



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL

Manoela Paschoal de Medeiros Lima

**Convergência de Propriedades Estruturais em Simulações Atomísticas de Membranas Lipopolissacarídicas com o Campo de Força GROMOS:** Diferentes Modelos de Água, Tratamentos Eletrostáticos de Longa Distância, Raio de Corte Simples e Esquema de Carga Baseado em Átomos

Recife

2021

Manoela Paschoal de Medeiros Lima

**Convergência de Propriedades Estruturais em Simulações Atomísticas de Membranas Lipopolissacarídicas com o Campo de Força GROMOS:** Diferentes Modelos de Água, Tratamentos Eletrostáticos de Longa Distância, Raio de Corte Simples e Esquema de Carga Baseado em Átomos

Dissertação de mestrado como requisito complementar para a obtenção do título de mestre do Programa de Pós-graduação em Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco.

Área de concentração: Química Teórica

**Orientadora: Prof. Dra. Thereza Amélia Soares**

Recife

2021

Catálogo na fonte  
Bibliotecária Monick Raquel Silvestre da S. Portes, CRB4-1217

L732c      Lima, Manoela Paschoal de Medeiros  
Convergência de propriedades estruturais em simulações atomísticas de membranas lipopolissacarídicas com o campo de força GROMOS: diferentes modelos de água, tratamentos eletrostáticos de longa distância, raio de corte simples e esquema de carga baseado em átomos / Manoela Paschoal de Medeiros Lima. – 2021.  
137 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Thereza Amélia Soares.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, Química, Recife, 2021.  
Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Química teórica. 2. Tratamentos eletrostáticos. I. Soares, Thereza Amélia (orientadora). II. Título.

541.2                      CDD (23. ed.)                      UFPE- CCEN 2021 - 188

Manoela Paschoal de Medeiros Lima

**Convergência de Propriedades Estruturais em Simulações Atomísticas de Membranas Lipopolissacarídicas com o Campo de Força GROMOS:** Diferentes Modelos de Água, Tratamentos Eletrostáticos de Longa Distância, Raio de Corte Simples e Esquema de Carga Baseado em Átomos

Dissertação de Mestrado como requisito complementar para a obtenção do título de mestre do Programa de Pós-graduação em Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovado em: 08/02/2021

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dra. Thereza Amélia Soares (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco  
Departamento de Química Fundamental

---

Prof. Dr. Roberto Lins  
Instituto Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz

---

Prof. Dr. Filipe da Silva Lima  
Universidade Federal de Pernambuco  
Departamento de Química Fundamental

Recife

2021

Dedico esse trabalho a todos os meus professores que sempre me fizeram acreditar na educação e que só por meio dela podemos ser instrumentos para a construção de um mundo melhor para todos os seres vivos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todas as pessoas do Departamento de Química Fundamental que me promoveram condições estruturais e psicológicas para o desenvolvimento intelectual, com a promoção de palestras, aulas e suporte. Aos meus amigos do laboratório Biomat, Denys Ewerton, Manuela Nader, Vinicius Firmino, Andresa Mersias e Breno Gazal, que permitiram conversas salutares, momentos de felicidade e a companhia para traçar um conhecimento como grupo, compartilhando informações, tirando dúvidas e prestando auxílio nos mais variados problemas. Agradeço em especial a minha orientadora Thereza Soares por toda orientação que só foram possíveis através de horas de discussão teórica, indicação de livros e artigos, por acompanhar de perto o meu trabalho e principalmente por me dar autonomia para ser profissional, assumindo responsabilidades. Agradeço a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa concedida durante todo o crescimento deste projeto e as agências que possibilitaram a infraestrutura e participação em eventos, como: Biomol/CAPES e STINT. E ao centro de computação de alto desempenho HPC2N (Umea University). Agradeço aos familiares que me deram suporte para a construção dos meus valores e caráter, que são para além do amor que compartilhamos, o que eu tenho de mais precioso na vida. Agradeço por fim ao meu namorado, Hélder, por acreditar no meu potencial e por ser porto seguro.

Para isso existem as escolas: não para ensinar as respostas, mas para ensinar as perguntas. As respostas nos permitem andar sobre a terra firme. Mas somente as perguntas nos permitem entrar pelo mar desconhecido. (ALVES, 2012, p. 67).

## RESUMO

Recentes implementações na versão do GROMACS 2016 levaram à suspensão de algoritmos previamente utilizados no desenvolvimento do campo de força GROMOS. Para garantir a precisão da abordagem metodológica atual adotada pelo GROMACS v.2016 com parâmetros atômicos previamente desenvolvidos como uma extensão do campo de força GROMOS para glicolipídeos, foram realizadas simulações de dinâmica molecular de membranas externas bacterianas formadas por lipopolissacarídeos e fosfolipídeos. As simulações foram realizadas em duas réplicas por períodos de 200 ns, com diferentes modelos de água e correções para o tratamento de interações eletrostáticas de longa distância com o uso de raio de corte simples de van der Waals para truncamento de interações baseado em grupos de carga atômicos. Mais especificamente foram comparados os modelos de água de carga pontual (SPC) e de carga pontual estendido (SPC/E) assim como as aproximações de campo de força reacional (RF) e malha de partículas de Ewald (PME) para o tratamento de interações eletrostáticas de longa distância. Análises dos sistemas simulados mostram que, sob todas as condições simuladas, as propriedades estruturais da membrana externa bacteriana reproduzem satisfatoriamente medidas experimentais dentro das incertezas associadas à medição. No entanto, foi observado um pequeno aumento da fluidez da membrana externa quando o modelo de água SPC/E é usado, e quando este modelo é combinado com as correções de RF, há uma redução da orientação de moléculas de água na superfície da membrana. Foi possível concluir que os parâmetros atômicos derivados do campo de força GROMOS para lipopolissacarídeos é compatível com o uso de um raio de corte simples para interações de van der Waals, esquema de cargas atômicas para as duas correções de interações de longo alcance RF e PME, e os dois modelos água SPC e SPC/E com a versão GROMACS 2016. Adicionalmente, caracterizamos os tempos de convergência para inúmeras propriedades estruturais extraídas destas simulações.

**Palavras-chaves:** modelos de água; tratamentos eletrostáticos de longo alcance; membrana externa de bactéria Gram-negativa.



## ABSTRACT

Recent implementations in the GROMACS 2016 version have led to the suspension of algorithms previously used in the development of the GROMOS force field. To guarantee the accuracy of the current methodological approach adopted by GROMACS v.2016 with atomic parameters previously developed as an extension of the GROMOS force field for glycolipids, molecular dynamics simulations of external bacterial membranes formed by lipopolysaccharides and phospholipids were carried out. The simulations were carried out in two replicates for periods of 200 ns, with different water models and corrections for the treatment of long-distance electrostatic interactions with the use of simple van der Waals cutting radius for truncating interactions based on groups atomic charge. More specifically, the point charge water (SPC) and extended point charge (SPC/E) models were compared, as well as the reactive force field (RF) and Particle Mesh Ewald (PME) approximations for the treatment of interactions long-distance electrostatic. Analysis of the simulated systems shows that, under all simulated conditions, the structural properties of the external bacterial membrane satisfactorily reproduce experimental measurements within the uncertainties associated with the measurement. However, a small increase in the fluidity of the outer membrane was observed when the SPC/E water model is used, and when this model is combined with RF corrections, there is a reduction in the orientation of water molecules on the membrane surface. It was possible to conclude that the atomic parameters derived from the GROMOS force field for lipopolysaccharides is compatible with the use of a simple cutting radius for van der Waals interactions, atomic charge scheme for the two corrections of long-range interactions RF and PME, and the two water models SPC and SPC/E with the GROMACS 2016 version. Additionally, we characterize the convergence times for numerous structural properties extracted from these simulations.

**Keywords:** single point water models; long-range electrostatic treatment; gram-negative outer membrane.

## LISTA DE FIGURAS

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Figura 1 – | Arquitetura da parede celular de bactéria gram-negativas.. . . . .   | 21 |
| Figura 2 – | Desenho esquemático dos quimiotipos e cadeias carbônicas da estrutura LPS-rough. Composta pelo Lipideo A - com dois radicais fosfato(em rosa) e cadeias aciladas de ácidos dodecanoíco e 3-hidroxidodecanoíco nas cadeias D-glucose(em azul); pelo Lipideo Re - com dois radicais carboxila (em roxo escuro) nas cadeias 3-desoxi-D-mannoct-2-ulosônico (KDO)(em salmão); pelo galU - com três radicais fosfato(em rosa) na primeira heptose(em verde) e um radical carboxila(em roxo escuro) ligado a 2-(2-L-alanil)-2-desoxi-D-galactosamina(em laranja); pelo rmlC - caracterizado por três glucoses(em roxo); e por rhamanose(em amarelo) e glucose(em roxo).. . . . . | 23 |
| Figura 3 – | Estrutura química da molécula de lipopolissacarídeo da bactéria Gram-negativa P.aeruginosa. Podem ser observadas três regiões funcionais: o lipídeo A, cujas cadeias alquilas formam a parte lipídica da bicamada, e o inner e outer core constituídos por oligossacarídeos. Fonte: T. Straatsma e T. Soares.(2009) . . . . .  | 25 |
| Figura 4 – | Representação das principais interações envolvidas que compõem a modelagem de campos de força, sendo os potenciais, referentes às interações intramoleculares: ligações, ângulos e diedros, respectivamente, em (a), (b),(c) e (d). . . . .  | 32 |
| Figura 5 – | A esfera de corte de raio $r_c$ e o raio externo $r_l$ em torno da molécula 1. Moléculas 2, 3, 4, 5 e 6 estão na lista da molécula 1; a molécula 7 não está na lista. . . . .  | 40 |
| Figura 6 – | Representação da aproximação da Equação de Coulomb a partir da utilização do raio de corte.. . . .   | 43 |

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Figura 7 –  | Representação da suavização da equação de Coulomb a partir da metodologia PME do espaço real (a esquerda) e recíproco (a direita) com o eixo x representando a distância. ....  | 44 |
| Figura 8 –  | Representação da estruturação do grid de: .....   | 45 |
| Figura 9 –  | Estrutura química da moléculas pentaacilada de LPS de <i>P. aeruginosa</i> . ....   | 53 |
| Figura 10 – | Projeções no plano xy (em rosa) para cálculo de $A_L$ considerando os átomos de fósforo de lipídio A e DPPE. ....   | 57 |
| Figura 11 – | Representação esquemática da função de distribuição radial considerando esferas de solvatação e picos de coordenação.. ....   | 61 |
| Figura 12 – | Representação esquemática do diagrama de caixa .....  | 63 |
| Figura 13 – | Representação do parâmetro de ordem do programa SuAVE para SPC-RF(preto), SPC/E-RF(verde), SPC-PME(vermelho) e SPC/E-PME(azul) em 200 ns. ....  | 66 |
| Figura 14 – | Distribuição das frequências da curvatura de LPS/DPPE em função dos ângulos de curvatura dos sistemas SPC-RF(preto), SPC-PME(vermelho), SPC/E-RF(verde) e SPC/E-PME(azul) ao longo de 200 ns.....   | 67 |
| Figura 15 – | Representação da membrana de LPS/DPPE: (a) SPC-RF(preto), (b) SPC-PME(vermelho), (c) SPC/E-RF(verde) e (d) SPC/E-PME(azul) em 1ns (a esquerda) e 200ns (a direita), respectivamente. ....   | 67 |
| Figura 16 – | (a) Evolução temporal e (b) diagrama de barra da área por lipídeo ( $A_L$ ). (c) Evolução temporal para a bicamada e (d) diagrama de barra da espessura da membrana ( $D_{HH}$ ). Calculados para SPC-RF (preto), SPC-PME (vermelho), SPC/E-RF (verde) e SPC/E-PME (azul). ....   | 70 |
| Figura 17 – | Representação do perfil de densidade do sistema simulado – Densidade ( $kg.m^{-3}$ ) - ao longo do eixo Coordenada (nm) - z. Nesse eixo temos: água (azul), DPPE (verde), LPS (vermelho), fosfatos (amarelo) e íons $Ca^{2+}$ (roxo).Ao lado temos a representação do sistema LPS/DPPE no perfil de densidade, em que DPPE está em verde, LPS em vermelho. .... | 72 |

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Figura 18 – | Perfil de densidade do sistema ( $kg.m^{-3}$ ) ao longo de coordenada ( eixo z, em nm) para os experimentos (a) SPC-RF; (b) SPC-PME; (c) SPC/E-RF e (d) SPC/E-PME em 200ns. Ao longo do eixo de coordenadas: água (azul), DPPE (verde), LPS (vermelho), fosfatos (amarelo) e íons $Ca^{2+}$ (roxo). . . . .                                     | 73 |
| Figura 19 – | Diagrama de caixa com o posicionamento dos fósforos e dos íons $Ca^{2+}$ para os modelos (a) SPC-RF,(b) SPC-PME,(c) SPC/E-RF e (d)SPC/E-PME. A representação está íons $Ca^{2+}$ (azul), P2H (amarelo), P4H (verde), P6H (vermelho), PA (lilas), PD (marrom) e P DPPE (rosa). . . . .   | 74 |
| Figura 20 – | Representação do lipídio A e das cadeias aciladas (I) ácido 3-hidroxidecanoyl (10:0-LP2), (II) ácido dodecanoyl (10:0-LP1) e (III) ácido dodecanoyl(12:0-LP1). . . . .  | 75 |
| Figura 21 – | Parâmetro de deutério $S_{CD}$ para cadeias aciladas de LPS. Parâmetro de ordem para as cadeias aciladas (a)SPC-RF (b)SPC-PME (c)SPC/E-RF (d) SPC/E-PME. Cadeias sn1 são representadas (em preto), sn2 (em vermelho) e sn3(em verde). . . . .   | 76 |
| Figura 22 – | Função de distribuição radial entre íons $Ca^{2+}$ : OW (a) e $PO_4$ (b); OW: OW(c) e $PO_4$ (d). . . . .   | 79 |
| Figura 23 – | Função de espalhamento, para experimento SPC-RF, dos íons ( $Ca^{2+}$ , em azul) e átomos de fósforo de LPS/DPPE (em heptose (galU): P2H(laranja),P4H(verde), P6H(vermelho); em glucose (lipídeo A): PA(roxo), PD(marrom);e de DPPE: P DPPE (rosa)), em função dos eixos x, y e z. . . . .  | 80 |
| Figura 24 – | Parâmetro de ordenamento das moléculas de água ( $S_{water}$ ), calculado por rotina gromacs, na superfície externa da membrana. Os sistemas simulados são (a) SPC-RF;(b) SPC-PME;(c) SPC/E-RF e (d) SPC/E-PME. Em preto,os primeiros 25 ns; em vermelho, os últimos 25 ns (75-100 ns), e pontilhado os intervalos 25-50 ns e 50-75 ns. . . . . | 80 |
| Figura 25 – | Função de autocorrelação (adimensional) entre os oxigênios da molécula de água para os modelos SPC e SPC/E, submetidos a TELD RF e PME.   |    |

|             |   |    |
|-------------|---|----|
|             | Tem-se a representação de SPC/E-RF (verde), SPC-RF (preto), SPC-PME (vermelho) e SPC/E-PME (azul). . . . .  | 82 |
| Figura 26 – | Função de autocorrelação de água pura em função do tempo (ao longo de 100 ns). São representados os modelos SPC (roxo) e SPC/E (azul ciano).  | 83 |
| Figura 27 – | (a) Cálculo de energia total e (b) potencial durante a trajetória de 200 ns para o sistema LPS/DPPE em presença de água SPC e SPC/E, com TELD RF e PME. Os experimentos respresentados são SPC-RF (preto), SPC-PME (vermelho), SPC/E-RF (verde) e SPC/E-PME (azul). . . . .                       | 85 |
| Figura 28 – | Distribuição dos ângulos de curvatura para 800 ns. Os sistemas representados são em vermelho SPC-PME e em azul SPC/E-PME. . . . .   | 86 |
| Figura 29 – | Área por lipídeo ( $A_L$ ) ao longo de 800 ns (a), histograma da média da área por lipídeo ( $A_L$ ) (b), espessura da bicamada lipídica ( $D_{HH}$ ) ao longo de 800 ns (c) e histograma da média da espessura da bicamada ( $D_{HH}$ ) (d) para SPC-PME (vermelho) e SPC/E-PME (azul).. . . . . | 87 |
| Figura 30 – | Média temporal para as análise de área por lipídeo ( $A_L$ ) e espessura da bicamada ( $D_{HH}$ ) em frações de 100 ns. Representadas para os sistemas LPS/DPPE e contra-íons $Ca^{2+}$ em presença de SPC-PME (vermelho) e SPC/E-PME (azul). . . . .   | 88 |
| Figura 31 – | Perfil de densidade do sistema ( $kg.m^{-3}$ ) ao longo de coordenada ( eixo z, em nm) para os experimentos SPC-PME(esquerda) e SPC/E-PME(direita) em 800 ns. Ao longo do eixo de coordenadas: água (azul), DPPE (verde), LPS (vermelho), fosfatos (amarelo) e íons $Ca^{2+}$ (roxo). . . . .     | 89 |
| Figura 32 – | Diagrama de caixa para os modelos (a)SPC-PME e (b)SPC/E-PME a partir dos íons $Ca^{2+}$ (azul), P2H (amarelo), P4H (verde),P6H (vermelho), PA (lilás), PD (marrom) e P DPPE (rosa). . . . .   | 90 |
| Figura 33 – | Parâmetro de deutério $S_{CD}$ para cadeias aciladas de LPS. Média de tempo dos últimos 50 ns de simulação para SPC-PME (a) e SPC/E-PME (b). Cadeias sn1 são representadas em preto, sn2 em vermelho e sn3 em verde.  | 90 |
| Figura 34 – | Representação da ligação íons $Ca^{2+}$ e $(CH_3)HPO_4$ . . . . .   | 92 |

|             |   |     |
|-------------|---|-----|
| Figura 35 – | Número de coordenação médio em sistema LPS/DPPE com SPC-PME(vermelho) e SPC/E-PME(azul), referente a ligação: íon (a) $Ca^{2+}$ -OW, (b) íon $Ca^{2+}$ - $PO_4$ e (c) OW- $PO_4$ ..   | 93  |
| Figura 36 – | Função de distribuição radial (ao final de 800 ns) em função da distância das ligações ( em nm) para os sistemas (a) $Ca^{2+}$ -OW, (b) $Ca^{2+}$ - $PO_4$ , (c)OW-OW e (d) OW- $PO_4$ ..   | 94  |
| Figura 37 – | Função de espalhamento, para experimento SPC-PME, dos íons ( $Ca^{2+}$ , em azul) e átomos de fósforo de LPS/DPPE (em heptose (galU): P2H(laranja), P4H(verde), P6H(vermelho); em glucose (lipídeo A): PA(roxos), PD(marrom); e de DPPE: P DPPE (rosa)), em função dos eixos x, y e z. ....   | 97  |
| Figura 38 – | Função de espalhamento, para experimento SPC/E-PME, dos íons ( $Ca^{2+}$ , em azul) e átomos de fósforo de LPS/DPPE (em heptose (galU): P2H(laranja), P4H(verde), P6H(vermelho); em glucose (lipídeo A): PA(roxos), PD(marrom);e de DPPE: P DPPE (rosa)), em função dos eixos x, y e z. ....  | 97  |
| Figura 39 – | Difusão da água em presença de LPS/DPPE (em unidades $10^{-5}cm^2/2$ ) por tempo (ns), representada por tensor único da média em x, y e z; calculado por meio de rotina gromacs. Em vermelho, SPC-PME e em azul SPC/E-PME. ....   | 98  |
| Figura 40 – | Razão de hidratação das cadeias aciladas ao longo de 800 ns. Representados, em vermelho, SPC-PME e ,em azul, SPC/E-PME. ....  | 100 |
| Figura 41 – | Parâmetro de ordenamento das moléculas de água ( $S_{water}$ ), calculado por rotina gromacs, na superfície externa da membrana. Os sistemas simulados são SPC-PME (esquerda) e SPC/E-PME (direita). No intervalo 700-800 ns de simulação temos em preto, os primeiros 25 ns; em vermelho, os últimos 25 ns (75-100 ns), e pontilhado os intervalos 25-50 ns e 50-75 ns. .... | 101 |
| Figura 42 – | Função de autocorrelação de água SPC (vermelho) e SPC/E (azul) em relação ao tempo. ....  | 101 |

## LISTA DE TABELAS

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Tabela 1 – | Parâmetros de campo de força e propriedades selecionadas para simple point charge (SPC) e extended simple point charge (SPC/E), modelos de água a 300 K e condições de simulação idênticas. Com carga de cada átomo ( $q_H$ e $q_O$ , em <i>eltrons</i> ) <sup>a,b</sup> , o ângulo entre as ligações H-O ( $\Theta_{HOH}$ , em <i>graus</i> ) <sup>c</sup> , o raio da ligação H-O ( $r_{O-H}$ , em <i>nm</i> ) <sup>d</sup> , constante dielétrica de Lennard Jones ( $\epsilon$ , em <i>kJ/mol</i> ) <sup>e</sup> , distância em que o potencial intermolecular entre as duas partículas é zero ( $\sigma$ em <i>nm</i> ) <sup>f</sup> , energia potencial ( $E_{pot}$ em <i>kJ/mol</i> ) <sup>g</sup> , momento de dipolo ( $D$ , em <i>debye</i> ) <sup>h</sup> , e coeficiente de autodifusão ( $D$ , em $10^{-5}cm^2/s$ ) <sup>i</sup> . . . . . | 37 |
| Tabela 2 – | Descrição do número de moléculas de cada componente do sistema utilizados na montagem das simulações e do tempo total de simulação alcançado ao final da parte I. Os sistemas foram LPS/DPPE a partir de modelos SPC e SPC/E; com tratamentos eletrostáticos de longa distância (TELD) RF e PME; as composições são descritas em termos de moléculas para LPS e $H_2O$ , e de íons para $Ca^{2+}$ ; com o tempo de simulação de 200ns. . . . .  | 56 |
| Tabela 3 – | Descrição do número de moléculas de cada componente do sistema utilizados na montagem das simulações e do tempo total de simulação alcançado ao final da parte II. Os sistemas foram LPS/DPPE a partir de modelos SPC e SPC/E; com tratamentos eletrostáticos de longa distância (TELD) PME; as composições são descritas em termos de moléculas para LPS e $H_2O$ , e de íons para $Ca^{2+}$ ; com o tempo de simulação de 800ns. . .  | 56 |
| Tabela 4 – | Valores comparativos da função de distribuição de pares ( $g(r)$ ) entre $Ca^{2+}$ -OW, $Ca^{2+}$ - $PO_4$ , $PO_4$ -OW e OW-OW. São descritos os valores obtidos computacionalmente nesse trabalho ( $g(r)$ ); valores comparativos da literatura ( $g(r)$ base) e suas metodologias de base. . . . .  | 63 |

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Tabela 5 –  | Valores médios de área por lipídeo ( $A_L$ , em $nm^2$ ), espessura ( $D_{HH}$ , em nm), parâmetro de deutério ( $S_{CD}$ , sem unidade de medida), difusividade do íon ( $D_{ion}$ , em $cm^2/s$ ) para o LPS-rough hexaacilado com modelos de água SPC-RF, SPC-PME, SPC/E-RF e SPC/E-PME.. . . . .  | 70 |
| Tabela 6 –  | Valores de coordenação dos ligantes calculadas por meio da função de distribuição radial (RDF) de gromos - retirados do ponto médio do primeiro pico de solvatação das ligações de $Ca^{2+}$ -OW, $Ca^{2+}$ - $PO_4$ , OW- $PO_4$ e OW-OW para o LPS-rough hexaacilado com modelos de água SPC-RF, SPC-PME, SPC/E-RF e SPC/E-PME. . . . .   | 72 |
| Tabela 7 –  | Tabela com os valores do parâmetro de deutério de sn1, sn2 e sn3; nos experimentos SPC-RF, SPC-PME, SPC/E-RF e SPC/E-PME. . . . .   | 78 |
| Tabela 8 –  | Constantes $C_6$ e $C_{12}$ de Lennard-Jones para o cálculo da energia de pares Oxigênio (O) e Hidrogênio (H), para os modelos de água SPC e SPC/E. .   | 84 |
| Tabela 9 –  | Parâmetros de energia de Lennard-Jones intermolecular e Coulomb intermolecular para os modelos SPC e SPC/E com TELD RF e PME. São apresentados na tabela os seguintes parâmetros: raio de corte (Cutoff, em nm), Energia de Lennard-Jones (Energia LJ, em $10^3$ kJ/mol), erro estatístico calculado por gromacs referente a energia de Lennard-Jones (em $10^3$ kJ/mol)), Energia de Coulomb (Energia Coulomb em $10^3$ kJ/mol) e o erro estatístico calculado por gromacs referente a energia de Coulomb (em $10^3$ kJ/mol)). . . . . | 84 |
| Tabela 10 – | Representação temporal cumulativa para a análise área por lipídeo ( $A_L, em [nm]^2$ ) e espessura da bicamada ( $D_{HH}, em [nm]$ ) em presença de água SPC-PME e SPC/E-PME no sistema LPS/DPPE e contra-íons $Ca^{2+}$ ..   | 88 |
| Tabela 11 – | Parâmetro de ordem de deutério (adimensional) para as cadeias aciladas sn1, sn2 e sn3 ao longo de 800 ns em presença de água SPC e SPC/E... .   | 91 |
| Tabela 12 – | Valores de coordenação dos ligantes calculadas por meio da função de distribuição radial (RDF) de gromos - retirados do ponto médio do primeiro pico de solvatação das ligações de $Ca^{2+}$ -OW, $Ca^{2+}$ - $PO_4$ , OW- $PO_4$ e OW-OW para o LPS-rough hexaacilado com modelos de água SPC-RF, SPC-PME, SPC/E-RF e SPC/E-PME a simulação de 800ns. . . . .  | 92 |



|             |   |     |
|-------------|---|-----|
| Tabela 13 – | Coeficientes de difusão (difusividade molar) dos íons $Ca^{2+}$ em $10^{-7}(cm^2/s)$ , em intervalos de 100 ns por meio do cálculo de tensor total medidos para LPS/DPPE em presença de água SPC e SPC/E respectivamente. . . . .   | 96  |
| Tabela 14 – | Coeficientes de difusão (difusividade molar) dos íons $Ca^{2+}$ em $10^{-7}(cm^2/s)$ ao longo de todo o intervalo de tempo de forma cumulativa, representado pelo eixo z e plano xy em modelos SPC e SPC/E respectivamente. . . . . | 96  |
| Tabela 15 – | Representação temporal cumulativa para a análise $A_L$ em presença de SPC-PME e SPC/E-PME no sistema LPS/DPPE e contra-íons $Ca^{2+}$ . . . . .   | 132 |
| Tabela 16 – | Representação temporal a cada 100ns para a análise $A_L$ em presença de SPC-PME e SPC/E-PME no sistema LPS/DPPE e contra-íons $Ca^{2+}$ . . . . .   | 132 |
| Tabela 17 – | Representação temporal cumulativa para a análise $D_{HH}$ em presença de SPC-PME e SPC/E-PME no sistema LPS/DPPE e contra-íons $Ca^{2+}$ . . . . .  | 133 |
| Tabela 18 – | Representação temporal cumulativa para a análise "Order" em presença de SPC-PME e SPC/E-PME no sistema LPS/DPPE e contra-íons $Ca^{2+}$ . . . . .   | 133 |
| Tabela 19 – | Representação temporal a cada 100ns para a análise $D_{HH}$ em presença de SPC-PME e SPC/E-PME no sistema LPS/DPPE e contra-íons $Ca^{2+}$ . . . . .  | 134 |
| Tabela 20 – | Número de coordenação do $Ca^{2+}$ -OW na primeira camada de solvatação a cada 100ns de simulação.. . . .   | 135 |
| Tabela 21 – | Número de coordenação do $Ca^{2+}$ - $PO_4$ na primeira camada de solvatação a cada 100ns de simulação. . . . .   | 135 |
| Tabela 22 – | Número de coordenação do OW-OW na primeira camada de solvatação a cada 100ns de simulação. . . . .  | 136 |
| Tabela 23 – | Número de coordenação do OW- $PO_4$ na primeira camada de solvatação a cada 100ns de simulação. . . . .   | 136 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

|               |  |
|---------------|--|
| $A_L$         | Área por lipídio                                   |
| DM            | Dinâmica Molecular                                 |
| <i>DHH</i>    | Espessura da bicamada                              |
| DPPE          | Dipalmitoyl phosphatidylethanolamine               |
| GROMACS       | Groningen Machine for Chemical Simulations         |
| GROMOS        | Groningen Molecular Simulation                     |
| KDO           | Ácido D-manno-oct-2-usolónico                      |
| LJ            | Lennard Jones                                      |
| LPS           | Lipopolissacarídeo                                 |
| ME            | Membrana Externa                                   |
| NPT           | Número de partículas, pressão, temperatura         |
| NTA           | ácido nitriloacético                               |
| PBC           | <i>Periodic Bondary Conditions</i>                 |
| PME           | <i>Particle Mesh Ewald</i>                         |
| Rc            | Raio de corte                                      |
| RDF           | <i>Radial Distribution Function</i>                |
| RF            | Reaction Field                                     |
| RMN           | Ressonância Magnética Nuclear                      |
| RMSD          | <i>Root Mean Square Deviation</i>                  |
| RMSF          | <i>Root Mean Square Deviation</i>                  |
| SCD           | Parâmetro de ordem de deutério                     |
| SN1           | Cadeia alquil do lipídio A contendo 7 átomos de C  |
| SN2           | Cadeia alquil do lipídio A contendo 7 átomos de C  |
| SN3           | Cadeia alquil do lipídio A contendo 8 átomos de    |
| SPC           | <i>Single Point Charge</i>                         |
| SPC/E         | <i>Single Point Charge Extended</i>                |
| <i>Swater</i> | Parâmetro de ordenação da água                     |
| TELD          | <i>Tratamento Eletrostático de Longa Distância</i> |

## SUMÁRIO

|              |   |           |
|--------------|---|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>21</b> |
| 1.1          | COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DO SISTEMA .....   | 22        |
| 1.2          | SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS E DINÂMICA MOLECULAR .....                                      | 25        |
| <b>2</b>     | <b>METODOLOGIA .....</b>  | <b>28</b> |
| 2.1          | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....   | 28        |
| <b>2.1.1</b> | <b>Ensembles Termodinâmicos .....</b>   | <b>28</b> |
| <b>2.1.2</b> | <b>Campos de Força Aditivos .....</b>   | <b>30</b> |
| <b>2.1.3</b> | <b>Modelos Explícitos de Água .....</b>   | <b>34</b> |
| <b>2.1.4</b> | <b>Algoritmo de Integração Leapfrog. ....</b>   | <b>37</b> |
| <b>2.1.5</b> | <b>Condições Periódicas De Contorno. ....</b>   | <b>38</b> |
| 2.1.5.1      | Lista de Vizinhos .....   | 40        |
| <b>2.1.6</b> | <b>Interações de van der Waals de Longa Distância .....</b>                               | <b>41</b> |
| <b>2.1.7</b> | <b>Interações Eletrostáticas de Longa Distância .....</b>                                 | <b>42</b> |
| 2.1.7.1      | Particle-mesh Ewald. ....   | 43        |
| 2.1.7.2      | Reaction Field. ....  | 47        |
| <b>2.1.8</b> | <b>Termostato .....</b>   | <b>49</b> |
| <b>2.1.9</b> | <b>Barostato .....</b>  | <b>50</b> |
| <b>3</b>     | <b>PROCEDIMENTOS COMPUTACIONAIS .....</b>   | <b>52</b> |
| 3.1          | ESTRUTURA E PARÂMETROS UTILIZADOS NA SIMULAÇÃO<br>DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> . .... | 52        |
| 3.2          | SETUP DE SIMULAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ÍONS<br>$Ca^{2+}$ E LPS/DPPE. ....             | 55        |
| 3.3          | ANÁLISES. ....  | 56        |
| <b>3.3.1</b> | <b>Área por cabeça (<math>A_L</math>) .....</b>   | <b>56</b> |
| <b>3.3.2</b> | <b>Espessura da Bicamada. ....</b>  | <b>57</b> |
| <b>3.3.3</b> | <b>Curvatura da Membrana. ....</b>  | <b>58</b> |
| <b>3.3.4</b> | <b>Difusão de íons .....</b>  | <b>58</b> |
| <b>3.3.5</b> | <b>Função de autocorrelação .....</b>   | <b>59</b> |
| <b>3.3.6</b> | <b>Função de distribuição radial. ....</b>  | <b>59</b> |
| <b>3.3.7</b> | <b>Função de ordem parâmetro de deutério. ....</b>  | <b>62</b> |

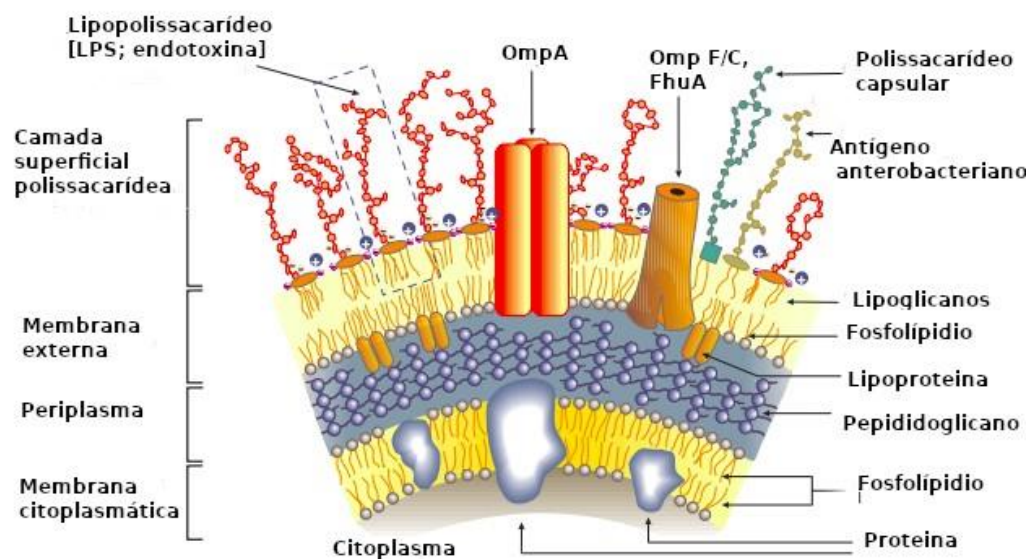
|               |  |           |
|---------------|--|-----------|
| <b>3.3.8</b>  | <b>Função de distribuição de água .....</b>  | <b>62</b> |
| <b>3.3.9</b>  | <b>Diagrama de Caixa .....</b>   | <b>62</b> |
| <b>3.3.10</b> | <b>Função de espalhamento .....</b>  | <b>63</b> |
| <b>4</b>      | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>  | <b>65</b> |
| <b>4.1</b>    | <b>ANÁLISE E CONVERGÊNCIA DE PROPRIEDADES<br/>ESTRUTURAIS E DINÂMICAS: PARTE I .....</b>                 | <b>65</b> |
| <b>4.1.1</b>  | <b>Estabilidade do Arranjo Lamelar em Membranas de LPS/DPPE ..</b>                                       | <b>65</b> |
| <b>4.1.2</b>  | <b>Propriedades Estruturais: Área por Lipídeo, Espessura da<br/>Membrana e Perfil de Densidade .....</b> | <b>69</b> |
| 4.1.2.1       | Perfil de densidade .....  | 71        |
| 4.1.2.2       | Função de probabilidade de densidade .....   | 73        |
| <b>4.1.3</b>  | <b>Propriedades Dinâmicas: <math>S_{CD}</math> .....</b>   | <b>75</b> |
| <b>4.1.4</b>  | <b>Dinâmica Estrutural de Solvatação da Membrana de LPS/DPPE ..</b>                                      | <b>78</b> |
| 4.1.4.1       | Função de distribuição radial .....  | 78        |
| 4.1.4.2       | Função de espalhamento .....   | 80        |
| <b>4.1.5</b>  | <b>Comportamento da Água em LPS/DPPE .....</b>   | <b>81</b> |
| 4.1.5.1       | Orientação da água .....   | 81        |
| <b>4.1.6</b>  | <b>Convergência de Propriedades Estruturais em 200 ns .....</b>  | <b>82</b> |
| <b>4.1.7</b>  | <b>Comparações da função de energia de pares.....</b>  | <b>84</b> |
| <b>4.2</b>    | <b>ANÁLISE E CONVERGÊNCIA DE PROPRIEDADES<br/>ESTRUTURAIS E DINÂMICAS: PARTE II .....</b>                | <b>86</b> |
| <b>4.2.1</b>  | <b>Estabilidade do Arranjo Lamelar em Membranas LPS/DPPE .....</b>                                       | <b>86</b> |
| <b>4.2.2</b>  | <b>Propriedades Estruturais: <math>A_L</math>, <math>D_{HH}</math> e Perfil de Densidade.....</b>        | <b>87</b> |
| 4.2.2.1       | Perfil de densidade .....  | 90        |
| 4.2.2.2       | Função de Probabilidade de Densidade .....   | 90        |
| <b>4.2.3</b>  | <b>Propriedade Dinâmica: <math>S_{CD}</math> .....</b>   | <b>91</b> |
| <b>4.2.4</b>  | <b>Dinâmica Estrutural de Solvatação de Membrana de LPS/DPPE</b>   | <b>92</b> |
| 4.2.4.1       | Função de distribuição radial .....  | 92        |
| <b>4.2.5</b>  | <b>Difusão de íons .....</b>   | <b>96</b> |
| <b>4.2.6</b>  | <b>Comportamento da Água em LPS/DPPE .....</b>   | <b>98</b> |
| 4.2.6.1       | Difusão da água .....  | 98        |
| 4.2.6.2       | Perfil de hidratação .....   | 98        |

|         |  |            |
|---------|--|------------|
| 4.2.6.3 | Orientação da água . . . . .                                       | 100        |
| 4.2.7   | <b>Convergência de Propriedades Estruturais em 800 ns. . . . .</b> | <b>101</b> |
| 5       | <b>CONCLUSÕES. . . . .</b>   | <b>102</b> |
| 5.1     | Perspectivas . . . . .   | 103        |
|         | <b>REFERÊNCIAS. . . . .</b>  | <b>104</b> |
|         | <b>APÊNDICE A – PARÂMETROS TOPOLÓGICOS USADOS . . . .</b>          | <b>112</b> |
|         | <b>APÊNDICE B – PARÂMETROS DE SIMULAÇÃO . . . . .</b>              | <b>117</b> |
|         | <b>APÊNDICE C – ANÁLISE DE DESEMPENHO . . . . .</b>                | <b>120</b> |
|         | <b>APÊNDICE D – ESTRUTURAS LIPÍDICAS . . . . .</b>                 | <b>121</b> |
|         | <b>APÊNDICE E – ANÁLISE TEMPORAL . . . . .</b>                     | <b>132</b> |
|         | <b>ANEXO A – PUBLICAÇÕES E EVENTOS . . . . .</b>                   | <b>137</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* pertence ao grupo das bactérias gram-negativas, e é responsável por uma ampla gama de doenças que acometem o ser humano, dentre elas a septicemia, a pneumonia e vários outros tipos de infecções agudas e crônicas, como as acometidas no trato respiratório de pacientes com fibrose cística. (2) Soluções terapêuticas para tais doenças são desafiadoras devido à alta taxa de mortalidade associada, e à possibilidade de desenvolvimento de resistência ao medicamento durante a terapia. A resistência antimicrobiana representa uma ameaça emergente e persistente à saúde pública; responsável pela produção a nível extracelular de: toxinas, hemolisinas, agressinas, fatores de aderência e cápsulas polissacarídeas. (3) A arquitetura da parede celular (representada na figura 1) é caracterizada pela presença de: membrana interna, periplasma, membrana externa e a camada externa polissacarídea. A estrutura da camada externa das bactérias gram-negativas é constituída majoritariamente de forma assimétrica por uma região de lipídio A, revestimento polissacarídeo e pela presença do antígeno. A membrana externa de bactérias gram-negativas é uma barreira de proteção crítica contra agentes xenobióticos, como os antibióticos e moléculas imunes inatas hospedeiras. Por essa razão, a membrana externa limita drasticamente o acesso de antibióticos e apresenta um papel crítico na resistência de antibióticos aos patógenos.

Figura 1 – Arquitetura da parede celular de bactéria gram-negativas.



