada. Para então estabelecer um valor mínimo de átomos, ou pontos amostrais, na superfície, de modo que a superfície desenvolvida pelo protocolo computacional seja compatível com a interface química

estudada, basta avaliar os valores de densidade que, independentemente do valor do parâmetro de ajuste, promovam ajustes com valores de RMSD próximos ou menores que 2,0.

A Figura A5 pode demonstrar mais facilmente essa definição, utilizando para isso, o exemplo dos ajustes realizados sobre a superfície f_3 .

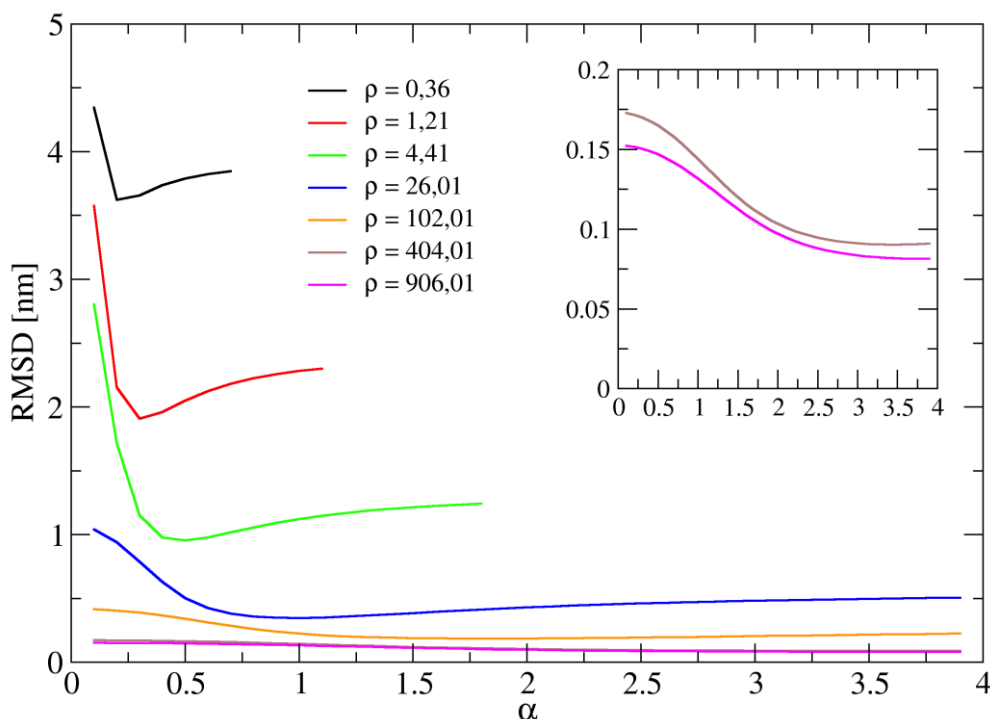


Figura A4. Valores do desvio médio quadrado entre o grid de ajuste desenvolvido e a superfície amostral de pontos para a superfície f_1 . O gráfico no interior refere-se às curvas com densidade de 404,01 e 906,01 átomos/nm², que na apresentam-se como retas em relação às demais curvas.

É possível observar a completa falta de conexão entre as duas primeiras superfícies apresentadas e a superfície amostral, em azul. Esse problema é parcialmente corrigido uma vez que a densidade de pontos amostrais sobre a superfície aumenta, como verificado na terceira imagem, com densidade de 4,41 pontos/nm², onde o RMSD entre a superfície amostral e ajustada foi avaliado em 3,148 nm. Entretanto, esse problema só se verifica satisfatoriamente solucionado quando a densidade aumenta para 26,01 pontos/nm², que condiz com o valor de RMSD de 1,322 nm (Tabela A4). Portanto, a partir deste valor de densidade a diferença entre a superfície amostral e a ajustada se revela mínima. Este fato pode ser observado nas outras superfícies utilizadas no estudo comparativo, caracterizando assim, o valor de densidade de 26,01 pontos/nm² como um valor limite além do qual, pode-se assegurar que a superfície ajustada conserva satisfatória concordância com a interface química ou superfície sendo estudada.

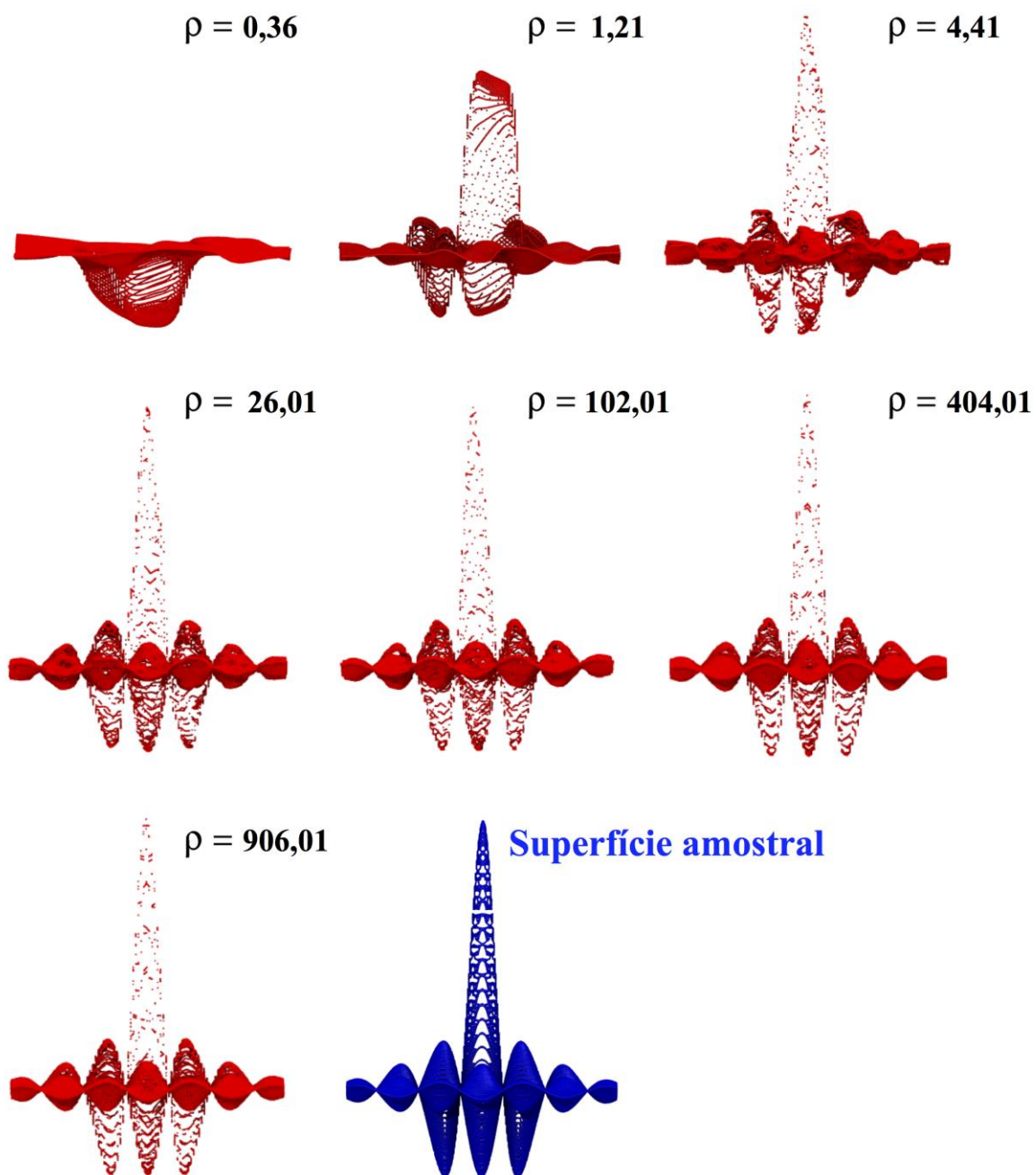


Figura A5. Avaliação gráfica da superfície ajustada pelo protocolo do SuAVE, utilizando um grid de 10201 pontos em um domínio de 10 X 10 nm, para diferentes densidades amostrais (número de pontos amostrais na superfície, átomos/nm²). Em vermelho, estão as superfícies desenvolvidas pelo SuAVE em cada densidade amostral. Em azul, está a superfície utilizada para o estudo e que deve ser reproduzida pelo programa.

Nas Tabelas a seguir são mostrados os valores de densidade amostral de pontos e os valores de α encontrados pela avaliação das curvas de RMSD.

Tabela A2: Valores de α definidos para cada densidade amostral de pontos de f_1

Bin	ρ (átomos/nm ²)	$\ln(\rho)$	α	$\ln(\alpha)$	RMSD (nm)
5,000	0,360	-1,022	0,200	-1,609	3,623
10,000	1,210	0,191	0,300	-1,204	1,909
20,000	4,410	1,484	0,500	-0,693	0,953
50,000	26,010	3,258	1,000	0,000	0,347
100,000	102,010	4,625	1,800	0,588	0,185
200,000	404,010	6,001	3,400	1,224	0,090
300,000	906,010	6,809	3,800	1,335	0,081

Tabela A3: Valores de α definidos para cada densidade amostral de pontos de f_2

Bin	ρ (átomos/nm ²)	$\ln(\rho)$	α	$\ln(\alpha)$	RMSD (nm)
5,000	0,360	-1,022	0,100	-2,303	5,913
10,000	1,210	0,191	0,200	-1,609	5,589
20,000	4,410	1,484	0,700	-0,357	5,125
50,000	26,010	3,258	1,450	0,372	2,170
100,000	102,010	4,625	2,300	0,833	0,977
200,000	404,010	6,001	3,700	1,308	0,441
300,000	906,010	6,809	3,900	1,361	0,396

Tabela A4: Valores de α definidos para cada densidade amostral de pontos de f_3

Bin	ρ (átomos/nm ²)	$\ln(\rho)$	α	$\ln(\alpha)$	RMSD (nm)
5,000	0,360	-1,022	0,100	-2,303	10,747
10,000	1,210	0,191	0,200	-1,609	10,618
20,000	4,410	1,484	0,700	-0,357	3,148
50,000	26,010	3,258	1,100	0,095	1,322
100,000	102,010	4,625	1,800	0,588	0,626
200,000	404,010	6,001	3,000	1,099	0,285
300,000	906,010	6,809	3,200	1,163	0,265

Tabela A5: Valores de α definidos para cada densidade amostral de pontos de f_4

Bin	ρ (átomos/nm²)	$\ln(\rho)$	α	$\ln(\alpha)$	RMSD (nm)
5,000	0,360	-1,022	0,200	-1,609	21,466
10,000	1,210	0,191	0,300	-1,204	14,928
20,000	4,410	1,484	0,500	-0,693	8,208
50,000	26,010	3,258	1,000	0,000	2,632
100,000	102,010	4,625	2,100	0,742	1,475
200,000	404,010	6,001	3,800	1,335	0,717
300,000	906,010	6,809	4,400	1,482	0,636

O perfil final de valores do parâmetro de ajuste utilizado no programa, para cada valor de densidade de pontos amostrais, foi estipulado como sendo a média dos valores apresentados nas tabelas acima. Estes valores podem ser verificados abaixo.

Tabela A6: Valores de α definidos para cada densidade amostral de pontos

Bin	ρ (átomos/nm²)	$\ln(\rho)$	α	$\ln(\alpha)$
5,000	0,360	-1,022	0,150	-1,897
10,000	1,210	0,191	0,250	-1,386
20,000	4,410	1,484	0,600	-0,511
50,000	26,010	3,258	1,138	0,129
100,000	102,010	4,625	2,000	0,693
200,000	404,010	6,001	3,475	1,246
300,000	906,010	6,809	3,825	1,342

Para facilitar a avaliação de uma relação funcional entre os valores do parâmetro de ajuste e os valores de densidade de pontos, mostra-se bastante útil o desenvolvimento do gráfico constituído pelos pontos mostrados na Tabela A6. Através deste, a identificação da relação se torna mais evidente e uma regressão linear pode ser realizada.

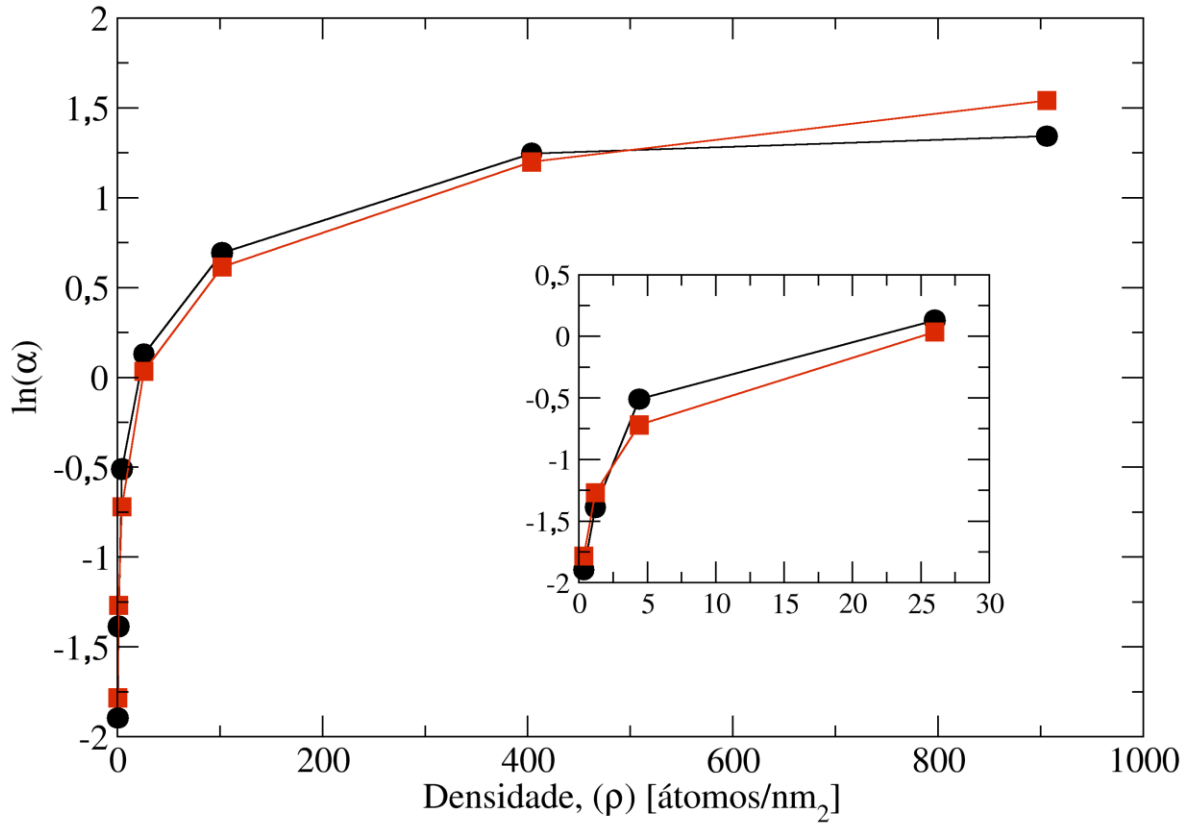


Figura A6: Gráfico da relação entre $\ln(\alpha)$ e a densidade amostral. Em preto, estão os valores do parâmetro de ajuste que representam o menor desvio médio quadrático entre os átomos da superfície e os pontos ajustados, para cada valor de densidade. Em vermelho, estão os pontos do modelo que melhor explica essa relação.

A função utilizada para realizar a regressão linear e que, portanto, passa a definir o parâmetro de ajuste é mostrada abaixo.

$$\ln(\alpha(\rho)) = 0,4247 \ln(\rho) - 1,3501$$

O coeficiente de determinação da regressão de dados realizada é 0,9882, o que indica que cerca de 98,82% dos pontos conseguem ser explicados pelo modelo proposto. Este resultado é satisfatório para o desenvolvimento do modelo, visto que não é necessário que os valores obtidos sejam exatamente aqueles mostrados nas tabelas acima. Para facilitar o entendimento desta relação e simplificar o modelo desenvolvido, faz-se conveniente uma modificação na equação acima descrita. Tomando a exponencial de ambos os lados da equação, é possível chegar ao novo modelo abaixo.

$$\alpha(\rho) = e^{-1,3501} \rho^{0,4247}$$

$$\alpha(\rho) = 0,2592\rho^{0,4247}$$

Além desta modificação, é possível alterar a função de ponderação do SuAVE, considerando as seguintes modificações de variáveis.

$$\frac{1}{2\sigma^2} = \frac{\alpha^2}{\pi} = 0,02139\rho^{0,8494}$$

$$2\sigma^2 = \frac{1}{0,02139\rho^{0,8494}} = 46,7554\rho^{-0,8494}$$

$$\delta'(i, j, k; R_c) = \left(x_g(i) - x_s(k)\right)^2 + \left(y_g(j) - y_s(k)\right)^2, \quad k \in CI$$

Com essas modificações, a função de ponderação pode ser novamente expressa como segue.

$$P(i, j, k; \sigma, R_c) = e^{-\frac{\delta'(i, j, k; R_c)^2}{2\sigma^2}}$$

Com isto, é possível perceber que a função peso é uma função Gaussiana centrada no ponto $(X_g(i), Y_g(i))$ e cujo desvio padrão é inversamente proporcional à densidade amostral de átomos na superfície.

Superfícies fechadas

A avaliação do parâmetro de ajuste utilizado no processo de interpolação de superfícies fechadas seguiu o mesmo processo descrito anteriormente. Foram realizados estudos da influência do parâmetro de ajuste sobre o processo de interpolação de 4 superfícies amostrais cujo formato foi escolhido para extrapolar a geometria de vesículas ou micelas lipídicas. Ou seja, as superfícies possuem variações de curvatura que podem não ser observadas por micelas ou vesículas, mas que certamente preparam o código para interpolar qualquer superfície fechada.

As superfícies utilizadas seguem descritas abaixo. Por estarem em coordenadas esféricas, estas funções descrevem os valores do parâmetro ρ de qualquer ponto da superfície como uma função dos seus parâmetros θ e φ .

$$\rho_1(\theta, \varphi) = C + \cos(2\varphi) \quad 0 \leq \varphi \leq \pi, \quad 0 \leq \theta < 2\pi$$

$$\rho_2(\theta, \varphi) = C + \cos(3\varphi + \theta) \quad 0 \leq \varphi \leq \pi, \quad 0 \leq \theta < 2\pi$$

$$\rho_3(\theta, \varphi) = C + \cos(2\varphi + 3\theta) \quad 0 \leq \varphi \leq \pi, \quad 0 \leq \theta < 2\pi$$

$$\rho_4(\theta, \varphi) = C + \sin(4\varphi) \cos(2\theta) \quad 0 \leq \varphi \leq \pi, \quad 0 \leq \theta < 2\pi$$

O parâmetro C mostrado nas equações é uma constante que foi escolhida com os valores 4 e 5 nm, em diferentes ensaios. Com a variação deste parâmetro o raio médio de cada estrutura também variou, permitindo que o ensaio dos ajustes pudesse ser realizado com maior variabilidade das densidades amostrais de pontos.

Assim como no procedimento com superfícies abertas, os valores do parâmetro α de cada ensaio, que minimizaram o valor do RMSD entre os pontos amostrais e os pertencentes às superfícies de ajuste, estão dispostos nas Tabelas A7, A8, A9 e A10.

Tabela A7: Valores de α definidos para cada densidade amostral de pontos de $\rho_1(\theta, \varphi)$

Pontos	Área (nm ²)	ρ (átomos/nm ²)	ln(ρ)	α	RMSD (nm)
36	313,632	0,115	-2,165	0,100	0,593
121	313,632	0,386	-0,952	0,200	0,319
441	313,632	1,406	0,341	0,300	0,195
2601	313,632	8,293	2,115	0,400	0,066
36	201,521	0,179	-1,722	0,100	0,577
121	201,521	0,600	-0,510	0,300	0,311
441	201,521	2,188	0,783	0,400	0,180
2601	201,521	12,907	2,558	0,600	0,059

Tabela A8: Valores de α definidos para cada densidade amostral de pontos de $\rho_2(\theta, \varphi)$

Pontos	Área (nm ²)	ρ (átomos/nm ²)	$\ln(\rho)$	α	RMSD (nm)
36	314,763	0,114	-2,168	0,200	0,706
121	314,763	0,384	-0,956	0,200	0,384
441	314,763	1,401	0,337	0,300	0,289
2601	314,763	8,263	2,112	0,800	0,189
36	201,731	0,178	-1,723	0,200	0,662
121	201,731	0,600	-0,511	0,300	0,387
441	201,731	2,186	0,782	0,400	0,285
2601	201,731	12,893	2,557	1,000	0,188

Tabela A9: Valores de α definidos para cada densidade amostral de pontos de $\rho_3(\theta, \varphi)$

Pontos	Área (nm ²)	ρ (átomos/nm ²)	$\ln(\rho)$	α	RMSD (nm)
36	315,004	0,114	-2,169	0,100	0,780
121	315,004	0,384	-0,957	0,200	0,519
441	315,004	1,400	0,336	0,500	0,424
2601	315,004	8,257	2,111	1,800	0,219
36	201,545	0,179	-1,722	0,100	0,746
121	201,545	0,600	-0,510	0,300	0,524
441	201,545	2,188	0,783	0,600	0,426
2601	201,545	12,905	2,558	2,500	0,221

Tabela A10: Valores de α definidos para cada densidade amostral de pontos de $\rho_4(\theta, \varphi)$

Pontos	Área (nm ²)	ρ (átomos/nm ²)	$\ln(\rho)$	α	RMSD (nm)
36	314,731	0,114	-2,168	0,100	0,669
121	314,731	0,384	-0,956	0,300	0,313
441	314,731	1,401	0,337	0,400	0,226
2601	314,731	8,264	2,112	0,900	0,088
36	200,647	0,179	-1,718	0,100	0,623
121	200,647	0,603	-0,506	0,400	0,311
441	200,647	2,198	0,787	0,500	0,214
2601	200,647	12,963	2,562	1,100	0,082

Da mesma forma como no procedimento realizado com as superfícies abertas, o perfil final de valores do parâmetro de ajuste utilizado no programa, para cada valor de densidade de pontos amostrais, foi estipulado como sendo a média dos valores apresentados nas tabelas acima. Estes valores podem ser verificados abaixo, na Tabela A11.

Os valores mostrados na Tabela A11 podem ser mais facilmente compreendidos através da Figura A7, onde os dados da tabela são dispostos juntamente com a função que melhor se ajusta aos mesmos.

Tabela A11: Valores de α médios, definidos para cada densidade amostral de pontos.

ρ (átomos/nm ²)	$\ln(\rho)$	α	$\ln(\alpha)$
0,114	-2,168	0,125	-2,079
0,385	-0,955	0,225	-1,492
1,402	0,338	0,375	-0,981
8,269	2,113	0,975	-0,025
0,179	-1,722	0,125	-2,079
0,601	-0,509	0,325	-1,124
2,190	0,784	0,475	-0,744
12,917	2,559	1,300	0,262

É possível perceber que o intervalo de densidades utilizadas para realizar o ensaio de ajuste sobre as superfícies fechadas escolhidas é bem menor do que o utilizado sobre as superfícies abertas. Isto se dá, em parte, pela excelente concordância entre as superfícies amostral e ajustada, mesmo em densidades amostrais muito baixas, como as mostradas nas tabelas acima. Por este motivo, valores de densidade maiores que os mostrados nas tabelas levam a superfície ajustada a, basicamente, superimpor os pontos amostrais, diminuindo significativamente os valores de RMSD calculados, que chegam a valores tão baixos quanto 0,059 nm, como mostrado na Tabela A7. Por este motivo, não se faz necessário o estudo de densidades amostrais maiores que as já utilizadas nos ensaios mostrados.

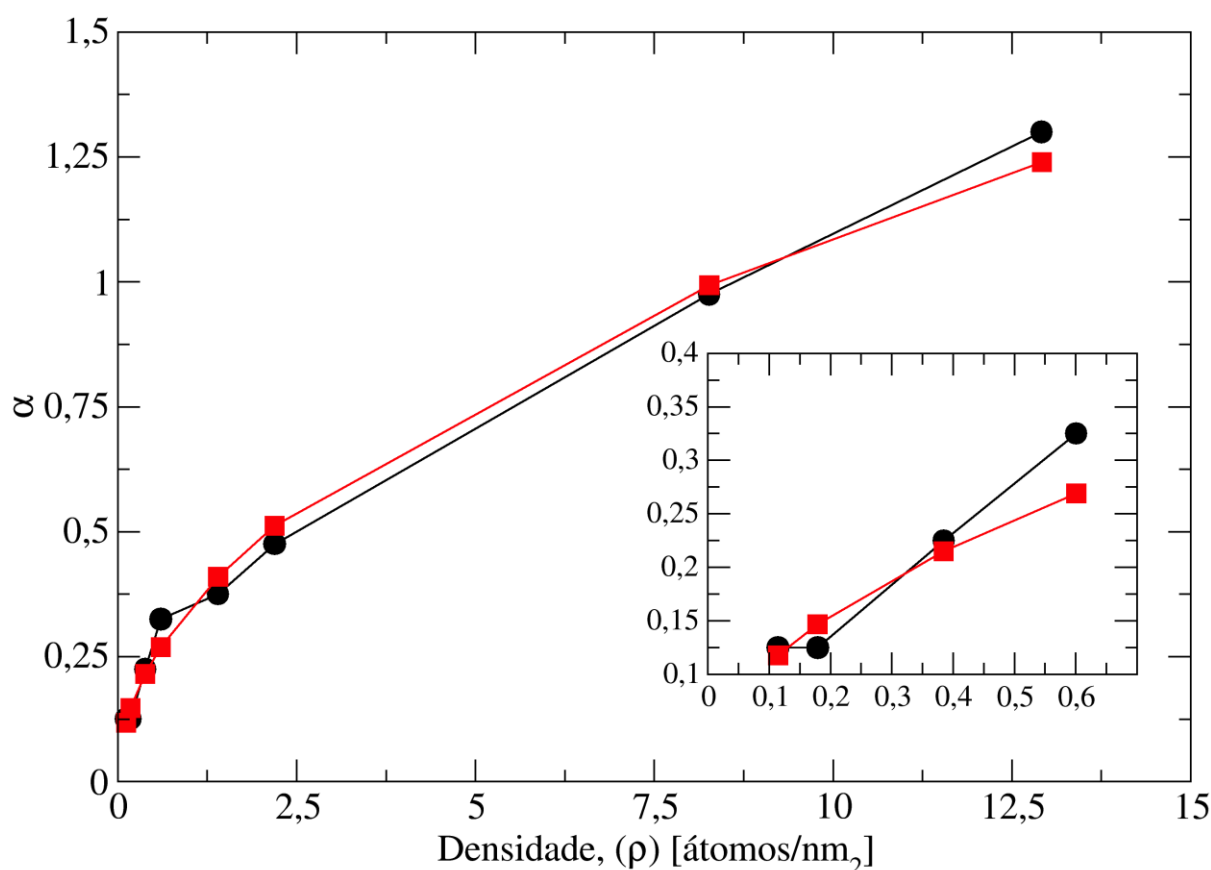


Figura A7: Gráfico da relação entre α e a densidade amostral. Em preto, estão os valores do parâmetro de ajuste que representam o menor desvio médio quadrático entre os átomos da superfície e os pontos ajustados, para cada valor de densidade. Em vermelho, estão os pontos do modelo que melhor explica essa relação.