Fonte: Alexander, C., and Rietschel, E. T. (2001)

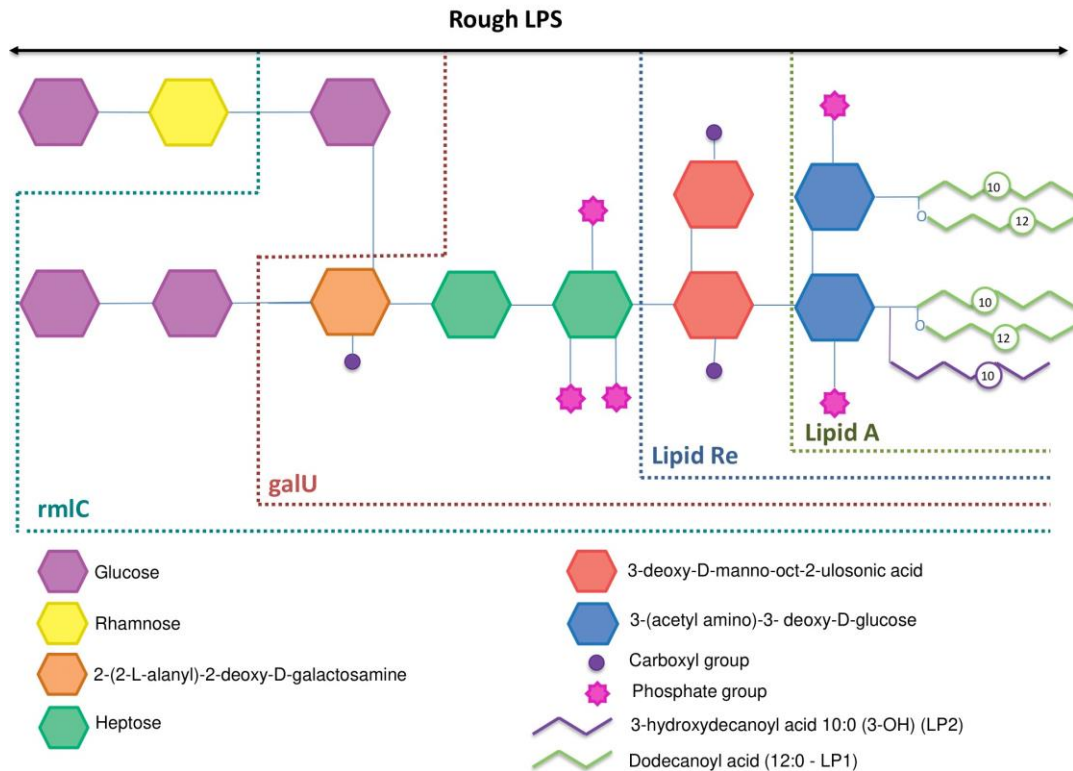
As bactérias apresentam diversos mecanismos de resistência. Os mecanismos de resistência intrínsecos mantêm a integridade da membrana externa, dificultando a suscetibilidade de permeação da membrana por possíveis agentes antimicrobianos e acesso de novos agentes bactericidas.(4) Este fenômeno pode ser observado nas ineficientes rotas para captação de antibióticos das proteínas F(Omp F/C) encontradas na membrana externa, e responsáveis por cerca de 75% do transporte para a região intracelular.(5) A hidrofobicidade da bicamada da membrana externa faz com que a permeabilidade de macromoléculas carregadas sejam pouco eficientes. De forma geral, a captação de pequenas moléculas hidrofílicas fica reduzida a pequenas porções da membrana externa. Para reduzir a resistência intrínseca das bactérias gram-negativas é necessária utilização de agentes seletivos que apresentem energia para vencer a barreira de permeabilidade das membranas externas, como grupos de antibióticos polimixina, proteínas catiônicas, peptídeos, poliaminas, agentes quelantes como ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) ou ácido nitriloacético (NTA). (6) Estes atuam desestabilizando interações fortes entre a rede LPS-cátion na superfície bacteriana. Ao utilizar cátions divalentes, a ligação desses com os grupos fosfato da camada interna contribuem significativamente para a resistência de agentes antimicrobianos hidrofóbicos, neutralizando a superfície externa da membrana. Resultados experimentais sugerem a tendência de mudança de comportamento em diferentes íons, principalmente dos íons cálcio em lipídio A, correlacionando fluidez da membrana e farmacocinética. (7) Análises mais detalhadas de propriedades reológicas e termodinâmicas são ainda de difícil medição experimentalmente, principalmente em função de variações na conformação do LPS em diferentes sistemas. (8)

## 1.1 COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DO SISTEMA

O sistema estrutural é composto pelo LPS-rough. As três principais regiões dessa estrutura são: lipídio A, inner core e outer core.(9) O lipídio A liga-se a longas cadeias polissacarídeas, que irão caracterizar a hidrofobicidade do sistema, resultando na resistência antibiótica observada. Essas são constituídas por duas moléculas de glucosamina (3-acetil amino-3-desoxi-D-glucose) ligadas covalentemente na posição 1-6, fosfatada em 1-4 e acilado nas posição 2-3, como descrito na seção pontilhada em verde à direita, referente ao lipídio A, na figura 2. As cadeias aciladas ligadas ao lipídio A são compostas de por ácido 3-hidroxidecanóico (com 10 carbonos na cadeia) e por ácido dodecanóico (com 12 carbonos na cadeia).

O lipídio A âncora as moléculas de LPS-rough no inner core (cadeias localizadas na região galU e Lipid Re) e outer core da membrana bacteriana (cadeias glucose e rhamnose, localizadas em rmlC) na figura 2. A região interna é normalmente construída através do ácido 3-desoxi-Dmannoct-2-ulosônico (KDO) (em rosa) e L-glicero-D-manno-heptose (LD-Hep)(em verde). As funções aniônicas do sistema recebem contribuições dos KDO e de LD-Hep acima descritos, devido aos grupos carboxílicos em 5-6 presentes em um e aos grupos fosfato ligados ao carbono C2, C4 e C6 do outro, respectivamente. Os grupos carregados na estrutura de LPS, como grupos cabeças polares em fosfolipídeos são importantes para a organização molecular e funções da membrana bacteriana externa, pois ligam-se a cátions divalentes. (10) Essas ligações garantem

Figura 2 – Desenho esquemático dos quimiotipos e cadeias carbônicas da estrutura LPS-rough. Composta pelo Lipideo A - com dois radicais fosfato(em rosa) e cadeias aciladas de ácidos dodecanoico e 3-hidroxdodecanoico nas cadeias D-glucose(em azul); pelo Lipideo Re - com dois radicais carboxila (em roxo escuro) nas cadeias 3-desoxi-Dmannoct-2-ulosônico (KDO)(em salmão); pelo galU - com três radicais fosfato(em rosa) na primeira heptose(em verde) e um radical carboxila(em roxo escuro) ligado a 2-(2-L-alanil)-2-desoxi-D-galactosamina(em laranja); pelo rmlC - caracterizado por três glucoses(em roxo); e por rhamanose(em amarelo) e glucose(em roxo).



Fonte: A autora (2019)

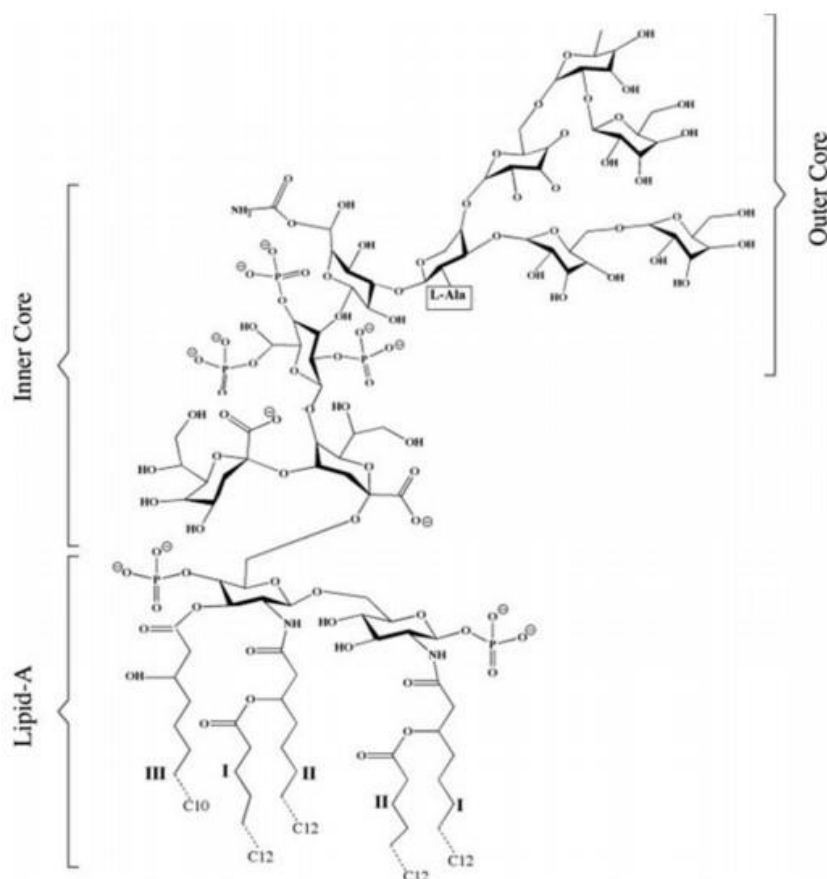


a integridade estrutural da membrana por meio da força do caráter iônico dessas ligações. (11) Na região do outer core temos a 2-(2-L-alanil)-2-desoxi-D-galactosamina (em laranja) ligada covalentemente a sequências de glucose(em roxo), tendo adição de L-Rhamnose. A descrição do sistema quimicamente detalhada também pode ser encontrada na figura 3.

O núcleo rough conecta-se à região antígeno O, formada por uma repetição variável de 3-5 unidades de açúcar, tipicamente hexoses. O antígeno O pode ser observado esquematicamente na camada mais externa da figura 1. Este apresenta alta variabilidade estrutura e determina a especificidade sorotípica das moléculas de LPS, ao passo que o lipídio A, citado anteriormente, é o ativador da resposta imune em mamíferos. As formas agonísticas de LPS podem induzir aumento de resistência imunológica geral contra infecções microbianas e virais, reforçando as respostas imunes específicas a antígenos como adjuvantes, ou evocar sintomas patológicos graves característicos.(6) Estímulos ambientais ou mutações genéticas desencadeiam bactérias a expressar LPS sem a cadeia específica O, o LPS rough, estrutura presente nesse trabalho. Esse fenótipo, que foi utilizado nesse trabalho, apresenta oligossacarídeos principais de comprimento e sequências variáveis, que serão chamados de quimiotipos. As modificações químicas associadas a remodelação da membrana bacteriana são frequentemente expressas por transições conformacionais de LPS com dependência de temperatura e concentração de cátions. A natureza do cátion também se mostra como uma variável relevante, preferencialmente quando se trata de cátions divalentes, que experimentalmente, agregam-se ao LPS e aumentam a resistência bacteriana. (12)

Alguns agentes atuam de forma seletiva contra bactérias gram-negativas, de modo a aumentar a permeabilidade da membrana externa pela destabilização das interações firmes entre LPS-cátion na superfície da bactéria. A caracterização experimental de estruturas dinâmicas da bicamada lipídica a resolução atômica ou atômica-próxima não é facilmente atingível nem mesmo para sistemas compostos por um único tipo de lipídio. Isto é principalmente devido à sua grande fluidez e falta de ordem de médio e longo alcance. A complexidade química e o polimorfismo dinâmico das moléculas de LPS faz a caracterização estrutural das membranas um desafio ainda maior.

Figura 3 – Estrutura química da molécula de lipopolissacarídeo da bactéria Gram-negativa *P.aeruginosa*. Podem ser observadas três regiões funcionais: o lipídeo A, cujas cadeias alquílicas formam a parte lipídica da bicamada, e o inner e outer core constituídos por oligossacarídeos



Fonte: T. Straatsma e T. Soares. (2009)

## 1.2 SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS E DINÂMICA MOLECULAR

Simulações computacionais são ferramentas de interconexão entre teoria e prática, capaz de validar modelos e observar quantitativamente medidas experimentais que apresentam barreiras fenomenológicas ou limitações experimentais. Os métodos de simulação computacional mormente utilizados na atualidade baseiam-se em princípios físicos matemáticos robustos, são estes a dinâmica molecular (DM) baseada em modelos determinísticos da natureza, e o Monte Carlo (MC), baseado em modelos estocásticos de eventos. Os dois métodos de simulação computacional abordam problemas reais a partir de diferentes princípios, podendo convergir a uma mesma conclusão, baseado no princípio da

ergodicidade, dependendo do fenômeno considerado e do tempo de simulação. Simulações em MC não consideram informações sobre evolução temporal, sendo representativo em probabilidades conformacionais e comportamentos termodinâmicos, tais como energia livre. O espaço de integração é amostrado de acordo com um processo Markoviano e a integral é aproximada pela média dos estados amostrados correspondentes. (13)

A DM estuda a evolução temporal das coordenadas e os momentos de estruturas macromoleculares. A obtenção da trajetória se dá através das equações newtonianas. A trajetória é importante na avaliação de parâmetros dependentes do tempo, como a acessibilidade de uma determinada superfície molecular. (13) Simulações de DM proporcionam a investigação de propriedades dinâmicas dos sistemas, tais como coeficientes de difusão, resposta a perturbações e funções de autocorrelação estrutural dentre uma gama de possibilidades de análise. (14), (15) A simulação de DM continua sendo uma das principais ferramentas para investigar as propriedades dos modelos de membranas biológicas em nível atômico ou semi-atômico, trata-se de um método robusto para validar os rearranjos espaciais e temporais de organização das bicamadas lipídicas durante a fusão da membrana, fissão ou porosidade e assim por diante.

A confiabilidade das simulações de dinâmica molecular depende da precisão dos potenciais interatômicos, ou campo de força, para reproduzir a estrutura lipídica e fases sob condições variáveis de temperatura, hidratação, pH e heterogeneidade composicional, por exemplo. A capacidade de reprodutibilidade adequada de um campo de força em relação ao sistema experimental só pode ser obtido através de comparações sistemáticas dos sistemas simulados em relação as medições experimentais. De modo que a aptidão do campo de força dado para reproduzir corretamente os dados experimentais podem ser avaliados através de comparações sistemáticas das propriedades do sistema em relação as medidas experimentais. é, no entanto, fundamental distinguir a medição direta, da medição a partir de dados indiretos, obtidos experimentalmente. A primeira é inferida a partir de dados primários e se baseia em suposições de um determinado modelo. Exemplos de metodologias indiretas para as bicamadas lipídicas são raio-X e fator de forma de nêutrons dos experimentos de espalhamento; relaxamento de H, C e P e uma divisão quadripolar em espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). (16),(17),(??) A área da secção transversal por lípido, espessuras de bicamada lipídica, parâmetro de ordem de ligação de coeficiente de difusão lipídica são exemplos de medições obtidas através dessas metodologias. A partir do exposto, podemos intuir que medições experimentais diretas para membranas ainda são desafiadoras, quando comparadas as

metodologias computacionais. No entanto, há progressos recentes no desenvolvimento de bicamadas lipídicas suportadas compostas de modelos de membrana externa passível de caracterização por técnicas estruturais.

Ao considerar simulações computacionais dos modelos de membrana externa para LPS, os parâmetros experimentais utilizados no campo de força (nesse caso, o GROMOS, detalhado posteriormente) irão definir de forma atomística o grau de interação entre as moléculas. O campo de força GROMOS, assim como outros modelos atomísticos, por si só não é capaz de calcular os efeitos de polarizabilidade entre as interações entre os pares. A simulação a nível quântico dos efeitos de polarizabilidade torna o cálculo das interações para sistemas grandes inviável. Um modelo computacional de parâmetros de cátions que reproduza de forma implícita as características experimentais é desejável. O estudo seguinte visa validar os parâmetros para LPS para o campo de força GROMOS através de dinâmica molecular frente a diferentes tratamentos eletrostáticos de longa distância e modelos de água (SPC e SPC/E), com intuito de validar esses parâmetros para as novas versões do programa GROMACS v.2016 que descontinuaram a utilização do esquema de tratamento de longa distância Reaction Field (RF).

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 2.1.1 Ensembles Termodinâmicos

A partir das técnicas de simulação molecular é possível entender e prever comportamentos de sistemas da natureza, como as biomoléculas. O entendimento em termos macroscópicos advém das transformações de informações, tais como posições atômicas, forças e velocidades. (18) Várias conformações energéticas são possíveis e para predição acurada da conformação mais provável são utilizados os cálculos de energia de minimização que identificam as configurações do ponto de mínimo individual no sistema. As funções de mecânica estatística podem ser utilizadas para derivar a função de partição (para o cálculo de propriedades termodinâmicas) e determinar as configurações de mínimo ao longo da superfície de energia. Para o cálculo da propriedade A (média no tempo) são considerados os momentos ( $p^N(t)$ ) e a posição ( $r^N(t)$ ) para a N partículas que compõem o sistema, calculados através da integral do valor médio considerado um intervalo infinito, descrito na equação 2.1.

$$A_{med} = \lim_{\tau \rightarrow \infty} 1/\tau \int_{t=0}^{\tau} A(p^N(t), r^N(t)) dt \quad (2.1)$$

Diante da inviabilidade da resolução da equação 2.1 para todas as partículas do sistema, considerando-se que os sistemas apresentam uma ordem de  $10^{23}$  partículas, utiliza-se da mecânica estatística, tratando o sistema como um ensemble, ou seja, um conjunto imaginário de microestados de um grande número de sistemas em diferentes estados quânticos com atributos macroscópicos comuns, em que as variáveis termodinâmicas são mantidas constantes ao longo da simulação. As possibilidades estruturais de um sistema representado por cada microestado dentro de um ensemble pertencem a um espaço de fase. (19) Considerando-se a média temporal pela média no ensemble descrita na equação 2.2 abaixo:

$$\langle A \rangle = \int dp^N dr^N A(p^N, r^N) \rho(p^N, r^N) \quad (2.2)$$

$\langle A \rangle$  representa a média da propriedade A sobre todas as réplicas dos ensembles gerado pela simulação. A densidade de probabilidade é representada por  $\rho(p^N, r^N)$ , a posição determinada por  $r^N$ . Cada microestado tem um peso sobre o ensemble que é proporcional a sua energia por meio de (equação 2.3):

$$K(p^N, r^N) = \exp(-E(p^N, r^N)/k_B T) \quad (2.3)$$

$E(p^N, r^N)$  é a energia,  $k_B$  a constante de boltzmann e  $T$  a temperatura. A probabilidade de cada microestado na função de partição tem peso proporcional a sua energia e é representado pelo somatório de todas as  $N$  partículas por meio da equação 2.4:

$$Q(T) = \sum_{i=1} X e^{-E_i/(RT)} \quad (2.4)$$

Compondo a equação :

$$\rho(p^N, r^N) = \frac{K(p^N, r^N)}{Q} \quad (2.5)$$

Em sistemas NVT o hamiltoniano pode ser considerado igual a  $E(p^N, r^N)$ , em que energia cinética é depende do momento das partículas, enquanto a energia potencial é representada pela posição. Em dinâmica molecular é comum o sistema ser determinado por condições com constante número de partículas ( $N$ ), volume ( $v$ ) e energia( $E$ ), conhecido como microcanônico (NVE). A maioria dos experimentos alvo de simulações é realizado a volume e temperatura constante, ensemble canônico (NVT), ou à pressão e temperatura constante, ensemble isobáricoisotérmico (NPT). (19) A função de partição é geralmente escrita em termos do Hamiltoniano,  $H$ ; para um sistema  $N$  de partículas, a função de partição para o ensemble canônico monoatômico é representado segundo a equação 2.46 (20):

$$Q_{NVT} = \frac{1}{N!} \frac{1}{h^{3N}} \int \int dp^N dr^N \exp\left[-\frac{H(p^N, r^N)}{k_B T}\right] \quad (2.6)$$

O termo  $N!$  no denominador garante que o número de microestados não sejam calculados mais de um vez para sistemas não discretos, preservando a existência de um limite termodinâmico para os sistemas.  $N!$  garante a indistinguibilidade das partículas, o segundo termo iguala a função de partição a partícula na caixa, sistema em que considera-se constante número de partículas, volume e temperatura. O termo  $h^{3N}$  garante a adimensionalidade do resultado, uma vez que  $h$  caracteriza-se como uma unidade de ação, geralmente tomada como a constante de Planck. Os métodos de amostragem podem ser Monte Carlo (MC) ou Dinâmica Molecular (DM). Em MC cada simulação depende apenas da configuração predecessora e não de qualquer outra configuração visitada anteriormente. As configurações são geradas aleatoriamente e existem critérios especiais para aceitar ou refutar a nova configuração. Esses critérios visam garantir que a probabilidade de uma determinada configuração ser igual ao fator de Boltzmann.

Ocorre que naturalmente, de modo a representar a realidade os estados de baixa energia são gerados com maior probabilidade que as configurações de alta energia. Em MC cada configuração que é aceita, os valores das propriedades desejadas são calculadas e ao final do cálculo das médias dessas propriedades é obtida por

$$\langle A \rangle = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M A(r^N) \quad (2.7)$$

Onde M é o número de passos de tempo. Na DM cada simulação é considerada, calculando-se o tempo médio das propriedades. As equações de movimento de Newton conferem uma configuração não aleatória. Fazem uso de metodologia determinística, onde o estado do sistema em qualquer futuro deve ser previsível. Nessa equação os potenciais simples assemelham-se a esferas-rígidas. Dessa forma, as colisões são perfeitamente elásticas, e ocorrem quando a separação entre os pares esféricos são iguais a soma dos raios. Após a primeira colisão, novas velocidades de colisão são calculadas, partindo da conservação do momento linear; As médias termodinâmicas são obtidas através de 2.8:

$$\langle A \rangle = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M A(p^N, r^N) \quad (2.8)$$

Neste trabalho foi feito uso do método de DM com uma representação atomística do sistema através de campo de força aditivo clássico. A seguir faremos uma explanação do método de dinâmica molecular e das escolhas feitas em nosso protocolo de simulação.

### 2.1.2 Campos de Força Aditivos

Campos de força são expressões matemáticas que descrevem a dependência da energia com as coordenadas de suas partículas. Os parâmetros são obtidos tanto por meio de cálculos *ab initio* ou semi-empíricos de mecânica quântica, como através de difração de nêutrons, raios-X e elétrons, NMR, infravermelho, Raman e espectroscopia de nêutrons. O conjunto de moléculas é definida como um sistema de forças elásticas simples (harmônica), desta forma o campo de força substitui o verdadeiro potencial por um modelo simplificado válido na região que está sendo simulada, capaz de reproduzir propriedades de interesse do sistema simulado. (21) Ao realizar uma simulação de DM é importante perceber que cada molécula possui características individuais como ligação interatômica, ângulo, raio atômico, distribuição das cargas, sua habilidade de interagir com outras moléculas e compostos químicos. O cálculo da energia

potencial do sistema importa na medida em que caracteriza a interação entre moléculas ou mesmo o comportamento entre soluto e solvente. O principal papel do campo de força é descrever propriedades da molécula como sua geometria, energia conformacional e estereoisomérica, barreiras de torção, deformação de torsão, frequência vibracional e calor de formação. (22) O campo de força precisa representar as interações atômicas e moleculares, de modo a reproduzir as propriedades e mecanismos do processo de interesse. De modo geral, o campo de força relaciona o modelo matemático (forma funcional) e os parâmetros atômicos ou moleculares associados ao sistema molecular de interesse. Campos de força são modelos empíricos e devem ser escolhidos de modo a representarem adequadamente o sistema de interesse. Uma das principais características desejáveis de campos de força é a transferibilidade da forma funcional e dos parâmetros associados, isso significa que um conjunto de parâmetros em comum pode ser utilizado para modelar uma série de moléculas semelhantes, ao invés de determinar novo grupo de parâmetros para cada nova molécula. A forma funcional deve ser o compromisso entre acurácia e a eficiência computacional. (23) Normalmente o campo de força é separado em duas categorias entre os parâmetros intermoleculares e moleculares, que são no primeiro caso, os termos representativos das interações ligadas dos átomos em "i)" e os termos referentes as interações não ligadas, citadas em "ii)".

i) Termo representativo de interações ligadas: estiramento de ligações, vibrações de ângulos,

rotação de diedros, manutenção de átomos em planos, adaptadas segundo equações descritas no capítulo 4 de Leach (23):

$$V(r) = \sum_{\text{ligaes}} k_b \cdot (b - b_0)^2 + \sum_{\text{ngulos}} \frac{1}{2} k_\theta \cdot (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{torso}} k_\phi \cdot [\cos(n\phi + \sigma) + 1] + \sum_{\text{imprprios}} \frac{1}{2} k_\xi (\omega - \omega_0)^2 \quad (2.9)$$

em que  $k_b$  representa a constante de força do potencial de estiramento,  $b$  representa o comprimento das  $n$  ligações (distância mínima para que as condições periódicas de contorno sejam aplicadas) e  $b_0$  o comprimento de referência. O segundo termo somatório da equação 2.9 representa o termo de curvatura de ângulo de ligação, em que  $k_\theta$  é a constante de força,  $\theta$  valor do ângulo de ligação em uma dada configuração e  $\theta_0$  a ligação angular de referência. O terceiro termo representa o potencial de torção, que descreve a energia potencial do sistema molecular em função da rotação em torno de cada ângulo diédrico. Vale ressaltar que as energias envolvidas, nesta interação, são significativamente mais baixas do que no estiramento de



ligação e flexão de ângulo, vistos anteriormente. Nesta equação, os termos  $n$  e  $\phi$  representam o potencial diedral e o ângulo entre os dois planos descritos na equação, enquanto o termo  $\sigma$  representa a fase do potencial 2.9. O último termo representa o potencial torsional impróprio, também conhecido como torção fora do plano, utilizado para manter a conformação planar de 4 átomos e calcular o ângulo a partir de um valor de referência  $\omega$ .(24) A partir dessa característica, consegue descrever de forma correta a geometria e quiralidade do átomo.(22) O parâmetro  $k_\xi$  determina a rigidez do potencial, enquanto  $\omega$  determina o valor de equilíbrio do somatório. (25) A figura 4 representa de forma esquemática os ligação, ângulos, torsão e diedros impróprios descritos na equação acima.

ii) Termo representativo das interações não ligadas: interações eletrostáticas e de van der Waals

$$V(r) = \sum_i^{N_a-1} \sum_{j=i+1}^{N_a} \left[ \left( \frac{C_{12}(i,j)}{r_{ij}^6} - C_6(i,j) \right) \frac{1}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right] \quad (2.10)$$

onde  $C_{12}(i,j)$  é o coeficiente de repulsão de van der Waals para as interações entre os átomos ou sítios  $i$  e  $j$ .  $C_6(i,j)$  é o coeficiente de dispersão e  $r_{ij}$  a distância entre os sítios.

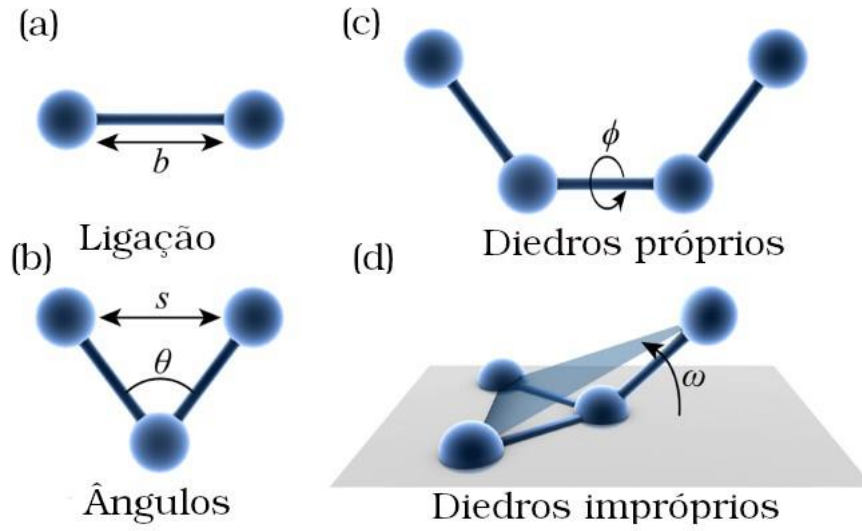
$$C_{12}(i,j) = 4\epsilon\sigma^{12} \quad (2.11)$$

e

$$C_6(i,j) = 4\epsilon\sigma^6 \quad (2.12)$$

em que  $\epsilon$  é a profundidade do poço potencial,  $\sigma$  é a distância entre os dois sítios onde o potencial de van der Waals é zero. O segundo termo da equação (2.5) descreve a interação coulômbica de longa distância em que  $q_i$  e  $q_j$  representam as cargas das partículas.

Figura 4 – Representação das principais interações envolvidas que compõem a modelagem de campos de força, sendo os potenciais, referentes às interações intramoleculares: ligações, ângulos e diedros, respectivamente, em (a), (b), (c) e (d).



Fonte: Sun Q. (2020)

A dinâmica molecular é um método baseado nas leis de movimento de Newton, cujas energias de interação interatômica obedecem ao princípio da conservação do momento linear. Para a representação de uma grande quantidade de átomos, o sistema é visto como massivo, sendo calculado através de potenciais contínuos pela metodologia de diferenças finitas. Pode-se assumir as posições e propriedades dinâmicas como expansões da séries de Taylor:

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t \cdot v(t) + \frac{1}{2!} \Delta t^2 \cdot a(t) + \frac{1}{3!} \Delta t^3 \cdot b(t) + \dots \quad (2.13)$$

Onde  $v(t)$  representa a velocidade,  $a(t)$  a aceleração,  $b(t)$  a terceira derivada e assim por diante. Para atualização das posições e aceleração das interações sequenciais utilizam-se algoritmos de integração, dentre os quais o algoritmo Leapfrog foi utilizado neste trabalho e será detalhado em seção posterior. Ao expressar o sistema como uma série de Taylor diferenciável é necessário determinar o ponto de truncamento de modo que este represente o menor custo computacional, com resultado em ordem de grandeza satisfatória. A série de potência é representada cortando o primeiro termo de forma arbitrária, o segundo termo cortado é aquele o qual temos um valor de  $r_{eq}$  mínimo, truncando no primeiro valor não nulo, de forma que

$$V(r_{ab}) = \frac{1}{2} \cdot k_{ab} \cdot (r_{ab} - r_{ab,eq})^2 \quad (2.14)$$

$k$  representa a constante de força para o sistema harmônico.

A maioria dos campos de força utilizados em simulações de dinâmica molecular de proteínas compartilham um número significativo de similaridades. Os termos harmônicos

descrevem o comprimento de ligação e os ângulos, a série de Fourier descreve as torções, interações atômicas emparelhadas são descritas através das equações de Lennard-Jones e função Coulômbica. (19) As principais diferenças entre os vários campos de força resultam das diversas abordagens adotadas para derivar os parâmetros individuais. Alguns exemplos a serem citados são os campos de força AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement), OPLS (Optimized Potential for Liquid Simulations), CHARMM (Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics) e GROMOS (Groningen Molecular Simulation), utiliza átomos unidos para representar grupos não polares de CH, CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> de hidrocarbonetos como uma partícula única que permite atingir uma aceleração cerca de três vezes maior em relação a simulações atômicas, desenvolvido para reproduzir propriedades termodinâmicas de líquidos puros e as entalpias de solvatação de diferentes moléculas em solução. (26), (27), (28), (22), (29) A calibração e validação dos campos de força são focados em reproduzir as propriedades de proteínas solvatadas em água ou características de membranas puras. Neste trabalho foi utilizado o campo de força GROMOS para modelar o comportamento do sistema em estudo.

### 2.1.3 Modelos Explícitos de Água

A água é tida como o solvente mais comum em sistemas biológicos. Subsequentemente, uma das principais características da molécula de água é a sua polarizabilidade, bem como a sua capacidade de formar ligações de hidrogênio com caráter doador ou aceptor. Ao realizar simulação com modelos de água, faz-se necessário a que esses sejam representativos nas condições de interesse da simulação, uma vez que a água pode apresentar diversas conformações com a variação das suas condições, como é comum ocorrer com as mudanças de temperatura, por exemplo. De forma geral, os modelos de água utilizados em simulação podem ser divididos em três categorias. A primeira dela é a de sítios de interação simples, em que para cada molécula de água mantêm-se uma geometria rígida e a interação entre as moléculas é descrita usando os termos não ligados. A segunda é a de modelos flexíveis, essas apresentam mudanças internas na estrutura. Nesse caso, a flexibilidade é alcançada usando termos de alongamento de ligação harmônica para as ligações OH e termos de flexão de ângulo harmônico para o ângulo HOH. Os últimos são os modelos em que o caráter de polarização é expresso de forma explícita. No caso de sistemas com número elevado de moléculas de água não é comum a utilização de termos explícitos, devido ao custo computacional associado. (30) O que será percebido nos modelos utilizados nesse trabalho.

Os modelos de água mais utilizados para representar modelos biológicos computacionais são transferable interaction potential (TIP3P), simple point charge (SPC) e simple point charge extended (SPC/E). Os três modelos citados anteriormente apresentam um único ponto de carga no núcleo, mas diferem: na distribuição de carga (SPC apresenta modelos tetraédricos de carga), nos parâmetros de van der Waals e na geometria.(31) É curioso notar que o modelo TIP, diferentemente de SPC e derivados, não apresenta o segundo pico na distribuição radial (representada esquematicamente na figura 11). Ao longo deste trabalho apenas o modelo SPC e SPC/E serão trabalhados. Dessa forma, os dados apenas desses modelos serão expostos em tabela 1. (32),(33)

Tabela 1 – Parâmetros de campo de força e propriedades selecionadas para simple point charge (SPC) e extended simple point charge (SPC/E), modelos de água a 300 K e condições de simulação idênticas. Com carga de cada átomo ( $q_H$  e  $q_O$ , em *eltrons*)<sup>a,b</sup>, o ângulo entre as ligações H-O ( $\Theta_{HOH}$ , em *graus*)<sup>c</sup>, o raio da ligação H-O ( $r_{O-H}$ , em *nm*)<sup>d</sup>, constante dielétrica de Lennard Jones ( $\epsilon$ , em *kJ/mol*)<sup>e</sup>, distância em que o potencial intermolecular entre as duas partículas é zero ( $\sigma$  em *nm*)<sup>f</sup>, energia potencial ( $E_{pot}$  em *kJ/mol*)<sup>g</sup>, momento de dipolo ( $D$ , em *debye*)<sup>h</sup>, e coeficiente de autodifusão ( $D$ , em  $10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ )<sup>i</sup>.

| Modelo                               | SPC         | SPC/E       |
|--------------------------------------|-------------|-------------|
| $q_H(e)^a$                           | 0,41        | 0,4238      |
| $q_O(e)^b$                           | -0,82       | -0,8476     |
| $\Theta_{HOH}(\text{graus})^c$       | 109,47      | 109,47      |
| $r_{O-H}(\text{nm})^d$               | 0,0100      | 0,0100      |
| $\epsilon(\text{kJ/mol})^e$          | 0,65017     | 0,65017     |
| $\sigma(\text{nm})^f$                | 0,31656     | 0,31656     |
| $E_{pot}(\text{kJ/mol})^g$           | -41,3(0,16) | -46,4(0,18) |
| Dipolo(D) <sup>h</sup>               | 2,27        | 2,39        |
| $D(10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s})^i$ | 4,5(0,08)   | 2,8(0,02)   |

Fonte : <nist.gov.br> (2020)

Durante as simulações computacionais da água, é desejável que os modelos representados apresentem boa concordância com os modelos experimentais. Um dos fatores que devem ser observados para a concordância entre os modelos é o comportamento dinâmico do soluto em relação ao solvente, isso se dá em consequência das múltiplas colisões randômicas entre eles. É válido notar em consequência disso, que ao simular biomoléculas em dinâmica molecular o

solvente é inserido de forma explícita. Ademais, devido a essa condição, uma das principais características da água que podem afetar as simulações, trata-se da polaridade da molécula. A fim de determinar propriedades físico-químicas é importante entender o efeito da polarizabilidade em relação aos potenciais de pares efetivos. Tendo como exemplo nos modelos SPC e derivados, a ausência de polarizabilidade não gera reprodutibilidade de algumas propriedades. Outrossim, a relação cooperativa entre as ligações intermoleculares e a polarização é perdida, quando a polarização não é bem representada. Sem o efeito de polarização entre os potenciais puros, não há como reproduzir as propriedades do estado condensado, comuns nos sistemas grandes. (34) Em modelos de água polares, a média dos efeitos de polarização está contida no potencial efetivo de pares. A inclusão dessa correção no modelo de água SPC, em relação a outros modelos, conseguiu melhorar a adequação de densidade, de funções de distribuição radial e da constante de difusão. As diferenças nos pares potenciais geram diferenças significativas nos coeficientes de autodifusão e no comportamento da função de distribuição radial. O momento de dipolo extraído por raio-x para a água no seu estado líquido varia entre 2,4 a 3,0 D. (35) O estudo de Badyal et. al mostra por difração de raio-X um resultado 2,95 (0,6) D a temperatura de 300 K. (36) Nos modelos de água teóricos não polarizáveis temos um padrão de variação entre 2,1 e 2,4 D, assim como pode ser percebido para os modelos SPC (2,27 D) e SPC/E (2,39 D), expressos na tabela 1.

Uma das características das ligações de hidrogênio da água é o seu caráter extremamente direcional. A força das ligações de hidrogênio (em torno de 5 kcal/mol) são normalmente intermediárias entre as interações fracas de van de Waals (em torno de 0,3 kcal/mol) e as ligações covalentes (em torno de 100 kcal/mol). (37) Os modelos de água podem ser considerados como rígidos ou flexíveis, permitindo todos os graus de liberdade para as ligações OH e para os ângulos entre HOH. (38) Ao analisarmos os parâmetros dos modelos de água SPC e SPC/E, é possível perceber um maior momento dipolar de SPC/E em relação a SPC, devido ao aumento das cargas pontuais em H e O. De modo geral, em simulações com modelos de água não polarizáveis o momento de dipolo é subestimado. Ao desconsiderar o efeito de polarizabilidade da água sabemos que o hamiltoniano no momento de dipolo induzido irá considerar apenas a média do dipolo e não a sua flutuação. (39) Variações na flutuação permitem a análise do espalhamento e dispersão, que passam a ser significativos em longas simulações. A mudança de parametrização de SPC/E em relação a SPC advém justamente da necessidade de correção de polarização. A energia de polarização, ou seja, o custo para distorcer

uma molécula ao seu estado polarizado, representa 3,74kJ/mol para água SPC, enquanto 5,22kJ/mol para água SPC/E. (34) De forma geral, SPC/E apresenta valores acurados para densidade e auto-difusão, tendendo a extrapolar nos valores de entalpia de vaporização e subestimar a constante dielétrica. (40) A diferença na carga de oxigênio de SPC/E também é responsável por maior acurácia na viscosidade em relação a SPC. A viscosidade a 300 K com sistema de condições periódicas de SPC é 0,54, SPC/E é 0,82, enquanto a viscosidade da água experimental é 0,85. (14) Ao comparar sistemas periódicos utilizando-se RF percebe-se que variações na constante de permissividade são capazes de gerar variações significativas na viscosidade. (41) As principais características são descritas na tabela 1.

Segundo o manual do GROMOS além da influência dos modelos de água, o tamanho do sistema pode influenciar o comportamento da distribuição radial do primeiro e do segundo pico de solvatação, como exemplo, simulações a partir de 820 moléculas podem apresentar seus picos menos largos. (42) Declara também que a escolha do raio de corte pode ter influência na alturas dos picos de interação O-O, quando o tratamento eletrostático de longa distância escolhido é RF.

Para RF e GROMOS, o modelo SPC ainda se apresenta como o mais ajustado.