A função que melhor explica a distribuição dos pontos obtidos nos estudos de ajuste é dada pela equação abaixo.

$$\alpha(\rho) = 0,3464\rho^{0,4984}$$

É muito satisfatório perceber que a função segue o mesmo modelo do caso das superfícies abertas, com apenas pequenas modificações nos seus parâmetros. O coeficiente de determinação da regressão de dados realizada é 0,9838, o que indica que cerca de 98,38% dos pontos conseguem ser explicados pelo modelo proposto. Este resultado é satisfatório para o desenvolvimento do modelo, visto que não é necessário que os valores obtidos sejam exatamente aqueles mostrados nas tabelas acima, mas que sigam a mesma tendência.

Seguindo as mesmas modificações realizadas no caso das superfícies abertas, é possível expressar a mesma equação nos formatos abaixo.

$$\ln(\alpha(\rho)) = 0,4984 \ln(\rho) - 1,0602$$

$$\frac{1}{2\sigma^2} = \frac{\alpha^2}{\pi} = 0,0382\rho^{0,9968}$$

$$2\sigma^2 = \frac{1}{0,0382\rho^{0,9968}} = 26,1780\rho^{-0,9968}$$

Este último parâmetro é diretamente introduzido na função de ponderação utilizada no SuAVE, e que já foi devidamente introduzida no tópico anterior.

Como último ponto a ser destacado neste tópico, vale a pena avaliar também a influência da densidade de pontos amostrais sobre resultado final do ajuste da superfície, realizado pelo algoritmo desenvolvido neste trabalho. Na Figura A8 é possível acompanhar como as superfícies ajustadas seguindo diferentes amostragens realizadas sobre $\rho_3(\theta, \varphi)$ tendem ao formato da superfície original. Mesmo utilizando o melhor parâmetro de ajuste encontrado para cada amostragem, as superfícies geradas sobre densidades amostrais inferiores a 8,257 pontos/nm² não são capazes de recriar a estrutura original em seus detalhes mais importantes. Por outro lado, densidades superiores a 32,384 pontos/nm² são capazes de recriar a estrutura original quase que exatamente, possuindo desvios menores do que 0,059 nm, como mostrado na Tabela A7, no caso da função $\rho_1(\theta, \varphi)$.

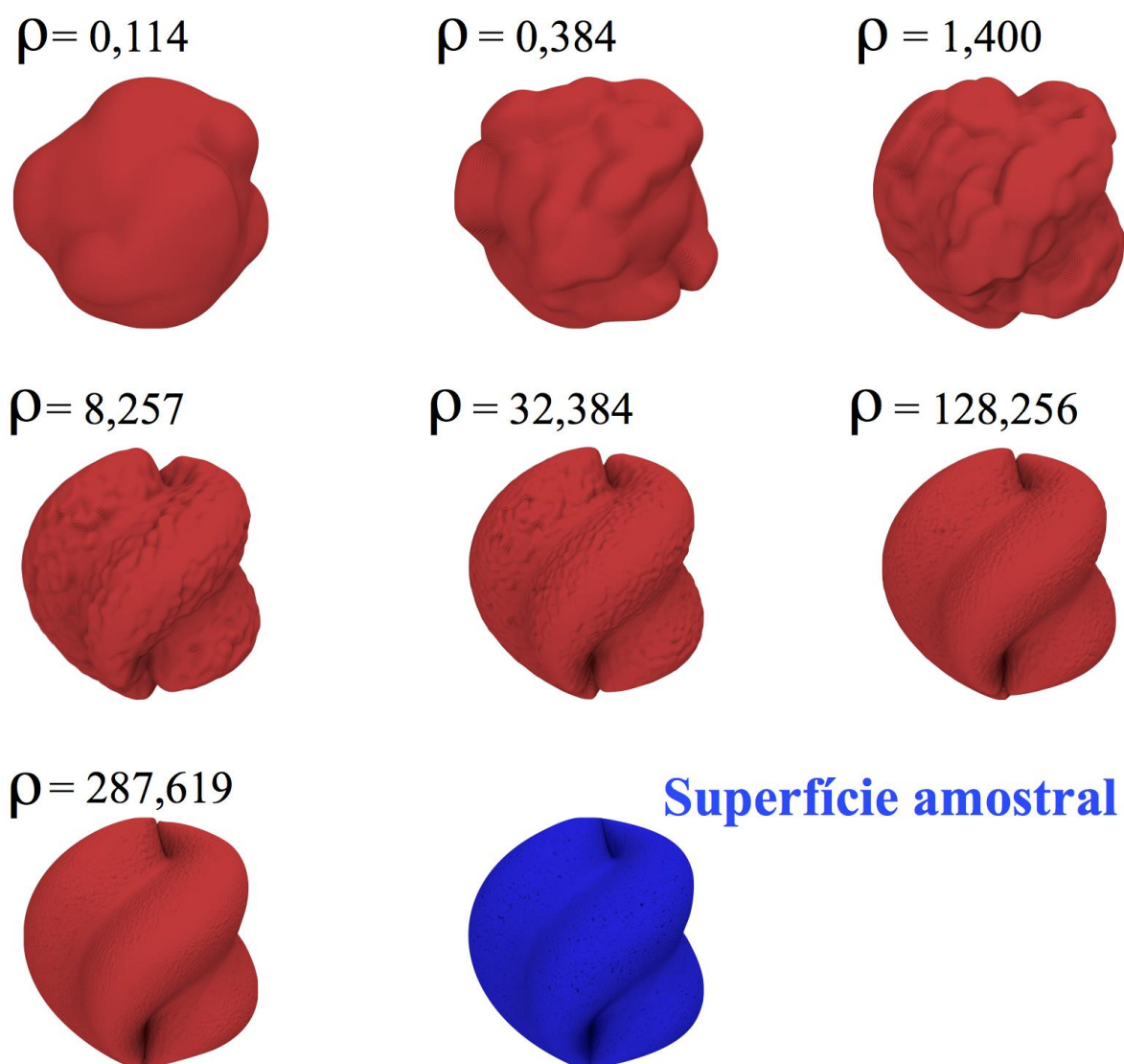


Figura A8. Avaliação gráfica da superfície ajustada pelo protocolo do SuAVE, utilizando um grid de 10201 pontos, para diferentes densidades amostrais (número de pontos amostrais na superfície, átomos/nm²). Em vermelho, estão as superfícies desenvolvidas pelo SuAVE em cada densidade amostral. Em azul, está a superfície utilizada para o estudo e que deve ser reproduzida pelo programa

APÊNDICE C - CÁLCULO DO VOLUME ENTRE SUPERFÍCIES DISTINTAS

Com a finalidade de calcular o volume entre duas superfícies distintas ajustadas pelo protocolo computacional do SuAVE faz-se necessário o cálculo da integral de volume sob a superfície desenvolvida. Entretanto, a resolução dessa integral se mostra demasiadamente complicada, sendo apenas acessível via algoritmos numéricos ou aproximações lineares da superfície. Neste último aspecto, a aproximação linear da superfície pelo seu plano tangente torna-se bastante útil e pode oferecer boa precisão para cálculos geométricos e de propriedades intrínsecas à superfície.

As expressões descritas a seguir são parte do desenvolvimento do cálculo do volume sob a superfície de ajuste do SuAVE pela sua aproximação linear utilizando planos tangentes. Para isso, então, seguem algumas definições importantes. Dada a função de ajuste de superfícies do SuAVE como expressa abaixo:

$$z_g = f(x, y) = \frac{\sum_{k \in CI} z_s(k) e^{-\frac{\delta^2(k)}{2\sigma^2}}}{\sum_{k \in CI} e^{-\frac{\delta^2(k)}{2\sigma^2}}}$$

em que,

$$\delta^2(k) = (x - x_s(k))^2 + (y - y_s(k))^2$$

e σ é o desvio padrão, função da densidade de pontos amostrais (átomos), definida no tópico anterior. Uma vez que é possível explicitar cada ponto da superfície desenvolvida pelo programa como um vetor no espaço $\mathbb{R}^3$, (x, y, z) , é possível introduzir uma função $S: \mathbb{R}^3 \rightarrow \mathbb{R}$, que converte esses vetores em pontos contidos na reta real, $\mathbb{R}$. Essa função é definida como segue.

$$S(x, y, z) = f(x, y) - z = k$$

Em que k é uma constante real. Essa função define a equação de ajuste utilizada pelo SuAVE como uma das suas superfícies de nível. Em especial, basta k ser nulo e a equação de ajuste do SuAVE, já descrita, é recuperada e z passa a ser definido por z_g . Para descrever o plano tangente que aproxima cada ponto desta superfície, torna-se conveniente definir sua equação diferencial total, como mostrada abaixo.

$$dS(x, y, z) = \frac{\partial S}{\partial x} dx + \frac{\partial S}{\partial y} dy + \frac{\partial S}{\partial z} dz = dk = 0$$

$$dS(x, y, z) = S_x dx + S_y dy + S_z dz = dk = 0$$

Reorganizando a equação é possível verificar que:

$$S_x dx + S_y dy = -S_z dz$$

$$dz = -\frac{S_x}{S_z} dx - \frac{S_y}{S_z} dy$$

Sendo a variável z descrita por $f(x, y)$ sempre que k for nulo. Neste caso, como já descrito, z passa a ser definida como o próprio z_g e, portanto, é válido afirmar pelo Teorema da Função Implícita que:

$$\frac{\partial z}{\partial x} = -\frac{S_x}{S_z} = \frac{\partial z_g}{\partial x} \quad e \quad \frac{\partial z}{\partial y} = -\frac{S_y}{S_z} = \frac{\partial z_g}{\partial y}$$

Utilizando um ponto qualquer no domínio da função z_g , dado por (x_c, y_c) , é possível expressar as derivadas parciais, dadas acima, como constantes A e B , assim como mostrado abaixo.

$$\frac{\partial z}{\partial x}(x_c, y_c) = A \quad e \quad \frac{\partial z}{\partial y}(x_c, y_c) = B$$

Com isso, é possível chegar à seguinte expressão:

$$dz = \frac{\partial z}{\partial x}(x_c, y_c) dx + \frac{\partial z}{\partial y}(x_c, y_c) dy$$

Discretizando essa equação no ponto (x_c, y_c) utilizando diferenças progressivas, é possível mostrar que o resultado é o mesmo que a linearização por série de Taylor da função z_g em torno deste ponto. Esta equação define o plano tangente à superfície de ajuste do SuAVE em torno do ponto (x_c, y_c) .

$$\Delta z = (z - z_c) = \frac{\partial z}{\partial x}(x_c, y_c)(x - x_c) + \frac{\partial z}{\partial y}(x_c, y_c)(y - y_c)$$

$$(z - z_c) = A(x - x_c) + B(y - y_c)$$

$$z = Ax + By - Ax_c - By_c + z_c$$

Para facilitar os cálculos torna-se conveniente substituir os últimos três termos da equação acima por uma constante, C. Assim, a equação do plano tangente à superfície de ajuste do SuAVE na vizinhança do ponto (x_c, y_c) é expressa por:

$$z = Ax + By + C$$

Para cada ponto da superfície sendo considerado, é conveniente definir uma vizinhança onde a aproximação linear da superfície definida pelo plano tangente seja válida e leve a pequenos desvios. Define-se, então, os intervalos $[x_c - \frac{\Delta x}{2}, x_c + \frac{\Delta x}{2}] = [a, b]$ sobre o eixo x e $[y_c - \frac{\Delta y}{2}, y_c + \frac{\Delta y}{2}] = [c, d]$ sobre o eixo y, de onde se derivam as seguintes relações:

$$b - a = \Delta x$$

$$d - c = \Delta y$$

Uma vez definido o plano tangente a cada ponto da superfície, e a sua vizinhança, torna-se simples calcular o volume abaixo da superfície. O volume compreendido sob essa superfície, nos intervalos considerados, é dado pela seguinte integral:

$$V(x_c, y_c) = \int_c^d \int_a^b (Ax + By + C) dx dy$$

$$V(x_c, y_c) = A \left(\frac{b^2 d}{2} - \frac{b^2 c}{2} + \frac{a^2 d}{2} - \frac{a^2 c}{2} \right) + B \left(\frac{d^2 b}{2} - \frac{d^2 a}{2} + \frac{c^2 b}{2} - \frac{c^2 a}{2} \right) + C(bd - ad - bc + ac)$$

$$V(x_c, y_c) = A \left(\frac{(b - a)(b + a)(d - c)}{2} \right) + B \left(\frac{(d - c)(d + c)(b - a)}{2} \right) + C(d - c)(b - a)$$

Utilizando as relações estabelecidas acima, é possível verificar que:

$$V(x_c, y_c) = A \frac{\Delta x \Delta y}{2} (\Delta x + 2a) + B \frac{\Delta x \Delta y}{2} (\Delta y + 2c) + C \Delta x \Delta y$$

Substituindo os valores de a e c em termos de x_c e y_c , a equação pode ser modificada como segue:

$$V(x_c, y_c) = A \Delta x \Delta y (x_c) + B \Delta x \Delta y (y_c) + C \Delta x \Delta y$$

$$V(x_c, y_c) = A \Delta x \Delta y (x_c) + B \Delta x \Delta y (y_c) + (-Ax_c - By_c + z_c) \Delta x \Delta y$$

$$V(x_c, y_c) = z_c \Delta x \Delta y$$

Em que z_c é definido pela equação do SuAVE no ponto x_c, y_c .

Como este volume é relativo a apenas um certo domínio na vizinhança do ponto definido, então o volume da superfície inteira, calculada pelo programa, é dado pelo somatório dos volumes de cada partição retangular do programa, cujo volume pode ser individualmente calculado pela expressão acima. O volume entre as superfícies é expresso, pois, como a diferença entre os volumes sob as diferentes superfícies desenvolvidas durante a execução do pacote computacional.

APÊNDICE D - CÁLCULO AUXILIAR PARA ANÁLISE DE DENSIDADE

Superfícies abertas

Assim como o cálculo do volume entre superfícies distintas, conseguir quantificar o volume das fatias desenvolvidas na análise de densidade realizada pelo SuAVE é fundamental. Como descrito na metodologia, no tópico da análise de densidade, as fatias têm o formato da superfície sendo ajustada, de modo tal que o perfil de densidade final apresenta compatibilidade com o perfil de uma superfície plana. Este fato permite o SuAVE explorar diferentes morfologias e configurações de interfaces com a análise de densidade, o que não é válido para os programas convencionais. Para realizar essa análise, faz-se necessário o cálculo do volume de cada fatia desenvolvida pelo programa e disposta ao longo do eixo normal do sistema.

A fim de mostrar como é realizado esse cálculo, é necessário definir as superfícies que limitam uma dada fatia desenvolvida pelo programa. Para isto, são consideradas as superfícies Z_{g1} e Z_{g2} , cujo formato é idêntico a configuração do grid ajustado pelo SuAVE para um certo sistema em estudo. A relação entre estas superfícies é definida como segue abaixo.

$$Z_{g2}(x, y) = Z_{g1}(x, y) + k, \quad \forall (x, y) \in R^2$$

A partir desta definição é possível constatar que o formato da superfície Z_{g1} é preservado na superfície Z_{g2} e que elas apresentam-se apenas transladadas no sentido do eixo canônico z . O volume existente entre essas superfícies é definido como pode ser visto abaixo.

$$\Delta V = V_2 - V_1 = \iint (Z_{g2} - Z_{g1}) dx dy$$

$$\Delta V = V_2 - V_1 = \iint (Z_{g1} + k - Z_{g1}) dx dy$$

$$\Delta V = V_2 - V_1 = \iint k dx dy = k \iint dx dy$$

Integrando a função nos intervalos que definem o domínio da superfície no plano xy, é possível verificar que o volume da fatia definida entre as superfícies Z_{g1} e Z_{g2} é descrito pela relação abaixo.

$$\Delta V = (x_{max} - x_{min})(y_{max} - y_{min})k$$

$$\Delta V = \Delta x \Delta y (bin)^2 k$$

Uma vez que cada termo da equação acima é constante e definido no início da execução de cada cálculo realizado pelo programa, o volume das fatias definidas na análise de densidade é, também, constante e independe do formato da superfície sendo estudada. Esse é um resultado muito interessante, uma vez que representa também o volume das fatias realizadas por programas convencionais que pressupõem uma configuração plana para a interface em estudo. A diferença entre o cálculo realizado pelo SuAVE e esta metodologia é a forma de contar o número de partículas dentro de cada fatia. Como o formato das fatias é diferente, o número de partículas de certo grupo químico dentro destas fatias também o é, a depender da relação entre a distribuição espacial das partículas deste grupo químico e a configuração espacial das fatias.

Superfícies fechadas

Como já mostrado no tópico 2.3.4.2, o volume contido por uma superfície fechada pode ser calculado pelo somatório dos volumes das pirâmides de base triangular que compõem a tesselação da superfície. Este procedimento é o mesmo utilizado para avaliar o volume contido nas fatias definidas ao longo da direção radial do sistema.

Para iniciar o desenvolvimento das equações descritas no tópico 2.3.2.2, faz-se necessário o cálculo do volume contido pela superfície média do sistema. Esta, por sua vez, é construída através da média entre as duas superfícies, indicadas pelo usuário, que descrevem as camadas externa e interna de uma vesícula. De modo geral, este volume médio, V_m , pode ser calculado através do seguinte funcional.

$$V_m = \iint \frac{R_m^3(\theta, \phi)}{3} \sin(\theta) d\phi d\theta \quad , 0 < \phi < \pi$$

$$0 < \theta < 2\pi$$

Em que R_m é a função radial de cada ponto pertencente à superfície média, parametrizada pelos valores dos ângulos θ e ϕ . Neste formato é muito fácil realizar um redimensionamento do tamanho da estrutura, e por consequência do volume da mesma, apenas multiplicando a função radial por um fator k . Este fator é utilizado para limitar o volume das fatias e para facilmente calcular o volume compreendido por elas. Ao introduzir esta variável, é possível definir um novo volume da estrutura redimensionada, V_k , como mostrado nas equações abaixo.

$$V_k = \iint \frac{(kR_m)^3(\theta, \phi)}{3} \text{sen}(\theta) d\phi d\theta \quad 0 \leq k < \infty$$

$$V_k = k^3 \iint \frac{R_m^3(\theta, \phi)}{3} \text{sen}(\theta) d\phi d\theta$$

$$V_k = k^3 V_m$$

Como pode ser observado, o volume V_k pode ser obtido apenas multiplicando o volume da superfície média, previamente calculado, pelo fator k elevado a terceira potência.

Uma maneira mais fácil de entender a utilização do parâmetro k é através da figura abaixo, onde são mostradas a superfície média da vesícula dada como exemplo no tópico 2.3.2.2 e as superfícies obtidas pela utilização de diferentes valores de k .

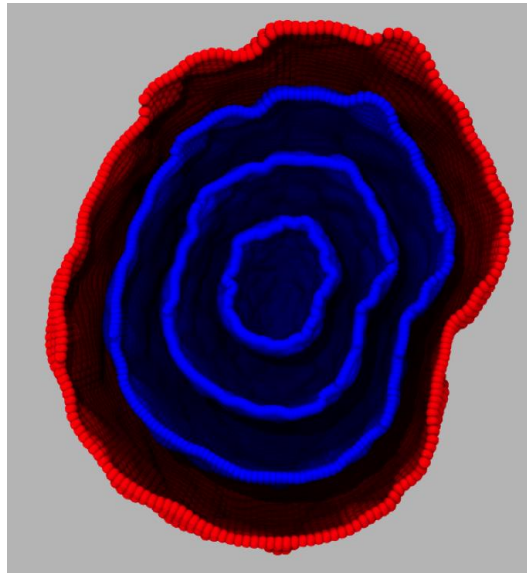


Figura A9. Superfície média da vesícula dada como exemplo no tópico 2.3.2.2, em vermelho, e, em azul, as superfícies obtidas pelo seu redimensionamento realizado com k igual a 0,25, 0,5 e 0,75.

É fácil observar que entre duas superfícies geradas com valores diferentes do parâmetro k , pode-se definir uma fatia do volume pertencente à estrutura original e cuja configuração é também preservada.

Esta metodologia fornece uma forma prática e rápida de construir inúmeras fatias volumétricas com mesma configuração espacial da estrutura original, e que são, finalmente, utilizadas para calcular a densidade de grupos químicos dentro de cada região do espaço compreendido dentro da superfície fechada e até mesmo fora dela. Sendo assim, o volume entre as diferentes superfícies que limitam uma fatia volumétrica da estrutura pode ser apresentado no formato da equação abaixo.

$$\Delta V = V_{sup} - V_{inf} = (k_{sup}^3 - k_{inf}^3)V_m$$

Em que k_{sup} e k_{inf} são os valores do parâmetro de redimensionamento que definem as superfícies superior (ou mais externa) e inferior (ou mais interna) de uma fatia de volume do sistema que contém a mesma configuração da superfície compacta (fechada) original.

Como último aspecto a ser detalhado neste tópico, não se pode deixar de explicitar que, mesmo que as definições realizadas acima tenham sido desenvolvidas sobre um volume calculado através de integrais múltiplas da função radial dos pontos que compõem a superfície, esses resultados são igualmente aplicados sobre o volume calculado pela metodologia apresentada no tópico 2.3.4.2, resultante da soma dos volumes das pirâmides de base triangular definidas sobre a tesselação da superfície. Isto é possível, uma vez garantida a convergência do somatório numérico para o valor analítico calculado pelas integrais.

APÊNDICE E - DERIVADAS ESPACIAIS E VETOR NORMAL À MALHA DE AJUSTE

A partir da superfície de nível $S(x, y, z)$ definida no Apêndice C e que engloba a função de ajuste desenvolvida pelo SuAVE, $z_g(x, y)$, é possível descrever o vetor normal à malha de ajuste, $\vec{N}$, como o vetor gradiente da função $S(x, y, z)$, assim como mostrado na equação abaixo.

$$z_g = f(x, y) = \frac{\sum_{k \in CI} z_s(k) e^{-\frac{\delta^2(k)}{2\sigma^2}}}{\sum_{k \in CI} e^{-\frac{\delta^2(k)}{2\sigma^2}}}$$

$$S(x, y, z) = z - f(x, y) = k$$

$$\vec{N} = (S_x, S_y, S_z) = \vec{\nabla} S$$

A componente do vetor normal na direção z assume o valor de 1, de acordo com sua definição na função de nível. Os componentes nas direções x e y são facilmente obtidos através das derivadas parciais da função $S(x, y, z)$ em relação a cada eixo. Como exemplo, segue a derivada parcial da superfície de nível na direção do eixo x.

$$S_x = -\frac{\partial z_g}{\partial x} = -\frac{\left(\sum_k \frac{-(x - x_s(k))}{\sigma^2} z_s(k) e^{-\frac{\delta^2(k)}{2\sigma^2}}\right) \left(\sum_k e^{-\frac{\delta^2(k)}{2\sigma^2}}\right)}{\left(\sum_k e^{-\frac{\delta^2(k)}{2\sigma^2}}\right) \left(\sum_k e^{-\frac{\delta^2(k)}{2\sigma^2}}\right)} + \frac{\left(\sum_k z_s(k) e^{-\frac{\delta^2(k)}{2\sigma^2}}\right) \left(\sum_k \frac{-(x - x_s(k))}{\sigma^2} e^{-\frac{\delta^2(k)}{2\sigma^2}}\right)}{\left(\sum_k e^{-\frac{\delta^2(k)}{2\sigma^2}}\right) \left(\sum_k e^{-\frac{\delta^2(k)}{2\sigma^2}}\right)}$$

$$S_x = \left[\frac{\left(\sum_i \sum_j \frac{(x - x_s(i))}{\sigma^2} z_s(i) e^{-\frac{(\delta^2(i) + \delta^2(j))}{2\sigma^2}}\right)}{\left(\sum_i \sum_j e^{-\frac{(\delta^2(i) + \delta^2(j))}{2\sigma^2}}\right)} - \frac{\left(\sum_i \sum_j \frac{(x - x_s(i))}{\sigma^2} z_s(j) e^{-\frac{(\delta^2(i) + \delta^2(j))}{2\sigma^2}}\right)}{\left(\sum_i \sum_j e^{-\frac{(\delta^2(i) + \delta^2(j))}{2\sigma^2}}\right)} \right]$$

$$S_x = \left[\frac{\left(\sum_i \sum_j \frac{(x - x_s(i))}{\sigma^2} (z_s(i) - z_s(j)) e^{-\frac{(\delta^2(i) + \delta^2(j))}{2\sigma^2}} \right)}{\left(\sum_i \sum_j e^{-\frac{(\delta^2(i) + \delta^2(j))}{2\sigma^2}} \right)} \right]$$

Da mesma forma a derivada parcial da superfície de nível na direção do eixo y pode ser escrita pela equação abaixo.

$$S_y = \left[\frac{\left(\sum_i \sum_j \frac{(y - y_s(i))}{\sigma^2} (z_s(i) - z_s(j)) e^{-\frac{(\delta^2(i) + \delta^2(j))}{2\sigma^2}} \right)}{\left(\sum_i \sum_j e^{-\frac{(\delta^2(i) + \delta^2(j))}{2\sigma^2}} \right)} \right]$$

Embora a derivação dessas expressões não seja, de todo, complicada, elas demandam um alto custo computacional por necessitar de um somatório duplo sobre o número de pontos amostrais do sistema. Por esse motivo é que a metodologia implementada no SuAVE para calcular o vetor normal à superfície de ajuste é baseada num simples produto vetorial entre dois vetores tangentes à malha.

APÊNDICE F - MOMENTOS PRINCIPAIS DE INÉRCIA

Com a finalidade de descrever toda a metodologia implementada no SuAVE para realizar o cálculo dos momentos principais de inércia de uma superfície fechada, cabe iniciar a discussão com a definição dos elementos do tensor de inércia, ponto central da metodologia.

Como visto no tópico 2.3.6, o tensor de inércia é descrito como segue.

$$I = \begin{bmatrix} I_{xx} & -I_{xy} & -I_{xz} \\ -I_{yx} & I_{yy} & -I_{yz} \\ -I_{zx} & -I_{zy} & I_{zz} \end{bmatrix}$$

Considerando a superfície discreta desenvolvida pelo SuAVE (x_g, y_g, z_g) , os elementos do tensor de inércia são definidos como mostrado abaixo.

$$I_{xx} = \sum_i (z_g(i)^2 + y_g(i)^2) m_i$$

$$I_{yy} = \sum_i (z_g(i)^2 + x_g(i)^2) m_i$$

$$I_{zz} = \sum_i (x_g(i)^2 + y_g(i)^2) m_i$$

$$I_{xy} = I_{yx} = \sum_i x_g(i) y_g(i) m_i$$

$$I_{xz} = I_{zx} = \sum_i x_g(i) z_g(i) m_i$$

$$I_{zy} = I_{yz} = \sum_i z_g(i) y_g(i) m_i$$

Nas equações acima, os somatórios são realizados sobre todos os pontos pertencentes à malha de ajuste. Como esta malha é constituída de pontos virtuais, não existentes na estrutura real da interface sendo analisada, a massa atribuída a cada ponto também não pode ser real. Assim, com a finalidade de que a distribuição desta "massa virtual" seja homogênea e garanta

que a estrutura da malha de ajuste seja avaliada apenas pelas suas características geométricas, o valor de m_i atribuído a cada ponto de ajuste foi de $1/N$, onde N é o número total de pontos pertencentes à malha de ajuste.