#### 2.1.4 Algoritmo de Integração Leapfrog

Em simulações de dinâmica molecular clássica há a requisição de esquemas eficientes de escalonamento de tempo, que aproximem a dinâmica ao longo de vários passos, considerando o custo computacional e conservação de energia. É comum nesse caso a discretização do sistema. A presença de diferentes potenciais interatômicos no modelo impõe restrições severas ao passo de tempo da integração numérica de esquemas explícitos. Ao simular sistemas grandes é desejável manter o número de graus de liberdade o menor possível. De modo geral, a correlação das forças com a posição e a velocidade da partícula  $i$  precisa ser incorporada nas equações de movimento da partícula em questão, enquanto contribuições não correlacionadas ( $\alpha$  index) podem ser representadas por forças aleatórias. (34) As metodologias mais comuns utilizam otimização estocástica, na qual a busca pela solução envolve aleatoriedade em algum sentido. O potencial de força médio dos modelos pode ser representado pela equação 2.15:

$$V_m(x_i) = \langle V(x_i, x_a) \rangle_\alpha \quad (2.15)$$

Um dos algoritmos mais famosos na realização dessa tarefa é o algoritmo de Verlet, onde as posições das partículas em um instante qualquer da simulação dependem da posição no instante anterior e das forças que agiram sobre ele. (43) A representação matemática do algoritmo de Verlet pode ser visto na equação 2.16:

$$x(t_n + \Delta t) = 2x(t_n) - x(t_n - \Delta t) + m^{-1}F(t_n) \cdot (\Delta t)^2 + O[(\Delta t)^4] \quad (2.16)$$

O índice  $n$  denota o número de passos de integração. Podemos perceber que nesse sistema apenas as potências pares de  $\Delta t$  ocorrem. Podemos perceber também, a partir da equação acima, que em Verlet as velocidades não se apresentam de forma explícitas e os elementos de ordem zero se cancelam, decorrendo em um controle pouco eficiente da energia cinética do sistema. Caso seja necessário, as velocidades podem ser calculadas através de outra fórmula, sendo este um problema associado ao método. Leapfrog é um algoritmo derivado de Verlet. Leapfrog deriva-se de expansões de Taylor, fazendo uso das leis de Newton e sendo dependente da definição do passo temporal. (44), (45) Através desse algoritmo de integração é possível determinar ambas, a velocidade e posição de uma configuração específica, no entanto o momento é calculado em um intervalo de tempo distinto, de modo que a conservação de energia não pode ser testada. No algoritmo Leapfrog temos as equações 2.17 e 2.18:

$$v(t_n + \Delta t/2) = v(t_n - \Delta t/2) + m^{-1}F(t_n) \cdot \Delta t + O[(\Delta t)^3] \quad (2.17)$$

$$x(t_n + \Delta t) = x(t_n) + v(t_n + \Delta t/2) \cdot \Delta t + O[(\Delta t)^3] \quad (2.18)$$

A vantagem do método de integração Leapfrog é devido ao esquema de integração da velocidade se dar de forma explícita, sendo possível o acoplamento do sistema a um banho térmico. A simulação do presente trabalho considerou esses fatores e foi adotada a metodologia de Leapfrog. A presença de algoritmos estocásticos de terceira ordem promove resultados de maior eficiência, sendo limitado apenas às propriedades sistemáticas da força. A determinação do passo de tempo é essencial para a acurácia da simulação, de modo que  $\Delta t$  deve ser um décimo do menor período de movimento. (23)

### 2.1.5 Condições Periódicas De Contorno

Ao realizar simulações de dinâmica molecular ocorre a construção de caixas de simulação para número  $N$  de moléculas. As que se localizam próximas as bordas da caixa podem apresentar comportamento distinto do modelo experimental equivalente. Esse fenômeno se dá devido a

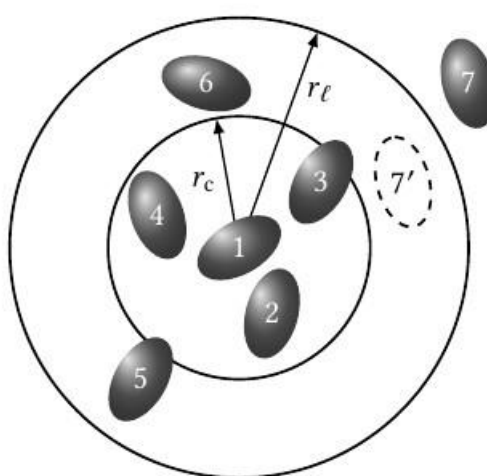


metodologia matemática empregada. Sistemas diferenciais finitos utilizados na resolução de problemas físicos e matemáticos apresentam uma peculiaridade: a presença dos efeitos de borda. Alguns estudos desses efeitos em simulações de bicamadas lipídicas foram relatados por Jiang et al e West et. al.. (46), (47) A fim de evitar estes efeitos em DM causados pela utilização de sistemas diferenças finitos, deve-se aproximar a simulação a um sistema “infinito”. Tal técnica consiste na replicação de caixas de simulação idênticas, dispostas ao redor da célula principal, fazendo com que a partir do número de partículas (N) e volume (V) tendendo ao infinito, a relação  $N/V$  mantenha-se constante e o sistema formado irá tender ao limite termodinâmico, com movimentação idêntica das partículas, garantindo a permanência dos átomos e moléculas dentro da caixa. (48) Em sistemas cristalinos essas condições de contorno são desejadas. Em caso de simulação de sistemas não periódicos como líquidos ou soluções, a periodicidade induz artefatos computacionais. Funções de condições de contorno periódicas preservam a massa, o número de partículas e a energia total do sistema simulado. (49) O aspecto chave da imposição de condições de contorno periódicas é que nenhuma molécula nas células simuladas vejam o ‘vácuo’ dentro das distâncias de interação do raio de corte ( $R_c$ ). (50) O raio de corte determina até onde as interações devem ser calculadas na etapa de integração. O cálculo das interações requer a determinação das partículas que interagem entre si, bem como da soma apropriadas destas interações. Ao determinar as dimensões do  $R_c$  devemos ter em mente que tanto maior o seu valor, maior será o custo computacional associado. Na dinâmica, ao passo que os átomos se movimentam entre as paredes das caixas, as flutuações desses átomos tenderão a apresentar uma média bem definida. (50) As condições periódicas de contorno são especialmente úteis no caso das forças não ligadas, uma vez que o número de termos não ligados aumenta com o quadrado do número de átomos em uma ordem de  $N^2$ . Se estas interações forem calculadas para cada par de átomos do sistema, o cálculo torna-se computacionalmente custoso. Adicionalmente, como a maioria dos átomos em simulações de biomoléculas pertencem ao solvente, assim o custo computacional de calcular-se as interações entre todos os átomos constituintes do sistema seria destinado a interações entre átomos do solvente em detrimento das interações entre átomos do soluto-soluto ou soluto-solvente. Por esta razão, o uso de condições periódicas de contorno requer o uso de raios de corte para os termos não-ligados em conjunção com a convenção da imagem mínima (com a percepção de um número reduzido de caixas por intervalo), na qual apenas uma única imagem (a mais próxima) de cada átomo é considerada no cálculo dos termos não-ligados de curta distância. (48) Uma condição para a definição do raio de corte é que este não seja tão grande a ponto que



a partícula veja a sua própria imagem nas réplicas dos sistemas, de modo que a partícula não possa interagir consigo mesma. Em sistemas cúbicos, o raio de corte não pode ser maior que a metade do tamanho da célula.

Figura 5 – A esfera de corte de raio  $r_c$  e o raio externo  $r_l$  em torno da molécula 1. Moléculas 2, 3, 4, 5 e 6 estão na lista da molécula 1; a molécula 7 não está na lista.



Fonte: desconhecida

#### 2.1.5.1 Lista de Vizinhos

A lista de vizinhos trata-se de uma ferramenta matemática que tem por objetivo considerar de forma iterativa, quais  $j$  moléculas estão em torno de uma molécula  $i$ , de modo a reduzir o custo computacional no cálculo da distância entre uma molécula  $i$  e todas as outras, passando a considerar apenas as moléculas contidas na lista dentro de um intervalo de raio  $r_l$ . Na metodologia original Verlet utiliza-se de um potencial de corte esférico  $r_c$ , em torno de uma molécula que também é envolta por um raio maior "skin",  $r_l$ . Inicialmente a lista é construída com todos os vizinhos de cada molécula, o qual a separação do par esteja dentro do intervalo  $r_l$ . Estes vizinhos são armazenados em uma matriz, designada lista de dimensões  $4\pi r_l^3 \rho N/6$ . Ao mesmo tempo uma segunda matriz de indexação é criada de dimensão  $N$ , funcionando como ponteiro para que os vizinhos da molécula  $i$  sejam encontrados. O sucesso da metodologia consiste em criar uma capa ("skin") espessa o suficiente para que, entre as reconstruções, uma

molécula, como 7 na figura 5, que não está na lista da molécula 1, não pode penetrar através da capa na esfera do potencial  $r_c$ . Moléculas como 3 e 4 podem entrar e sair dessa esfera, mas como estão na lista da molécula 1, elas sempre são consideradas independentemente, até que a lista seja atualizada em seguida.

Os intervalos de atualização da lista são sempre determinados no começo do programa, intervalos entre 10 a 20 passos são considerados padrão. Ao longo da construção da lista, um vetor é criado para cada molécula, o deslocamento total de cada molécula é atualizado por este vetor a cada atualização, quando a soma do deslocamento de uma molécula ultrapassa  $r_l - r_c$ , a lista de vizinhos deve ser atualizada novamente. (51) O algoritmo da tabela Verlet provou ser eficiente quando o número de átomos é relativamente pequeno e os átomos se movem lentamente. (52) Um sistema com  $N > 1000$  moléculas, recomenda-se a utilização do método de indexação de célula, utilizado para o procedimento de atualização mais eficiente. Neste caso se o sistema inteiro é dividido em  $M^3$  células, vão existir uma média de  $N/M^3$  moléculas por célula, determinando-se a vizinhança por  $3^{3N}/M^3$  átomos. Atualização rápida pode resultar em cálculo incorreto devido a movimentação de átomos para dentro da região do raio de corte dos termos não ligados. O uso de raio de corte para o tratamento de interações não-ligadas de longa distância é um requerimento em simulações de biomoléculas devido a grande dimensão do sistema e longas escalas de tempo simuladas; no entanto como em toda aproximação, o uso de raio de corte induz artefatos, os quais são minimizados através de outras aproximações. O raio de corte se mostra menos problemático no tratamento de interações de Lennard-Jones que de Coulomb, pois a primeira apresenta um decaimento mais rápido em função do tempo que a última. Na subseção seguinte serão descritas as aproximações utilizadas no presente trabalho para correção das interações não-ligadas de longa distância.

### 2.1.6 Interações de van der Waals de Longa Distância

Ao calcular as interações dos termos não ligados, como por exemplo as interações de van der Waals, são utilizadas as estruturas de pontos flutuantes para os cálculos de aceleração. Os sistemas de raio de corte podem ser utilizando único ou duplo raio de corte, não apresentando diferença em relação a taxa de transferência de pontos flutuantes. Muito embora por razões históricas sejam comumente utilizadas estruturas com duplo raio de corte, poucos ou quase nenhuma das simulações clássicas apresentaram grande nível de acurácia, devido parcialmente as propriedades caóticas das trajetórias de simulação. O erro associado a utilização de  $R_c$

simples está em torno de  $10^{-3}$ , sendo aproximadamente o erro associado ao algoritmo PME. (29) As principais diferenças no uso de  $R_c$  simples ou  $R_c$  duplo reside prioritariamente na estrutura de hardware utilizada. É sabido que a estrutura de armazenamento de dados em simulações que se utilizam de  $R_c$  simples apresentam maior eficiência no armazenamento do cache. A utilização de  $R_c$  simples podem ser favorecidas em algumas arquiteturas devido ao registro de instrução única de múltiplos dados (SIMD) que funcionam com o dobro do pico da taxa de transferência para  $R_c$  simples em relação ao duplo, sendo, portanto, mais eficientes no processo de transferência. (53) A utilização da lista de vizinhos torna o processo menos computacionalmente custoso, uma vez que não será mais necessário o cálculo para distância entre todos os átomos do sistema, a lista é criada a partir de uma matriz convencional e uma matriz ponteiro, de modo a serem guardados o primeiro e o último átomo em elementos distintos. Uma condição para o cálculo da lista de vizinhos é que a distância para calcular os vizinhos dos átomos seja mais que o raio de corte dos termos não ligados, de modo que nenhum átomo inicialmente fora do raio de corte dos vizinhos aproxime-se mais que a distância do raio de corte dos termos não ligados antes da atualização dela. A escolha do  $R_c$  por si só não consegue reduzir significativamente o tempo computacional das interações não ligadas, uma vez que as distâncias entre os pares de átomos serão calculadas para decidir se estes encontram-se perto o suficiente para o cálculo da energia de interação. O cálculo das  $N(N-1)$  distâncias levam mesmo tempo que o cálculo da energia individualmente.

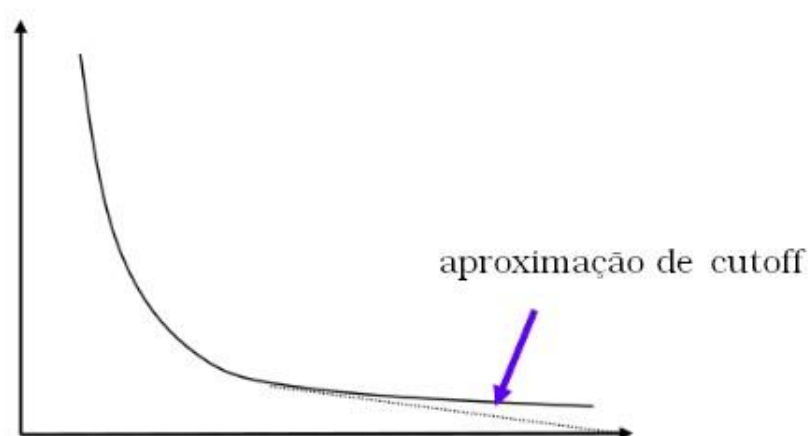
### 2.1.7 Interações Eletrostáticas de Longa Distância

Ao utilizar condições periódicas de contorno é necessário a consideração de interações de longa distância por meio dos potenciais de alcance, de modo a satisfazer a condição de neutralidade requerida em sistemas convergentes. Esta condição de convergência condicional pode ser observada tomando como exemplo o somatório de Coulomb em três dimensões ( $R^3$ ) expresso na equação 2.19, uma vez que a energia potencial é proporcional a  $1/r$ , enquanto o número de termos é proporcional a  $r^3$ , como não ocorre cancelamento dos termos, a convergência absoluta depende de situações em que os sinais não importam. (54)

$$U(q) = \sum_n \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \frac{Q_i Q_j}{\|q_i - q_j + L_n\|} \quad (2.19)$$

As interações não ligadas contêm um termo de repulsão, um termo de dispersão e um termo de Coulomb, em que os termos repulsivos e dispersivos são tomados pela equação de LennardJones(6-12 interações) e foram tratados na seção acima. A representação do diagrama do potencial de Coulomb pode ser observada na imagem:

Figura 6 – Representação da aproximação da Equação de Coulomb a partir da utilização do raio de corte.



Fonte: A autora (2020)

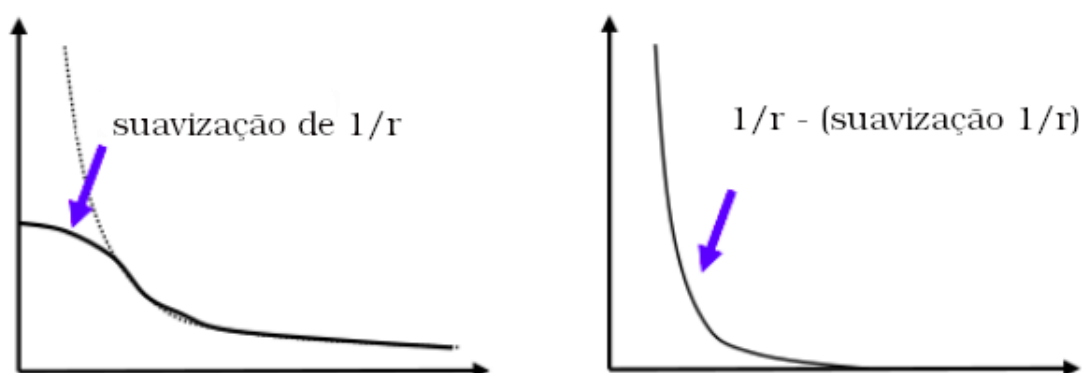
Os métodos de cálculo de forças eletrostáticas mostram-se interessantes, uma vez que nesse tipo de sistema o truncamento do potencial não é permitido. (55) Ao tratar o sistema separadamente da sua cauda assintótica, é possível ocasionar divergência no sistema a menos que a função de energia potencial decresça mais rápido que  $r^{-n}$ , em que  $n$  é a dimensão do sistema. Sabemos que o tratamento eletrostático de longa distância e a escolha de  $R_c$  adequado são capazes de alterar resultados de análises como: área por lipídio ( $A_L$ ), o raio de giro ( $R_g$ ) e função de distribuição radial (RDF). (56), (57) Em estudos com DMPC e água SPC utilizando-se GROMOS 54A7 com RF por  $R_c$  simples (1,4 nm) e duplo (0,8/1,4 nm) e PME (1,0 nm).

Foram percebidas diferenças não significativas quando comparado o esquema de  $R_c$ , já ao serem considerados tratamentos de PME e RF, diferenças pequenas, porém consistentes foram notadas em  $A_L$  e  $R_g$ . (56) Nas seções abaixo serão tratadas em detalhes os tratamentos eletrostáticos de termos não ligados baseados em PME e RF, que serão utilizados nesse trabalho.

## 2.1.7.1 Particle-mesh Ewald

O método Particle-mesh Ewald (PME) utiliza-se da criação de um sistema de malha com condições de contorno esféricas, utilizando-se de dois principais termos  $\alpha$  e  $r_c$ , que serão expressos na equação 2.25, provenientes da soma de Ewald. Para um melhor desempenho computacional, utiliza-se para o cálculo do espaço inverso e a transformada rápida de Fourier, bem como o método de interpoladores de lagrange. Nesse cálculo, o potencial total é dividido em partes de longo e curto alcance, como expressas na figura abaixo.

Figura 7 – Representação da suavização da equação de Coulomb a partir da metodologia PME do espaço real (a esquerda) e recíproco (a direita) com o eixo x representando a distância.



Fonte: A autora (2020)

Essas secções são a divisão do potencial, considerada como o somatório entre o espaço real ( $\phi_1$ ) e recíproco ( $\phi_2$ ).

$$\phi = \phi_1 + \phi_2 \quad (2.20)$$

No primeiro subproblema, as interações são de curto alcance, tendem a grandes variações para pequenos valores de raio ( $r_c$ ) e depois do raio de corte possuem valores pouco significantes. Conseguem uma boa aproximação para a soma do potencial eletrostático a partir do cálculo direto. O segundo subproblema tem uma variação lenta função para todos os valores de  $r$ , de modo que a transformação Fourier representa apenas uma limitada quantidade de vetores. Essa limitação permite um cálculo eficiente dessa contribuição para o potencial

eletrostático total em espaço recíproco, que pode ser resolvido, especialmente para condições de contorno periódicas, usando Transformadas de Fourier.

O esquema de formação da malha para o espaço direto, divide-se inicialmente pela consideração da interação íon-íon entre as partículas carregadas, considerando-as como cargas pontuais com nuvens, cuja célula básica contém igual distribuição de carga para os átomos positivos e negativos. Considerando-se as interações coulômbicas entre duas partículas por vez teremos o seguinte somatório:

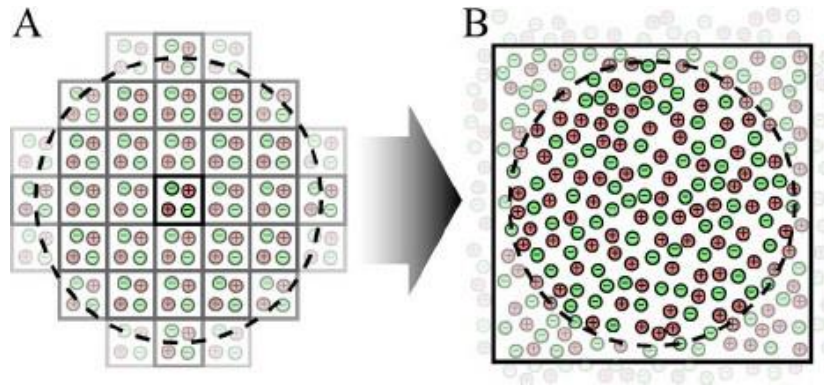
$$V = \frac{1}{2} \sum \sum \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (2.21)$$

Com a carga dos átomos  $q_i$  e  $q_j$ , a constante dielétrica ( $\epsilon_0$ ) e a relação  $r_i - r_j = r_{ij}$ , entre os raios dos átomos. Tomando a malha central em sistema cúbico é possível determinar que considerando-se o sistema tridimensional haverá seis outras malhas em torno da caixa central com distância  $r_{box}$ , de modo que o potencial pode ser calculado:

$$V = \frac{1}{2} \sum_{n=0}^6 \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (2.22)$$

A representação ilustrativa da distribuição da malha pode ser percebida através da figura abaixo.

Figura 8 – Representação da estruturação do grid de:



Fonte: J. Fennell and J. D. Gezelter

O somatório do sistema é condicionalmente convergente na medida em que temos igual distribuição de cargas do sistema. De modo a tornar a convergência mais rápida do sistema, considera-se a divisão do termo “1/r” da função de Coulomb da seguinte forma (58) :

$$\frac{1}{r} = \frac{\text{erf}(r)}{r} + \frac{1 - \text{erf}(r)}{r} \quad (2.23)$$

A função  $\text{erf}(r)$ , trata-se da função de erro e, deve ser definida de modo que para pequenos valores de  $r$ , haja uma rápida variação de “ $1/r$ ” e com o crescimento do eixo  $r$ , ocorram decaimentos da função. (58)

$$\text{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int \exp(-t^2) dt \quad (2.24)$$

Ao considerar as malhas como sistema cúbicos teremos  $n = (n_x L_x, n_y L_y, n_z L_z)$ . Teremos associada a função um termo  $\alpha$  a ser determinado de modo que apenas cargas dentro da esfera de corte sejam selecionadas. A função potencial passa ser representada como (58):

$$V_{dir} = \frac{1}{2} \sum_n \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0} \frac{\text{erfc}(\alpha|r_{ij} + n|)}{|r_{ij} + n|} \quad (2.25)$$

O raio de corte  $|n|$  limita-se ao cálculo direto das interações entre os pares apenas para cargas dentro do raio de corte. Assume-se que o raio de corte deve ser escolhido suficientemente grande, de modo que o ponto de corte seja suficientemente menor que todos os outros erros numéricos e possa ser negligenciado. (59) No cálculo da soma direta, o parâmetro de Ewald  $\alpha$  é escolhido grande o suficiente para que um raio de corte fixo possa ser aplicado, reduzindo assim a complexidade da soma direta de  $O(N^2)$  para  $O(N)$ .

O somatório da função gaussiana no espaço real inclui a interação de cada gaussiana consigo mesma, ocorrendo a subtração do auto-termo (23):

$$V = \frac{-\alpha}{\sqrt{(\pi)}} \sum \frac{q_k^2}{4\pi\epsilon_0} \quad (2.26)$$

Correção para permissividade a partir de um quarto termo ( $V_{correo}$ ) podem ser requeridas, dependendo das condições de simulação da esfera no entorno a caixa. Para condições de permissividade que não tendem ao infinito (sistemas não condutores). São considerados no sistema a influência da carga consigo mesma através da equação 2.27:

$$V_{correção} = \frac{2\pi}{3L^3} \left| \sum \frac{q_i}{4\pi\epsilon_0} r_i \right|^2 \quad (2.27)$$

Os métodos de longa distância dependem do cálculo da energia potencial nas transformadas de Fourier da densidade de carga (18):

$$\sum \rho q(k) = \rho q(r) \exp(-ik \cdot r) = \sum q_i \exp(-ik \cdot r_i) \quad (2.28)$$

O coeficiente  $\rho$  é conhecido como fator de estrutura. É realizada interpolação de Lagrange na malha simulada para a densidade de carga. Sendo a densidade da carga na malha conhecida é possível realização do cálculo do campo elétrico  $\epsilon(r)$  e o potencial  $\phi(r)$  usando a equação de Poisson.(18)

$$\nabla^2 \phi(r) = \nabla \epsilon(r) = 4\pi \rho^q(k) \quad (2.29)$$

A resolução de Poisson apresenta a densidade de carga substituída por uma transformada de Fourier finita na malha, baseada na densidade de carga (58):

$$p_M(k) := h^3 \sum \rho_M(r_p) \exp^{-ikr_p} \quad (2.30) \text{ e}$$

onde o somatório refere-se ao espaço tridimensional no espaço real e o vetor  $k$  corresponde a malha do espaço de Fourier. (58) O campo ao longo da malha pode ser interpolado para obter a força da carga. O espaço recíproco representa melhor a interação "partícula-malha" e pode ser reescrito:

$$V_{rec} = \frac{1}{2\pi V} \sum \frac{e^{(-\pi m/\alpha)^2}}{m^2} S(m) S(-m) \quad (2.31)$$

em que  $S(m)$  representa o fator estruturante. (60) A metodologia apresenta em geral alta eficiência sendo requerido menos que 40% da sobrecarga de outras metodologias com uma acurácia de  $2 \times 10^{-4}$ . O potencial do par PME e suas derivadas são funções contínuas de posição, independente da precisão exigida, evitando assim problemas de integração de funções descontínuas. (61) Os principais erros decorrentes da escolha de PME advém do parâmetro de ajuste  $\alpha$ , uma escolha inadequado pode resultar em perda de acurácia no cálculo ou mesmo cálculo equivocado das forças e energias.

#### 2.1.7.2 Reaction Field

No modelo Reaction Field (RF) de tratamento de longas distâncias, utiliza-se do sistema padrão de truncamento esférico, em que uma esfera é construída com raio igual a distância de corte. A função eletrostática no caso de RF, tem influência dependendo do esquema de raio de corte. O cálculo das moléculas dentro do raio de corte é feito de forma explícita. (23) As condições de contorno periódicas aplicadas, dependem intrinsecamente da escolha esquema de



raio de corte entre truncamento por partícula(átomo) ou grupo de carga. (29) A principal diferença entre a escolha dos sistemas indicados é a presença ou não de  $s$  (vetor paramétrico), termo dos parâmetros atômicos. Para o sistema de truncamento em átomos:

$$\Psi_{eleij}(r) = H(R_c - \bar{r}_{ij})\psi(RF)\bar{r}_{ij} \quad (2.32)$$

Para o sistema de truncamento em cargas:

$$\Psi_{eleij}(r;s) = H(R_c - R_{ij})\psi(RF)\bar{r}_{ij} \quad (2.33)$$

onde  $\bar{r}_{ij}$  é a imagem mínima na condição periódica de contorno conectando os vetores das partículas  $i$  e  $j$ .  $R_{ij}$  representa a imagem mínima nas condições periódicas de contorno conectando o vetor ao centro de carga, cujo as partículas pertencem  $R_{ij}(r)$ .  $R_c$  é a distância do raio de corte,  $H$  é a função passo de Heaviside (1 para argumentos positivos e 0 para todos os outros casos). A partir da versão 4.6 de GRONingen Machine for Chemical Simulations (GROMACS) a utilização do sistema de  $R_c$  baseado em truncamento de cargas (*Groups*) tornou-se incomum devido a incompatibilidade para arquitetura de fluxo contínuo, como GPU. O esquema de  $R_c$  baseado em átomos (Verlet) também funciona com CPU. O modelo de cargas passa a ser utilizado em sistemas que utilizam água como solvente e em que a conservação de energia não é a principal preocupação. (29) Para computar a interação do meio para além das condições de contorno da esfera, é modelado um meio homogêneo de constante dielétrica  $\epsilon_s$ . O campo eletrostático devido aos entornos dielétricos é dada por:

$$E_i = \frac{2 \cdot (\epsilon_s - 1)}{\epsilon_s + 1} \left( \frac{1}{r_c^3} \right) \sum_{j; r_{ij} \leq r_c} (\mu_j) \quad (2.34)$$

em que  $\mu_j$  representa o dipolo das moléculas vizinhas dentro da distância do raio de corte  $r_c$  da molécula  $i$ . A interação entre a molécula  $i$  e RF pertence ao grupo de interações molécula molécula de curto alcance. As formas para o controle do método de RF, dependem das variáveis,  $r_c$  e  $\epsilon_s$ . Ao ser considerado um sistema de truncamento simples, podem ser acarretas descontinuidades na energia e/ou força quando há mudança do número de moléculas dentro da cavidade. Esse problema é evitado ao adicionar um raio limite de mudança para moléculas próximas as condições de contorno de RF. (29)

$$\Psi^{(RF)}(r) = \frac{1}{r} - \frac{C_{RF}}{2R_{RF}^3} \cdot r^2 - \frac{1 - (1/2)C_{RF}}{R_{RF}} \quad (2.35)$$

com

$$C_{RF} = \frac{(2\epsilon_{cs} - 2\epsilon_{RF})(1 + \kappa_{RF}R_{RF}) - \epsilon_{RF} \cdot (\kappa_{RF}R_{RF})^2}{(\epsilon_{cs} + 2\epsilon_{RF})(1 + \kappa_{RF}R_{RF}) + \epsilon_{RF} \cdot (\kappa_{RF} \cdot R_{RF})^2} \quad (2.36)$$

em que  $\epsilon_{RF}$  é a permissividade em RF,  $\kappa_{RF}$  comprimento de triagem inversa de Debye e  $R_{RF}$  o raio de corte de RF. As equações potenciais separadamente podem ser descritas através de suas interações coulômbicas, dependentes da distância e independentes da distância:

$$\nu^{(ele,pws,RF-CB)} = (4\pi\epsilon_0)^{-1} \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j}{\bar{r}_{ij}} \quad (2.37)$$

$$\nu^{(ele,pws,RF-RF)} = (4\pi\epsilon_0)^{-1} \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j C_{RF} \bar{r}_{ij}^2}{2R_{RF}^3} \quad (2.38)$$

$$\nu^{(ele,pws,RF-RF)} = (4\pi\epsilon_0)^{-1} \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j (1 - (1/2)C_{RF})}{2R_{RF}^3} \quad (2.39)$$

inserindo a equação 2.28 e 2.29 na equação abaixo teremos a função eletrostática referente a auto-interação

$$\Psi^{(ele,slf)} = \lim r_i r_o \Psi_{oi}^{(ele)}(r; s) \quad (2.40)$$

teremos

$$\Psi^{(ele,slf)} = \frac{1 - (1/2)C_{RF}}{R_{RF}} \quad (2.41)$$

as interações de  $\Psi^{(ele,slf)}$  depende apenas das condições de contorno e dos parâmetros associados a polarização. Para reduzir artefatos no método de RF, uma grande constante dielétrica  $\epsilon_{RF}$  pode ser usada. (62) Estudos mostram que ao aproximar o valor de  $\epsilon_{RF}$  de 80 teremos um valor muito próximo a quando  $\epsilon$  tende a  $\infty$ . (63) Há em geral a requisição de homogeneidade do sistema para representação do ambiente de cada partícula como um dielétrico constante.

### 2.1.8 Termostato

Ao realizar simulações de dinâmica molecular, propriedades extensivas são de vasto interesse, como temperatura e pressão. Devido a necessidade e conveniência, a disponibilidade de métodos para a temperatura e/ou pressão constantes em dinâmica são de grande valor prático. É importante ressaltar que métodos para manter a temperatura constante são fundamentais para alguns processos, como por exemplo o desdobramento de proteínas. Uma alternativa para manter a temperatura é através do sistema de acoplamento de banho térmico utilizado no termostato de Berendsen et al. (1984), mantendo o sistema a temperatura fixa. O

banho atua como uma fonte de energia térmica, promovendo e retirando energia do sistema quando apropriado. A equação de de acoplamento fraco é descrita por:

$$\frac{dT(t)}{dt} = \frac{T_{banho} - T(t)}{\tau} \quad (2.42)$$

Em que  $\tau$  é o parâmetro de acoplamento em que a magnitude determina o quão firme é o acoplamento do banho térmico e do sistema.  $T_{banho}$  representa a temperatura que deseja-se manter. Esse método é capaz de fornecer um decaimento exponencial em torno da temperatura desejada. (23) Um grande problema do acoplamento de Berendsen é a supressão da variação de energia cinética devido a flutuações durante a simulação. Para simulação de sistemas grandes a médias dos ensembles não será afetada significativamente, apenas a distribuição de energia. Nos sistemas de interesse a temperatura está estreitamente ligada a média de tempo da energia cinética e consequentemente a velocidade média. Um termostato similar ao de Berendsen capaz de corrigir o rescalamento do termostato, de modo que o fator de escala possa ser descrito pela equação 2.43:

$$\lambda = [1 + \frac{n_T \sigma t}{\tau_T} (\frac{T_{banho}}{T(1 - \Delta * t/2)} - 1)]^{0,5} \quad (2.43)$$

Esse acoplamento é aplicado ao sistema escalonando as magnitudes dos vetores velocidade de cada partícula no sistema por uma quantidade a cada  $\tau_T$  passos de simulação. Quanto maior o parâmetro , mais fraco o acoplamento. O parâmetro  $\tau_T$  se aproxima do valor da constante de tempo tal do acoplamento de temperatura:

$$\tau_T = \frac{2C_v \tau_T}{N_{gl} k} \quad (2.44)$$

Onde  $C_v$  é a capacidade calorífica total do sistema,  $k$  é a constante de Boltzmann e  $N_{gl}$  é o número total de graus de liberdade. (48)

### 2.1.9 Barostato

Muitas metodologias para o controle de pressão são análogas ao controle de temperatura. A pressão consegue ser mantida constante através do controle do volume. Uma alternativa é acoplar o sistema a um banho de pressão, análogo ao banho térmico. A taxa de mudança de pressão é dada por:

$$\frac{dP(t)}{dt} = \frac{1}{\tau_p} \cdot (P_{banho} - P(t)) \quad (2.45)$$

Onde  $\tau_p$  é a constante de acoplamento,  $P_{banho}$  é a pressão que deseja ser mantida, e  $P(t)$  é a pressão no tempo  $t$ . O volume da caixa de simulação é escalada por um fator  $\mu$ , dado pela equação:

$$\mu_{ij} = 1 - \frac{n_{PC} \cdot \delta t}{3 \cdot \tau_p} \beta_{ij} (P_{0,ij} - P_{ij}(t)) \quad (2.46)$$

Em que  $n_{PC}$  é o número de passos da simulação,  $\delta t$  o intervalo de tempo,  $\beta$  é a compressibilidade isotérmica do sistema,  $\tau_p$  é a constante de acoplamento da pressão,  $P_0$  é o valor de pressão que se deseja manter constante ao longo da simulação e  $P_{i,j}(t)$  a variação de pressão em  $t$ . A metodologia pode ser usada de forma isotrópica ou anisotrópica. Em geral, a melhor abordagem é a anisotrópica que permite que as dimensões da caixa variem de forma independente. Ao permitir deformações puramente anisotrópicas e o uso de restrições deve-se considerar uma escala mais lenta ou o decréscimo do passo de tempo para evitar erros dos algoritmos de restrição. Segundo Van der Spoel et al.(2014) o algoritmo de controle de pressão de Berendsen produz uma simulação com a pressão média correta, embora o valor do conjunto NPT não é exato, e ainda não está claro exatamente quais erros essa aproximação pode produzir.

### 3 PROCEDIMENTOS COMPUTACIONAIS

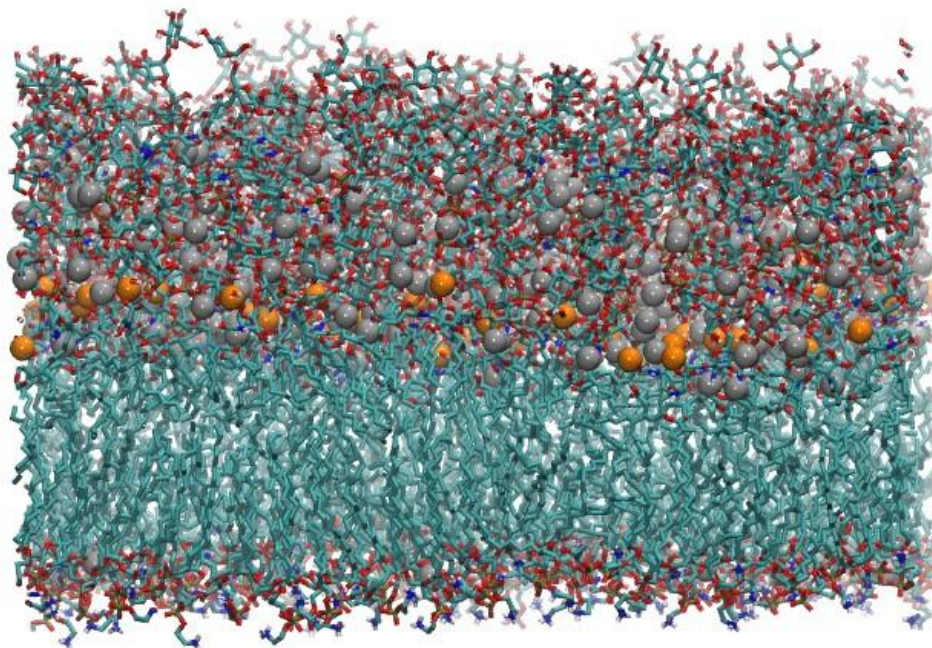
Os resultados dessa dissertação são divididos em duas partes, as quais serão detalhadas sequencialmente. Ao longo da parte I foram comparadas as análises estruturais e dinâmicas para simulação ao longo de 200ns de equilíbrio seguidos de 200ns de simulação de LPS/DPPE com íons  $Ca^{2+}$  considerando os tratamentos eletrostáticos de longa distância RF e PME para os modelos de água SPC e SPC/E. O objetivo desta seção foi validar a similaridade dos resultados tradicionalmente obtidos no grupo em SPC-RF, para diferentes tratamentos eletrostáticos cada vez mais otimizados nas novas versões de GROMACS. Ao longo da parte II deste trabalhos foram estendidas as simulações da parte I até 800ns, de modo a serem comparados os parâmetros de convergência temporal para os sistemas com tratamento eletrostático de longa distância PME e validar a compatibilidade entre os modelos.

#### 3.1 ESTRUTURA E PARÂMETROS UTILIZADOS NA SIMULAÇÃO DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Nesse trabalho foram simulados modelos moleculares de membrana externa bacteriana. A membranas externa de bactérias gram-negativas são compostas predominantemente por lipopolissacarídeos (LPS) na monocamada externa e por 1,2-dipalmitoyl-3fosfatidiletanolamina (DPPE). A membrana externa bacteriana funciona como uma barreira físico-química que limita a penetração de antibióticos outros agentes externos na célula bacteriana, desta maneira, a membrana bacteriana é crucial para a resistência destes patógenos ao tratamento por antibióticos. Foram utilizados parâmetros atômicos compatíveis com o campo de força GROMOS, a saber o GROMOS 53a6<sub>glyc</sub>, para as representar os carboidratos do LPS, enquanto os parâmetros das cadeias aciladas foram retiradas do campo de força GROMOS 53a6, adaptados e validados para o lipídio A. (64) As cargas atômicas foram RESP (restrained electrostatic potential) com o nível teórico de hf/6-31g\*. (65) É importante notar que os parâmetros atômicos do GROMOS 53a6<sub>glyc</sub> contém correções de potenciais diedrais para hexapiranosse mas todos os demais parâmetros atômicos são iguais ao do conjunto 54a7. (66) As cargas atômicas para os novos grupos químicos e novos potenciais de torção (como por exemplo para as ligações p-glicosídicas e todos os diedros c-c-c-o) usados em quimiotipos do LPS foram calculados para manutenção da compatibilidade com as versões anteriores do campo

de força GROMOS. (67), (68) Os parâmetros atômicos de van der Waals foram retirados de GROMOS 45a4/53a6. (67) Foram simulados bicamadas contendo 72 moléculas de LPS rough pentaacilados na monocamada externa, 180 moléculas de DPPE e 288 contra íons  $Ca^{2+}$  para neutralizar a carga de -8 por unidade de LPS, como descrito na figura 9, onde os íons  $Ca^{2+}$  estão representados em cinza e os íons fósforo em laranja.

Figura 9 – Estrutura química das moléculas pentaaciladas de LPS de *P. aeruginosa*.



Fonte: A autora (2019)

Para manter as mesmas dimensões iniciais das caixas de simulação o sistema apresenta o mesmo número de átomos de soluto, porém diferente quantidade de moléculas de solvente (i.e SPC=30699, SPC/E=30507). A topologia e parâmetros atômicos utilizados para descrever a ME bacteriana estão descritas no apêndice A. A montagem do sistema para a parte I e II deste trabalho pode ser vista na tabela 2 e 3 abaixo.