Com isto, a soma das "massas virtuais" de cada um dos pontos de ajuste da malha gerada pelo SuAVE, tem valor unitário. Isto equivale a dizer que qualquer interface que esteja sendo avaliada pelo programa vai possuir uma massa de valor unitário.

Uma consequência direta desta definição é que os valores dos momentos principais de inércia, calculados pelo SuAVE, não refletem heterogeneidades na distribuição da densidade dos átomos ao longo de toda a extensão da interface sendo analisada. Os resultados vão estar diretamente ligados apenas à organização espacial desta interface amostral, e por isso, são particularmente importantes para avaliar a variação da morfologia da interface amostral ao longo da simulação.

Uma vez que a definição do tensor de inércia, implementado no SuAVE, tenha sido concluída, vale a pena discutir como os momentos principais de inércia são obtidos.

Como antecipado no tópico 2.3.6, a obtenção dos valores dos momentos principais de inércia, que caracterizam a morfologia da interface amostral, dá-se através do processo de diagonalização do tensor de inércia. Este procedimento foi implementado no SuAVE segundo o trabalho de Kopp (2008). Não cabendo aqui a repetição do detalhamento algébrico descrito neste trabalho, vale exibir o resultado prático do processo de diagonalização, que é o tensor de inércia diagonalizado.

$$I_{\beta} = \begin{bmatrix} I_1 & 0 & 0 \\ 0 & I_2 & 0 \\ 0 & 0 & I_3 \end{bmatrix}_{\beta}$$

Em que β é a base de autovetores do tensor de inércia, composta pelos eixos principais de inércia da interface amostral. Cada valor observado na diagonal principal do tensor corresponde a um momento principal de inércia e está ligado a um dos autovetores obtidos.

APÊNDICE G - DIFERENÇAS FINITAS PARA CÁLCULO DE CURVATURA GAUSSIANA E MÉDIA

A metodologia utilizada para determinar as derivadas parciais da superfície de ajuste foi a sua discretização em termos de diferenças finitas. Nesta aproximação, as derivadas de primeira e segunda ordem de uma função $f(x)$ qualquer podem ser calculadas à partir da descrição desta função em termos da série de Taylor.

$$f(x + \Delta x) = f(x) + \frac{1}{1!}f'(x)\Delta x + \frac{1}{2!}f''(x)\Delta x^2 + \dots$$

Quando o Δx é muito pequeno, nesta expressão, os termos quadráticos ou de ordem superior se aproximam rapidamente de zero, e podem ser eliminados do somatório sempre que o erro residual deste procedimento seja desprezível. Seguindo esta condição, é fácil mostrar que a derivada de primeira ordem da função $f(x)$ pode ser aproximada por:

$$f'(x) \cong \frac{f(x + \Delta x) - f(x)}{\Delta x} = \frac{f(x + \Delta x) - f(x - \Delta x)}{2\Delta x}$$

Seguindo este mesmo procedimento para a derivada de segunda ordem, é possível observar o seguinte desdobramento:

$$f''(x) \cong \frac{f'(x) - f'(x - \Delta x)}{\Delta x}$$

$$f''(x) \cong \frac{\frac{f(x + \Delta x) - f(x)}{\Delta x} - \frac{f(x) - f(x - \Delta x)}{\Delta x}}{\Delta x}$$

$$f''(x) \cong \frac{f(x + \Delta x) + f(x - \Delta x) - 2f(x)}{\Delta x^2}$$

Uma vez em posse destas aproximações, é possível calcular os coeficientes da primeira e segunda forma fundamental, já explicitados no tópico 2.3.7 da metodologia, para a superfície desenvolvida pelo SuAVE, $S(x,y,z)$, descrita no Apêndice C.

$$E = 1 + S_x^2 = 1 + \left(\frac{S(x + \Delta x, y, z) - S(x - \Delta x, y, z)}{2\Delta x} \right)^2$$

$$F = S_x S_y = \left(\frac{S(x + \Delta x, y, z) - S(x - \Delta x, y, z)}{2\Delta x} \right) \left(\frac{S(x, y + \Delta y, z) - S(x, y - \Delta y, z)}{2\Delta y} \right)$$

$$G = 1 + S_y^2 = 1 + \left(\frac{S(x, y + \Delta y, z) - S(x, y - \Delta y, z)}{2\Delta y} \right)^2$$

$$L = S_{xx} = \left(\frac{S(x + \Delta x, y, z) + S(x - \Delta x, y, z) - 2S(x, y, z)}{\Delta x^2} \right)$$

$$M = S_{xy}$$

$$= \left(\frac{S(x + \Delta x, y + \Delta y, z) - S(x - \Delta x, y + \Delta y, z) - S(x + \Delta x, y - \Delta y, z) + S(x - \Delta x, y - \Delta y, z)}{4\Delta x \Delta y} \right)$$

$$N = S_{yy} = \left(\frac{S(x, y + \Delta y, z) + S(x, y - \Delta y, z) - 2S(x, y, z)}{\Delta y^2} \right)$$

A obtenção destes parâmetros encerra todo o processo numérico do cálculo das curvaturas Gaussiana e Média da superfície sendo ajustada. Como ressalva, vale destacar que as aproximações são válidas para valores diminutos dos intervalos Δx e Δy , de modo que a linearização da superfície de ajuste, através da série de Taylor, seja possível.

APÊNDICE H - ANÁLISE DESEMPENHO DAS FERRAMENTAS E OTIMIZAÇÃO DO CÓDIGO PARA EXECUÇÃO PARALELA

A análise de desempenho das ferramentas implementadas no SuAVE começa com uma medição do tempo necessário para execução das principais etapas descritas na Figura 3, isto é, dos passos 2, 3 e 4, referentes à leitura do arquivo de entrada, desenvolvimento da superfície de ajuste e o cômputo das propriedades geométricas e físicas de interesse, respectivamente.

Em particular, as ferramentas implementadas no SuAVE contam com um alto grau de similaridade entre si. A implementação realizada em cada ferramenta foi desenvolvida de forma a preservar todo o código, a menos do bloco de análise das propriedades geométricas e físicas. Deste modo, a diferença principal entre as ferramentas é o passo 4 da Figura 3. Dito isto, é possível avaliar o tempo de processamento de cada uma das ferramentas através da análise de apenas uma delas, pois o passo 4 do algoritmo compreende apenas uma pequena fração do tempo total de processamento do programa, como pode ser visto na Figura A10.

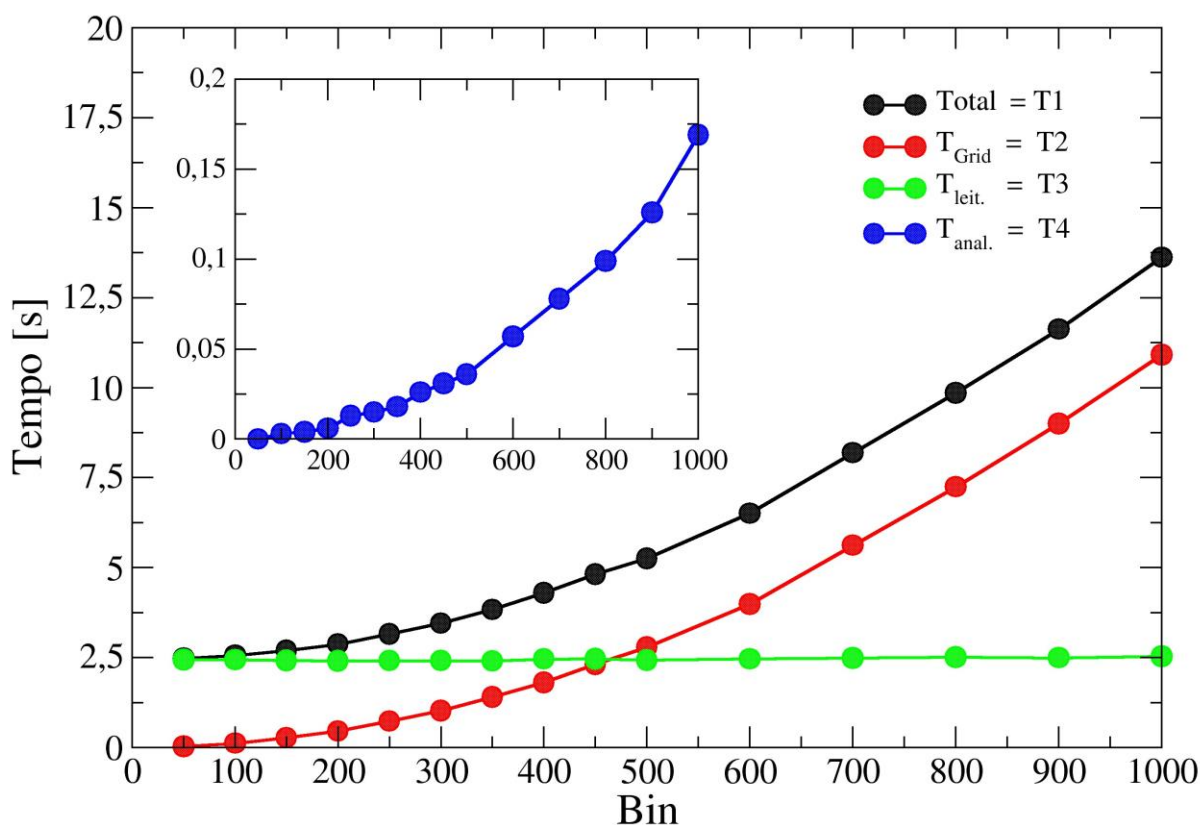


Figura A10. Tempo consumido por cada uma das etapas de processamento dos programas implementados no SuAVE. Em preto está o tempo total de processamento do programa *s_area*, durante a análise dos 6 primeiros frames da trajetória do sistema P_H_C10_315. Em vermelho está o tempo consumido pelo desenvolvimento da superfície de ajuste. Em azul está o tempo consumido durante o cálculo da propriedade geométrica medida e em verde está o tempo consumido apenas com a leitura do arquivo de entrada, calculado como $T_3 = T_1 - T_2 - T_4$.

Diversas inferências podem ser colhidas desta disposição de dados. A primeira delas, que justifica a extensão das conclusões extraídas da análise de desempenho de apenas uma ferramenta para todas as outras, é a confirmação de que o tempo de processamento consumido no passo 4, a análise das propriedades geométricas e físicas da interface em estudo, representa apenas 1,24 % do tempo total consumido na execução do programa. Como este é o único passo que é divergente entre todas as análises implementadas, é seguro afirmar que não há perda significativa de informação ao considerar o perfil apresentado na Figura A10, como representativo de todas as análises que compõem o pacote de ferramentas do SuAVE.

A segunda conclusão que pode ser facilmente extraída da Figura A10 é o grau de sensibilidade dos passos de desenvolvimento do grid de ajuste e da análise geométrica da superfície, em relação ao número de partições retangulares compondo o grid, Bin. É evidente que essas são as únicas etapas cujo tempo de execução sofre interferência direta da resolução do grid de ajuste. O tempo consumido na etapa de leitura comporta também o tempo de inicialização e finalização do programa, bem como o tempo consumido na atividade de escrita dos arquivos de output. Entretanto, estas etapas, como esperado, são pouco sensíveis à resolução do grid de ajuste, sendo principalmente impactadas pelo tamanho do arquivo de entrada, como exemplificado na Tabela 6 do tópico 3.4.2.

Dessarte, é evidente que, com vistas à otimização do código implementado e aceleração do seu processamento, o passo 3 do programa, responsável pelo desenvolvimento da superfície de ajuste, deve ser aprimorado com a utilização da API OpenMP. As Figuras A11 e A12 mostram como esta tarefa foi desenvolvida nos programas próprios para a análise de superfícies abertas e fechadas, respectivamente.

Nas figuras, as variáveis “*grid*” e “*coarse*” guardam as posições espaciais dos pontos do grid de ajuste e da superfície amostral, respectivamente. A função “*param*” é responsável por calcular o valor do parâmetro de ajuste, tanto nos programas próprios para superfícies abertas quanto fechadas. A variável “*peso*”, como o próprio nome sugere, guarda o peso, a relevância, da posição do ponto amostral que está sendo avaliado em determinado passo do loop. Por fim, as variáveis “*n_grid*” e “*num*” guardam, respectivamente, o número de divisões do grid de ajuste e o número de átomos de referência utilizados para promover o processo de ajuste.

É possível notar, em vermelho, o comando que aciona o processo de *fork*, após o qual, o programa deixa de ser executado por apenas uma *Master Thread* e passa a dirigir o processo de ajuste por um time de *Slave Threads*, cuja quantidade depende do número de threads disponíveis no computador. No final do loop, há um sinal *Join*, novamente direcionado ao

OpenMP, que força o programa a sincronizar e abandonar as *Slave Threads* e continuar o processamento apenas com a *Master Thread*, finalizando a região de processamento paralelo.

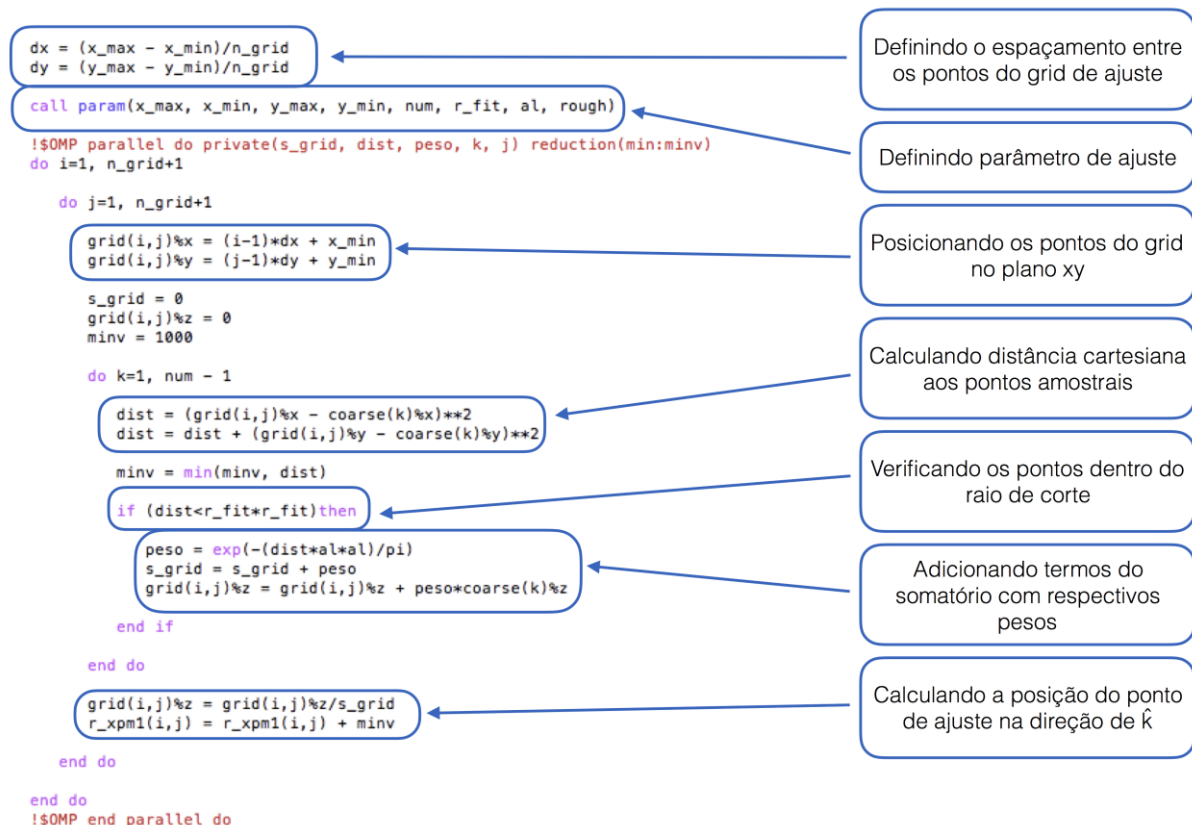


Figura A11. Loop utilizado para desenvolvimento da superfície de ajuste em interfaces químicas abertas

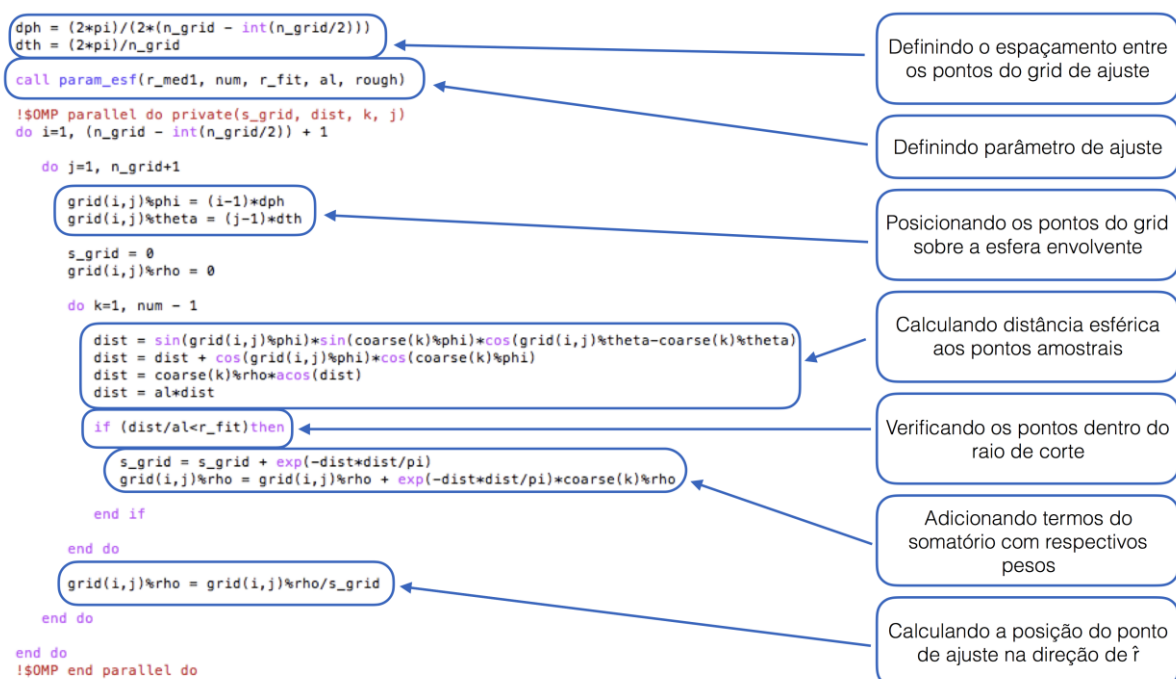


Figura A12. Loop utilizado para desenvolvimento da superfície de ajuste em interfaces químicas fechadas

Com estas duas linhas de código, direcionadas ao OpenMP, o programa passa a apresentar um processamento paralelo durante o desenvolvimento das superfícies de ajuste. Um ensaio com 1000 frames da trajetória do sistema P_H_C10_315 foi realizado em duas máquinas diferentes com intuito de avaliar o *speed up* obtido pela implementação descrita.

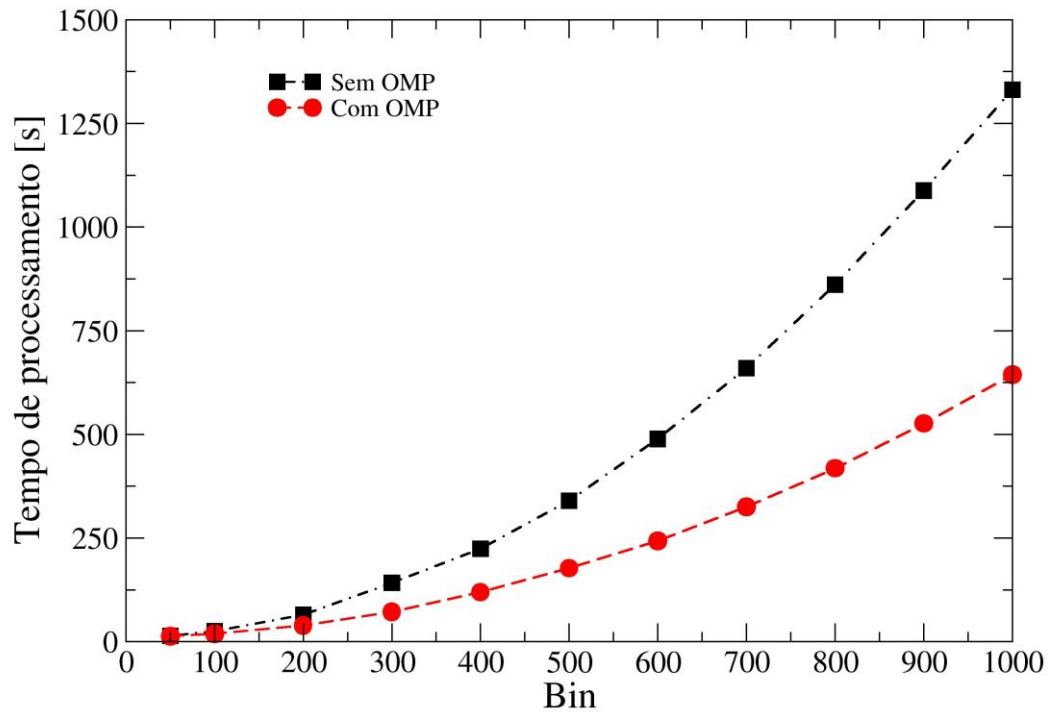


Figura A13. Ensaio realizado com máquina 64 bits, intel Core i3-5010U CPU 2,10 GHz, quad-core.

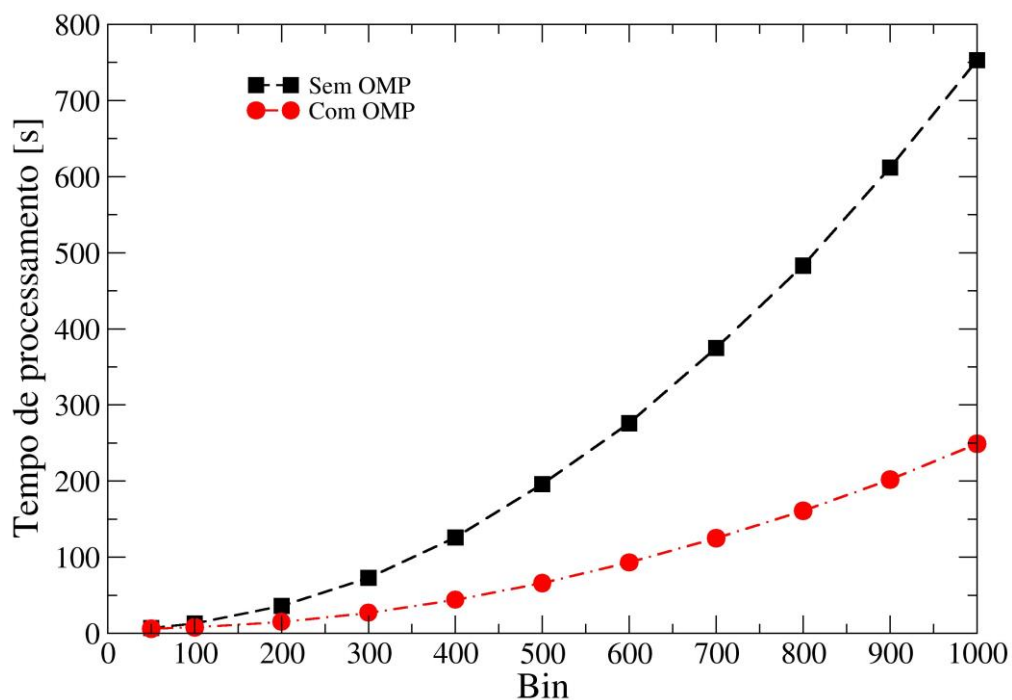


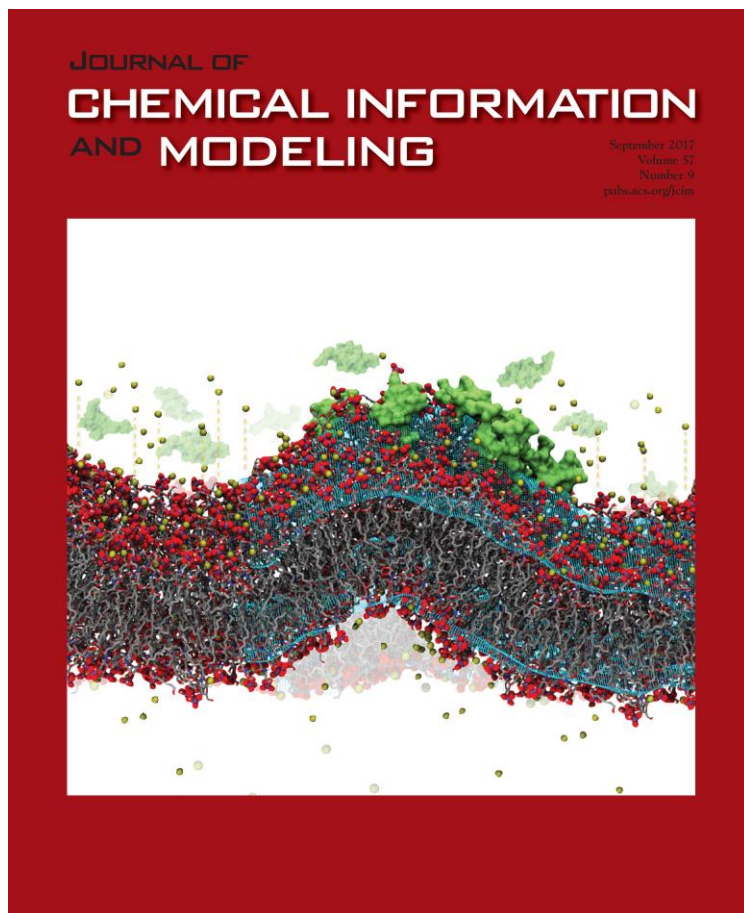
Figura A14. Ensaio realizado com a máquina 64 bits, intel Core i5-7400 CPU 3,0 GHz, quad-core.

É evidente, nas Figuras A13 e A14, que a utilização do OpenMP, no loop de desenvolvimento da superfície de ajuste, promove um aumento na velocidade de processamento do programa de, pelo menos 2 vezes, em comparação com a versão sequencial. Além disso, os resultados apresentados pela segunda máquina mostram uma maior velocidade de processamento em comparação com os resultados da primeira máquina. Essa diferença é advinda principalmente do processador com um maior *clock* interno (número de ciclos processados por segundo), que acarreta em uma diminuição de 43,4 % no tempo de processamento do programa.

A implementação do OpenMP mostra-se, portanto, eficaz em acelerar o processamento do programa, podendo alcançar diferentes razões de *speed up*, a depender das características físicas da máquina onde o programa está sendo executado. Nos ensaios realizados, esta razão pôde chegar a aproximadamente 3,02, no caso do ensaio realizado na segunda máquina. Não obstante, este valor pode ser satisfatoriamente melhorado quando na utilização de máquinas que comportem maiores números de *threads* de processamento. Um estudo sistemático do ganho em velocidade deve ser avaliado em cada máquina onde o programa vai ser executado, de modo a extrair o máximo de processamento possível.