Tabela 2 – Descrição do número de moléculas de cada componente do sistema utilizados na montagem das simulações e do tempo total de simulação alcançado ao final da parte I. Os sistemas foram LPS/DPPE a partir de modelos SPC e SPC/E; com tratamentos eletrostáticos de longa distância (TELDD) RF e PME; as composições são descritas em termos de moléculas para LPS e  $H_2O$ , e de íons para  $Ca^{2+}$ ; com o tempo de simulação de 200ns

| Experimento | Sistemas | Modelo | TELDD | Composição |           |        | Tempo (ns) |
|-------------|----------|--------|-------|------------|-----------|--------|------------|
|             |          |        |       | LPS        | $Ca^{2+}$ | $H_2O$ |            |
| 1           | LPS/DPPE | SPC    | RF    | 72         | 288       | 30699  | 200        |
| 2           | LPS/DPPE | SPC    | PME   | 72         | 288       | 30699  | 200        |
| 3           | LPS/DPPE | SPC/E  | RF    | 72         | 288       | 30507  | 200        |
| 4           | LPS/DPPE | SPC/E  | PME   | 72         | 288       | 30507  | 200        |

Fonte: A autora (2020)

Na parte I do trabalho foram testadas a compatibilidade dos nossos modelos moleculares com dois modelos de água explícita e duas aproximações para o tratamento de interações eletrostáticas de longa distância ao longo de 200ns de simulação. (69) A membrana externa bacteriana foi simulada em presença de dois modelos de água SPC e SPC/E, sujeitos a duas abordagens diferentes de tratamentos eletrostáticos de longa distância, o RF generalizado e PME. (31), (34), (70), (61). Os quatro experimentos serão representados por: SPC-RF, SPC-PME, SPC/E-RF e SPC/E-PME. Cada um desses experimentos gerados foi rodado em duplicata.

Na parte II foram estendidos por 800ns os experimentos com TELDD PME, mantendo as configurações do modelo construído na parte I, de modo que o tempo de convergência entre as análises selecionadas fossem sistematicamente estudadas e comparadas.

Tabela 3 – Descrição do número de moléculas de cada componente do sistema utilizados na montagem das simulações e do tempo total de simulação alcançado ao final da parte II. Os sistemas foram LPS/DPPE a partir de modelos SPC e SPC/E; com tratamentos eletrostáticos de longa distância (TELDD) PME; as composições são descritas em termos de moléculas para LPS e  $H_2O$ , e de íons para  $Ca^{2+}$ ; com o tempo de simulação de 800ns.

| Experimento | Sistemas | Modelo | TELDD | Composição |           |        | Tempo (ns) |
|-------------|----------|--------|-------|------------|-----------|--------|------------|
|             |          |        |       | LPS        | $Ca^{2+}$ | $H_2O$ |            |
| 5           | LPS/DPPE | SPC    | PME   | 72         | 288       | 30699  | 800        |
| 6           | LPS/DPPE | SPC/E  | PME   | 72         | 288       | 30507  | 800        |

Fonte: A autora (2020)



Os experimentos 5 e 6 serão chamados de SPC-PME e SPC/E-PME na seção II.

### 3.2 SETUP DE SIMULAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ÍONS $Ca^{2+}$ E LPS/DPPE

Uma vez construídas a bicamada LPS/DPPE foram adicionados ao sistema por meio da rotina genion do GROMACS a adição de íons  $Ca^{2+}$  aleatoriamente em meio a região permeada por moléculas de água. A energia do sistema foi minimizada por meio do algoritmo Steepest Descent, sendo empregado até que a maior força encontrada sobre as partículas do sistema tenha menos que  $10 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-1}$ . Em seguida foi realizada a etapa de equilíbrio dos sistemas. Nesta etapa foi realizada simulações de NVT e NPT a temperatura de 300 K e pressão de 1 bar e os mesmos parâmetros de simulação. O  $R_c$  utilizado para as distâncias de interação de van der Waals de 1,4 nm. As interações eletrostáticas de longa distância foram tratadas a partir de duas abordagens distintas. Além disso, esquema grupo de carga e corte baseado em átomos foi utilizado com simulações RF e PME, respectivamente. A correção de RF foi aplicada as interações eletrostáticas para um  $R_c$  de 1,4 nm em conjunto com uma constante de permissividade dielétrica de 66. (71) A correção PME foi utilizada para um  $R_c$  de 1,2 nm com uma interpolação de cargas de quarta ordem em um espaçamento de Fourier de 0,16 nm. As simulações de dinâmica molecular ocorreram por meio de um passo de tempo de 2 fs no ensemble NPT. O comprimento das ligações dentro do soluto e a geometria das moléculas de água foram restringidas utilizando os algoritmos LINCS e SETTLE, respectivamente. (72), (73) As velocidade iniciais foram calculadas utilizando a distribuição de Maxwell-Boltzmann a 310 K e 1 bar. Acoplamentos separados foram utilizados para controlar a temperatura do soluto e do solvente com contra-íons em um termostato de redimensionamento de velocidade com tempo de relaxamento de 0,4 ps. A pressão foi mantida a 1 bar na direção lateral e normal em relação a bicamada por um acoplamento fraco a um banho de pressão semi-isotrópico com um tempo de relaxação de 0,1 ps e compressibilidade isotérmica de  $4,5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ . As trajetórias foram gravadas a cada 2 ps. Os sistemas foram simulados usando o programa GROMACS v.2016.4 rodando em plataformas CPU e GPU. O sistemas foram equilibrados por 200 ns, quando a propriedade de área por lipídio molecular convergiu, e foram seguintemente simulados por 200 ns adicionais para os experimentos da parte I e por adicionais 800ns para os experimentos da parte II. As simulações foram realizadas em duplicatas usando valores diferentes de *seed number* na primeira etapa da equilibração. Os arquivos de entrada utilizados



para as simulações podem ser encontrados no apêndice B. A lista de pares não ligados foi atualizada a cada 5 passos em simulações de RF e PME. Entre os modelos de SPC e SPC/E há apenas uma variação de (5%) no momento de dipolo, sendo preservado a distância do raio O-H. Para manter as caixas em iguais dimensões foi necessário adicionar mais água ao sistema que continha água SPC/E, a diferença na quantidade de água geral entre os modelos foi de 192 moléculas de água que representam menos de (1%) em relação ao volume total de solvente.

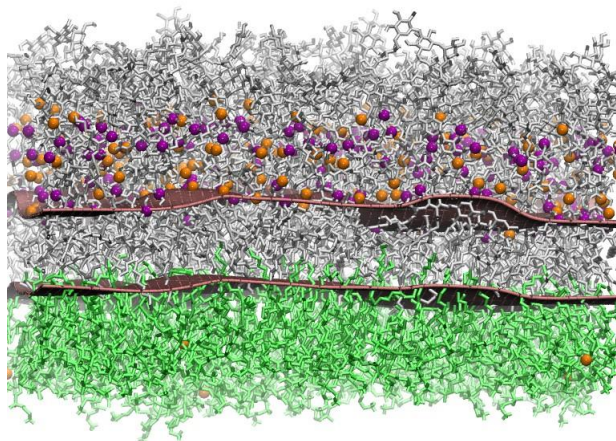
### 3.3 ANÁLISES

Tendo por objetivo entender a estrutura e estabilidade do sistema em estudo, foram utilizados majoritariamente dois pacotes de programas. As análises descritas nesta seção foram realizadas com o programa GROMACS 2016.4 e o software SuAVE. (74), (75) A partir do SuAVE foi realizado um mapeamento da superfície independente da sua curvatura. Nos sistemas de bicama lipídica LPS-rough/DPPE desse trabalho foram estudadas as propriedades que poderiam sofrer influência da mudança do TELD e dos diferentes modelos de água simulados. Através do programa VMD e da biblioteca *seaborn* de python 2.7 foram geradas as imagens. (76), (77)

#### 3.3.1 Área por cabeça ( $A_L$ )

A área por cabeça tem por intuito medir quanto espaço bidimensional um lipídio ocupa como parte de uma bicamada ou monocamada, descrevendo o grau de empacotamento dos lipídios em relação ao sistema. A  $A_L$  é calculada através da projeção no plano xy da área da membrana, sendo dividida pelo número de lipídios que compõem a bicama, que no caso desse trabalho são 72 grupamentos lipídicos. A projeção é obtida ao criar uma malha tomando os átomos de interesse definidos no índice do sistema como referência para a região de interface. No caso deste trabalho os átomos utilizados foram os fósforos localizados no lipídio A de LPS-rough e os fósforos localizados em DPPE. A escolha destes limites baseou-se na pequena frequência de mobilidade desses átomos ao longo da simulação, bem como pela sua posição nos limites da interface com a água. A propriedade  $A_L$  é de grande valia, pois servir de ponto de comparação com medidas retiradas experimentalmente para sistemas lamelares. (78)

Figura 10 —. Projeções no plano xy (em rosa) para cálculo de  $A_L$  considerando os átomos de fósforo de lipídio A e DPPE



Fonte: A autora (2020)

A área por cabeça funciona como um parâmetro para mensurar a convergência do sistema para uma conformação estável, na medida em que não ocorram variações significativas do sistema ao longo do tempo. A equação que descreve o sistema é:

$$A_{pc} = \frac{A_t}{n_l} \quad (3.1)$$

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

### 3.3.2 Espessura da Bicamada

A espessura da bicamada é um parâmetro estrutural, que é capaz de refletir o tamanho das cadeias lipídicas, essa medida pode ser extraída de dados experimentais. (78) O protocolo para a estimativa da espessura da interface é calculado na interface hidrofóbica, utilizando-se das distâncias entre os picos referentes ao grupamento fosfato. A análise foi realizada a partir da malha de ajuste do programa SuAVE, através da rotina *stthick*, em que considera para o cálculo efeitos de curvatura na superfície da bicamada.

### 3.3.3 Curvatura da Membrana

A curvatura da membrana é uma análise que permite localizar modificações estruturais nas bicamadas. O cálculo é realizado através de um campo de vetores normais criados a partir da superfície da membrana, sendo calculados o desvio angular entre cada vetor e o eixo normal, definido por padrão como o eixo z. O valor de desvio é definido entre 0° e 90°, representando no primeiro, vetores paralelos e no segundo, vetores ortogonais. O parâmetro de curvatura é definido através dos polinômios de Legendre de segunda ordem com o cosseno dos ângulos calculados no passo anterior. (75) A análise é realizada com a rotina `s_order` implementado em SuAVE.

$$S_c(\theta) = \frac{1}{2}(3\cos^2(\theta) - 1) \quad (3.2)$$

o ângulo  $\theta$  é o ângulo de desvio calculado e  $S_c$  é o parâmetro de ordem de curvatura. O valor do parâmetro de curvatura é 1 quando a superfície normal ao plano apresenta ângulo  $\theta = 0$ .

### 3.3.4 Difusão de íons

A propriedade de difusão de íons relaciona de forma direta as leis de transporte de massa que devem ser obedecidas pelo sistema. A partir da relação de Einstein para o movimento Browniano pode ser calculada a difusividade em simulações de dinâmica molecular. (18)

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \langle \|r_i(t) - r_i(0)\|^2 \rangle = 6D_a t \quad (3.3)$$

O primeiro termo da equação representa o desvio médio quadrático da posição das partículas compondo o sistema ao longo do tempo de simulação e a constante  $D_a$  é a constante de difusão da partícula em relação ao seu sistema. Essa propriedade é extraída das simulações através do algoritmo `gmx msd` no software GROMACS. Ao utilizar o algoritmo são desconsiderados os 10 % iniciais e finais da trajetória, para melhor ajuste da curva de desvio médio quadrático da posição das partículas ao longo do tempo. A acurácia do erro nessa análise só faz sentido quando o desvio médio quadrático é perfeitamente linear nos intervalos citados. (74) Foram escolhidas para difusão o eixo z, o plano xy e o tensor total de movimentação do sistema de átomos escolhidos.

### 3.3.5 Função de autocorrelação

A função de autocorrelação representa a média do desvio de cada conjunto, de modo a estudar a correlação dentro de um espaço amostral de dois eventos subsequentes ou o condicionamento de um em relação ao outro. Uma vez que em dinâmica molecular temos um sistema determinístico, é importante por meio da ferramenta de autocorrelação se a amostragem dos espaços de fase está satisfatória. A variação ocorre entre -1 e 1, em que -1 representa uma anti-correlação perfeita e 1 uma correlação perfeita. A nulidade corresponde ausência de correlação entre os eventos. (48) Esses parâmetros requerem que definamos um plano ou um vetor unitário com o qual calcular a reorientação. (79) A função de autocorrelação para quaisquer propriedades de  $f(t)$  é dada pela equação 3.4:

$$C_f(k) = \frac{E[(f(t) - \mu)(f(t + k) - \mu)]}{\sigma^2} \quad (3.4)$$

Mediante adaptações em dinâmica molecular a função de autocorrelação é medida através da seguinte equação:

$$C_f(j\Delta t) = \frac{1}{N-j} \sum_{i=0}^{N-1-j} f(i\Delta t)f((i+j)\Delta t) \quad (3.5)$$

Onde  $E$  representa o valor esperado das funções definidas na equação 3.4,  $\mu$  é a média da propriedade medida,  $\sigma$  é o desvio padrão em torno a média. Na equação 3.5,  $N$  representa o número de eventos amostrados e  $\Delta t$  o espaço de tempo entre os eventos. A rotina utilizada para o cálculo foi "gmx analyse" do GROMACS.

### 3.3.6 Função de distribuição radial

A análise de distribuição radial é realizada experimentalmente utilizando difração de raio-x e de nêutrons. A função de distribuição radial é mais bem representada para substâncias na fase sólida. Os conceitos de 'cascas' de vizinhos e 'número de coordenação' são mais apropriados para sólidos do que para líquidos, mas fornecem medidas úteis da estrutura de um líquido, desde que a analogia com sólidos não seja levada muito longe. (20) Os sistemas líquidos apresentam caráter dinâmico descrevendo a desordem do sistema e lidando com estruturas intermediárias. Os picos ao longo da função representam as distâncias de separação mais prováveis entre os átomos. A partir da distância entre os picos podemos supor o provável empacotamento do sistema. A função de distribuição radial é útil para descrever a estrutura de

sistemas líquidos, considerando-se cascas esféricas de comprimento  $dr$ , a uma distância  $r$  de outro átomo escolhido como na figura 11, em que a região  $dr$  em azul representa a primeira camada de solvatação. A função de distribuição de pares,  $g(r)$  dá a probabilidade de encontrar um átomo a uma distância  $r$  de outro átomo quando comparado a distribuição de um gás ideal.  $g(r)$  é adimensional, através dessa ferramenta é possível observar as camadas de solvatação de íons em solução, e dessa forma, calcular o seu número de coordenação. Uma das formas de representá-la é a através de equação:

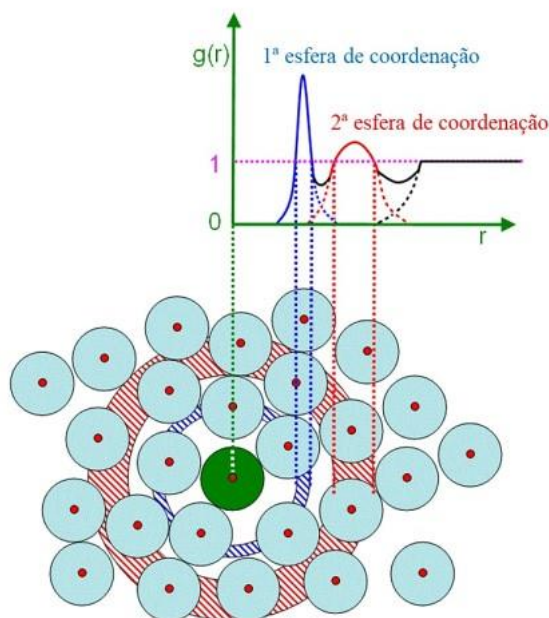
$$g_{AB}(r) = \frac{\langle \rho(r) \rangle}{\langle \rho_{local} \rangle} \quad (3.6)$$

Em que  $\rho(r)$  é a densidade calculada das partículas B a uma distância  $r$  da partícula A,  $\rho_{local}$  é a densidade local, para uma mesma distância  $r$  de um sistema com gases ideais. Portanto, a razão mostra de que teremos interações atrativas para  $\rho(r)$  maiores que a unidade e repulsivas caso  $\rho(r)$  menores que a unidade. Por meio do Campo de Força GROMOS é utilizada a rotina "gmx rdf":

$$g(r) = \frac{1}{\langle \rho_B \rangle_{local}} \frac{1}{N_A} \sum_{i \in A} \sum_{j \in B} \frac{\sigma(r_{ij} - r)}{4\pi r^2} \quad (3.7)$$

Em que  $\rho_{B(r)}$  é o número de partículas do tipo B encontradas a uma distância em torno de  $r$  da partícula A.  $\langle \rho_B \rangle_{local}$  densidade da partícula do tipo sobre as partículas esféricas de A em torno de um raio  $r_{max}$ . Para o sistema de membrana estudado foram escolhidas as interações entre os íons cálcio e o oxigênio da água ( $Ca^{2+}$ -OW), os átomos de água entre si (OW-OW), os íons cálcio e o grupamento fosfato ( $Ca^{2+}$  -  $PO_4$ ) e entre o grupamento fosfato e o oxigênio da água ( $PO_4$ -OW). A função de coordenação para os sistemas simulados foi calculada a partir dos últimos 100ns de simulação, sendo extraídas as médias de cada intervalo de 10ns do tempo de simulação e retirados a partir desse valor a média e desvio padrão. Na simulação realizada, as distâncias tomaram-se como referência as distâncias da primeira esfera de coordenação como demonstrado em figura 22, considerando as distâncias  $Ca^{2+}$ -OW (0,246 nm), OW-OW (0,279 nm), OW- $PO_4$  (0,276 nm) e  $Ca^{2+}$ - $PO_4$  (0,254 nm). Os valores de distância variaram da literatura, excedendo entre 0,02 nm em OW-OW. (80), (81), (82), (83)

Figura 11 – Representação esquemática da função de distribuição radial considerando esferas de solvatação e picos de coordenação.



Modificado de

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

Tabela 4 – Valores comparativos da função de distribuição de pares ( $g(r)$ ) entre  $Ca^{2+}$ -OW,  $Ca^{2+}$  -  $PO_4$ ,  $PO_4$ -OW e OW-OW. São descritos os valores obtidos computacionalmente nesse trabalho ( $g(r)$ ); valores comparativos da literatura ( $g(r)$  base) e suas metodologias de base.

| Interação          | $g(r)$ | $g(r)$ base | metodologia de base |
|--------------------|--------|-------------|---------------------|
| $Ca^{2+}$ -OW      | 0,246  | 0,246       | ab initio           |
| $Ca^{2+}$ - $PO_4$ | 0,254  | 0,255       | experimental        |
| $PO_4$ -OW         | 0,276  |             | não encontrado      |
| OW-OW              | 0,279  | 0,24-0,25   | experimental        |

O ponto tomado como referência para  $g(r)$  obtidos nesse experimento foram os pontos centrais do primeiro pico.

### 3.3.7 Função de ordem parâmetro de deutério

O ordenamento das cadeias lipídicas é capaz de conferir fluidez ao sistema. É percebida, por exemplo, mobilidade conformacional entre as fases gel e líquido-cristalino quando a

temperatura do sistema está acima da temperatura de transição. Esse grau de ordenamento é calculado através do parâmetro de ordem de deutério ( $S_{CD}$ ). Os parâmetros de ordem são, normalmente, definidos para todos os carbonos saturados ( $CH_2$ ) que têm dois átomos de carbono vizinhos. (79) Em ligações saturadas, o parâmetro de ordem é uma medida da restrição espacial do movimento do vetor C – H e é proporcional às divisões quadrupolares de deutério em medições de RMN.

(84), (85) O parâmetro de deutério é calculado como:

$$S_{CD} = \frac{3 \langle \cos^2(\theta_i) \rangle - 1}{2} \quad (3.8)$$

O ângulo  $\theta_i$  representa a inclinação entre a cadeia lipídica e o vetor normal da bicamada (comumente o eixo z), onde serão retiradas as médias das caudas da bicamada normal e o vetor C(i-1)-C(i+1). A partir da equação percebemos facilmente que quando  $\theta = 0^\circ$ , ou seja, ocorre perfeita simetria entre a cadeia lipídica e o eixo z, o valor de  $S_{CD} = 1$ , ao passo que  $\theta_i = 45^\circ$ , teremos  $S_{CD} = 0,25$ . A metodologia utilizada, a partir dos campos de força GROMOS, apresenta-se simplificada pela utilização dos hidrogênios implicitamente. A rotina utilizada foi `gmx order` do programa GROMACS.

### 3.3.8 Função de distribuição de água

A propriedade de distribuição da água calcula a orientação da molécula de água em relação a normal da caixa. O programa atribui moléculas de água inteiras a uma fatia, com base no primeiro átomo de três no grupo de arquivos de índice. Assume uma ordem O, H, H. Pode ser também determinada pela média do cosseno do ângulo entre o momento de dipolo da água e o eixo da caixa. A caixa é dividida em fatias e a média da orientação por fatia é expressa. (48)

### 3.3.9 Diagrama de Caixa

Gráficos de caixa são muito úteis em gráficos comparações entre conjuntos de dados, porque eles têm alto impacto visual e são fáceis de entender. (86) Os dados nesse modelo de representação são expostos de forma uni-variada no gráfico de caixa através de grupos numéricos chamados quartis. Os gráficos de caixa podem ter linhas que se estendem a partir das caixas chamados "bigodes" indicando a variabilidade fora dos quartis superiores e inferiores. O objetivo desse tipo de gráfico é demonstrar a população estatística. O espaçamento

entre as diferentes partes representa a dispersão e a assimetria dos dados. Os valores são representados demonstrando os dados a partir do limite inferior, limite superior, primeiro quartil, mediana e terceiro quartil.

Figura 12 – Representação esquemática do diagrama de caixa



Fonte: A autora (2020)

Limite inferior: representa o menor ponto amostral excluindo-se as dispersões.

Primeiro quartil: representa 25% da amostragem dos dados.

Mediana: representa 50% dos valores amostrais.

Terceiro quartil: representa 75% dos valores amostrais.

Limite superior: ponto mais distante dos valores amostrais excluindo as dispersões.

### 3.3.10 Função de espalhamento

Problemas em que a natureza é multivariada em que cada observação consiste em medidas de várias variáveis. A análise de espalhamento trata-se de uma ferramenta exploratória, identificando potenciais relações entre variáveis por meio da criação de uma matriz de covariância. (86)

$$S = \sum_{k=1}^n (x_k - m)(x_k - m)^T \quad (3.9)$$

onde  $m$  é o vetor médio

$$m = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n x_k \quad (3.10)$$

Caso as duas variáveis sejam perfeitamente lineares terão inclinação positiva e valor de  $S = 1$ .

Caso sejam perfeitamente lineares com inclinação negativa terão o valor de  $S = -1$ .



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

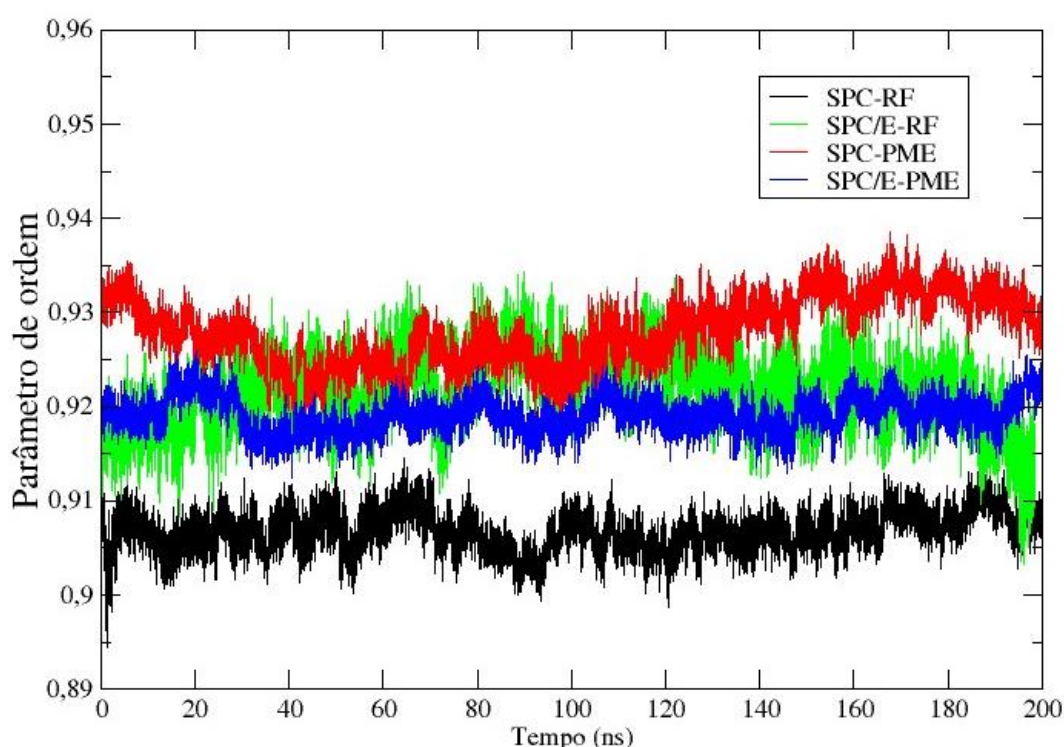
Implementações de novos modelos de tratamento eletrostáticos de longa distância (TELD) nas versões mais recentes o GROMACS, geraram divergências em algumas propriedades estruturais estudadas. As implementações foram otimizadas pelos desenvolvedores para o modelo de água SPC/E. O objetivo inicial desse trabalho é validar a utilização dos novos modelos de TELD implementados no software com o modelo de água SPC/E, de modo a garantir a compatibilidade dos resultados das novas versões do GROMACS (SPC/E-PME) com as propriedades obtidas anteriormente com o modelo (SPC-RF) para a membrana LPS rough associada a DPPE (LPS/DPPE). Os protocolos adotados de modelo de água foram SPC e SPC/E, comparando os TELD de RF e PME, em que cada um dos protocolos foi feito em duplicata. Ao final de cada simulação computacional foram realizadas análises de propriedades estruturais, dinâmicas e distribuição estatística dos sistemas simulados para garantir a convergência do LPS. As análises estruturais escolhidas para essa etapa do trabalho foram a área por lipídio  $A_L$ , espessura da bicamada  $D_{HH}$  e perfil de densidade. Para as propriedades dinâmicas o parâmetro de deutério  $S_{CD}$  foi selecionado. Para as propriedades estruturais foram tomados: função de distribuição radial  $g_{RDF}$ , histograma, probabilidade de densidade e função de espalhamento. Ao realizar simulações em DM uma dúvida recorrente é o tempo de simulação necessário para garantir a convergência dos parâmetros de interesse e do sistema. A variância nos resultados pode ser uma pista. A partir da variância de difusão de íons e principalmente do ordenamento da água, foi escolhido estender a simulação dos sistemas com PME. Nesse sentido é realizado um estudo sistemático utilizando as variações dos parâmetros ao longo do tempo para cada análise. Para análise desse sistema de convergência o capítulo foi dividido em duas seções principais que cobrem a dinâmica estrutural de membranas LPS/DPPE em duas escalas de tempo, a saber 200 ns e 800 ns. Sendo comparados as funções de autocorrelação da membrana e da água.

### 4.1 ANÁLISE E CONVERGÊNCIA DE PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E DINÂMICAS: PARTE I

#### 4.1.1 Estabilidade do Arranjo Lamelar em Membranas de LPS/DPPE

Nesta subseção serão discutidas análises de propriedades estruturais e dinâmicas, assim como a convergência dos sistemas em 200 ns de simulação. Nesta escala de tempo a bicamada de LPS/DPPE manteve uma estrutura lamelar em fase de líquido cristalino conforme esperado para estes sistemas em presença de cátions divalentes e a temperatura de 300 K. O parâmetro de ordem representado pelo SuAVE nos traz informações sobre a lamelaridade do sistema, sendo o parâmetro de ordem igual 1, referente a um sistema lamelar e paralelo ao plano xy; e igual a 0 um sistema totalmente não lamelar. A partir dos 200 ns simulados e representados na figura 13, todos os sistemas demonstraram comportamento lamelar. O menor valor de parâmetro de ordem ocorreu em SPC-RF (0,91) e maior parâmetro para SPC-PME (0,93). Não ocorrendo variações de padrão observado entre os modelos SPC-PME, SPC/E-PME e SPC/E-RF.

Figura 13 – Representação do parâmetro de ordem do programa SuAVE para SPC-RF(preto), SPC/E-RF(verde), SPC-PME(vermelho) e SPC/E-PME(azul) em 200 ns.

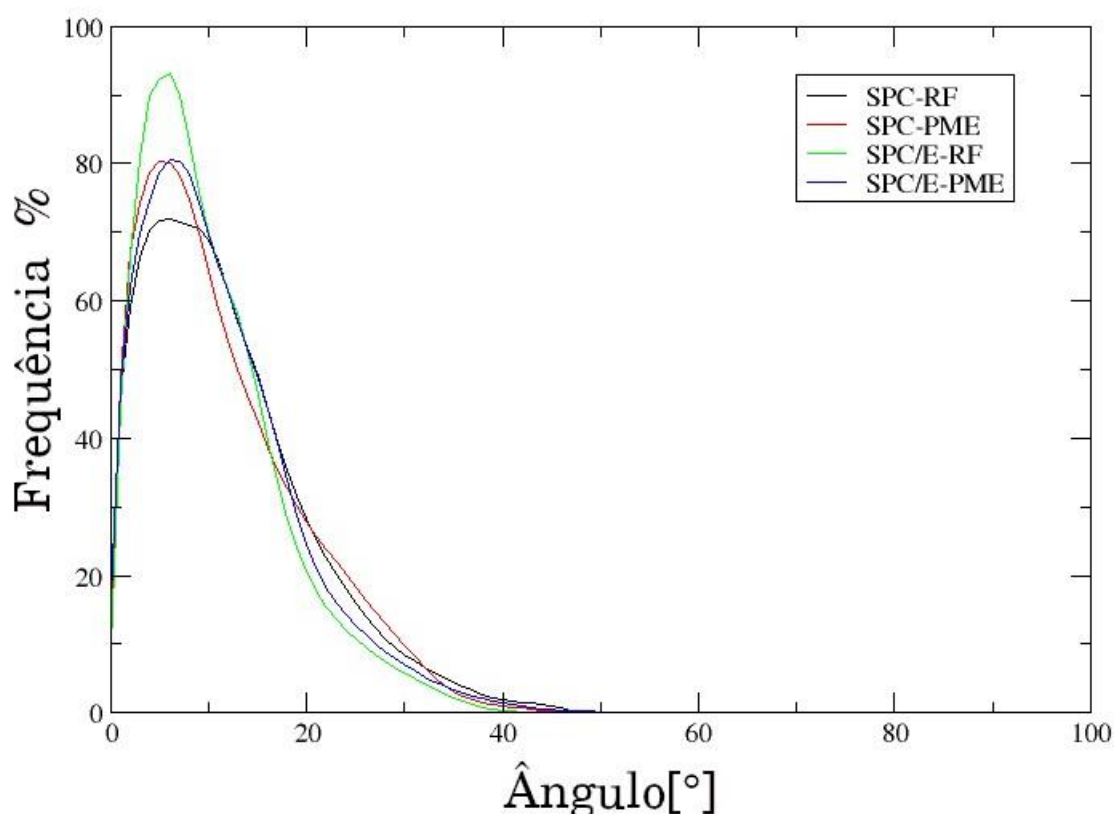


Fonte: A autora (2020)

A partir da figura 14, observa-se a distribuição dos ângulos de curvatura ao longo de 200 ns de dinâmica. A baixa frequência de ângulos de inclinação com valores altos observados na figura em questão, indicam que estes sistemas apresentam um arranjo lamelar com

lipídios alinhados ao eixo z da membrana. Não se observam diferenças significativas no perfil de curvatura ou arranjo tridimensional devido ao uso de correções de interações de longa distância via RF ou PME. Na presença de PME, o modelo SPC e SPC/E apresentam perfil de curvatura idênticos, como pode ser percebido abaixo.

Figura 14 – Distribuição das frequências da curvatura de LPS/DPPE em função dos ângulos de curvatura dos sistemas SPC-RF (preto), SPC-PME(vermelho), SPC/E-RF(verde) e SPC/E-PME(azul) ao longo de 200 ns.



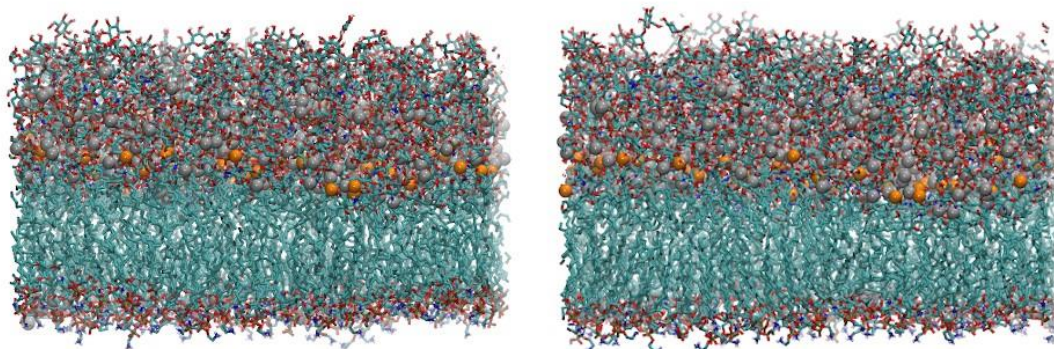
Fonte: A autora (2020)

A conformação visual dos sistemas após 1 ns (a esquerda) e 200ns (a direita) de simulação pode ser observada através da Figura 15. Nessa figura, a escolha da cor dos íons  $Ca^{2+}$  e grupos fosfatos representados em esferas de van der Waals foram de cor cinza e laranja, respectivamente.

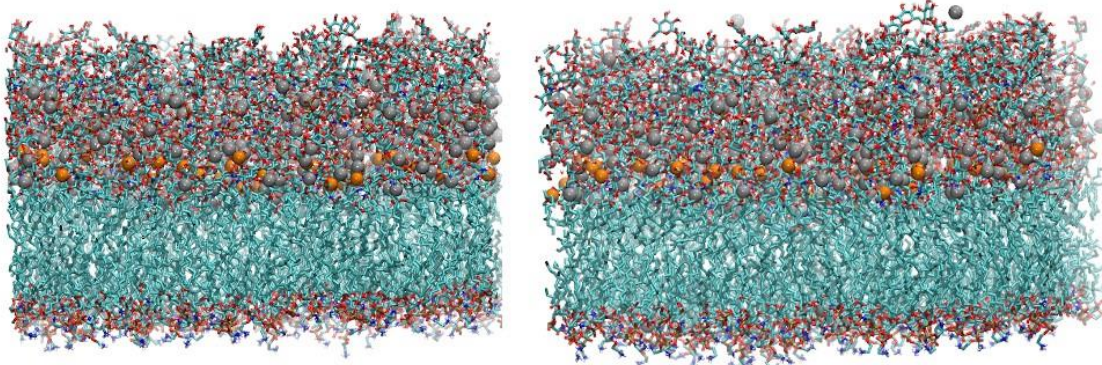
Figura 15 – Representação da membrana de LPS/DPPE: (a) SPC-RF(preto), (b) SPC-PME(vermelho), (c) SPC/E-RF(verde) e (d) SPC/E-PME(azul) em 1ns (a esquerda) e 200ns (a direita), respectivamente.



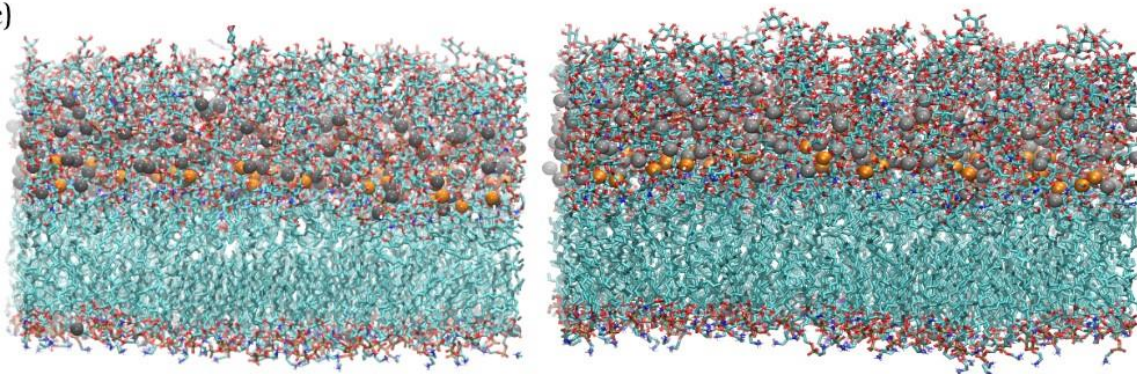
(a)



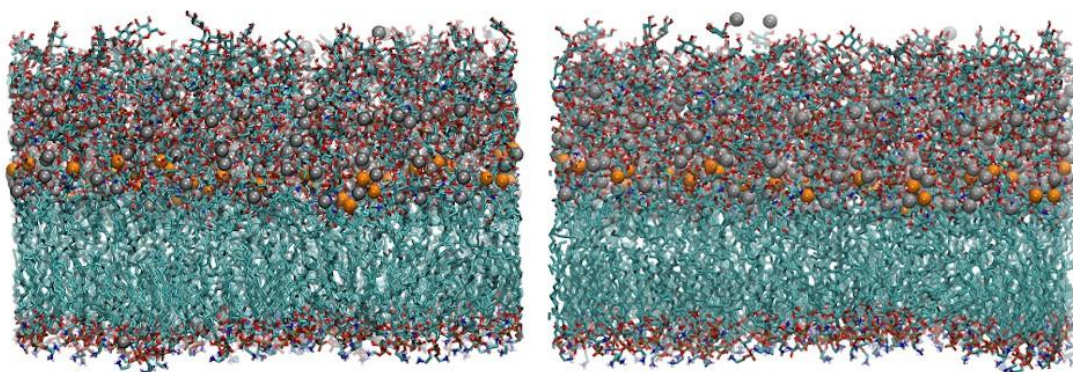
(b)



(c)



(d)



1ns

200ns

Fonte: A autora (2020)

### 4.1.2 Propriedades Estruturais: Área por Lipídeo, Espessura da Membrana e Perfil de Densidade

A área por lipídeo  $A_L$  é uma propriedade que mede o grau de empacotamento dos sistemas simulados. Em membranas lipopolissacarídicas,  $A_L$  depende de fatores como força de interação entre cada molécula, número de cadeias alquílicas, quimiotipos, temperatura e tipo de contra-íon. Essa propriedade apresenta vantagens em relação a outras propriedades que podem ser extraídas das simulações computacionais por ser medida experimentalmente de forma mais precisa, facilitando assim uma comparação direta entre modelos e medidas. Os valores experimentais obtidos por difração de raio-X para  $A_L$  de LPS hexa-acilado em fase de líquido cristalino são 1,42, 1,56 e 1,82  $nm^2$  a partir de diferentes métodos. (87), (88), (89) Os valores de  $A_L$  calculados a partir das simulações do sistema LPS/DPPE estão entre 1,51  $nm^2$  e 1,55  $nm^2$ , próximo a variação observada para os valores obtidos experimentalmente, como mostra a figura 16 e tabela 5. O desvio padrão obtidos para os valores de  $A_L$  e  $D_{HH}$  ao longo dos sistemas simulados representa menos que 1 % das médias, mostrando baixa variabilidade entre modelos SPCs e SPC/Es na presença de RF e PME. Os sistemas com o modelo de água SPC mostra ter maior  $A_L$  que os sistemas com o modelo SPC/E, e por tanto menor empacotamento, independente do TELD. O experimento SPC-PME apresentou o maior parâmetro de ordem, bem como a maior  $A_L$ . A partir da figura 16 (a), percebemos tendência a convergência das médias de  $A_L$  para SPC-RF, SPC-PME, SPC/E-RF e SPC/E-PME devido ao comportamento linear da análise ao longo do tempo.