ANEXO A - PUBLICAÇÕES

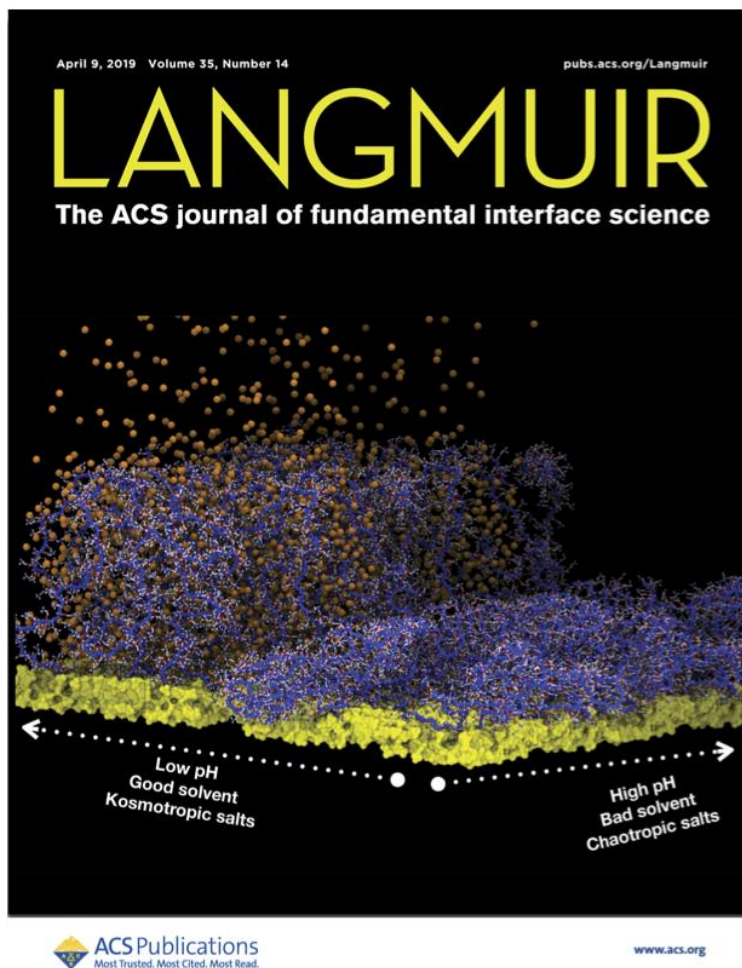
SANTOS, D. E. S.; POL-FACCHIN, L.; LINS, R. D.; SOARES, T. A. Polymyxin Binding to the Bacterial Outer Membrane Reveals Cation Displacement and Increasing Membrane Curvature in Susceptible but Not in Resistant Lipopolysaccharide Chemotypes. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 57(9),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



Abstract: Lipid-A is the causative agent of Gram-negative sepsis and is responsible for an increasingly high mortality rate among hospitalized patients. Compounds that bind Lipid-A can limit this inflammatory process. The cationic antimicrobial peptide polymyxin B (Pmx-B) is one of the simplest molecules capable of selectively binding to Lipid-A and may serve as a model for further development of Lipid-A binding agents. Gram-negative bacteria resistance to Pmx-B relies on the upregulation of a number of regulatory systems, which promote chemical modifications of the lipopolysaccharide (LPS) structure and leads to major changes in the physical–chemical properties of the outer membrane. A detailed understanding of how the chemical structure of the LPS modulates macroscopic properties of the outer membrane is paramount for the design and

optimization of novel drugs targeting clinically relevant strains. We have performed a systematic investigation of Pmx-B binding to outer membrane models composed of distinct LPS chemotypes experimentally shown to be either resistant or susceptible to the peptide. Molecular dynamics simulations were carried out for Pmx-B bound to the penta- and hexa-acylated forms of Lipid-A (more susceptible) and Lipid-A modified with 4-amino-4-deoxy-l-arabinose (resistant) as well as the penta-acylated form of LPS Re (less susceptible). The present simulations show that upon binding to the bacterial outer membrane surface, Pmx-B promotes cation displacement and structural changes in membrane curvature and integrity as a function of the LPS chemotype susceptibility or resistance to the antimicrobial peptide.

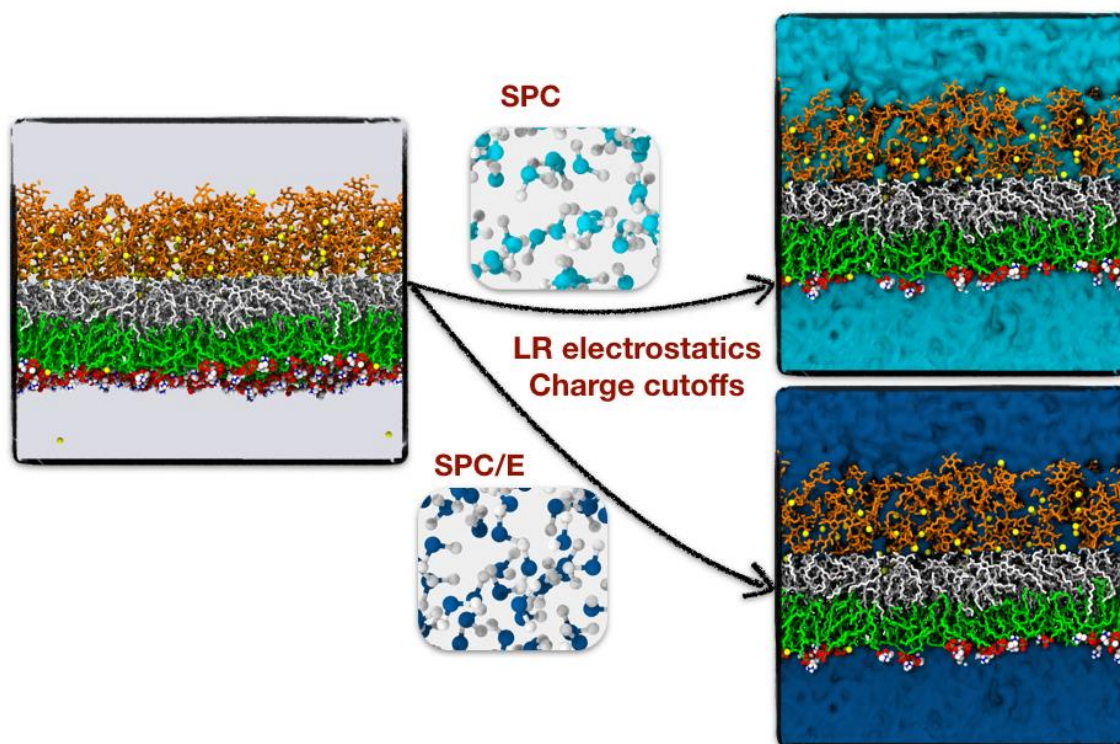
SANTOS, D. E. S.; LI, D.; RAMSTEDT, M.; GAUTROT, J.; SOARES, T. A. Conformational Dynamics and Responsiveness of Weak and Strong Polyelectrolyte Brushes: Atomistic Simulations of PDMAEMA and PMETAC. *Langmuir*, v. 35(14), p. 5037–5049, 2019. (CAPA)



Abstract: The complex solution behavior of polymer brushes is key to control their properties, including for biomedical applications and catalysis. The swelling behavior of poly(dimethyl aminoethyl methacrylate) (PDMAEMA) and poly(2-(methacryloyloxy)ethyl trimethylammonium chloride) (PMETAC) in response to changes in pH, solvent, and salt types has been investigated using atomistic molecular dynamics simulations. PDMAEMA and PMETAC have been selected as canonical models for weak and strong polyelectrolytes whose complex conformational behavior is particularly challenging for the development and validation of atomistic models. The GROMOS-derived atomic parameters reproduce the experimental swelling coefficients obtained from ellipsometry measurements for

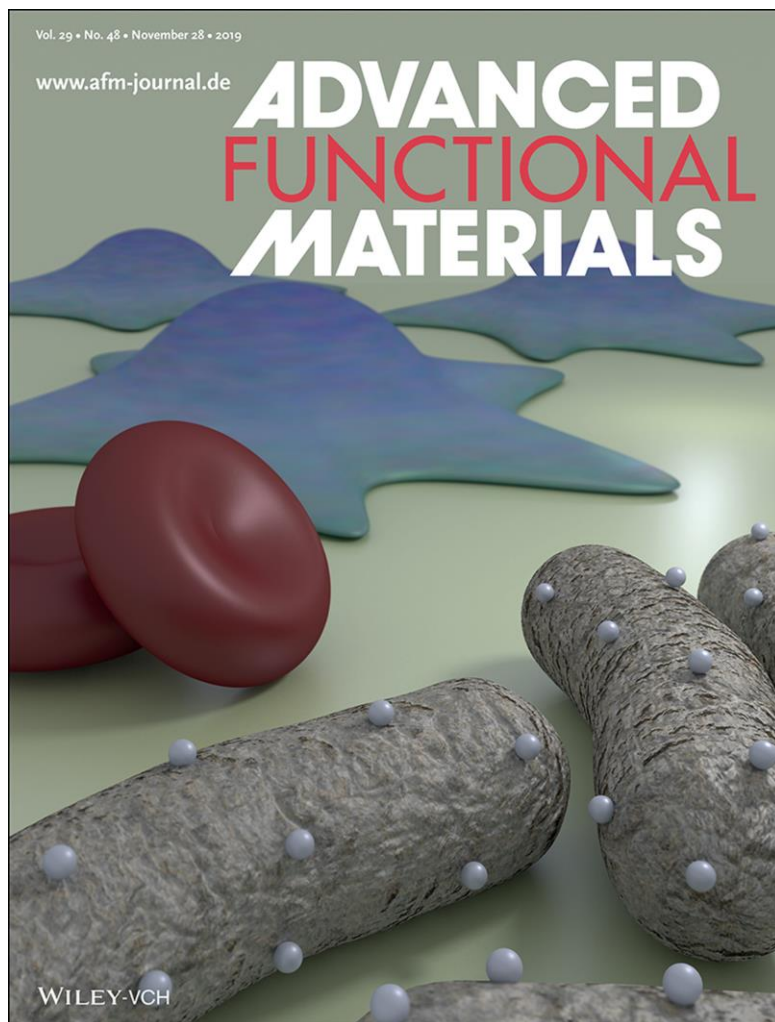
brushes of 5–15 nm thickness. The present atomistic models capture the protonated morphology of PDMAEMA, the swollen and collapsed conformations of PDMAEMA and PMETAC in good and bad solvents, and the salt-selective response of PMETAC. The modular nature of the molecular models allows for the simple extension of atomic parameters to a variety of polymers or copolymers.

LIMA, M. P. M.; NADER, M.; SANTOS, D. E. S.; SOARES, T. A. Compatibility of GROMOS-derived atomic parameters for lipopolysaccharide membranes with the SPC/E water model and alternative long-range electrostatic treatments using single nonbonded cutoff and atom-based charge schemes. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 0, p. 1-12, 2019.



Abstract: Recent developments of GROMACS v.2016 ceased to support methodological approaches used in the development and validation of the GROMOS force field. We investigated the performance of a previously developed extension of the GROMOS force field for lipopolysaccharides to reproduce the structural dynamics of bacterial outer membrane (OM) using a single cutoff for nonbonded interactions and atom-based charge truncation. We further compared this setup for use with reaction field (RF) or particle mesh Ewald (PME) approximations in the presence of simple point charge (SPC) and extended simple point charge (SPC/E) water models. We found that the OM structural dynamics is well conserved in all simulated conditions, reproducing the available experimental data within the measurement uncertainty. The SPC/E model induces a small increase in OM fluidity, and when combined with the RF correction, shows a decrease in water orientation at the membrane surface. The present simulations support the compatibility of the GROMOS-derived lipopolysaccharide (LPS) parameters for use with single cutoff and atom-based charge schemes, either with RF or PME approximations, in GROMACS v.2016. Both SPC and SPC/E water models are suitable for use, but usage of SPC/E combined with the reaction field correction needs to be further investigated.