Tabela 5 – Valores médios de área por lipídeo ( $A_L$ , em  $nm^2$ ), espessura ( $D_{HH}$ , em nm), parâmetro de deutério ( $SCD$ , sem unidade de medida), difusividade do íon ( $D_{ion}$ , em  $cm^2/s$ ) para o LPS-rough hexaacilado com modelos de água SPC-RF, SPC-PME, SPC/E-RF e SPC/E-PME.

|                           | SPC        | SPC        | SPC/E        | SPC/E      |
|---------------------------|------------|------------|--------------|------------|
| TELD                      | RF         | PME        | RF           | PME        |
| $A_L(nm^2)$               | 1,54(0,01) | 1,55(0,01) | 1,53(0,01)   | 1,51(0,01) |
| $D_{HH}(nm)$              | 3,15(0,01) | 3,16(0,02) | 3,15(0,01)   | 3,20(0,01) |
| $SCD$                     | 0,23(0,02) | 0,24(0,02) | 0,212(0,005) | 0,22(0,01) |
| $D_{ion} (10^{-7}cm^2/s)$ | 0,52(0,02) | 0,12(0,04) | 0,52(0,04)   | 0,11(0,06) |

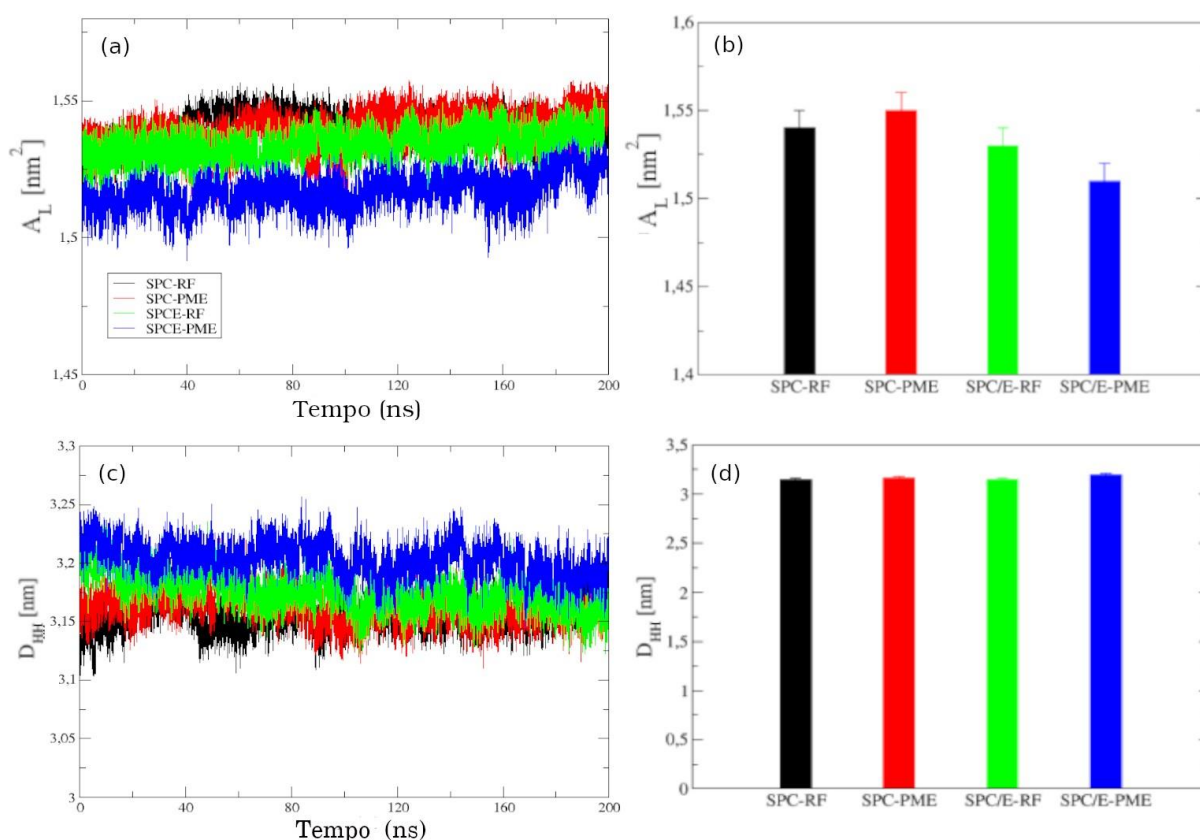
Fonte: A autora (2020)

A análise da espessura ( $D_{HH}$ ) mostra-se interessante para entendermos se há uma tendência de contração ou expansão da membrana ao longo do tempo. Tal análise também



nos traz a dimensão da hidrofobicidade na região LPS/DPPE. Alguns estudos, como Dias et al (90), mostram que existe uma correlação inversa entre o parâmetro área por cabeça ( $A_L$ ) e espessura da bicamada ( $D_{HH}$ ). Esse comportamento também foi observado na presente simulação, está exposto na figura 16 (b) e (d). O valor médio de  $D_{HH}$  é conservado ao longo tempo para todas as simulações, e indica que esta propriedade atinge convergência na escala de tempo simulada, tendo a média da espessura em torno de 3,15 nm. Foi observado uma maior  $D_{HH}$  em SPC/E

Figura 16 – (a) Evolução temporal e (b) diagrama de barra da área por lipídeo ( $A_L$ ). (c) Evolução temporal para a bicamada e (d) diagrama de barra da espessura da membrana ( $D_{HH}$ ). Calculados para SPC-RF (preto), SPC-PME (vermelho), SPC/E-RF (verde) e SPC/E-PME (azul).



Fonte: A autora (2020)

PME, de 3,20 nm, em relação ao modelos SPCs e SPC/E-RF. A variação de 0,05 nm é pequena, representando uma variação menor que 2 % em relação a espessura média, sendo até menor que a distância entre a ligação C-C, que mede cerca de 0,154 nm. São expressos na tabela 5 também os valores de parâmetro de deutério ( $S_{CD}$ ) e difusividade média dos íons

$Ca^{2+}$ . Tais valores serão discutidos em seções suas próprias, por motivos organizacionais. Por hora, por meio das tabelas 5 e 6 é possível ter um panorama geral das principais resultados numéricos para os experimentos realizados. .

Tabela 6 – Valores de coordenação dos ligantes calculadas por meio da função de distribuição radial (RDF) de gromos - retirados do ponto médio do primeiro pico de solvatação das ligações de  $Ca^{2+}$ -OW,  $Ca^{2+}$ - $PO_4$ , OW- $PO_4$  e OW-OW - para o LPS-rough hexaacilado com modelos de água SPC-RF, SPC-PME, SPC/E-RF e SPC/E-PME.

|                    | SPC           |               | SPC/E         |              |
|--------------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| RDF                | RF            | PME           | RF            | PME          |
| $Ca^{2+}$ -OW      | 6,13(0,05)    | 6,32(0,02)    | 6,11(0,02)    | 6,02(0,02)   |
| $Ca^{2+}$ - $PO_4$ | 0,98(0,02)    | 0,93(0,02)    | 0,92(0,02)    | 1,01(0,02)   |
| OW- $PO_4$         | 0,0791(0,004) | 0,0815(0,004) | 0,0830(0,004) | 0,075(0,004) |
| OW-OW              | 4,8303(0,002) | 4,795(0,002)  | 4,828(0,004)  | 4,819(0,002) |

Fonte: A autora (2020)

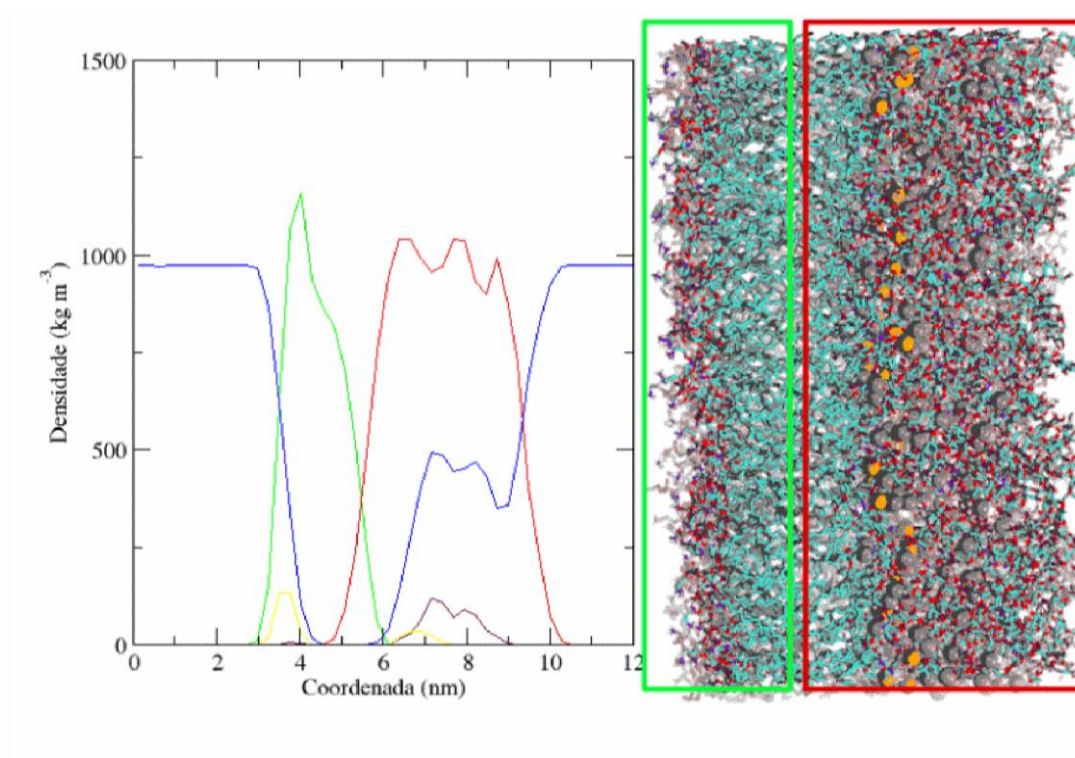
#### 4.1.2.1 Perfil de densidade

A análise do perfil de densidade parcial descreve a localização do sistema em relação a localização ao longo do eixo z dos componentes, e traz informação da avaliação do grau de hidratação. A análise pode indicar perfil lamelar para os sistemas, além de suas medidas poderem ser comparadas a resultados obtidos por experimentos de difração de nêutrons. (91) A figura 17, mostra esquematicamente a orientação e eixo do sistema LPS/DPPE tomados para a produção dos perfis de densidade.

A figura 18 é composta pelos experimentos (a)SPC-RF (b) SPC-PME; (c) SPC/E-RF e (d) SPC/E-PME. A presença de fosfato (em amarelo) ocorre entre 3 e 4 nm em todos os experimentos da figura 18. Participando, dessa forma, de DPPE (em verde) que se localiza entre 3 e 6 nm. É possível observar os fosfatos também entre 6 e 8 nm, participando de LPS. Os fosfatos eletricamente carregados encontram-se em LPS, de modo que os contra-íons,  $Ca^{2+}$  (em roxo), localizam-se também nessa região, com coordenadas z entre 6 e 9 nm. A região da bicamada lipídica mantém-se íntegra, ou seja, sem a presença de água. A região com maior densidade de água dentro da membrana apresenta-se na região onde estão localizados os grupamentos fosfato eletricamente carregados e os íons  $Ca^{2+}$ . Isso se deve ao alto grau de hidratação dos contra-íons. Tal comportamento é percebido para os quatro

modelos, SPC-RF, SPC-PME, SPC/E-RF e SPC/E-PME. O perfil de densidade mostrou uma pequena variação de densidade de água em seu estado *bulk*, ou seja, nas regiões 1-3 nm e 10-11 nm, para o modelo SPC quando comparado ao modelo SPC/E. Esse padrão mostrou-se consistente com o maior dipolo e mais favorável energia potencial ( $E_{pot}$ ) das moléculas de água no modelo SPC/E.

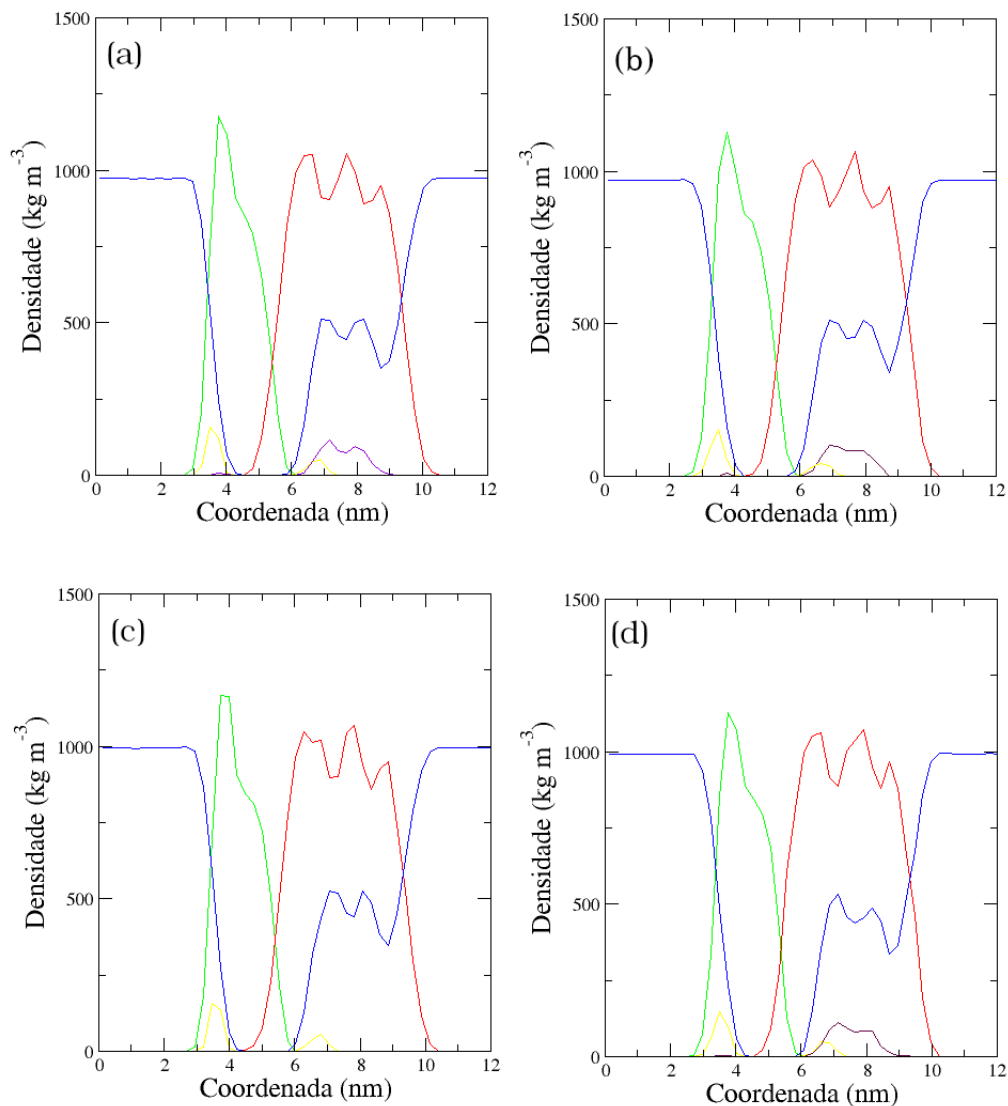
Figura 17 – Representação do perfil de densidade do sistema simulado - Densidade ( $kg.m^{-3}$ ) - ao longo do eixo Coordenada (nm) - z. Nesse eixo temos: água (azul), DPPE (verde), LPS (vermelho), fosfatos (amarelo) e íons  $Ca^{2+}$  (roxo). Ao lado temos a representação do sistema LPS/DPPE no perfil de densidade, em que DPPE está em verde, LPS em vermelho.



Fonte: A autora (2020)



Figura 18 – Perfil de densidade do sistema ( $\text{kg.m}^{-3}$ ) ao longo de coordenada (eixo z, em nm) para os experimentos (a) SPC-RF; (b) SPC-PME; (c) SPC/E-RF e (d) SPC/E-PME em 200ns. Ao longo do eixo de coordenadas: água (azul), DPPE (verde), LPS (vermelho), fosfatos (amarelo) e íons  $\text{Ca}^{2+}$  (roxo).



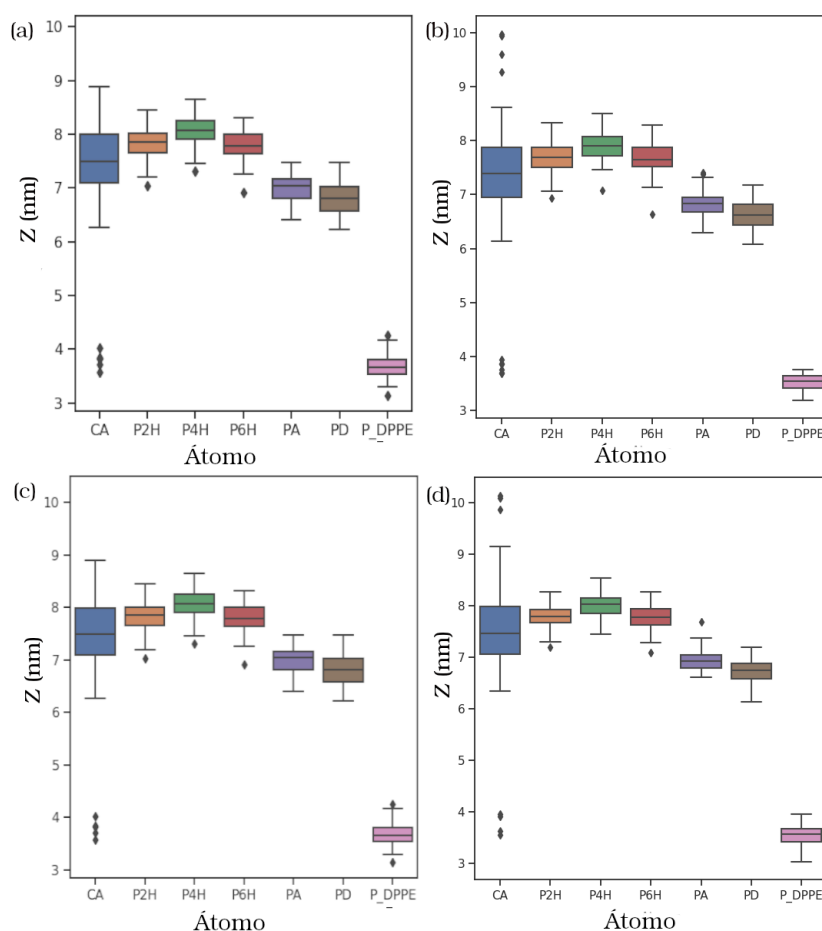
Fonte: A autora (2020)

#### 4.1.2.2 Função de probabilidade de densidade

O diagrama de caixa representa a distribuição empírica dos dados na forma de barra do limite inferior e superior, em que os dados são distribuídos em intervalos de mesmo tamanho, cada parte com 25 % dos dados. Os valores discrepantes são representados como bolinhas. O limite inferior da caixa representa o primeiro quartil da amostra e o limite superior o terceiro quartil. Enquanto que na barra ao meio da caixa temos o valor da mediana, como visto mais detalhadamente na seção de análises. Na figura 19, ao longo do

eixo x, temos: íons  $Ca^{2+}$ ; grupos de fosfatos carregados presentes em heptose (P2H, P4H, P6H); grupos de fosfatos carregados em lípidio A (PA, PD) e grupos P presente em DPPE. Ao longo do eixo z, os íons  $Ca^{2+}$  apresentam: mediana em torno de 7,5 nm e amplitude interquartílica de 1 nm. O limite superior dos íons  $Ca^{2+}$  no sistema SPC/E-PME mostra-se ligeiramente maior que nos outros analisados, apresentando pontos não discrepantes mais distantes dos valores amostrais.

Figura 19 – Diagrama de caixa com o posicionamento dos fosfóros e dos íons  $Ca^{2+}$  para os modelos (a) SPC-RF, (b) SPC-PME, (c) SPC/E-RF e (d) SPC/E-PME. A representação está íons  $Ca^{2+}$  (azul), P2H (amarelo), P4H (verde), P6H (vermelho), PA (lilas), PD (marrom) e P DPPE (rosa).



Fonte: A autora (2020)

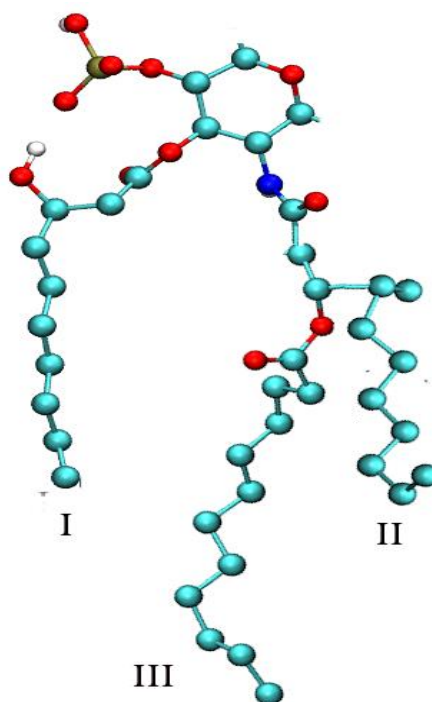
A figura 19 foi gerada a partir do programa python e os valores referentes a posição de cada átomo representado extraído do arquivo final da trajetória. São percebidos pontos discrepantes (bolinhas), na figura, para os íons  $Ca^{2+}$ , tanto em modelos SPC como SPC/E (em ambos os TELD). No entanto, discrepâncias na região entre 9-10 nm só foram percebidas em TELD do tipo PME. As discrepâncias de íons  $Ca^{2+}$  entre 3-4 nm ocorrem na mesma região onde

estão localizados átomos de fósforo de DPPE. Através do diagrama de caixa podemos perceber que entre 7,0-7,4 nm ocorre orientação no sentido de PA e PD, enquanto que 7,4-8,0 nm, no sentido de - P2H, P4H e P6H. Por esse tratar-se de um diagrama de caixa, sabemos que metade do íons  $Ca^{2+}$ , ou seja, quase 144 íons, encontram-se distribuídos no intervalo entre 7-8 nm, estando os outros 144 distribuídos de forma majoritária entre 6-7 nm e 8-9 nm.

#### 4.1.3 Propriedades Dinâmicas: $S_{CD}$

A propriedade ordem de carbono-deutério ( $S_{CD}$ ), mede o grau de ordenamento de cadeias alquila calculando o ângulo do alinhamento entre o vetor normal a membrana (eixo Z) e cada vetor definido entre o C e H, descrevendo mobilidade e fluidez dessas. Quanto maior o valor do parâmetro de ordem, mais ordenadas estarão as cadeias da bicamada. As cadeias consideradas são ácido 3-hidroxidecanoyl (I) com 10 ligações de carbono; ácido dodecanoyl (II) e (III) com 10 ligações de carbono e 12 ligações respectivamente. As cadeias consideradas foram ilustradas na figura 20. Para o cálculo do ângulo de inclinação dos carbonos em relação ao eixo normal, são tomados como referência os carbonos iniciais e finais. A fim de reduzir os efeitos de desvio no cálculo, foram ignorados da média os carbonos 1, 8, 9 e 10 para cadeias com 10 carbonos; foram ignorados os carbonos 1, 10, 11 e 12 para cadeias com 12 carbonos.

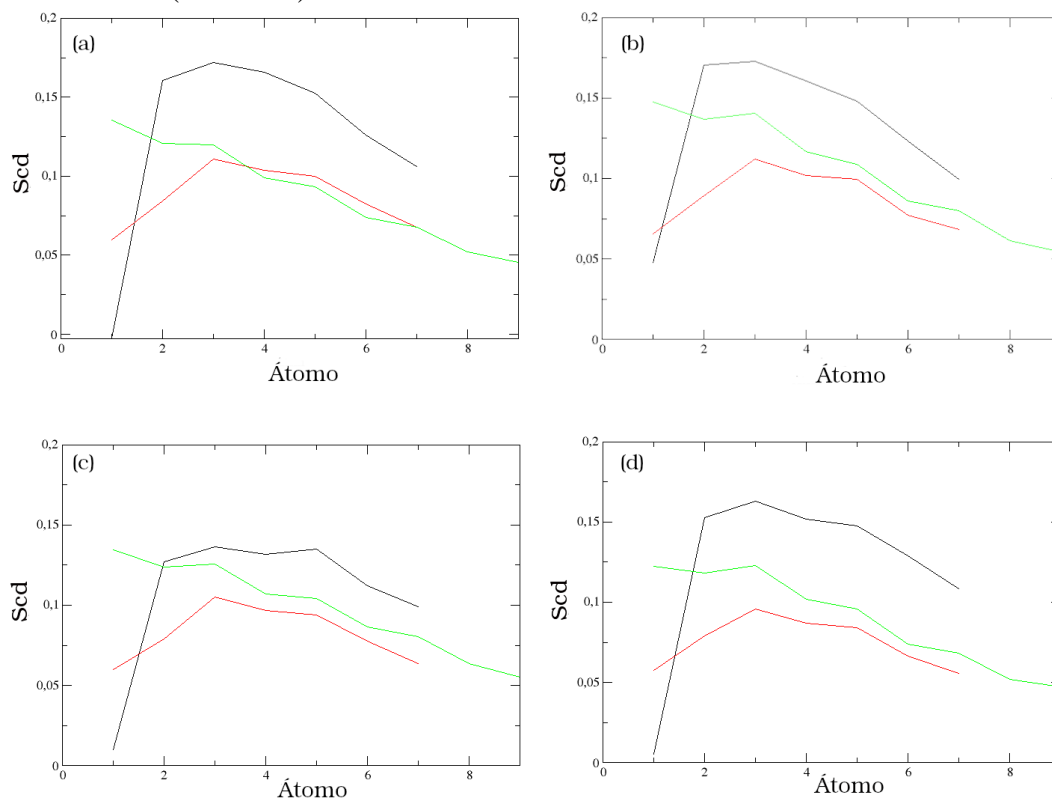
Figura 20 – Representação do lipídio A e das cadeias aciladas (I) ácido 3-hidroxidecanoyl(10:0LP2), (II) ácido dodecanoyl(10:0-LP1) e (III) ácido dodecanoyl(12:0-LP1).



Fonte: A autora (2020)

A cadeia (I), (II) e (III), foram tomadas como os sistemas sn1, sn2 e sn3 respectivamente. Para o cálculo de sn2 e sn3, foram tomadas as médias entre os pares de ligações presentes na 3-(amino acetil)-3-deoxy-D-glucose) representadas a cima. O comportamento esperado em  $S_{CD}$  de cadeias lipídicas é um gráfico com decaimento do parâmetro de ordem de forma crescente, ou seja, que os parâmetros mais próximos a região hidrofóbica sejam menos ordenados. A partir da tabela 7, os valores de  $S_{CD}$  para sn1, sn2 e sn3 mostram-se ligeiramente mais ordenados em SPC que SPC/E, independente da aproximação usada para o tratamento eletrostático de longa distância. Na figura 21 o maior ordenamento nos átomos iniciais de sn1 e sn3 se devem a presença de grupos ceto-ésteres no átomo 1 e 3 para sn1; no átomo 1 para sn3. O radical sn2 caracteriza-se como o menos ordenado.

Figura 21 – Parâmetro de deutério  $S_{CD}$  para cadeias aciladas de LPS. Parâmetro de ordem para as cadeias aciladas (a)SPC-RF (b)SPC-PME (c)SPC/E-RF (d) SPC/E-PME. Cadeias sn1 são representadas (em preto), sn2 (em vermelho) e sn3 (em verde).



Fonte: A autora (2020)

Não existem medidas experimentais de  $S_{CD}$  para LPS ou derivados publicados na literatura especializada. Desta forma, é utilizada uma aproximação que faz uso da técnica de reflectância total atenuada acoplada à espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier para estimar o comportamento orientacional das moléculas de LPS a partir da posição de pico  $x_s$  de vibração simétrica de estiramento do grupo metileno em torno de  $2850\text{ cm}^{-1}$ . (92) O parâmetro de ordem obtido por esta técnica é um valor para toda a membrana e não valores individuais para os átomos de carbono da cadeia. Baseado nessa técnica, o lipídio A de *P. aeruginosa* de 0,28 na fase líquida cristalina (88)  $S_{CD}$  calculado indica alta fluidez da bicamada simulada em relação a estimativa experimental, porém o valor de  $S_{CD}$  calculado é representativo para a bicamada líquida-cristalina na fase  $L\alpha$ . Estima-se os valores de S para LPS na fase líquida cristalina em torno de  $0,25\pm0,05$ , os valores obtidos computacionalmente para os sistemas em estudo assemelham-se aos valores obtidos em trabalhos anteriores. (93)

Tabela 7 – Tabela com os valores do parâmetro de deutério de sn1, sn2 e sn3; nos experimentos SPC-RF, SPC-PME, SPC/E-RF e SPC/E-PME.

| Modelo    | $S_{CD}$   |              |              |
|-----------|------------|--------------|--------------|
|           | sn1        | sn2          | sn3          |
| SPC-RF    | 0,30(0,02) | 0,178(0,006) | 0,208(0,008) |
| SPC-PME   | 0,30(0,02) | 0,189(0,005) | 0,24(0,01)   |
| SPC/E-RF  | 0,29(0,01) | 0,167(0,008) | 0,212(0,006) |
| SPC/E-PME | 0,29(0,01) | 0,158(0,003) | 0,21(0,01)   |

Fonte: A autora (2020)

#### 4.1.4 Dinâmica Estrutural de Solvatação da Membrana de LPS/DPPE

##### 4.1.4.1 Função de distribuição radial

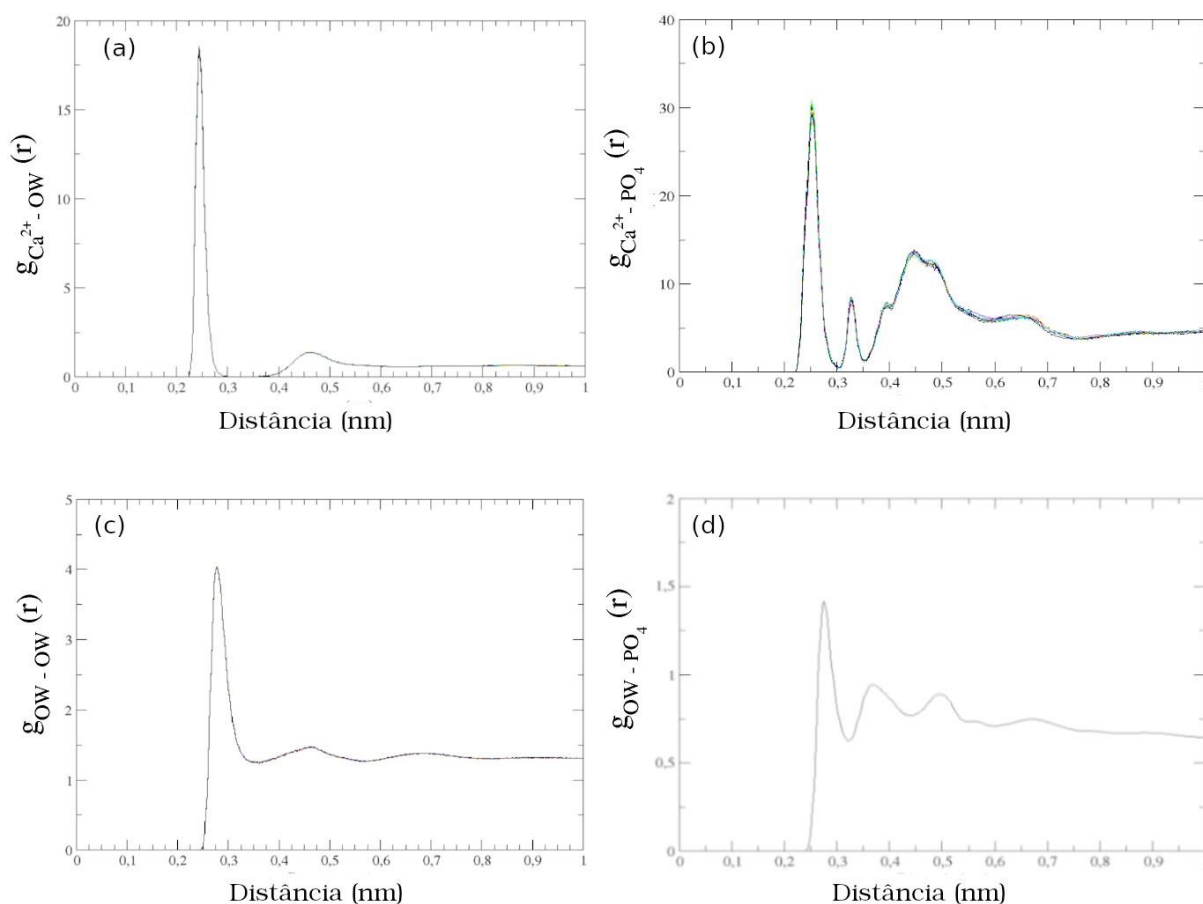
A função de distribuição radial (RDF) traz informações estruturais sobre a densidade de matéria circundante em função da distância de um ponto. Dessa, são extraídas informações sobre a frequência de ocorrência de determinada distância entre ligantes. Semelhante ao perfil de difração de raios-X (DRX), para uma estrutura cristalina, em que os altos picos observados em seu gráfico RDF, são capazes de indicar intervalos atômicos frequentemente presentes na estrutura. Em simulação de DM, o RDF é calculado contando o número de pares de átomos entre os intervalos de separação determinados.

A partir da tabela 6 observa-se os valores médios de coordenação para os grupos estudados, em torno da primeira camada de solvatação. Na presença do LPS-rough, a coordenação total do íon  $Ca^{2+}$  observada na tabela 5 variou entre 7,02-7,25, enquanto a coordenação do íon  $Ca^{2+}$  na presença do fosfato variou entre 0,92-1,01, em relação a média de coordenação. A água coordenou-se mais fortemente consigo mesma (valores entre 4,795-4,830), enquanto sua coordenação com o fosfato ficou entre 0,0791-0,0830 (praticamente inexistente). O valor descrito na literatura obtido em relação a coordenação média dos íons de cálcio com água através de metodologias experimentais, como a difração de raio-X, foi percebido variações entre 6-8. (94) Ao comparar com experimentos, quando consideradas outras técnicas, o valor médio obtido é de 7,1. (80) Simulações de DM realizadas por 1  $\mu$ s com íon  $Ca^{2+}$  e água (SPC-RF), em campo de força "GROMOS 54a7" com íons de "GROMOS 53a6", resultou em coordenação de 7,88. Simulações realizadas com o íon  $Ca^{2+}$ , o íon  $PO_4^-$  e água (SPC/E-PME) em 200 ns, utilizando os mesmos parâmetros deste experimento apresentaram coordenação média Ca-OW de 5,973 e Ca- $PO_4$  de 0,959, totalizando coordenação média do  $Ca^{2+}$  de 6,927. Dessa forma podemos afirmar que os valores obtidos para coordenação dos íons  $Ca^{2+}$  encontrados nessa simulação mostram-se condizentes com os valores obtidos na literatura, bem como de experimentos em DM com a mesma metodologia. Ademais, segundo Katz et al, há uma pequena penalidade energética devido alteração do número de moléculas de água na primeira camada de coordenação entre 6 e 8. (95)

Comparações experimentais entre os valores médios de coordenação do íon  $Ca^{2+}$  com o fosfato não foram encontradas, sendo então considerados para efeitos comparativos um íon de raio iônico mais próximo ao do  $Ca^{2+}$  (100 pm), o íon  $Mg^{2+}$  (72 pm). No modelo experimental partindo de  $Mg^{2+}$  e dimetilfosfato (DMP) em presença de água, foram observadas ocupação de um oxigênio do grupo fosfato na posição do oxigênio da água em camada de solvatação octaédrica com seis moléculas de água ( $Mg(H_2O)_6^{2+}$ ). (96) O mesmo comportamento é observado neste trabalho em relação aos oxigênios não metilados do fósforo e os íons  $Ca^{2+}$ . As posições do grupo cálcio e fosfato são próximas, no entanto na tabela 5 percebemos ser pequena a formação de ligações a nível de primeira camada de solvatação. Em relação as distâncias dos picos de coordenação descritos na figura 22, em que há uma sobreposição dos gráficos dos 4 sistemas estudados, podemos perceber congruência em relação aos picos para os pares. As distâncias dos picos de coordenação serão discutidas sequencialmente, como (a) 0,246 nm, (b) 0,254 nm, (c) 0,279 nm e (d) 0,276

nm. Ao considerar simulações em ab initio, a função de distribuição radial para Ca-O estava situada em 0,246 nm, igual ao valor obtido em (a). (80) Trabalhos experimentais se aproximam do pico da primeira camada de solvatação de (b)  $Ca^{2+}$ - $PO_4$  e (c) OW-OW, em que foram observados respectivamente 0,255 nm e 0,24- 0,25 nm. (81), (83), (82)

Figura 22 – Função de distribuição radial entre íons  $Ca^{2+}$ : OW (a) e  $PO_4$  (b); OW: OW (c) e  $PO_4$  (d).



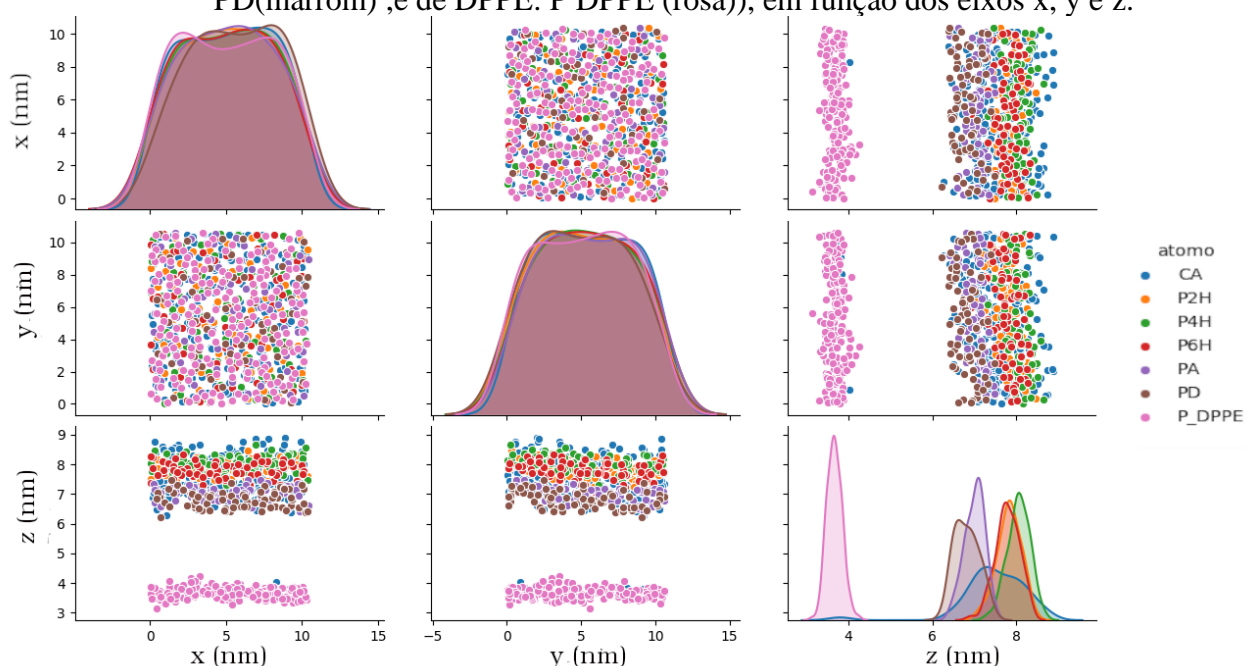
Fonte: A autora (2020)

#### 4.1.4.2 Função de espalhamento

Os gráficos da figura 23 foram obtidos através das coordenadas finais dos fósforos e íons  $Ca^{2+}$ . Essas foram plotadas por meio da biblioteca matplotlib e seaborn de python. A partir dos eixos, podemos perceber que para os íons  $Ca^{2+}$ , no modelo SPC-PME, que ocorre livre variação desses íons ao longo dos eixos x e y. Enquanto que ao longo do eixo z, os valores médios mantêm-se constantes. A figura 23, que representa o espalhamento de íons  $Ca^{2+}$  em

relação aos fosfatos dos sistemas, descreve o espalhamento apenas em relação a parte do superior da bicamada lipídica. Ao comparar a função de espalhamento para os átomos ao longo dos eixos x, y e z; podemos perceber que as posições dos íons  $Ca^{2+}$  estão na mesmas regiões da dos fosfatos. Isso demonstra a alta probabilidade de ligação desses. Percebemos também uma distribuição uniforme para os átomos de forma geral, ao longo de x e y, como era de se esperar.

Figura 23 – Função de espalhamento, para experimento SPC-RF, dos íons ( $Ca^{2+}$ , em azul) e átomos de fósforo de LPS/DPPE (em heptose (galU): P2H(laranja), P4H(verde), P6H(vermelho); em glucose (lipídeo A): PA(roxos), PD(marrom) ;e de DPPE: P DPPE (rosa)), em função dos eixos x, y e z.



Fonte: A autora (2020)

#### 4.1.5 Comportamento da Água em LPS/DPPE

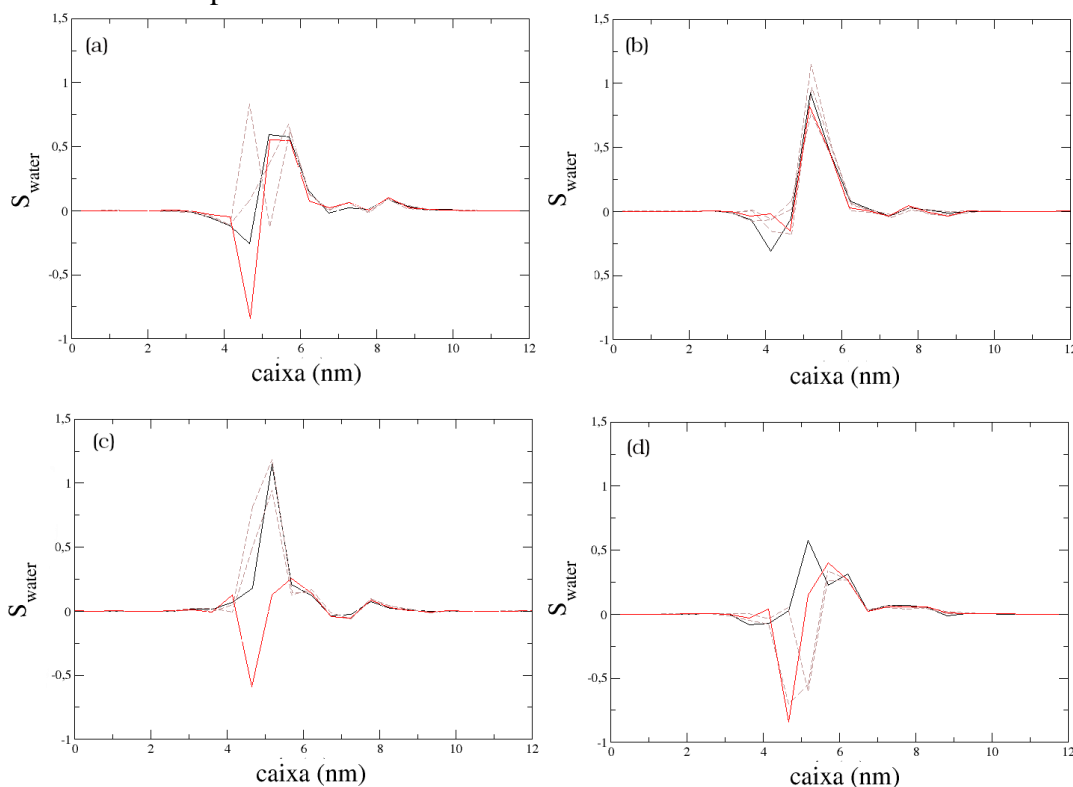
##### 4.1.5.1 Orientação da água

Ao longo da análise de orientação da água podemos perceber em figura 24 que as moléculas de água se orientaram mais fortemente entre 4 e 6 nm, devido a quantidade reduzida de moléculas de água nesse intervalo, bem como devido a presença de íons fosfato. Esse ordenamento não tem um padrão definido, mas varia entre 0,5 e 1,0 em relação a normal da membrana. A variação na ordenação nos mostra que as moléculas de água de ambos os modelos permanecem girando ao longo do intervalo de 25 ns dos últimos 100 ns de simulação. Na figura, a configuração inicial é mostrada em preto, a final em vermelho.



Amostras intermediárias são amostradas a cada 25000 passos e são mostradas nas linhas tracejadas em marrom.

Figura 24 – Parâmetro de ordenamento das moléculas de água ( $S_{water}$ ), calculado por rotina gromacs, na superfície externa da membrana. Os sistemas simulados são (a) SPCRF;(b) SPC-PME;(c) SPC/E-RF e (d) SPC/E-PME. Em preto, os primeiros 25 ns; em vermelho, os últimos 25 ns (75-100 ns), e pontilhado os intervalos 25-50 ns e 50-75 ns.



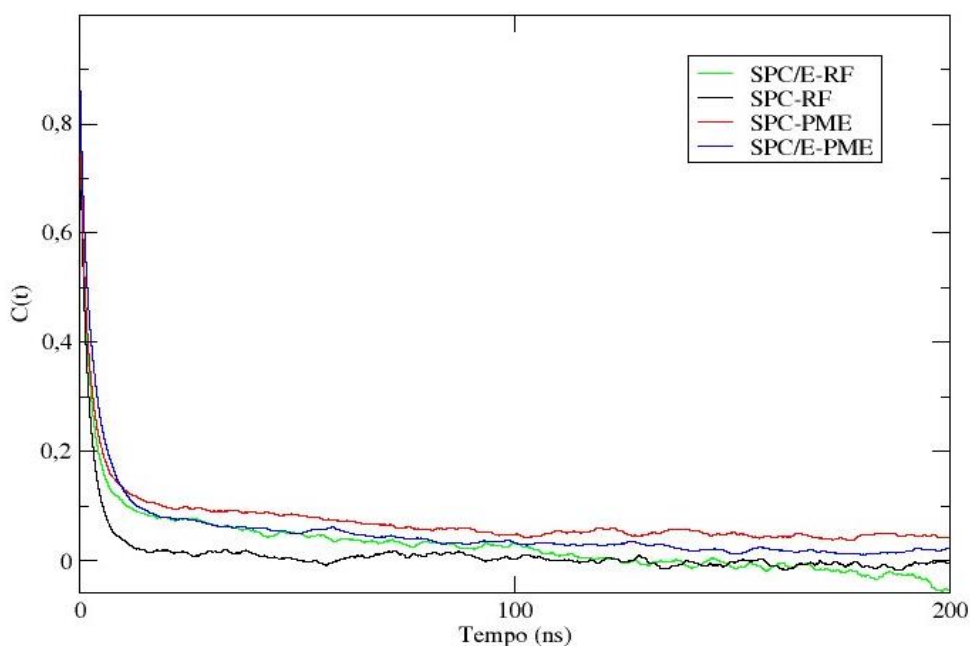
Fonte: A autora (2020)

#### 4.1.6 Convergência de Propriedades Estruturais em 200 ns

A função de autocorrelação tem seu valor variando de 1 a -1, em que 0 significa a total perda de correlação com o sistema inicial. O coeficiente de autocovariância mede a relação entre dois valores  $z_t$  e  $z_{t+k}$ , onde  $k$  é a distância entre os valores. A função de autocorrelação é uma função adimensional. Através dessa análise podemos perceber a não aleatoriedade dos dados e identificar um modelo de série temporal. Através da função de autocorrelação pode-se perceber que o sistema começa a perder correlação muito rapidamente ao longo dos primeiros 20 ns, em sequência vai decrescendo muito lentamente até perder completamente a correlação com sua conformação inicial. Próximo aos 200 ns os sistemas SPC-RF, SPC/E-RF e SPC/E-PME estão seguindo linearmente em  $C(t) = 0$ , ou seja, com perda da correlação.

SPC-PME demorou mais para convergir em relação aos demais sistemas como demonstrado na figura 25.

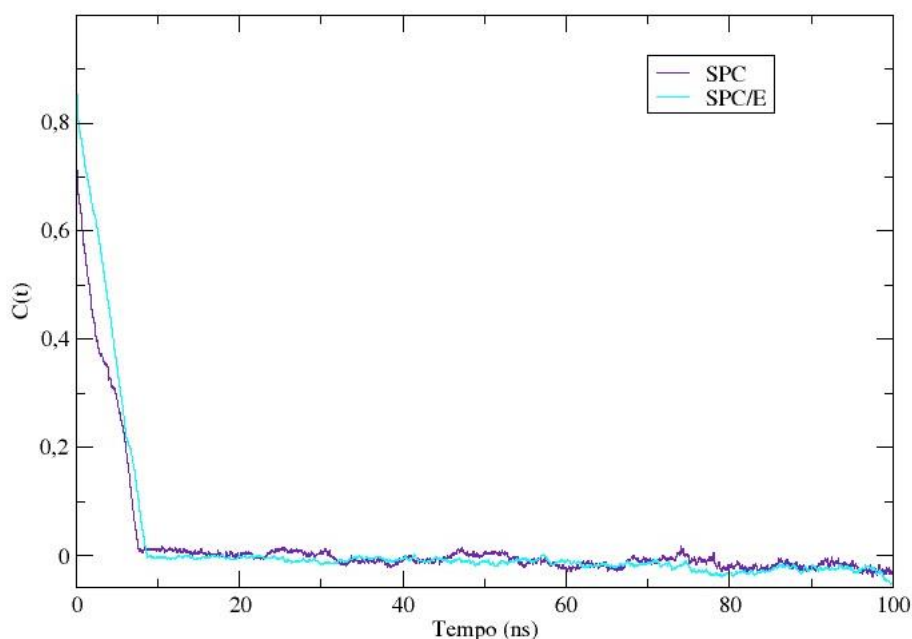
Figura 25 – Função de autocorrelação (adimensional) entre os oxigênios da molécula de água para os modelos SPC e SPC/E, submetidos a TELD RF e PME. Tem-se a representação de SPC/E-RF (verde), SPC-RF (preto), SPC-PME (vermelho) e SPC/E-PME (azul).



Fonte: A autora (2020)

Ao comparar a perda de autocorrelação para sistemas de água puros da figura 26, a perda completa de autocorrelação ocorre em tempo inferior a 10 ns, permanecendo estacionária ao longo do intervalo. Esse intervalo representa 100% em relação as mudanças lentas de conformação da água como jump e tumbling, da ordem de 1-7 ps. A presença de sistemas carregados em simulações de DM demora muito mais tempo para apresentar estabilização e convergência de seus sistemas.

Figura 26 – Função de autocorrelação de água pura em função do tempo (ao longo de 100 ns). São representados os modelos SPC(rox) e SPC/E(azul ciano).



Fonte: A autora (2020)

#### 4.1.7 Comparações da função de energia de pares

A função de energia potencial entre os diferentes modelos de água varia em uma fração de 11% segundo a tabela 1. Esta seção tem por objetivo comparar esses valores em relação as simulações. Ao relacionar a energia de pares entre diferentes grupos moleculares pelo termo de Lennard-Jones, é possível perceber que não há diferença nos termos para os diferentes modelos de água testados, como pode ser visto na tabela abaixo.

Tabela 8 – Constantes  $C_6$  e  $C_{12}$  de Lennard-Jones para o cálculo da energia de pares Oxigênio (O) e Hidrogênio (H), para os modelos de água SPC e SPC/E.

| Modelo | $C_6(O)^{1/2}$ | $(C_{12}(O)^{1/2}) \times 10^{-3}$ | $(C_6(H)^{1/2}) \times 10^{-3}$ |
|--------|----------------|------------------------------------|---------------------------------|
| SPC    | 0,05116        | 1,623                              | 0,0                             |
| SPC/E  | 0,05116        | 1,623                              | 0,0                             |

Fonte: Gromacs (2014)

Qualquer variação nessa análise é resultado da diferença entre os dipolos dos modelos de água, e como essa diferença pode resultar em aumento ou diminuição na distância entre os átomos. Nos sistema simulados temos uma diferença de 192 (0,6%) moléculas de água

SPC a mais para um sistema de mesma dimensão, entre os diferentes experimentos. De forma quantitativa, o cálculo da energia de Lennard Jones demonstrou, que apenas alterando o modelo de água temos uma diferença no parâmetro de Lennard-Jones entre 0,2%(RF) e 23,9%(PME) a mais de SPC/E em relação a SPC. Para os parâmetros de Coulomb, a variação em relação a alteração no modelo de água resultou em variação de 0,74% (RF) e 6,54% (PME), como mostrado na tabela 9.

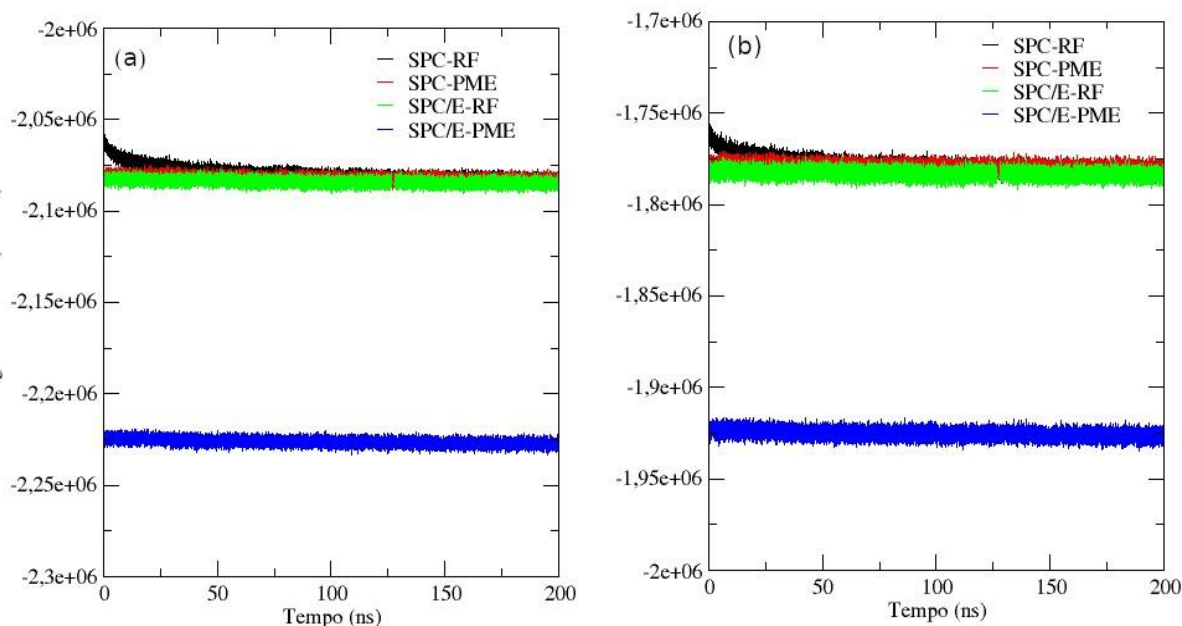
Tabela 9 – Parâmetros de energia de Lennard-Jones intermolecular e Coulomb intermolecular para os modelos SPC e SPC/E com TELD RF e PME. São apresentados na tabela os seguintes parâmetros: raio de corte (Cutoff, em nm), Energia de Lennard-Jones (Energia LJ, em  $10^3$  kJ/mol), erro estatístico calculado por gromacs referente a energia de Lennard-Jones (em  $10^3$  kJ/mol)), Energia de Coulomb (Energia Coulomb em  $10^3$  kJ/mol) e o erro estatístico calculado por gromacs referente a energia de Coulomb (em  $10^3$  kJ/mol)).

| Modelo<br>TELD                    | SPC     |         | SPC/E   |         |
|-----------------------------------|---------|---------|---------|---------|
|                                   | RF      | PME     | RF      | PME     |
| Cutoff(nm)                        | 1,4     | 1,2     | 1,4     | 1,2     |
| Energia LJ x $10^3$ (kJ/mol)      | 157,5   | 167,22  | 157,85  | 219,91  |
| erro estatístico x $10^3$         | 0,2     | 0,06    | 0,07    | 0,06    |
| Energia Coulomb x $10^3$ (kJ/mol) | -2805,6 | -2822,3 | -2807,6 | -3019,4 |
| erro estatístico x $10^3$         | 1,200   | 0,2     | 0,2     | 0,3     |

Fonte: Gromacs (2014)

A função de energia potencial descreve as mudanças energéticas em função das variações das coordenadas atômicas, incluindo o rearranjo de ligações químicas. Essas variações representam tanto mudanças intra-atômicas (como ângulo, torção e ligação) como intermoleculares (interações de van der Waals e Coulômbica). A partir da figura 27 percebe-se uma continuidade ao longo de 200 ns de simulação para Energia total e potencial dos sistemas analisados. Nota-se uma menor energia no sistema com presença de água SPC/E-PME em relação aos demais. Os sistemas SPC em tratamento RF e PME, bem como SPC/E com TELD RF apresentaram diferenças entre si pouco significativas.

Figura 27 – (a) Cálculo de energia total e (b) potencial durante a trajetória de 200 ns para o sistema LPS/DPPE em presença de água SPC e SPC/E, com TELD RF e PME. Os experimentos representados são SPC-RF (preto), SPC-PME (vermelho), SPC/E-RF (verde) e SPC/E-PME (azul).



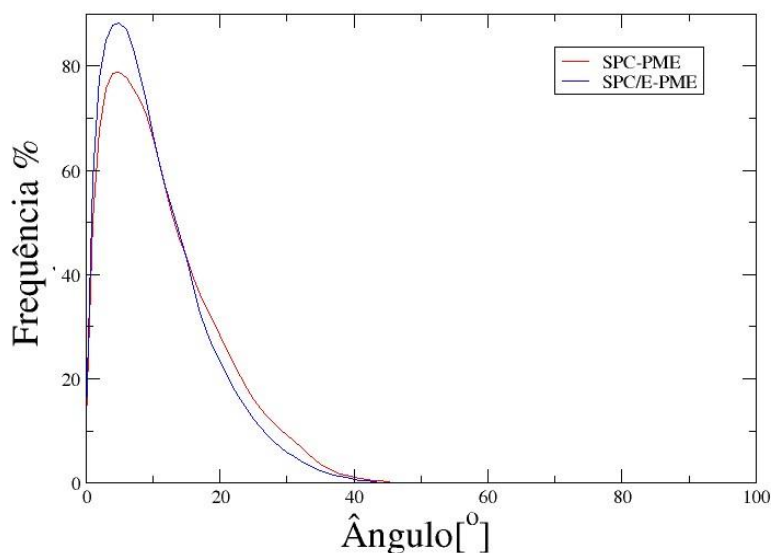
Fonte: A autora (2020)

## 4.2 ANÁLISE E CONVERGÊNCIA DE PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E DINÂMICAS: PARTE II

### 4.2.1 Estabilidade do Arranjo Lamelar em Membranas LPS/DPPE

O estudo da estabilidade do arranjo lamelar no sistema LPS/DPPE caracteriza o desvio do ângulo normal da superfície em relação ao eixo normal do sistema (eixo z). Quanto mais próximo a zero o valor obtido no eixo y, mais bem representada pelo plano xy estará o sistema e, conseqüentemente maior a sua planaridade. Os sistemas analisados e representados na figura 28 apresentaram pequenas variações de curvatura ao longo da simulação, tendo variação máxima de 40 graus de curvatura. Não é possível perceber significativas diferenças entre os sistemas simulados em relação a planaridade e ambos os sistemas mostram-se planos no intervalo.

Figura 28 – Distribuição dos ângulos de curvatura para 800 ns. Os sistemas representados são em vermelho SPC-PME e em azul SPC/E-PME.

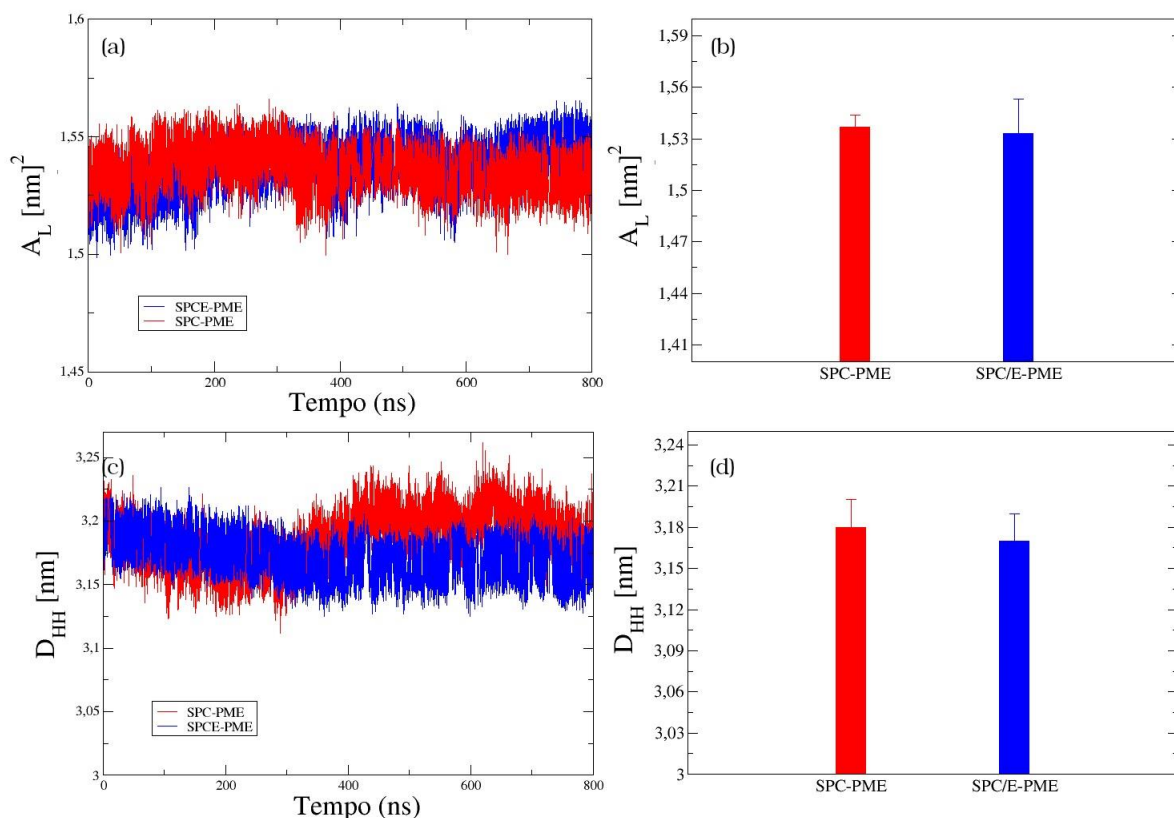


Fonte: A autora (2020)

#### 4.2.2 Propriedades Estruturais: $A_L$ , $D_{HH}$ e Perfil de Densidade

O cálculo do grau de empacotamento dos lipídios na simulação é medido através da análise área por lipídio para os sistemas hexacilados de LPS rough. A partir da figura 29 percebemos: (a) continuidade dos valores de  $A_L$  obtidos nos sistemas estudados; (b) área por lipídio para SPCPME e SPC/E-PME respectivamente de  $1,54 \text{ nm}^2$  e  $1,53 \text{ nm}^2$ ; (c) representação temporal de  $D_{HH}$  similar aos valores obtidos nos sistemas estudados anteriormente, com integridade da superfície mantida; (d) valor médio de  $D_{HH}$  para SPC-PME e SPC/E-PME respectivamente 3,18 (0,02) e 3,17 (0,02).

Figura 29 – Área por lipídeo ( $A_L$ ) ao longo de 800 ns (a), histograma da média da área por lipídeo ( $A_L$ ) (b), espessura da bicamada lipídica ( $D_{HH}$ ) ao longo de 800 ns (c) e histograma da média da espessura da bicamada ( $D_{HH}$ ) (d) para SPC-PME (vermelho) e SPC/E PME (azul).



Fonte: A autora (2020)

A tabela 10 mostra o crescimento dos parâmetros  $A_L$  e  $D_{HH}$  de forma cumulativa de 0 ns a 800 ns para os sistemas com SPC-PME e SPC/E-PME. A partir de 300 ns da referida tabela, os valores cumulativos obtidos para  $A_L$  e  $D_{HH}$  variam apenas no intervalo do desvio padrão, e mantêm o desvio padrão em baixos valores, indicando a convergência dos parâmetros.

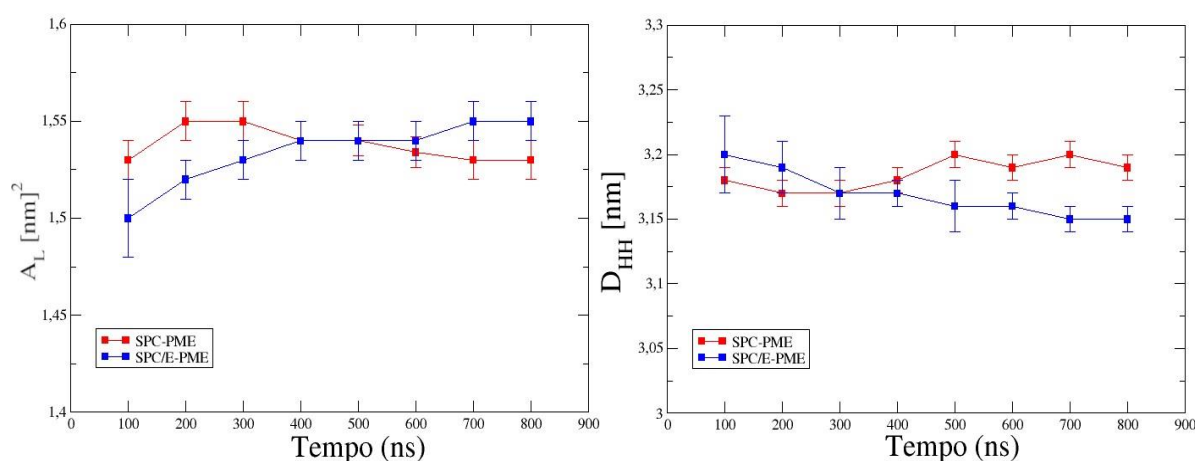
Tabela 10 – Representação temporal cumulativa para a análise área por lipídeo ( $A_L, em[nm]^2$ ) e espessura da bicamada ( $D_{HH}, em[nm]$ ) em presença de água SPC-PME e SPC/EPME no sistema LPS/DPPE e contra-íons  $Ca^{2+}$

| Tempo(ns) | $A_L[nm]^2$ |            | $D_{HH}[nm]$ |            |
|-----------|-------------|------------|--------------|------------|
|           | SPC-PME     | SPC/E-PME  | SPC-PME      | SPC/E-PME  |
| 100       | 1,53(0,01)  | 1,50(0,02) | 3,18(0,01)   | 3,20(0,03) |
| 200       | 1,54(0,01)  | 1,51(0,02) | 3,18(0,01)   | 3,20(0,02) |
| 300       | 1,54(0,01)  | 1,52(0,02) | 3,17(0,01)   | 3,17(0,02) |
| 400       | 1,54(0,01)  | 1,52(0,02) | 3,17(0,01)   | 3,18(0,02) |
| 500       | 1,54(0,01)  | 1,52(0,02) | 3,18(0,02)   | 3,18(0,02) |
| 600       | 1,54(0,01)  | 1,53(0,02) | 3,18(0,02)   | 3,17(0,02) |
| 700       | 1,54(0,01)  | 1,53(0,02) | 3,18(0,02)   | 3,17(0,02) |
| 800       | 1,54(0,01)  | 1,53(0,02) | 3,18(0,02)   | 3,17(0,02) |

Fonte: A autora (2020)

A figura 30 nos mostra o comportamento temporal de  $A_L$  e  $D_{HH}$  em frações temporais, como por exemplo 0-100 ns, 100-200 ns, etc. Por se tratar de um sistema dinâmico, é interessante perceber que ao longo dos diferentes intervalos continuam os valores para  $A_L$  e  $D_{HH}$  oscilando ao longo do tempo para SPC-PME (vermelho) e SPC/E-PME (azul).

Figura 30 – Média temporal para as análise de área por lipídeo ( $A_L$ ) e espessura da bicamada ( $D_{HH}$ ) em frações de 100 ns. Representadas para os sistemas LPS/DPPE e contra-íons  $Ca^{2+}$  em presença de SPC-PME (vermelho) e SPC/E-PME (azul).



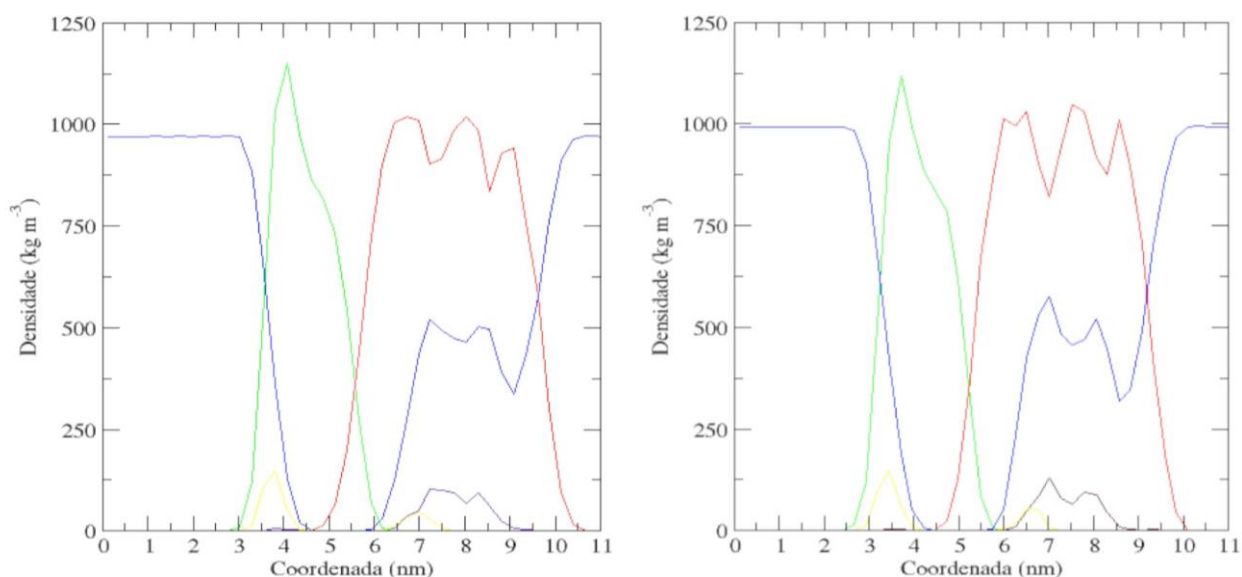
Fonte: A autora (2020)

#### 4.2.2.1 Perfil de densidade



O perfil de densidade nos traz informações sobre a distribuição da densidade ao longo dos 12nm da caixa simulada, descrevendo o perfil de densidade de cada um dos componentes do sistema. O perfil de densidade em 800 ns exposto na figura 31 confirma que não houve desestruturação da bicamada lipídica ao longo do eixo z, demonstrando a manutenção do perfil de densidade dos contra-íons do sistema. O perfil de densidade não varia simulações com os modelos SPC-PME(a esquerda) e SPC/E-PME(a direita). Temos as moléculas de LPS em vermelho, DPPE em verde, grupos fosfato em laranja e íons  $Ca^{2+}$  em roxo. Ao comparar com a figura 18, percebemos que não houveram variações do perfil obtido em 800 ns e 200 ns de simulação, nos levando a acreditar que esse parâmetro já havia convergido anteriormente.

Figura 31 – Perfil de densidade do sistema ( $kg.m^{-3}$ ) ao longo de coordenada ( eixo z, em nm) para os experimentos SPC-PME(esquerda) e SPC/E-PME(direita) em 800 ns. Ao longo do eixo de coordenadas: água (azul), DPPE (verde), LPS (vermelho), fosfatos (amarelo) e íons  $Ca^{2+}$  (roxo).

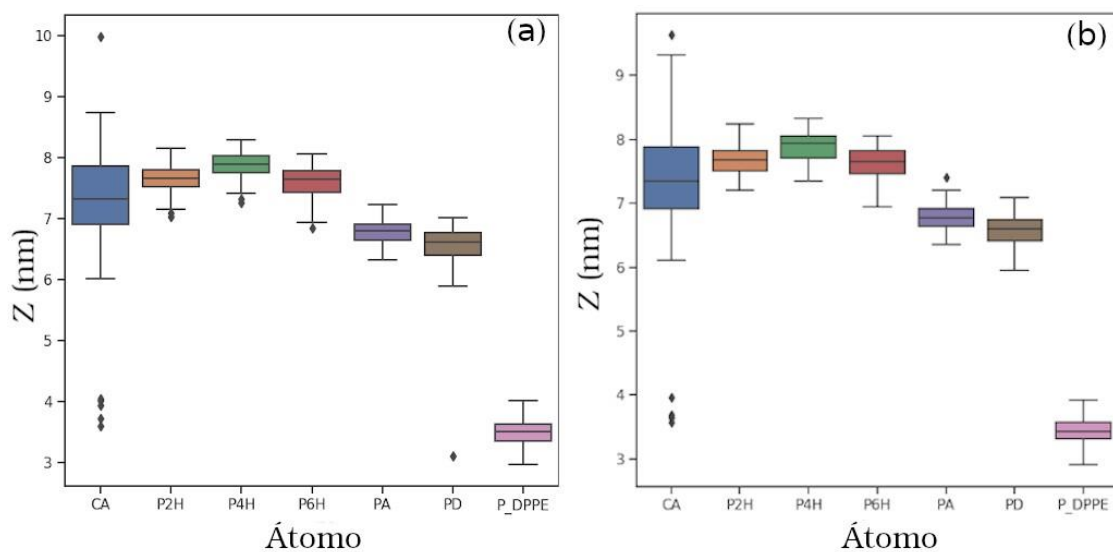


Fonte: A autora (2020)

#### 4.2.2.2 Função de Probabilidade de Densidade

A função de probabilidade ao longo dos 800 ns para SPC e SPC/E com TELD expressos na figura 32 nos mostra que os limites superior e inferior descritos se mantêm aos da figura 19.

Figura 32 – Diagrama de caixa para os modelos (a)SPC-PME e (b)SPC/E-PME a partir dos íons  $Ca^{2+}$  (azul), P2H (amarelo), P4H (verde), P6H (vermelho), PA (lilás), PD (marrom) e P DPPE (rosa).

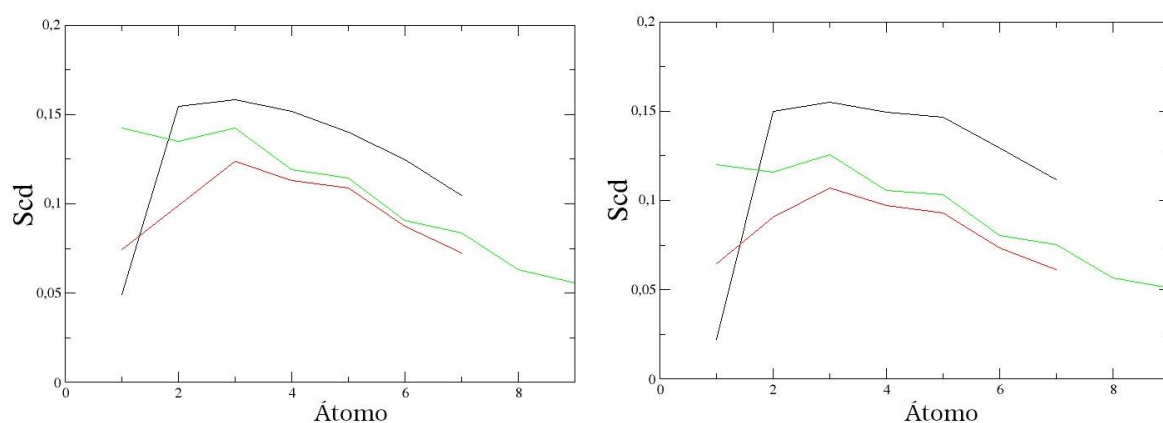


Fonte: A autora (2020)

#### 4.2.3 Propriedade Dinâmica: $S_{CD}$

O parâmetro de deutério mostra comportamento análogo ao observado em 200 ns, como pode ser percebido na figura 33.

Figura 33 – Parâmetro de deutério  $S_{CD}$  para cadeias aciladas de LPS. Média de tempo dos últimos 50 ns de simulação para SPC-PME (a) e SPC/E-PME (b). Cadeias sn1 são representadas em preto, sn2 em vermelho e sn3 em verde.



Fonte: A autora (2020)

Tabela 11 – Parâmetro de ordem de deutério (adimensional) para as cadeias aciladas sn1, sn2 e sn3 ao longo de 800 ns em presença de água SPC e SPC/E

| Modelos   | SCD        |              |            |
|-----------|------------|--------------|------------|
|           | sn1        | sn2          | sn3        |
| SPC-PME   | 0,30(0,01) | 0,175(0,007) | 0,20(0,03) |
| SPC/E-PME | 0,29(0,02) | 0,19(0,01)   | 0,20(0,02) |

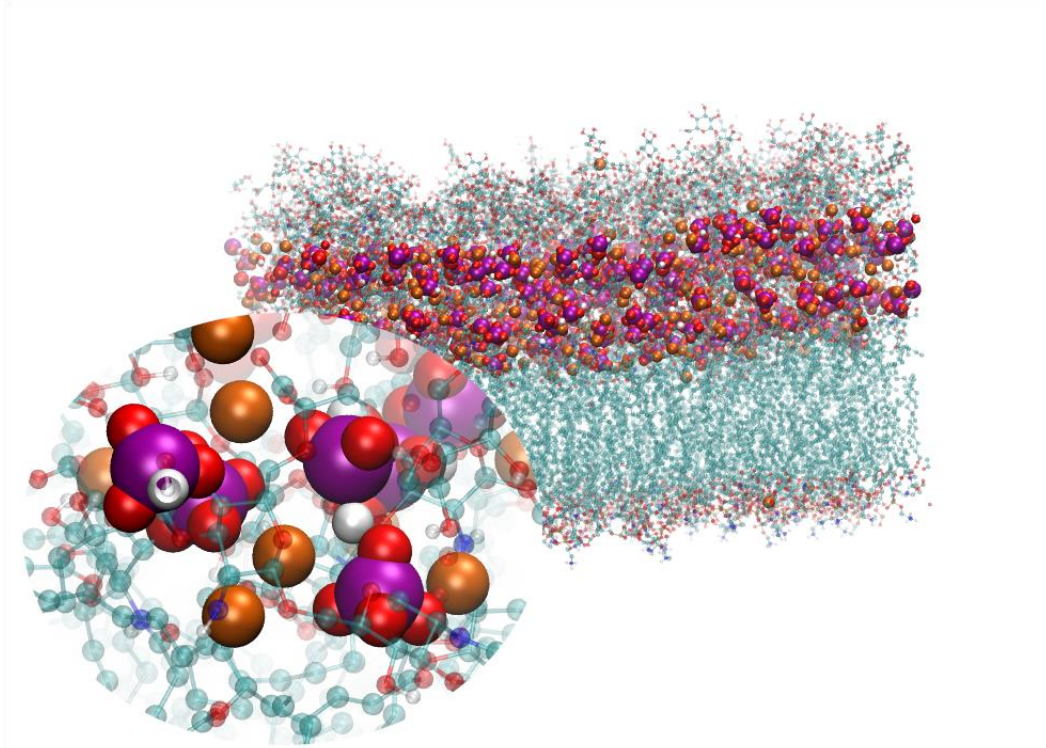
Fonte: A autora (2020)

#### 4.2.4 Dinâmica Estrutural de Solvatação de Membrana de LPS/DPPE

##### 4.2.4.1 Função de distribuição radial

O LPS rough, membrana externa de *P. aeruginosa*, conta ao longo de sua estrutura 5 grupos fosfato por segmento (representados na figura 3), sem diferenciação de carga no grupo, três deles em heptose (P2H, P4H e P6H) e dois deles em lipídio A (PA e PD), os grupamentos fosfato e carboxila que conferem carga a membrana. Sistemas carregados contam com a presença de contra-íons para neutralização do sistema, que no caso em questão são os íons  $Ca^{2+}$ . Cada grupamento fosfato ( $PO_4^{-2}$ ) apresenta carga líquida -2 e, de modo a ligar-se com um dos íons  $Ca^{2+}$ , preferencialmente através dos oxigênios não metilado (em geral OP2 e OP3) com cargas -0,884 e. O íon  $Ca^{2+}$  caracteriza-se como fortemente hidratado e como vimos em seções anteriores apresenta número de coordenação experimental entre 6 e 8, também apresentam alta densidade de carga. Os íons fosfato ( $HPO_4^{-2}$ ) apresentam alta densidade de carga distribuída. Ligações entre íons com mesma densidade de carga tendem a ter contato direto. Segundo Van der Vergt et al, moléculas de água nas proximidades dos ânions fosfato terão uma reorientação diferente da água em seu estado bulk. (97) A figura 34 representa a tendência de ligação entre os íons  $Ca^{2+}$  (em laranja) e os oxigênios não metilados do fosfato (em vermelho).

Figura 34 – Representação da ligação íons  $Ca^{2+}$  e  $(CH_3)HPO_4$



Fonte: A autora (2020)

A tabela 12 nos traz informações sobre o número de coordenação dos pares íon com oxigênio da molécula de água, fosfato dos grupos heptose e lípidio A; bem como água com fosfato dos grupos heptose e lipídio A, com água. O número de coordenação total para os íons  $Ca^{2+}$  em LPS/DPPE a 800 ns com SPC-PME e SPC/E-PME foram respectivamente 7,25 e 7,22. O número de coordenação total da água para SPC-PME e SPC/E-PME foi respectivamente 4,49 e 4,53. Os valores obtidos em 800 ns mostraram-se consistentes aos valores das análises em 200 ns, como pode ser observado na tabela 5.