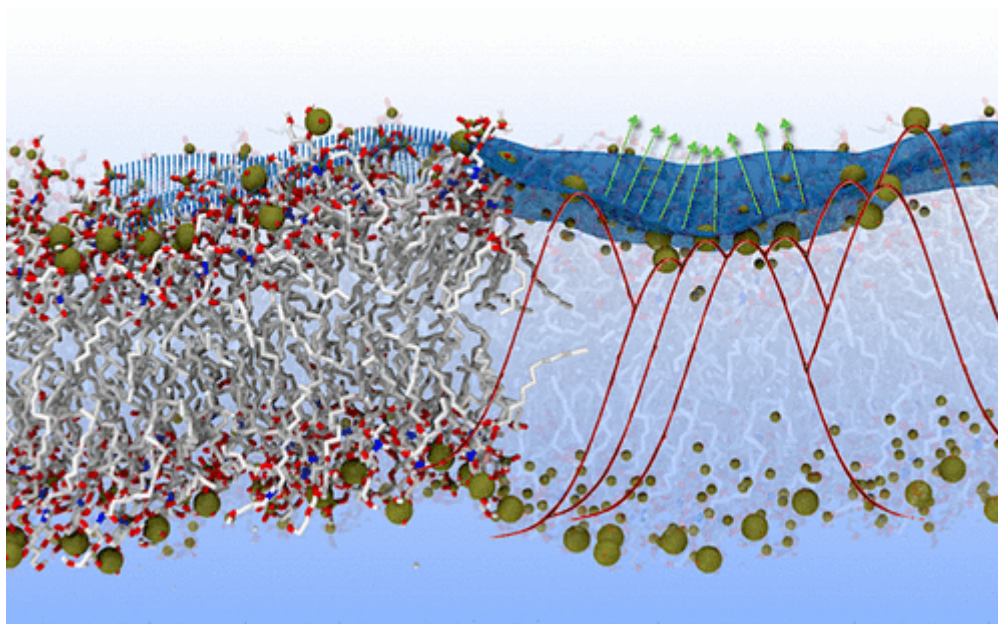
CAPELETTI, L. B.; DE OLIVEIRA, J. F. A.; LOIOLA, L. M. D.; GALDINO, F. E.; SANTOS, D. E. S.; SOARES, T. A.; FREITAS, R. O.; CARDOSO, M. B. Gram-Negative Bacteria Targeting Mediated by Carbohydrate–Carbohydrate Interactions Induced by Surface-Modified Nanoparticles. *Advanced Functional Materials*, v. 29, p. 1904216, 2019. (CAPA)



Abstract: Antibiotic resistant pathogens are a modern threat to the human health. As a worldwide spreading problem, there is an urgency for new strategies to minimize antibiotic resistance, particularly the super-resistant strains. Here, the efficient design of carbohydrate-coated silica nanoparticles is reported which specifically target Gram-negative bacteria cells. The system is functionalized with gluconamide moieties and demonstrates increased binding ability to the bacterial membrane, enabling controlled drug delivery onto the pathogen wall. In addition, the high stability of the nanoparticles in biological media and the lack of non-specific protein adhesion are engendered by such functionalization, which also demonstrates low cytotoxicity

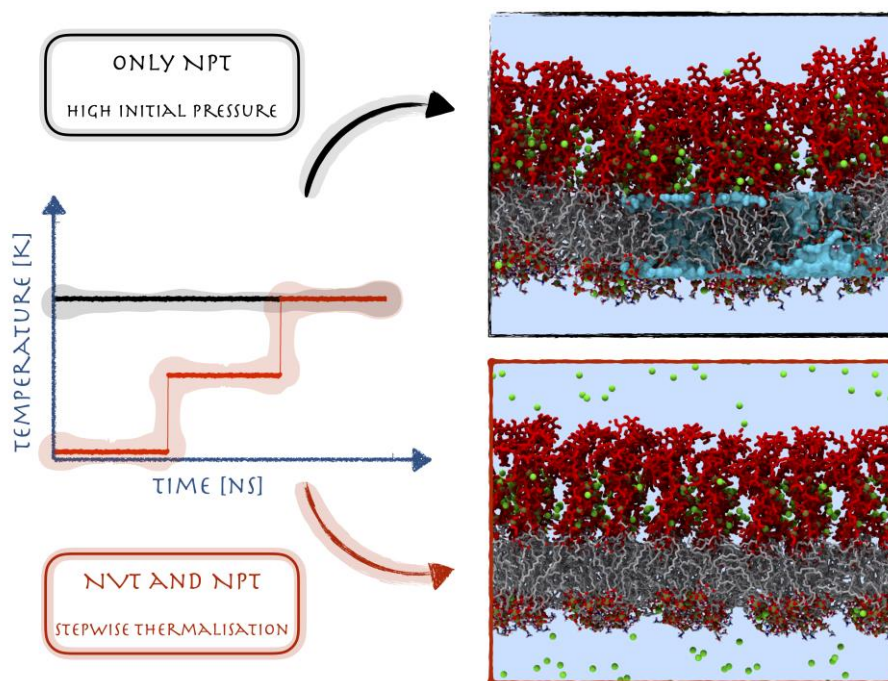
and hemolytic activity prevention. Local interaction between nanoparticles and the bacterium membrane is experimentally accessed at the biomolecular level unveiling a short-range chemical connection. Atomistic molecular dynamics simulations depict the rapid penetration of gluconamide in the lipopolysaccharide region of the bacterial outer membrane, corroborating the experimental findings. Thus, this novel outer membrane-targeting platform provides a new strategy to reduce drug intake and, hence, minimize bacterial resistance.

SANTOS, D. E. S.; PONTES, J. F. S.; LINS, R. D.; COUTINHO, K.; SOARES, T. A. SuAVE: A Tool for Analyzing Curvature-Dependent Properties in Chemical Interfaces. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60(2), p. 473-484, 2020.



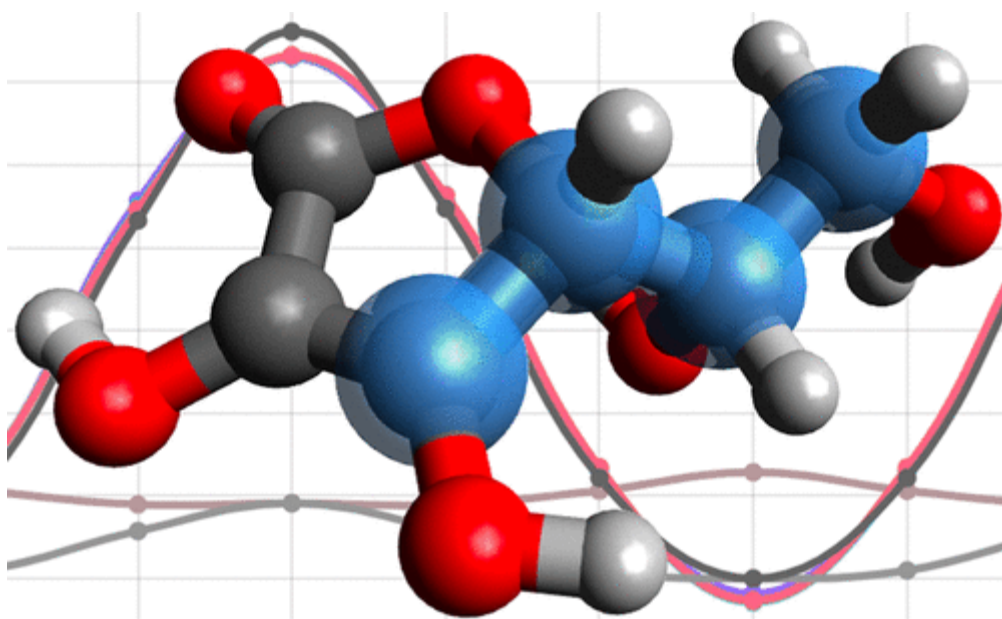
Abstract: Curvature is an intrinsic feature of biological membranes underlying vital cellular processes such as endocytosis, membrane fusion–fission, trafficking, and remodeling. The continuous expansion of the spatiotemporal scales accessible to computational simulations nowadays makes possible quasi-atomistic molecular dynamics simulations of these processes. In spite of that, computation of the shapes and curvatures associated with the dynamics of biological membranes remains challenging. For this reason, the effect of curvature is often neglected in the analysis of quantities essential for the accurate description of membrane properties (e.g., area and volume per lipid, density profiles, membrane thickness). We propose an algorithm for surface assessment via grid evaluation (SuAVE) that relies on the application of a radial base function to interpolate points scattered across an interface of any shape. This enables the representation of the chemical interface as fully differentiable so that related geometrical properties can be calculated through the straightforward employment of well-established differential geometry techniques. Hence, the effect of different types or degrees of curvature can be accurately taken into account in the calculations of structural properties of any interfaces regardless of chemical composition, asymmetry, and level of atom coarseness. The main functionalities implemented in SuAVE are featured for a number of tetraacylated and hexaacylated Lipid-A membranes of distinct curvatures and a surfactant micelle. We show that the properties calculated for moderately to highly curved membranes differ significantly between curvature-dependent and -independent algorithms.

MESSIAS, A.; SANTOS, D. E. S.; PONTES, F. J. S.; LIMA, F. S.; SOARES, T. A. Out of Sight, Out of Mind: The Effect of the Equilibration Protocol on the Structural Ensembles of Charged Glycolipid Bilayers. **Molecules**. v. 25 (21), p 5120-5136, 2020.



Abstract: Molecular dynamics (MD) simulations represent an essential tool in the toolbox of modern chemistry, enabling the prediction of experimental observables for a variety of chemical systems and processes and majorly impacting the study of biological membranes. However, the chemical diversity of complex lipids beyond phospholipids brings new challenges to well-established protocols used in MD simulations of soft matter and requires continuous assessment to ensure simulation reproducibility and minimize unphysical behavior. Lipopolysaccharides (LPS) are highly charged glycolipids whose aggregation in a lamellar arrangement requires the binding of numerous cations to oppositely charged groups deep inside the membrane. The delicate balance between the fully hydrated carbohydrate region and the smaller hydrophobic core makes LPS membranes very sensitive to the choice of equilibration protocol. In this work, we show that the protocol successfully used to equilibrate phospholipid bilayers when applied to complex lipopolysaccharide membranes occasionally leads to a small expansion of the simulation box very early in the equilibration phase. Although the use of a barostat algorithm controls the system dimension and particle distances according to the target pressure, fluctuation in the fleeting pressure occasionally enables a few water molecules to trickle into the hydrophobic region of the membrane, with spurious solvent buildup. We show that this effect stems from the initial steps of NPT equilibration, where initial pressure can be fairly high. This can be solved with the use of a stepwise-thermalization NVT/NPT protocol, as demonstrated for atomistic MD simulations of LPS/DPPE and lipid-A membranes in the presence of different salts using an extension of the GROMOS forcefield within the GROMACS software. This equilibration protocol should be standard procedure for the generation of consistent structural ensembles of charged glycolipids starting from atomic coordinates not previously pre-equilibrated. Although different ways to deal with this issue can be envisioned, we investigated one alternative that could be readily available in major MD engines with general users in mind.

RUSU, V. H.; SANTOS, D. E. S.; POLETO, M. D.; GALHEIGO, M. M.; GOMES, A. T. A.; VERLI, H.; SOARES, T. A.; LINS, R. D. Rotational Profiler: A Fast, Automated, and Interactive Server to Derive Torsional Dihedral Potentials for Classical Molecular Simulation. *Journal of Chemical Information and Modeling*. v. 60, p. 5923–5927, 2020.



Abstract: Rotational Profiler provides an analytical algorithm to compute sets of classical torsional dihedral parameters by fitting an empirical energy profile to a reference one that can be obtained experimentally or by quantum-mechanical methods. The resulting profiles are compatible with the functional forms in the most widely used biomolecular force fields (e.g., GROMOS, AMBER, OPLS, and CHARMM). The linear least-squares regression method is used to generate sets of parameters that best satisfy the fitting. Rotational Profiler is free to use, analytical, and force field/package independent.

DE NICOLA, A.; SOARES, T. A.; **SANTOS, D. E. S.**; BORE, S. L.; SEVINK, G. J. A.; CASCELLA, M.; MILANO, G. Aggregation of Lipid A Variants: a Hybrid Particle-Field Model. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1865, p. 129570, 2021.

Abstract: Lipid A is one of the three components of bacterial lipopolysaccharides constituting the outer membrane of Gram-negative bacteria, and is recognized to have an important biological role in the inflammatory response of mammals. Its biological activity is modulated by the number of acyl-chains that are present in the lipid and by the dielectric medium, *i.e.*, the type of counter-ions, through electrostatic interactions. In this paper, we report on a coarse-grained model of chemical variants of Lipid A based on the hybrid particle-field/molecular dynamics approach (hPF-MD). In particular, we investigate the stability of Lipid A bilayers for two different hexa- and tetra-acylated structures. Comparing particle density profiles along bilayer cross-sections, we find good agreement between the hPF-MD model and reference all-atom simulation for both chemical variants of Lipid A. hPF-MD models of constituted bilayers composed by hexa-acylated Lipid A in water are stable within the simulation time. We further validate our model by verifying that the phase behavior of Lipid A/counterion/water mixtures is correctly reproduced. In particular, hPF-MD simulations predict the correct self-assembly of different lamellar and micellar phases from an initially random distribution of Lipid A molecules with counterions in water. Finally, it is possible to observe the spontaneous formation and stability of Lipid A vesicles by fusion of micellar aggregates.

ANEXO B - PRÊMIOS



Figura A3.1. Primeiro lugar e melhor pôster do V Encontro Anual da Biofísica, ocorrido em Recife, entre os dias 05 e 06 de Fevereiro de 2018.



Figura A3.2. Segundo lugar na categoria pôster do V Encontro Anual da Biofísica, ocorrido em Recife, entre os dias 05 e 06 de Fevereiro de 2018.

ANEXO C - PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

2017

XIX Simpósio Brasileiro de Química Teórica. SuAVE: a computational tool for the assessment of curved surfaces. Águas de Lindóia, SP, Brasil.

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

6° Stint Workshop on Cell-Biomaterials Interface. The validation of polymer brush models: Accounting for new variables. Londres, Inglaterra.

2018

V Encontro Anual de BIOFÍSICA. SuAVE: Uma ferramenta para avaliação de propriedades dependentes de curvatura em superfícies genéricas. Recife, PE, Brasil.

XLIII Congress of the Brazilian Biophysical Society. SuAVE: a new computational perspective for analyzing biological systems. Santos, SP, Brasil.

Workshop Geometry of Soft Matter. SuAVE: a computational tool for the assessment of curved surfaces. Natal, RN, Brasil.

2019

V Congresso Regional da SBBf. SuAVE: Uma metodologia computacional para avaliação de interfaces químicas curvadas. Recife, PE, Brasil.

XLIV Congress of the Brazilian Biophysical Society. Gaussian Curvature and Elastic Energy Variations of Gram- Negative P. aeruginosa Susceptible and Resistant Chemotypes in Presence of Antimicrobial Peptide Polymyxin B. Santos, SP, Brasil.

Reunião do INCT de Fluidos Complexos, INCT-FCx. Computational Methodology for Calculating Structural and Elastic Properties of Vesicles. Hotel Estância Atibainha, Nazaré Paulista/SP, Brazil.

2020

South American Initiative on Molecular Simulations. SuAVE: A new computational perspective for analyzing biological systems. Evento online. Vídeo disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=ROiJNai5zic>

2021

10° EMMSB (Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos). SuAVE: Uma ferramenta para análise de propriedades dependentes da curvatura em interfaces químicas abertas e fechadas. Evento online.