Tabela 12 – Valores de coordenação dos ligantes calculadas por meio da função de distribuição radial (RDF) de gromos - retirados do ponto médio do primeiro pico de solvatação das ligações de  $Ca^{2+}$ -OW,  $Ca^{2+}$ - $PO_4$ , OW- $PO_4$  e OW-OW - para o LPS-rough hexaacilado com modelos de água SPC-RF, SPC-PME, SPC/E-RF e SPC/E-PME a simulação de 800ns.

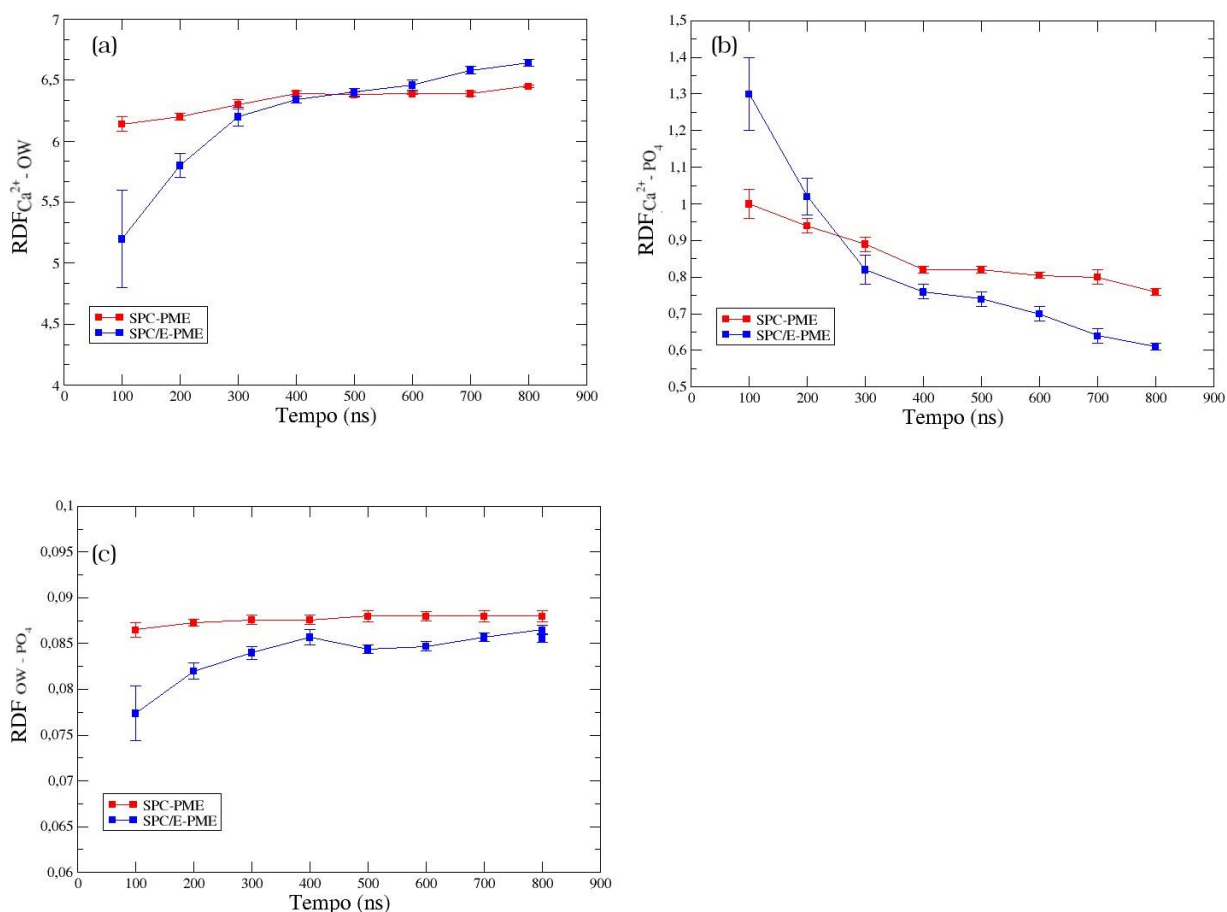
| Modelo    | $Ca^{2+}$ -OW | OW-OW        | OW- $PO_4$   | $Ca^{2+}$ - $PO_4$ |
|-----------|---------------|--------------|--------------|--------------------|
| SPC-PME   | 6,49(0,02)    | 4,412(0,003) | 0,080(0,001) | 0,76(0,01)         |
| SPC/E-PME | 6,58(0,04)    | 4,448(0,001) | 0,079(0,001) | 0,64(0,02)         |

Fonte: A autora (2020)

Ao analisar isoladamente o número de coordenação do íon  $Ca^{2+}$  em relação à água e ao íon  $PO_4$  presente em heptose e lipídio A, perceberemos um aumento da coordenação de  $Ca^{2+}$ -OW e decréscimo na coordenação  $Ca^{2+}$ - $PO_4$  em ambos modelos de água testados, se comparados as análises de RDF em 200 ns.

A fim de estudar a convergência temporal do número de coordenação foram extraídos os valores a partir de variações de 10 ns e agrupadas a cada 100 ns, retirando de cada 10 amostras de 10 ns a sua média e desvio padrão. Realizado de forma sistemática ao longo dos 800 ns. Os valores obtidos foram plotados na figura 35.

Figura 35 – Número de coordenação médio em sistema LPS/DPPE com SPC-PME(vermelho) e SPC/E-PME(azul), referente a ligação: íon (a)  $Ca^{2+}$ -OW, (b) íon  $Ca^{2+}$ - $PO_4$  e (c) OW- $PO_4$ .



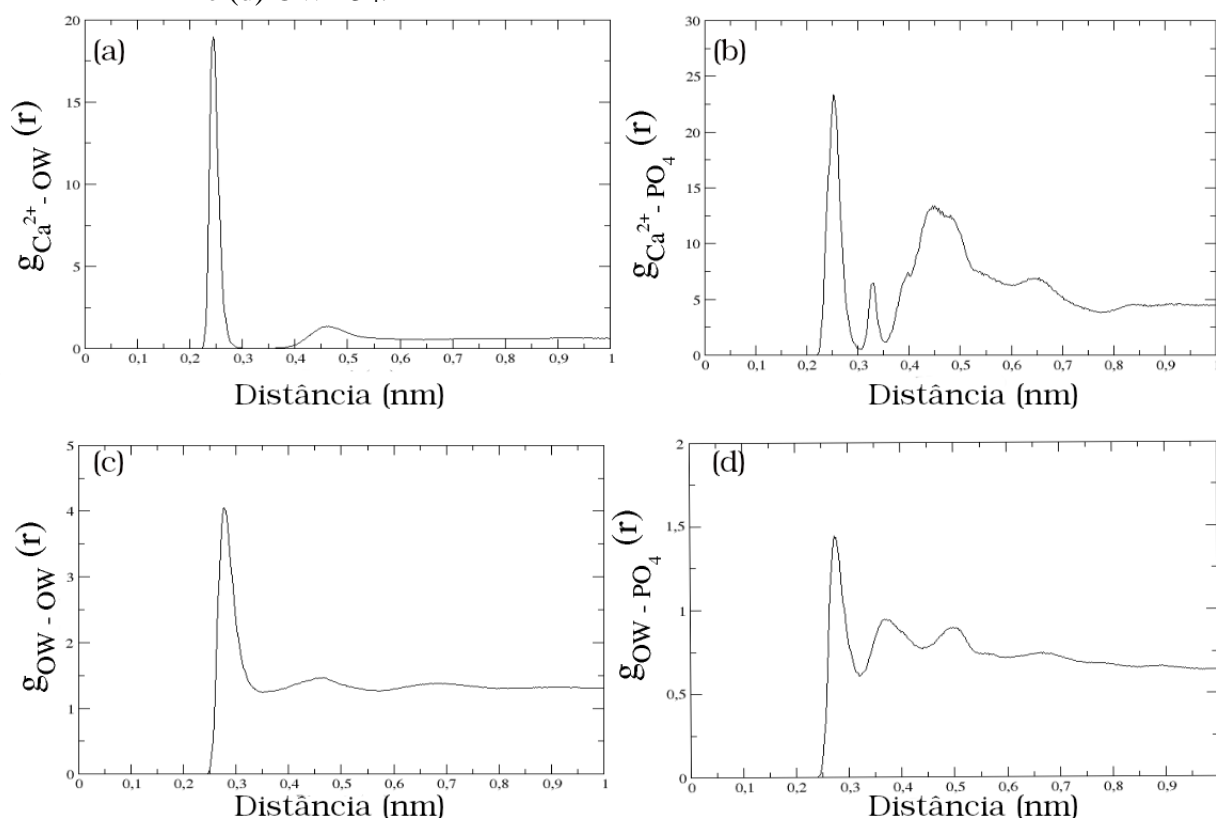
Fonte: A autora (2020)

A partir da figura podemos confirmar as tendências observadas nas tabelas 5 e 12, o aumento da coordenação de  $Ca^{2+}$ -OW e decréscimo de  $Ca^{2+}$ - $PO_4$  ocorrendo consistentemente ao longo da simulação. O sistema com SPC-PME mostrou menor desvio padrão que SPC/E-PME ao longo dos primeiros 300 ns de simulação. A partir de 400 ns começamos a perceber

um comportamento mais linear em ambos os sistemas e menor desvio padrão entre as amostras. Não há razão experimental que explique o aumento do número de coordenação do íon com a água, uma vez presentes os íons fosfato. Em seções posteriores, que tratam do Perfil de hidratação do sistema LPS/DPPE, perceberemos um aumento na proporção de água ao longo do LPS de 9 a 10% dependendo do sistema. A maior disponibilidade de água ao longo de LPS rough e a tendência de crescimento da coordenação de  $Ca^{2+}$ -OW em mesma proporção são indícios. Os valores obtidos podem indicar necessidade de reparametrização do fósforo para o experimento em questão.

A partir da figura 36 observamos os picos referentes a primeira camada de solvatação para a simulação de 800 ns. Os picos referentes ao modelo SPC-PME e SPC/E-PME se sobrepuseram no gráfico. Não foram percebidas alterações quando comparadas o sistema de 200 ns, desta forma também não são diferentes dos valores obtidos na literatura. Os valores de pico são para  $Ca^{2+}$ -OW,  $Ca^{2+}$ - $PO_4$ , OW- $PO_4$  e OW-OW, respectivamente: 0,246; 0,254; 0,276 e 0,279.

Figura 36 – Função de distribuição radial (ao final de 800 ns) em função da distância das ligações ( em nm) para os sistemas (a)  $Ca^{2+}$ -OW, (b)  $Ca^{2+}$ - $PO_4$ , (c) OW-OW e (d) OW $PO_4$ .



Fonte: A autora (2020)

#### 4.2.5 Difusão de íons

A difusividade trata-se do fluxo líquido de moléculas de uma região de maior para uma região de menor concentração, ocorrendo também em meios onde não há um gradiente de concentração como um processo de mistura de substâncias. A difusividade depende do tamanho e da forma do soluto, bem como da temperatura e viscosidade do solvente. A difusividade total do tensor íons  $Ca^{2+}$  chegam a ser 10000 vezes menor que a difusividade total do tensor água na simulação. Estes valores podem ser comparados na subseção difusividade da água, em que a difusividade da água varia entre  $2,00 \times 10^{-5}$  e  $3,25 \times 10^{-5}$ , enquanto a difusividade média ao longo de todo o intervalo de 800 ns em SPC-PME para os íons  $Ca^{2+}$  foram de  $2,2 \times 10^{-8}$ , como mostrados na tabela 14. Muito embora o raio iônico do íon  $Ca^{2+}$  (100pm) seja menor do que o próprio átomo de oxigênio (152pm), sendo, portanto, em teoria mais facilmente transportado, porém devido a presença de regiões carregadas, que permitem uma interação de contato direto, percebemos uma difusão menos pronunciada destes íons. Por meio da tabela 13 foram retiradas difusividades dos íons  $Ca^{2+}$  em intervalos de 100 ns calculados utilizando o tensor com o deslocamento em todos os eixos. Através dos valores obtidos de desvio padrão, percebemos ao longo de todo o tempo analisado em metade das amostras que em alguns intervalos, os modelos SPC-PME e SPC/E-PME apresentam um erro associado da mesma ordem de grandeza, da difusividade média, não sendo possível traçar um perfil de comportamento difusivo conclusivo ao longo do tempo. Mesmo a carga do dipolo para as moléculas de água SPC/E serem mais fortes e portando mais "viscosas", a maior difusividade em SPC só é percebida ao longo dos primeiros 400 ns, não sendo percebida ao longo de toda a simulação. Baseado no manual do Gromacs verificamos que a utilização do sistema de controle "pme-order" em uma interpolação de quarta ordem nos confere uma acurácia de  $5 \times 10^{-3}$ , podendo esta inacurácia estar relacionada a limitações sistemáticas da metodologia.

Tabela 13 – Coeficientes de difusão (difusividade molar) dos íons  $Ca^{2+}$  em  $10^{-7}(cm^2/s)$ , em intervalos de 100 ns por meio do cálculo de tensor total medidos para LPS/DPPE em presença de água SPC e SPC/E respectivamente.

| Tempo(ns) | Coeficiente de difusão(Difusividade molar))[ $10^{-7}(cm^2/s)$ ] |            |
|-----------|--|------------|
|           | Total  |            |
|           | SPC-PME  | SPC/E-PME  |
| 200-300   | 0,20(0,01)   | 0,11(0,12) |
| 300-400   | 0,17(0,14)   | 0,16(0,06) |
| 400-500   | 0,05(0,01)   | 0,30(0,08) |
| 500-600   | 0,06(0,02)   | 0,15(0,03) |
| 600-700   | 0,16(0,09)   | 0,07(0,06) |
| 700-800   | 0,000(0,01)  | 0,08(0,04) |

Fonte: A autora (2020)

Ao analisar a tabela 14 referente aos valores de difusividade cumulativos ao longo do eixo z e por meio do plano xy. Optou-se pela utilização do plano xy, uma vez que não havia expressiva diferença de comportamento dos eixos x e y isoladamente. Nota-se que a difusividade média dos íons é mais significativa ao longo do plano xy, chegando a ser 10 vezes maior se comparada ao eixo z, isso ocorre pela existência de regiões fosfatadas em que é mais expressa a tendência de ligação com íons  $Ca^{2+}$ . A maior tendência a difusão destes íons ocorre ao longo do plano xy, devido a menor variação de energia, quando comparado com a variação de cargas em z. O resultado disso é expresso no tensor total com valores próximos ao da difusão total nesse plano, percebidos ao comparar a tabelas 14 e 13.

Tabela 14 – Coeficientes de difusão (difusividade molar) dos íons  $Ca^{2+}$  em  $10^{-7}(cm^2/s)$  ao longo de todo o intervalo de tempo de forma cumulativa, representado pelo eixo z e plano xy em modelos SPC e SPC/E respectivamente.

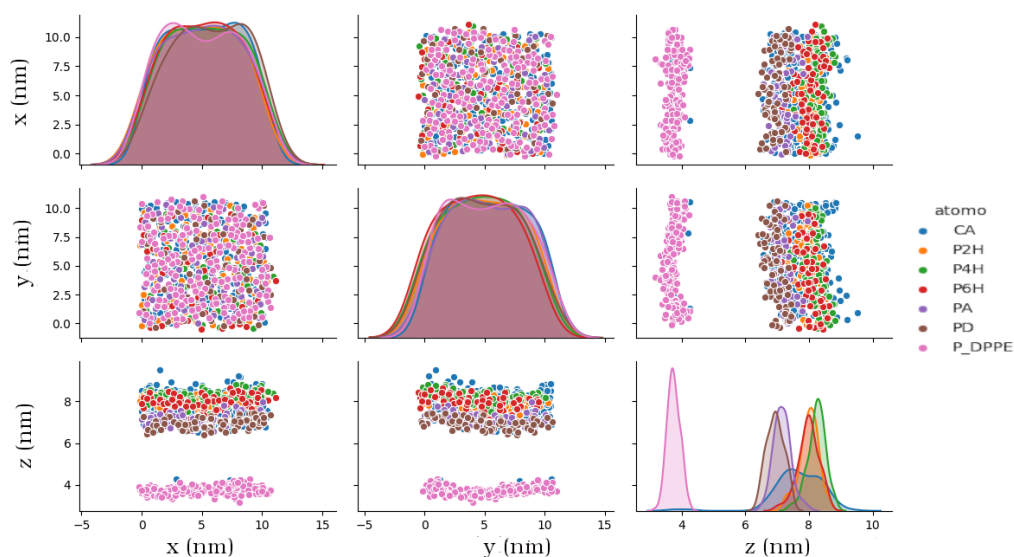
| Tempo(ns) | Coeficiente de difusão(Difusividade molar))[ $10^{-7}cm^2/s$ ] |            |            |            |
|-----------|--|------------|------------|------------|
|           | Eixo z   |            | Plano xy   |            |
|           | SPC-PME  | SPC/E-PME  | SPC-PME    | SPC/E-PME  |
| 200       | 0,010(0,001)   | 0,03(0,03) | 0,17(0,06) | 0,13(0,02) |
| 400       | 0,01(0,01)   | 0,04(0,04) | 0,18(0,04) | 0,33(0,11) |
| 600       | 0,01(0,01)   | 0,04(0,04) | 0,01(0,01) | 0,21(0,06) |

Fonte: A autora (2020)



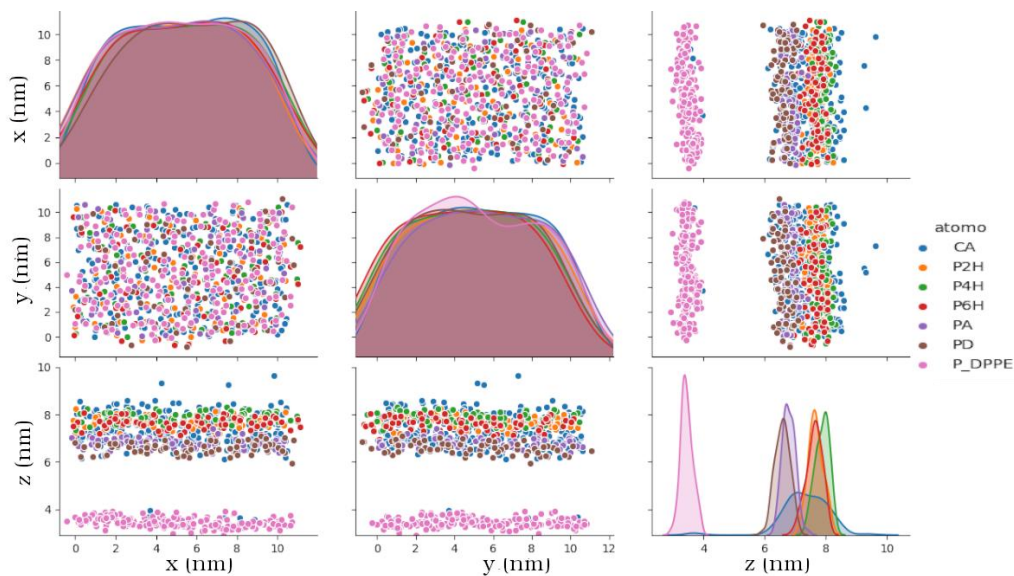
A partir das figuras 37 e 38 de espalhamentos dos íons  $Ca^{2+}$  e átomos de fósforo de forma a representar uma distribuição gaussiana ao longo de seus intervalos de ocorrência, bem como uniformidade de distribuição ao longo do plano xy. Não é possível perceber diferenças na distribuição de íons devido ao modelo de água utilizado como pode ser percebido na figura abaixo.

Figura 37 – Função de espalhamento, para experimento SPC-PME, dos íons ( $Ca^{2+}$ , em azul) e átomos de fósforo de LPS/DPPE (em heptose (galU): P2H(laranja), P4H(verde), P6H(vermelho); em glucose (lipídeo A): PA(roxos), PD(marrom) ;e de DPPE: P DPPE (rosa)), em função dos eixos x, y e z.



Fonte: A autora (2020)

Figura 38 – Função de espalhamento, para experimento SPC/E-PME, dos íons ( $Ca^{2+}$ , em azul) e átomos de fósforo de LPS/DPPE (em heptose (galU): P2H(laranja), P4H(verde), P6H(vermelho); em glucose (lipídeo A): PA(roxos), PD(marrom) ;e de DPPE: P DPPE (rosa)), em função dos eixos x, y e z.



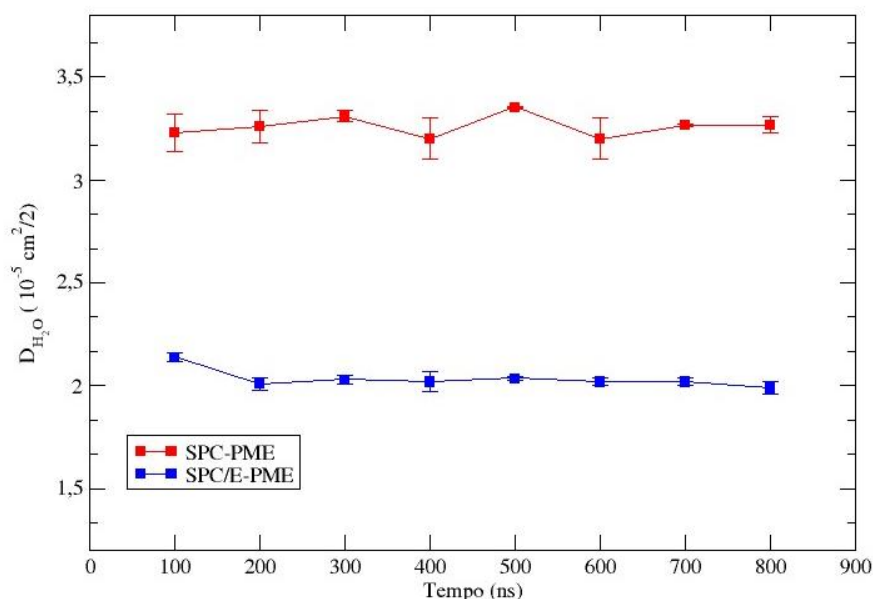
Fonte: A autora (2020)

## 4.2.6 Comportamento da Água em LPS/DPPE

### 4.2.6.1 Difusão da água

A difusividade mede a capacidade de penetração de uma molécula ou substância em um meio. O comportamento difusivo dos modelos água SPC e SPC/E em relação ao sistema LPS/DPPE estão expressos na figura 39, representados para o tempo de 800 ns de simulação.

Figura 39 – Difusão da água em presença de LPS/DPPE (em unidades  $10^{-5} \text{cm}^2/2$ ) por tempo (ns), representada por tensor único da média em x, y e z; calculado por meio de rotina gromacs. Em vermelho, SPC-PME e em azul SPC/E-PME.



Fonte: A autora (2020)

A difusividade média calculada no intervalo é respectivamente para SPC e SPC/E:  $3,3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/2$  e  $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/2$ . O valor obtido apresenta mesma ordem de grandeza, porém há um decréscimo de 30% na difusividade em ambos os modelos em relação ao padrão *bulk* expresso na tabela 1, esse resultado é esperado devido a presença de íons carregados  $\text{Ca}^{2+}$  e LPS/DPPE. A difusividade média da água experimental em estado *bulk* é  $2,63 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/2$ . (98)

#### 4.2.6.2 Perfil de hidratação

Esta seção tem por intuito relacionar de forma comparativa a razão de moléculas de água em relação ao número de átomos das cadeias aciladas presentes no intervalo entre 6 nm e 9,5 nm, região identificada na análise perfil de densidade (figura 31) com maior concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Os cálculos foram feitos de modo a considerar o número total de moléculas de água presentes nesse intervalo em razão ao número de átomos, procurando entender se haveria alguma tendência a hidratação das cadeias mais externas de LPS. Dessa forma, avalia-se a estabilidade de LPS/DPPE pela penetrabilidade da água na região entre 6 e 9,5 nm. A equação é expressa da seguinte forma:

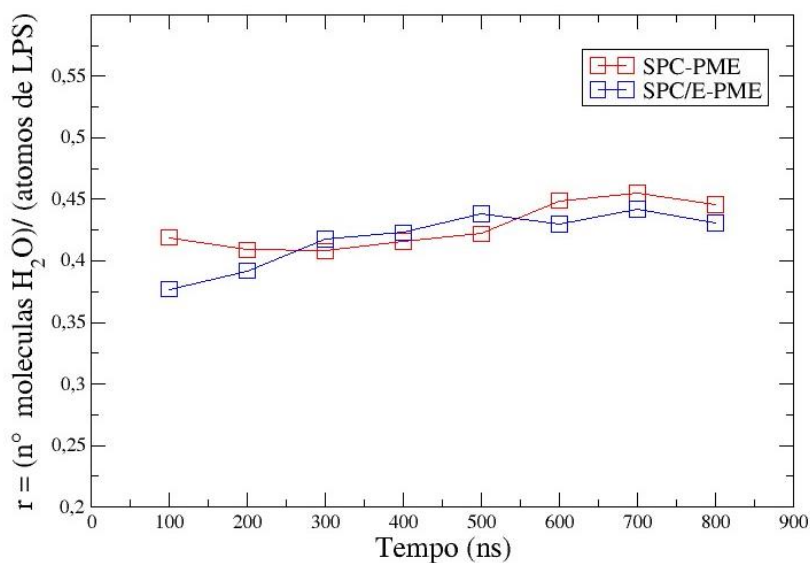
$$r = \frac{n_{H_2O}}{n_{LPS}} \quad (4.1)$$

Em que  $n_{H_2O}$  é o número de moléculas de água presentes no dados intervalo, dividido pelo número de átomos de LPS no intervalo,  $n_{LPS}$ . A escolha da razão entre esses termos ( $n_{H_2O}$  e  $n_{LPS}$ ) permite maior acurácia do grau de hidratação das cadeias externas de LPS, em

função da movimentação natural do sistema em DM. Na figura 40, percebe-se uma proporção equivalente de hidratação dos sistemas com os modelos de água SPC e SPC/E. A proporção média é de 0,4 moléculas de água por átomo de LPS, ou seja, 2 moléculas de água a cada 5 átomos de LPS. São encontradas em média nesse intervalo 15320 átomos que compõem o LPS, com desvio padrão amostral máximo de 92 átomos. O número médio de átomos presente representa cerca de 77 % do átomos dos 20016 átomos de LPS presentes no sistema, enquanto o número médio de moléculas de água presentes no intervalo representa cerca de 21 % (6557/30699, 6439/30507) da água na caixa.

Há discreta tendência ascendente no padrão de hidratação das cadeias aciladas com o crescimento do tempo de simulação. No entanto, mesmo com essa tendência, não foram percebidas diferenças significativas entre os modelos de água estudados com relação a sua penetrabilidade e, conseqüente hidratação.

Figura 40 – Razão de hidratação das cadeias aciladas ao longo de 800 ns. Representados, em vermelho, SPC-PME e ,em azul, SPC/E-PME.



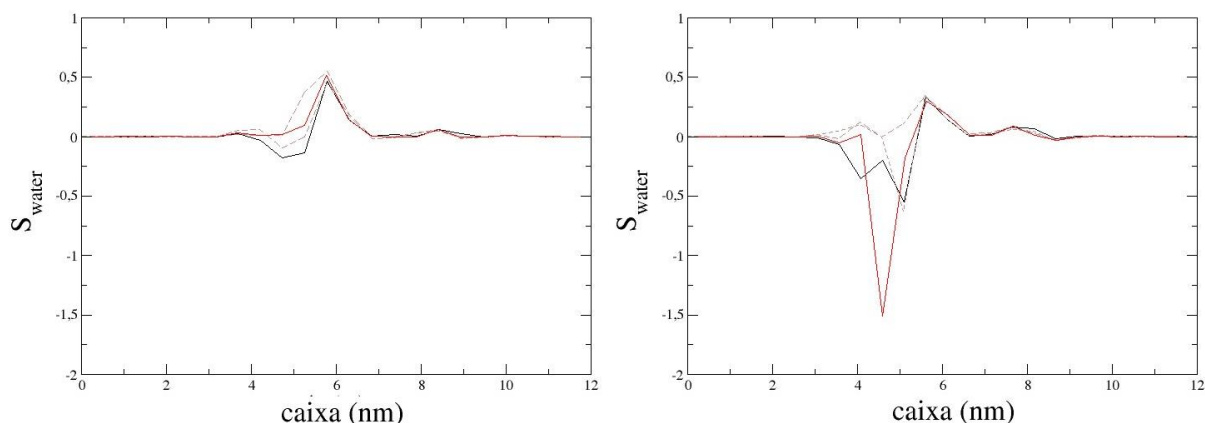
Fonte: A autora (2020)

#### 4.2.6.3 Orientação da água

Assim como na orientação da água em 200 ns, podemos perceber que a água se coordena negativamente próximo ao eixo z em 4 nm na figura 41, tendendo a se coordenar positivamente próximo ao eixo z em 6 nm. Isso ocorre devido a menor quantidade de água, como também devido a maior coordenação da água com os íons  $Ca^{2+}$ . Em ambos sistemas

os últimos 25ns encontram-se mais coordenados que os primeiros dentro do intervalo de 100 ns finais.

Figura 41 – Parâmetro de ordenamento das moléculas de água ( $S_{water}$ ), calculado por rotina gromacs, na superfície externa da membrana. Os sistemas simulados são SPC-PME (esquerda) e SPC/E-PME (direita). No intervalo 700-800 ns de simulação temos em preto, os primeiros 25 ns; em vermelho, os últimos 25 ns (75-100 ns), e pontilhado os intervalos 25-50 ns e 50-75 ns.

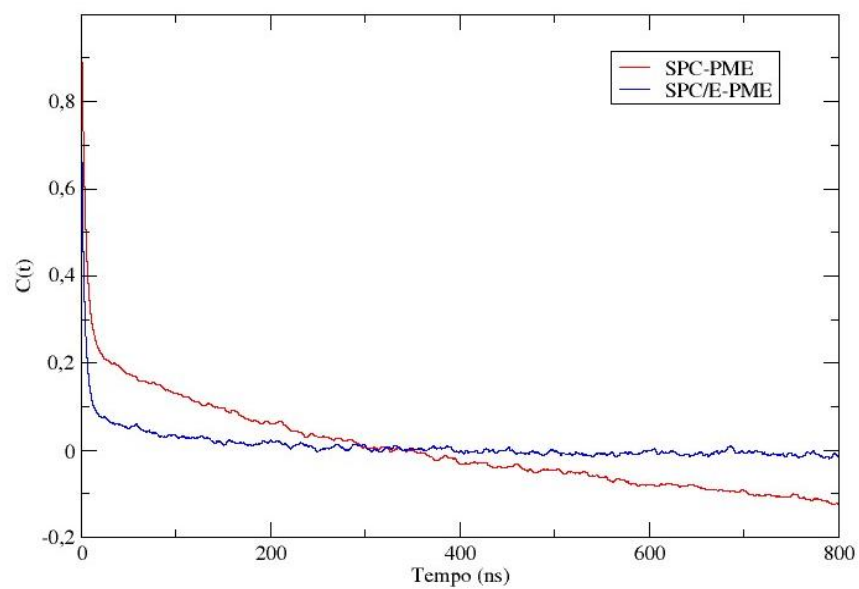


Fonte: A autora (2020)

#### 4.2.7 Convergência de Propriedades Estruturais em 800 ns

A função de autocorrelação relaciona-se ao efeito de memória conformacional inicial. No presente trabalho foram apenas calculadas as funções de autocorrelação para as moléculas de água. As moléculas mostraram perder completamente a correlação com a conformação inicial após 400ns, como descrito na figura 42.

Figura 42 – Função de autocorrelação de água SPC (vermelho) e SPC/E (azul) em relação ao tempo.



Fonte: A autora (2020)

## 5 CONCLUSÕES

Ao analisar os parâmetros referentes a propriedades estruturais em 200 ns foram percebidos que os modelos de água SPC mostraram, independente do tratamento eletrostático de longa distância, uma maior  $A_L$ , todos os sistemas analisados se comportaram de maneira lamelar em relação ao parâmetro de ordem calculado, através do programa SuAVE, todos os valores foram superiores a 0,9 em uma escala de 0 a 1. A distribuição de frequência de ângulos de curvatura ocorreu de forma mais pronunciada em  $20^\circ$  e atingiu a menor frequência nula a partir de  $50^\circ$ . O perfil de densidade mostrou que a estrutura hidrofóbica manteve-se integra, sem a presença de água em todos as simulações analisadas; foi percebida a maior densidade de íons  $Ca^{2+}$  na mesma região dos grupamentos fosfatados de LPS rough no eixo z, confirmados através da função de probabilidade de densidade. Em relação às propriedades dinâmicas (parâmetro de ordem de deutério) das cadeias aciladas sn1, sn2 e sn3 na região hidrofóbica da bicamada, a maior coordenação foi do sistema SPC-PME (0,24) e o menor de SPC / E-PME (0,22), mostrando grande proximidade ao valor 0,25 (0,05) estimado na literatura. Na seção estrutura de solvatação da membrana LPS / DPPE é observado número de coordenação dos íons globais  $Ca^{2+}$  variando entre 7,02 a 7,25 na presença de LPS / DPPE, condizente com valores obtidos a partir de difração de raio-x e simulações ab-initio. Os picos de coordenação da primeira camada de solvatação entre os sistemas  $Ca^{2+}$  - OW,  $Ca^{2+}$ - $PO_4$  estudados nesse trabalho são idênticos ao obtido na literatura. Não foram percebidas diferenças nesses parâmetros entre os sistemas simulados. A água orientou-se de forma mais pronunciada nos sistemas entre 4 e 6 nm permanecendo mais orientadas ao final das simulações. Todos os sistemas simulados mostram uma rápida perda inicial na função de autocorrelação inicial, sendo mais expressa em SPC-RF, tendo uma tendência assintótica próxima ao zero, porém não convergentes ao longo dos 200 ns simulados. A energia potencial e energia total mostraram-se convergentes para todos os sistemas simulados em 200 ns. Não foram percebidos ao longo de 200 ns de simulação diferenças significativas entre os modelos de água SPC e SPC/E, bem como ao TELD RF e PME. A fim de checar a convergência dos parâmetros analisados, os sistemas com TELD PME foram estendidos até 800 ns. Os parâmetros  $A_L$  e  $D_{HH}$  mostraram convergir nos primeiros 300 ns, tendo variações apenas dentro do intervalo do erro associado. Após 800 ns de simulação não foram percebidas alterações no padrão do perfil de densidade, bem como função de probabilidade de densidade, indicando convergência nos primeiros 200 ns. O parâmetro de deutério convergiu para um valor de 0,22 em SPC-PME e SPC/E-PME, mostrando que apenas

SPC/E-PME já havia convergido. Na seção de estrutura de solvatação o valor final para o número de coordenação referente a primeira camada de solvatação de  $Ca^{2+}$  foi 7,25 para SPC-PME e 7,22 para SPC/E-PME, permanecendo constante para SPC-PME e aumentando a coordenação para SPC/E-PME. Houve uma tendência de maior de aumento da coordenação de  $Ca^{2+}$ -OW ao longo da simulação e consequente redução da coordenação de  $Ca^{2+}$ - $PO_4$ . A difusividade de  $Ca^{2+}$  permanece maior no meio SPC devido a menor viscosidade deste modelo. A partir da função de autocorrelação da água percebemos que os modelos SPC e SPC/E demonstram perder correlação após 400 ns de simulação e também nesse intervalo a taxa de hidratação por molécula de LPS passa a ser constante. A maior taxa de difusão de SPC e o maior momento de dipolo de SPC/E não foram capazes de gerar alterações na análises realizadas neste estudo. Baseado nos estudos realizados recomenda-se a utilização, em sistemas de bicamada, de modelo de água SPC/E com TELD PME.

## 5.1 Perspectivas

A partir de simulações mais longas do sistema LPS/DPPE na presença de íons  $Ca^{2+}$  foram percebidas gradualmente um decréscimo das interações a nível de primeira camada de solvatação entre o grupamento  $Ca^{2+}$  e os íons  $PO_4^-$ . Esse decréscimo se mostrou pequeno, porém consistente ao longo das análises temporais realizadas. Este comportamento não condiz com a tendência esperada para íons de  $Ca^{2+}$  ou íons de similar carga e raio iônico na presença do grupamento fosfato, com número de coordenação médio igual a 1. Tem-se como perspectiva a necessidade de reparametrização dos íons fosfato a fim de que o sistema mantenha-se representativo ao experimental em simulações de mesmo tamanho deste trabalho (800 ns) ou mais longas.



## REFERÊNCIAS

- 1 ALVES, R. *A alegria de ensinar*. [S.l.]: Papirus Editora, 2012. Citado na página 7.
- 2 BLEVES, S. et al. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: a wealth of pathogenic weapons. *International Journal of Medical Microbiology*, Elsevier, v. 300, n. 8, p. 534–543, 2010. Citado na página 21.
- 3 DAFPE, M.; ETIENNE, G. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tubercle and lung disease*, Elsevier, v. 79, n. 3, p. 153–169, 1999. Citado na página 21.
- 4 HANCOCK, R. E. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, The University of Chicago Press, v. 27, n. Supplement\_1, p. S93–S99, 1998. Citado na página 22.
- 5 NIKAIDO, H.; NIKAIDO, K.; HARAYAMA, S. Identification and characterization of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, Elsevier, v. 266, n. 2, p. 770–779, 1991. Citado na página 22.
- 6 ALEXANDER, C.; RIETSCHER, E. T. Invited review: bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *Journal of endotoxin research*, Sage Publications Sage UK: London, England, v. 7, n. 3, p. 167–202, 2001. Citado 2 vezes nas páginas 22 e 23.
- 7 ASAI, Y. et al. The effect of divalent cations on the membrane properties and pharmacokinetics in rat of the lipid A analogue E5531. *Journal of pharmacy and pharmacology*, Wiley Online Library, v. 52, n. 1, p. 39–45, 2000. Citado na página 22.
- 8 HAMPTON, R.; RAETZ, C. Macrophage catabolism of lipid A is regulated by endotoxin stimulation. *Journal of Biological Chemistry*, Elsevier, v. 266, n. 29, p. 19499–19509, 1991. Citado na página 22.
- 9 STRAATSMA, T.; SOARES, T. A. Characterization of the outer membrane protein OprF of *Pseudomonas aeruginosa* in a lipopolysaccharide membrane by computer simulation. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Wiley Online Library, v. 74, n. 2, p. 475–488, 2009. Citado na página 22.
- 10 TAKAYAMA, K. et al. Physicochemical properties of the lipopolysaccharide unit that activates B lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, Elsevier, v. 265, n. 23, p. 14023–14029, 1990. Citado na página 22.
- 11 WILKINSON, S. G. Bacterial lipopolysaccharides—themes and variations. *Progress in lipid research*, Elsevier, v. 35, n. 3, p. 283–343, 1996. Citado na página 23.
- 12 GARIDEL, P. et al. Divalent cations affect chain mobility and aggregate structure of lipopolysaccharide from *Salmonella minnesota* reflected in a decrease of its biological activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, Elsevier, v. 1715, n. 2, p. 122–131, 2005. Citado na página 24.

- 13 PAQUET, E.; VIKTOR, H. L. Molecular dynamics, monte carlo simulations, and langevin dynamics: a computational review. *BioMed research international*, Hindawi, v. 2015, 2015. Citado na página 25.
- 14 ALLEN, M. P. et al. Introduction to molecular dynamics simulation. *Computational soft matter: from synthetic polymers to proteins*, NIC Series, v. 23, n. 1, p. 1–28, 2004. Citado 2 vezes nas páginas 25 e 34.
- 15 PETRENKO, R.; MELLER, J. Molecular dynamics. 2009. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons. Citado na página 25.
- 16 SNYDER, S.; KIM, D.; MCINTOSH, T. J. Lipopolysaccharide bilayer structure: effect of chemotype, core mutations, divalent cations, and temperature. *Biochemistry*, ACS Publications, v. 38, n. 33, p. 10758–10767, 1999. Citado na página 25.
- 17 HAYTER, J.; RIVERA, M.; MCGROARTY, E. Neutron scattering analysis of bacterial lipopolysaccharide phase structure. Changes at high pH. *Journal of Biological Chemistry*, ASBMB, v. 262, n. 11, p. 5100–5105, 1987. Citado na página 25.
- 18 ALLEN, M. et al. *Computer Simulation of Liquids*. Clarendon Press, 1989. (Oxford Science Publ). ISBN 9780198556459. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=O32VXB9e5P4C>>. Citado 3 vezes nas páginas 27, 42 e 52.
- 19 ADCOCK, S. A.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chemical reviews*, ACS Publications, v. 106, n. 5, p. 1589–1615, 2006. Citado 3 vezes nas páginas 27, 28 e 31.
- 20 HANSEN, J. P.; MCDONALD, I. *Theory of Simple Liquids*. London: Academic, 1990. Citado 2 vezes nas páginas 28 e 53.
- 21 GONZÁLEZ, M. Force fields and molecular dynamics simulations. *École thématique de la Société Française de la Neutronique*, EDP Sciences, v. 12, p. 169–200, 2011. Citado na página 29.
- 22 BROOKS, B. R. et al. CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of computational chemistry*, Wiley Online Library, v. 4, n. 2, p. 187–217, 1983. Citado 3 vezes nas páginas 29, 30 e 32.
- 23 LEACH, A. R.; LEACH, A. R. *Molecular modelling: principles and applications*. [S.l.]: Pearson education, 2001. Citado 6 vezes nas páginas 29, 30, 35, 42, 43 e 45.
- 24 OOSTENBRINK, C. et al. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *Journal of computational chemistry*, Wiley Online Library, v. 25, n. 13, p. 1656–1676, 2004. Citado na página 30.
- 25 BEKKER, H. "Molecular dynamics simulation methods revised". Tese (Doutorado), 1996. Date<sub>submitted</sub> : 1996 Rights : University of Groningen. Citado na página 30.
- 26 LYUBARTSEV, A. P.; RABINOVICH, A. L. Force field development for lipid membrane simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, Elsevier, v. 1858, n. 10, p. 2483–2497, 2016. Citado na página 32.

- 27 WEINER, S. J. et al. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *Journal of the American Chemical Society*, ACS Publications, v. 106, n. 3, p. 765–784, 1984. Citado na página 32.
- 28 JORGENSEN, W. L.; TIRADO-RIVES, J. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *Journal of the American Chemical Society*, ACS Publications, v. 110, n. 6, p. 1657–1666, 1988. Citado na página 32.
- 29 GUNSTEREN, W. F. van; BERENDSEN, H. J. Groningen molecular simulation (GROMOS) library manual. *Biomos, Groningen*, v. 24, n. 682704, p. 13, 1987. Citado 4 vezes nas páginas 32, 38, 43 e 44.
- 30 GUIMARAES, C. R. W. et al. On the application of simple explicit water models to the simulations of biomolecules. *Brazilian journal of physics*, SciELO Brasil, v. 34, n. 1, p. 126–136, 2004. Citado na página 32.
- 31 BERENDSEN, H. J. et al. Interaction models for water in relation to protein hydration. In: *Intermolecular forces*. [S.l.]: Springer, 1981. p. 331–342. Citado 2 vezes nas páginas 32 e 48.
- 32 ZIELKIEWICZ, J. Structural properties of water: Comparison of the SPC, SPCE, TIP4P, and TIP5P models of water. *The Journal of chemical physics*, American Institute of Physics, v. 123, n. 10, p. 104501, 2005. Citado na página 33.
- 33 MARK, P.; NILSSON, L. Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E water models at 298 K. *The Journal of Physical Chemistry A*, ACS Publications, v. 105, n. 43, p. 9954–9960, 2001. Citado na página 33.
- 34 BERENDSEN, H.; GRIGERA, J.; STRAATSMA, T. The missing term in effective pair potentials. *Journal of Physical Chemistry*, ACS Publications, v. 91, n. 24, p. 6269–6271, 1987. Citado 4 vezes nas páginas 33, 34, 35 e 48.
- 35 GUBSKAYA, A. V.; KUSALIK, P. G. The total molecular dipole moment for liquid water. *The Journal of chemical physics*, American Institute of Physics, v. 117, n. 11, p. 5290–5302, 2002. Citado na página 33.
- 36 BADYAL, Y. et al. Electron distribution in water. *The Journal of Chemical Physics*, American Institute of Physics, v. 112, n. 21, p. 9206–9208, 2000. Citado na página 33.
- 37 STILLINGER, F. H. Water revisited. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 209, n. 4455, p. 451–457, 1980. Citado na página 34.
- 38 REISSER, S. et al. Real cost of speed: the effect of a time-saving multiple-time-stepping algorithm on the accuracy of molecular dynamics simulations. *Journal of chemical theory and computation*, ACS Publications, v. 13, n. 6, p. 2367–2372, 2017. Citado na página 34.
- 39 ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. *Computer simulation of liquids*. [S.l.]: Oxford university press, 2017. Citado na página 34.
- 40 IZADI, S.; ONUFRIEV, A. V. Accuracy limit of rigid 3-point water models. *The Journal of chemical physics*, AIP Publishing, v. 145, n. 7, p. 074501, 2016. Citado na página 34.

- 41 SMITH, P. E.; GUNSTEREN, W. F. van. The viscosity of SPC and SPC/E water at 277 and 300 K. *Chemical physics letters*, Elsevier, v. 215, n. 4, p. 315–318, 1993. Citado na página 34.
- 42 SPOEL, D. van der; MAAREN, P. J. van; BERENDSEN, H. J. A systematic study of water models for molecular simulation: derivation of water models optimized for use with a reaction field. *The Journal of chemical physics*, AIP, v. 108, n. 24, p. 10220–10230, 1998. Citado na página 34.
- 43 VERLET, L. Computer" experiments" on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Physical review*, APS, v. 159, n. 1, p. 98, 1967. Citado na página 35.
- 44 LEIMKUHLER, B. J.; REICH, S.; SKEEL, R. D. Integration methods for molecular dynamics. In: *Mathematical Approaches to biomolecular structure and dynamics*, pages=161–185, year=1996, publisher=Springer. [S.l.: s.n.]. Citado na página 35.
- 45 GUNSTEREN, W. F. V.; BERENDSEN, H. J. A leap-frog algorithm for stochastic dynamics. *Molecular Simulation*, Taylor & Francis, v. 1, n. 3, p. 173–185, 1988. Citado na página 35.
- 46 JIANG, F. Y.; BOURET, Y.; KINDT, J. T. Molecular dynamics simulations of the lipid bilayer edge. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 87, n. 1, p. 182–192, 2004. Citado na página 36.
- 47 WEST, A. et al. Simulation studies of structure and edge tension of lipid bilayer edges: effects of tail structure and force-field. *The Journal of Physical Chemistry A*, ACS Publications, v. 117, n. 32, p. 7114–7123, 2013. Citado na página 36.
- 48 SPOEL, D. et al. *Gromacs User Manual version 4.6. 7*, 2014. Citado 4 vezes nas páginas 36, 45, 52 e 55.
- 49 CHATFIELD, D. Christopher J. Cramer: Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models. *Theoretical Chemistry Accounts: Theory, Computation, and Modeling (Theoretica Chimica Acta)*, Springer, v. 108, n. 6, p. 367–368, 2002. Citado na página 36.
- 50 CRAMER, C. J. *Essentials of computational chemistry: theories and models*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2013. Citado na página 36.
- 51 ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. *Computer Simulation of Liquids*. USA: Clarendon Press, 1989. ISBN 0198556454. Citado na página 37.
- 52 YAO, Z. et al. Improved neighbor list algorithm in molecular simulations using cell decomposition and data sorting method. *Computer physics communications*, Elsevier, v. 161, n. 1-2, p. 27–35, 2004. Citado na página 38.
- 53 LARSSON, P.; HESS, B.; LINDAHL, E. Algorithm improvements for molecular dynamics simulations. *Wiley interdisciplinary reviews: computational molecular science*, Wiley Online Library, v. 1, n. 1, p. 93–108, 2011. Citado na página 38.
- 54 LEIMKUHLER, B.; MATTHEWS, C. *Molecular Dynamics*. [S.l.]: Springer, 2016. Citado na página 39.
- 55 RAPAPORT, D. C.; RAPAPORT, D. C. R. *The art of molecular dynamics simulation*. [S.l.]: Cambridge university press, 2004. Citado na página 39.

- 56 SILVA, T. F. et al. The impact of using single atomistic long-range cutoff schemes with the GROMOS 54A7 force field. *Journal of chemical theory and computation*, ACS Publications, v. 14, n. 11, p. 5823–5833, 2018. Citado na página 40.
- 57 HUANG, C. et al. Effect of cut-off distance used in molecular dynamics simulations on fluid properties. *Molecular Simulation*, Taylor & Francis, v. 36, n. 11, p. 856–864, 2010. Citado na página 40.
- 58 DESERNO, M.; HOLM, C. How to mesh up Ewald sums. I. A theoretical and numerical comparison of various particle mesh routines. *The Journal of chemical physics*, American Institute of Physics, v. 109, n. 18, p. 7678–7693, 1998. Citado 2 vezes nas páginas 41 e 42.
- 59 TOUKMAJI, A. Y.; JR, J. A. B. Ewald summation techniques in perspective: a survey. *Computer physics communications*, Elsevier, v. 95, n. 2-3, p. 73–92, 1996. Citado na página 42.
- 60 WANG, H.; DOMMERT, F.; HOLM, C. Optimizing working parameters of the smooth particle mesh Ewald algorithm in terms of accuracy and efficiency. *The Journal of chemical physics*, American Institute of Physics, v. 133, n. 3, p. 034117, 2010. Citado na página 43.
- 61 DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An N log (N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of chemical physics*, American Institute of Physics, v. 98, n. 12, p. 10089–10092, 1993. Citado 2 vezes nas páginas 43 e 49.
- 62 FUKUDA, I.; NAKAMURA, H. Non-Ewald methods: theory and applications to molecular systems. *Biophysical reviews*, Springer, v. 4, n. 3, p. 161–170, 2012. Citado na página 44.
- 63 SCHULZ, R. et al. Scaling of multimillion-atom biological molecular dynamics simulation on a petascale supercomputer. *Journal of Chemical Theory and Computation*, ACS Publications, v. 5, n. 10, p. 2798–2808, 2009. Citado na página 44.
- 64 PONTES, F. J. et al. The effect of temperature, cations, and number of acyl chains on the lamellar to non-lamellar transition in lipid-A membranes: a microscopic view. *Journal of chemical theory and computation*, ACS Publications, v. 8, n. 10, p. 3830–3838, 2012. Citado na página 47.
- 65 BAYLY, C. I. et al. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *The Journal of Physical Chemistry*, ACS Publications, v. 97, n. 40, p. 10269–10280, 1993. Citado na página 47.
- 66 SCHMID, N. et al. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *European biophysics journal*, Springer, v. 40, n. 7, p. 843–856, 2011. Citado na página 47.
- 67 LINS, R. D.; HÜNENBERGER, P. H. A new GROMOS force field for hexopyranose-based carbohydrates. *Journal of computational chemistry*, Wiley Online Library, v. 26, n. 13, p. 1400–1412, 2005. Citado na página 47.
- 68 SOARES, T. A. et al. An improved nucleic acid parameter set for the GROMOS force field. *Journal of computational chemistry*, Wiley Online Library, v. 26, n. 7, p. 725–737, 2005. Citado na página 47.

- 69 LIMA, M. P. et al. Compatibility of GROMOS-Derived Atomic Parameters for Lipopolysaccharide Membranes with the SPC/E Water Model and Alternative Long-Range Electrostatic Treatments Using Single Nonbonded Cutoff and Atom-Based Charge Schemes. Citado na página 48.
- 70 TIRONI, I. G. et al. A generalized reaction field method for molecular dynamics simulations. *The Journal of chemical physics*, American Institute of Physics, v. 102, n. 13, p. 5451–5459, 1995. Citado na página 49.
- 71 GLÄTTLI, A.; DAURA, X.; GUNSTEREN, W. F. van. Derivation of an improved simple point charge model for liquid water: SPC/A and SPC/L. *The Journal of chemical physics*, American Institute of Physics, v. 116, n. 22, p. 9811–9828, 2002. Citado na página 49.
- 72 HESS, B. et al. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of computational chemistry*, Wiley Online Library, v. 18, n. 12, p. 1463–1472, 1997. Citado na página 49.
- 73 MIYAMOTO, S.; KOLLMAN, P. A. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *Journal of computational chemistry*, Wiley Online Library, v. 13, n. 8, p. 952–962, 1992. Citado na página 49.
- 74 ABRAHAM, M. J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, Elsevier, v. 1, p. 19–25, 2015. Citado 2 vezes nas páginas 50 e 52.
- 75 SANTOS, D. E. et al. SuAVE: A Tool for Analyzing Curvature-Dependent Properties in Chemical Interfaces. *Journal of Chemical Information and Modeling*, ACS Publications, v. 60, n. 2, p. 473–484, 2019. Citado 2 vezes nas páginas 50 e 52.
- 76 HUMPHREY, W. et al. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*, Guildford: Butterworth Scientific Limited, c1983-c1996., v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996. Citado na página 50.
- 77 DUCHESNAY, E.; LÖFSTEDT, T. Statistics and Machine Learning in Python. *Release 0.1*, 2018. Citado na página 50.
- 78 NAGLE, J. F.; TRISTRAM-NAGLE, S. Structure of lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, Elsevier, v. 1469, n. 3, p. 159–195, 2000. Citado na página 51.
- 79 DICKEY, A. N.; FALLER, R. Molecular modeling of biomembranes: a how-to approach. In: *Biomedical Applications of Biophysics*, pages=35–58, year=2010, publisher=Springer. [S.l.: s.n.]. Citado 2 vezes nas páginas 52 e 55.
- 80 SCHWENK, C. F.; LOEFFLER, H. H.; RODE, B. M. Molecular dynamics simulations of Ca 2+ in water: Comparison of a classical simulation including three-body corrections and Born–Oppenheimer ab initio and density functional theory quantum mechanical/molecular mechanics simulations. *The Journal of Chemical Physics*, American Institute of Physics, v. 115, n. 23, p. 10808–10813, 2001. Citado 3 vezes nas páginas 54, 70 e 71.

- 81 FAWCETT, R. W. A radial distribution function analysis of an amorphous calcium phosphate with calcium to phosphorus molar ratio of 1.42. *Calcified tissue research*, Springer, v. 13, n. 1, p. 319–325, 1973. Citado 2 vezes nas páginas 54 e 71.
- 82 HEAD-GORDON, T.; HURA, G. Water structure from scattering experiments and simulation. *Chemical reviews*, ACS Publications, v. 102, n. 8, p. 2651–2670, 2002. Citado 2 vezes nas páginas 54 e 71.
- 83 SOPER, A. The radial distribution functions of water and ice from 220 to 673 K and at pressures up to 400 MPa. *Chemical Physics*, Elsevier, v. 258, n. 2-3, p. 121–137, 2000. Citado 2 vezes nas páginas 54 e 71.
- 84 TIELEMAN, D. P.; MARRINK, S.-J.; BERENDSEN, H. J. A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, Citeseer, v. 1331, n. 3, p. 235–270, 1997. Citado na página 55.
- 85 DAVIS, J. H. The description of membrane lipid conformation, order and dynamics by 2H-NMR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, Elsevier, v. 737, n. 1, p. 117–171, 1983. Citado na página 55.
- 86 MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. *Applied statistics and probability for engineers*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2010. Citado 2 vezes nas páginas 55 e 56.
- 87 SNYDER, J. A.; MCINTOSH, J. R. Biochemistry and physiology of microtubules. *Annual review of biochemistry*, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, v. 45, n. 1, p. 699–720, 1976. Citado na página 61.
- 88 BRANDENBURG, K. et al. Physicochemical properties of bacterial glycopolymers in relation to bioactivity. *Carbohydrate research*, Elsevier, v. 338, n. 23, p. 2477–2489, 2003. Citado 2 vezes nas páginas 61 e 69.
- 89 BRUN, A. P. L. et al. Structural characterization of a model gram-negative bacterial surface using lipopolysaccharides from rough strains of Escherichia coli. *Biomacromolecules*, ACS Publications, v. 14, n. 6, p. 2014–2022, 2013. Citado na página 61.
- 90 DIAS, R. P. et al. Outer membrane remodeling: the structural dynamics and electrostatics of rough lipopolysaccharide chemotypes. *Journal of chemical theory and computation*, ACS Publications, v. 10, n. 6, p. 2488–2497, 2014. Citado na página 61.
- 91 PAN, J. et al. The molecular structure of a phosphatidylserine bilayer determined by scattering and molecular dynamics simulations. *Soft matter*, Royal Society of Chemistry, v. 10, n. 21, p. 3716–3725, 2014. Citado na página 63.
- 92 BRANDENBURG, K. Fourier transform infrared spectroscopy characterization of the lamellar and nonlamellar structures of free lipid A and Re lipopolysaccharides from Salmonella minnesota and Escherichia coli. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 64, n. 4, p. 1215–1231, 1993. Citado na página 69.
- 93 BRANDENBURG, K.; SEYDEL, U. Orientation measurements on membrane systems made from lipopolysaccharides and free lipid A by FT-IR spectroscopy. *European Biophysics Journal*, Springer, v. 16, n. 2, p. 83–94, 1988. Citado na página 69.

- 94 PROBST, M. et al. Molecular dynamics and x-ray investigation of an aqueous calcium chloride solution. *The Journal of Physical Chemistry*, ACS Publications, v. 89, n. 5, p. 753–759, 1985. Citado na página 70.
- 95 KATZ, A. K. et al. Calcium ion coordination: a comparison with that of beryllium, magnesium, and zinc. *Journal of the American Chemical Society*, ACS Publications, v. 118, n. 24, p. 5752–5763, 1996. Citado na página 70.
- 96 BLEUZEN, A. et al. Water exchange on magnesium (II) in aqueous solution: a variable temperature and pressure  $^{17}\text{O}$  NMR study. *Magnetic resonance in chemistry*, Wiley Online Library, v. 35, n. 11, p. 765–773, 1997. Citado na página 71.
- 97 VEGT, N. F. V. D. et al. Water-mediated ion pairing: Occurrence and relevance. *Chemical reviews*, ACS Publications, v. 116, n. 13, p. 7626–7641, 2016. Citado na página 85.
- 98 WANG, Q. et al. Size effect in determining the water diffusion rate in carbon nanotubes. *Journal of Molecular Liquids*, Elsevier, v. 334, p. 116034, 2021. Citado na página 92.



APÊNDICE A – PARÂMETROS TOPOLÓGICOS USADOS

| Monosaccharide                     | Atom type        | Atom charge | Monosaccharide                         | Atom type         | Atom charge |
|------------------------------------|------------------|-------------|--|-------------------|-------------|
| 3-(Acetyl amino)-3-deoxy-D-glucose | CH1 or CH2       | 0.232       | Heptose                                | CH1               | 0.232       |
|                                    | C                | 0.108       |  | CH1 aliphatic     | 0.376       |
|                                    | CH1              | 0.336       |  | OA hydroxyl       | -0.360      |
|                                    | CH1 aliphatic    | 0.376       |  | OA pyranose ring  | -0.642      |
|                                    | OA ether         | -0.480      |  | OA ether          | -0.480      |
|                                    | OA pyranose ring | -0.642      |  | H                 | 0.41        |
|                                    | OA hydroxyl      | -0.360      | Phosphate $\text{HPO}_4^-$             | OM                | -0.884      |
|                                    | O                | -0.450      |  | OA                | -0.733      |
|                                    | N                | -0.200      |  | PA                | 1.346       |
|                                    | H                | 0.310       |  | H                 | 0.43        |
| 3-Deoxy-D-manno-oct-2-ulonic acid  | CH1              | 0.232       | 2-(2-L-Alanyl)-2-deoxy-D-galactosamine | CH1               | 0.232       |
|                                    | CH1 aliphatic    | 0.376       |  | CH2 OR CH1 or CH3 | 0.000       |
|                                    | C                | 0.360       |  | CH1 aliphatic     | 0.376       |
|                                    |                  |             |  |                   |             |

|  |                  |        |                  |        |
|--|------------------|--------|------------------|--------|
| Dodecanoyl acid(12:0-LP1)                  | OA pyranose ring | -0.642 | C                | 0.270  |
|  | OM               | -0.680 | H                | 0.310  |
|  | OA hydroxyl      | -0.360 | N                | -0.310 |
|  | OA ether         | -0.480 | OA hydroxyl      | -0.360 |
|  | H                | 0.410  | OM               | -0.635 |
| 2-alpha-L-Rhamnose                         |                  |        | OA ether         | -0.480 |
|  | C                | -0.140 | CH2 or CH1       | 0.232  |
|  | CH2              | 0.000  | CH1 aliphatic    | 0.376  |
|  | C                | 0.580  | CH3              | 0.000  |
|  | OE               | -0.360 | OA ether         | -0.480 |
| 3-Hydroxydodecanoyl acid 10:0 (3-OH) (LP2) |                  |        | OA pyranose ring | -0.642 |
|  |                  |        | H                | 0.232  |
|  | CH1              | 0.232  | CH1              | 0.232  |
|  | CH2              | 0.000  | CH1 aliphatic    | 0.376  |
|  | C                | 0.580  | CH2              | 0.160  |
| L-Glycero-D-manno-heptose-7-formamide      |                  |        |                  |        |

| 6-alpha-D-Glucose                   | H                            | 0.410   | C                 | 0.580                        |   |                   |
|-------------------------------------|------------------------------|---|-------------------|------------------------------|---|-------------------|
|                                     | O                            | -0.380  | OA ether          | -0.480                       |   |                   |
|                                     | OA pyranose ring             | -0.642  | OA pyranose ring  | -0.642                       |   |                   |
|                                     | CH1                          | 0.232   | OE                | -0.360                       |   |                   |
|                                     | CH1 aliphatic                | 0.376   | O                 | -0.380                       |   |                   |
|                                     | OA ether                     | -0.480  | NT                | -0.830                       |   |                   |
|                                     | OA pyranose ring             | -0.642  | H                 | 0.415                        |   |                   |
|                                     | H                            | 0.41  | H                 | 0.410                        |   |                   |
|                                     | Bond-type                    | $k_b / (\times 10^6 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-4})$ | $b_0 / \text{nm}$ | Bond-type                    | $k_b / (\times 10^6 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-4})$ | $b_0 / \text{nm}$ |
|                                     | CHn-CHn                      | 5.43  | 0.152             | N-C                          | 11.80   | 0.133             |
| CHn-OA                              | 8.18                         | 0.143   | C-HC              | 12.30                        | 0.109   |                   |
| CHn-N or CHn-NL                     | 8.71                         | 0.147   | OA-H              | 15.70                        | 0.100   |                   |
| OA-P                                | 4.84                         | 0.1630  | C-O               | 16.60                        | 0.123   |                   |
| OM-P                                | 8.60                         | 0.148   | H-OA              | 15.7                         | 0.100   |                   |
| CHn-OA                              | 6.1                          | 0.1435  | C-NT              | 10.6                         | 0.133   |                   |
| N-H or NL-H                         | 18.70                        | 0.100   | CR1-N,NR,CR1,C    | 11.80                        | 0.133   |                   |
| CHn-C                               | 7.15                         | 0.1530  | CHn-NR (6-ring)   | 7.64                         | 0.148   |                   |
| Bond-angle type                     | $k_a / (\text{kJ mol}^{-1})$ | $\theta_0 / \text{degree}$                                | Bond-angle type   | $k_a / (\text{kJ mol}^{-1})$ | $\theta_0 / \text{degree}$                                |                   |
| C-NT-H                              | 390                          | 120.0   | CHn-CHn-N         | 520                          | 109.5   |                   |
| H-NT-H                              |                              |   | CHn-CHn-OA        |                              |   |                   |
|                                     |                              |   | CHn-CHn-C         |                              |   |                   |
| OA-CH <sub>1</sub> -CH <sub>1</sub> | 320                          | 109.5   | H-N-CHn           | 460                          | 115   |                   |
| OA-CHn-OA                           |                              |   |                   |                              |   |                   |

|   |   |                              |  |   |                              |
|---|---|------------------------------|--|---|------------------------------|
| CHn-CHn-CHn   | 285   | 109.5                        | H-N-C  | 415   | 123.0                        |
| CHn-OA-P  | 530   | 120                          | N-C-O  | 730   | 124.0                        |
| OM-P-OA   | 450   | 109.5                        | N-C-CHn  | 610   | 115.0                        |
| OA-P-OA   | 420   | 103.0                        | C-CHn-CHn<br>CHn-CHn-CHn<br>CHn-CHn-N                              | 530   | 111.0                        |
| OM-P-OM   | 780   | 120.0                        | CH <sub>1</sub> -OA-CH <sub>1</sub>                                | 380   | 109.5                        |
| CHn-OE-C  | 635   | 117.0                        | CH <sub>2</sub> -OA-H  | 450   | 109.5                        |
| CHn-C-OM  |   |                              | P-OA-H   |   |                              |
| OE-C-C  |   |                              | OM-C-OM  | 770   | 126.0                        |
| OE-C-O  | 700   | 122.0                        |  |   |                              |
| CHn-N-C   |   |                              |  |   |                              |
| OE-CHn-CHn  | 545   | 113.0                        |  |   |                              |
| Improper dihedral   | $k_2 / (\text{kJ mol}^{-1} \text{ rad}^{-2})$ | $\epsilon_0 / \text{degree}$ | Improper dihedral  | $k_2 / (\text{kJ mol}^{-1} \text{ rad}^{-2})$ | $\epsilon_0 / \text{degree}$ |
| CHn-CHn-OE-CHn  | 334.85  | 35.26                        | C-CHn-O-O  | 167.42  | 0                            |
| CHn-O-C-CH <sub>2</sub>   | 334.85  | 35.26                        | C-CH <sub>2</sub> -CH <sub>1</sub> -H                              | 167.42  | 0                            |
| CH <sub>1</sub> -N-C-CH <sub>2</sub><br>(2-(2-L-alany)-2-deoxy-D-galactosamine) | 334.85  | 35.26                        | C-CH <sub>2</sub> -N-O   | 167.42  | 0                            |
| CH <sub>1</sub> -OA-OA-CH <sub>1</sub>  | 334.85  | 35.26                        | CH <sub>1</sub> -OM-OM-C<br>(thamuse)                              | 167.42  | 0                            |
|   |   |                              | N-C-CH <sub>1</sub> -H<br>(acyl chain)                             | 167.42  | 0                            |
| Dihedral angle  | $k_0 / (\text{kJ mol}^{-1})$                  | $\delta$                     | Dihedral angle   | $k_0 / (\text{kJ mol}^{-1})$                  | $\delta$                     |
| CH <sub>1</sub> -CH <sub>1</sub> -OA-P  | 3.77  | 0                            | OA-CH <sub>1</sub> -CH <sub>1</sub> -CH <sub>1</sub>               | 0.7   | 180                          |
| OA-CH <sub>1</sub> -CH <sub>1</sub> -OE   | 2.09  | 0                            | CH <sub>1</sub> -CH <sub>1</sub> -CH <sub>1</sub> -CH <sub>1</sub> | 5.92  | 0                            |
| OA-CH <sub>1</sub> -CH <sub>1</sub> -P  | 2.80  | 0                            | CH <sub>1</sub> -OA-P-OA<br>or<br>OA-P-OA-H                        | 3.14  | 0                            |
| CH <sub>1</sub> -CH <sub>1</sub> -OA-C  | 3.77  | 0                            | OA-CH <sub>1</sub> -CH <sub>1</sub> -N                             | 0.418   | 0                            |
| CH <sub>1</sub> -CH <sub>1</sub> -CH <sub>1</sub> -N                            | 0   | 0                            | CH <sub>1</sub> -OA-C-C  | 24.0  | 180                          |

|  |                            |     |   |   |      |     |   |
|--|----------------------------|-----|---|---|------|-----|---|
| OA-C-C-C                               | 1.0                        | 0   | 6 | CH <sub>1</sub> -CH <sub>1</sub> -N-C   | 3.9  | 0   | 3 |
| N-C-CH <sub>1</sub> -CH <sub>1</sub>   |                            |     |   |   |      |     |   |
| CH <sub>1</sub> -N-C-CH <sub>2</sub>   | 24.0                       | 180 | 0 | OA-CH <sub>1</sub> -CH <sub>1</sub> -OA | 9.35 | 180 | 1 |
| OA-CHn-CHn-OA                          | 9.5                        | 0   | 3 | OA-CHn-OA-CHn                           | 9.45 | 180 | 1 |
| OA-CH <sub>1</sub> -OA-CH <sub>1</sub> | 3.65                       | 0   | 3 | OA-CHn-OA-CHn                           | 3.41 | 180 | 1 |
| OA-CHn-OA-CHn                          | 4.69                       | 0   | 3 | CHn-CHn-CHn-OA                          | 2.67 | 180 | 1 |
| OA-H                                   | Exclusion                  |     |   |   |      |     |   |
| OM-H                                   | within the phosphate group |     |   |   |      |     |   |

$k_p$ ,  $k_o$ ,  $k_s$ ,  $k_f$ : force constants;  $b_o$ : bond-length distance reference value;  $\theta_o$ : bond-angle reference value;  $\xi_o$ : improper-dihedral reference value;  $\delta$ : associated phase shift;

$n$ : multiplicity of the term.

## APÊNDICE B –PARÂMETROS DE SIMULAÇÃO

### B.1 Parâmetros para minimização

minim.mdp - used as input into grompp to generate em.tpr  
 integrator = steep ; Algorithm (steep = steepest descent minimization)  
 emtol = 1000.0 ; Stop minimization when the maximum force < 1000.0 kJ/mol/nm  
 emstep = 0.01 ;Energy step size  
 nsteps = 50000 ; Maximum number of (minimization) steps to perform;  
 Parameters describing how to find the neighbors of each atom and how to calculate  
 the interactions  
 nstlist = 1 ; Frequency to update the neighbor list and long range forces  
 cutoff-scheme = Verlet  
 ns\_type = grid ; Method to determine neighbor list (simple, grid)  
 coulombtype = PME ; Treatment of long range electrostatic interactions  
 rcoulomb = 1.0 ; Short-range electrostatic cut-off  
 rvdw = 1.0 ; Short-range Van der Waals cut-off  
 pbc = xyz ; Periodic Boundary Conditions (yes/no)

### B.2 Parâmetros para a dinâmica através de tratamento de longa distância RF

title = LPS-rough integrator = md  
 nsteps = 100000 ; 200ns dt = 0.002  
 nstxout = 1000 nstvout = 1000  
 nstenergy = 1000 nstxtcout = 1000  
 comm\_grps = Solute Water<sub>and</sub>Ions  
 continuation = no  
 constraint\_algorithm = lincs  
 constraints = all-bonds lincs\_iter =

```
1 lincs_order = 4 cutoff-scheme =  
verlet ns_type = grid nstlist = 5  
pbc = xyz
```

```
rlist = 1.4 coulombtype = reaction-  
field epsilon-rf = 66 rcoulomb =  
1.4 rvdw = 1.4 pme_order = 4 ;  
cubic interpolation fourierspacing  
= 0.16 tcoupl = v-rescale tc_grps =  
Solute Waterandions tau_t = 0.4  
0.4
```

```
ref_t = 300 300 pcoupl =  
berendsen tau_p = 0.1 ref_p  
= 1.0 1.0 compressibility =  
4.5e-5 4.5e-5 pcoupltype =  
semiisotropic refcoord_scaling  
= com ;dispcorr = no gen_vel  
= yes
```

## B.3 Parâmetros para a dinâmica através de PME

```
title = LPS-rough integrator = md
nsteps = 400000000 ; 800ns dt =
0.002 nstxout = 1000 nstvout = 1000
nstenergy = 1000 nstxtcout = 1000
comm_grps = Solute Waterand ions
continuation = yes
constraint_algorithm = lincs
constraints = all-bonds lincs_iter = 1
lincs_order = 4 cutoff-scheme =
verlet ns_type = grid nstlist = 5
pbc = xyz

rlist = 1.2

coulombtype = PME rcoulomb = 1.2 rvdw = 1.2
pme_order = 4 ; cubic interpolation fourierspacing =
0.16 tcoupl = v-rescale tc_grps = Solute Waterand ions
tau_t = 0.4 0.4 ref_t = 300 300 pcoupl = berendsen tau_p
= 0.1 0.1

ref_p = 1.0 1.0 compressibility
= 4.5e-5 4.5e-5 pcoupltype =
semi-isotropic
refcoord_scaling = com
dispcorr = no gen_vel = no
```



**APÊNDICE C – ANÁLISE DE DESEMPENHO**

| Sistema | Unid. processamento | Núcleos.hora | ns/dia | Núcleos de<br>process. |
|---------|---------------------|--------------|--------|------------------------|
| SPC     | CPU                 |              |        | 48                     |
| SPC     | GPU                 | 3625         | 37,075 | 28                     |
| SPC/E   | CPU                 | 9961,5       | 23,129 | 48                     |
| SPC/E   | GPU                 | 1794         | 37,448 | 14                     |

## APÊNDICE D – ESTRUTURAS LIPÍDICAS

### LPS-rough

|      |      |    |       |       |       |         |         |         |
|------|------|----|-------|-------|-------|---------|---------|---------|
| 1PA4 | C4A  | 1  | 0.593 | 1.109 | 6.446 | -0.0825 | 0.2117  | 0.4613  |
| 1PA4 | OP1A | 2  | 0.549 | 1.22  | 6.525 | -0.2286 | -0.0764 | 0.7878  |
| 1PA4 | PA   | 3  | 0.392 | 1.24  | 6.551 | -0.2913 | 0.1792  | 0.2221  |
| 1PA4 | OP2A | 4  | 0.327 | 1.326 | 6.45  | -0.2172 | 0.1763  | 0.1723  |
| 1PA4 | OP3A | 5  | 0.395 | 1.301 | 6.686 | -0.3017 | 0.1445  | 0.2383  |
| 1PA4 | OP4A | 6  | 0.328 | 1.096 | 6.588 | 0.0892  | -0.2136 | -0.6216 |
| 1PA4 | HP4A | 7  | 0.287 | 1.062 | 6.503 | -1.6592 | 0.9476  | -0.2899 |
| 1PA4 | C3A  | 8  | 0.602 | 1.151 | 6.301 | 0.1912  | -0.2174 | 0.3522  |
| 1PA4 | O3A  | 9  | 0.469 | 1.146 | 6.247 | 0.5062  | -0.1416 | -0.4474 |
| 1PA4 | C31  | 10 | 0.421 | 1.226 | 6.153 | -0.114  | 0.2618  | 0.2061  |
| 1PA4 | O31  | 11 | 0.497 | 1.315 | 6.116 | 0.5257  | -0.333  | 0.0659  |
| 1PA4 | C2A  | 12 | 0.684 | 1.052 | 6.219 | -0.0812 | -0.1517 | -0.0052 |
| 1PA4 | NA   | 13 | 0.713 | 1.126 | 6.096 | -0.761  | 0.3444  | 0.1273  |
| 1PA4 | HNA  | 14 | 0.729 | 1.223 | 6.114 | -3.2738 | 0.7749  | 0.3004  |
| 1PA4 | CA   | 15 | 0.72  | 1.073 | 5.974 | 0.4637  | 0.1293  | 0.2784  |
| 1PA4 | OCA  | 16 | 0.713 | 0.952 | 5.956 | 0.5845  | 0.0959  | 0.4552  |
| 1PA4 | CAA  | 17 | 0.746 | 1.163 | 5.879 | -0.0622 | 0.4802  | 0.4618  |
| 1PA4 | C6A  | 18 | 0.693 | 0.989 | 6.641 | -0.437  | -0.0235 | 0.1774  |
| 1PA4 | C6F  | 19 | 0.441 | 0.897 | 6.888 | -0.225  | 0.4521  | 0.019   |
| 1PA4 | O6F  | 20 | 0.58  | 0.864 | 6.876 | -0.1992 | 0.5789  | -0.0328 |
| 1PA4 | C2F  | 21 | 0.617 | 0.786 | 6.761 | -0.2103 | -0.0814 | 0.4042  |
| 1PA4 | O2F  | 22 | 0.608 | 0.874 | 6.647 | 0.4361  | -0.6971 | -0.127  |
| 1PA4 | C3F  | 23 | 0.512 | 0.683 | 6.724 | 0.1783  | -0.3223 | -0.0313 |
| 1PA4 | C5A  | 24 | 0.721 | 1.051 | 6.505 | -0.1424 | -0.2767 | 0.1205  |
| 1PA4 | O5A  | 25 | 0.782 | 0.953 | 6.42  | 0.3798  | 0.0378  | 0.123   |
| 1PA4 | C1A  | 26 | 0.811 | 1.012 | 6.293 | -0.0394 | 0.002   | 0.0074  |

|      |      |    |        |       |       |         |         |         |
|------|------|----|--------|-------|-------|---------|---------|---------|
| 1PA4 | O1A  | 27 | 0.888  | 0.906 | 6.233 | 0.1778  | 0.1296  | 0.0594  |
| 1PA4 | C6D  | 28 | 1.017  | 0.962 | 6.209 | 0.0488  | 0.4446  | 0.1013  |
| 1PA4 | C32  | 29 | 0.278  | 1.215 | 6.115 | -0.0005 | 0.1951  | -0.2152 |
| 1PA4 | C33  | 30 | 0.204  | 1.348 | 6.126 | 0.538   | 0.4654  | 0.2045  |
| 1PA4 | OH33 | 31 | 0.158  | 1.372 | 6.259 | -0.4923 | 0.2837  | -0.1096 |
| 1PA4 | HO33 | 32 | 0.229  | 1.339 | 6.32  | -0.1219 | -1.1139 | -1.2516 |
| 1PA4 | C34  | 33 | 0.084  | 1.325 | 6.034 | 0.4284  | 0.6475  | 0.3021  |
| 1PA4 | C35  | 34 | 0.119  | 1.363 | 5.89  | 0.0089  | -0.1302 | -0.0101 |
| 1PA4 | C36  | 35 | 0.006  | 1.352 | 5.787 | 0.011   | -0.395  | 0.0153  |
| 1PA4 | C37  | 36 | 0.075  | 1.391 | 5.657 | 0.3879  | -0.0258 | 0.3226  |
| 1PA4 | C38  | 37 | -0.011 | 1.376 | 5.531 | 0.2002  | 0.2142  | 0.4216  |
| 1PA4 | C39  | 38 | 0.075  | 1.405 | 5.408 | -0.0212 | -0.3212 | 0.1388  |
| 1PA4 | C40  | 39 | 0.123  | 1.55  | 5.392 | -0.1527 | -0.3025 | -0.0974 |
| 1PA4 | CB   | 40 | 0.663  | 1.146 | 5.751 | -0.0077 | 0.1665  | 0.467   |
| 1PA4 | OB   | 41 | 0.63   | 1.28  | 5.714 | -0.1759 | 0.1447  | 0.5369  |
| 1PA4 | CB1  | 42 | 0.502  | 1.302 | 5.686 | 0.0178  | -0.4226 | -0.8896 |
| 1PA4 | OB1  | 43 | 0.41   | 1.235 | 5.732 | -0.0744 | 0.061   | -0.3567 |
| 1PA4 | CB2  | 44 | 0.482  | 1.444 | 5.65  | 0.5973  | -0.129  | -0.0854 |
| 1PA4 | CB3  | 45 | 0.523  | 1.472 | 5.505 | 0.1617  | -0.1778 | -0.2177 |
| 1PA4 | CB4  | 46 | 0.491  | 1.618 | 5.475 | -0.1747 | -0.1234 | 0.3997  |
| 1PA4 | CB5  | 47 | 0.55   | 1.653 | 5.339 | 0.6512  | -0.4617 | 0.6633  |
| 1PA4 | CB6  | 48 | 0.574  | 1.802 | 5.313 | -0.3649 | -0.4154 | -0.0807 |
| 1PA4 | CB7  | 49 | 0.634  | 1.806 | 5.172 | 0.153   | 0.2062  | 0.1544  |
| 1PA4 | CB8  | 50 | 0.786  | 1.812 | 5.186 | 0.125   | 0.7251  | 0.2556  |
| 1PA4 | CB9  | 51 | 0.855  | 1.85  | 5.055 | 0.1159  | -0.4164 | -0.0921 |
| 1PA4 | CB10 | 52 | 0.81   | 1.764 | 4.937 | 0.0372  | -0.1455 | -0.2619 |
| 1PA4 | CB11 | 53 | 0.899  | 1.783 | 4.814 | -0.0843 | 0.4525  | -0.2582 |
| 1PA4 | CB12 | 54 | 0.862  | 1.677 | 4.71  | 0.2251  | -0.2083 | 0.2928  |

|      |      |    |       |       |       |         |         |         |
|------|------|----|-------|-------|-------|---------|---------|---------|
| 1PA4 | CB13 | 55 | 0.748 | 1.069 | 5.649 | -0.1498 | 0.741   | -0.0893 |
| 1PA4 | CB14 | 56 | 0.682 | 1.047 | 5.513 | -0.3722 | -0.5681 | 0.217   |
| 1PA4 | CB15 | 57 | 0.771 | 0.976 | 5.411 | 0.5869  | -0.32   | 0.8751  |
| 1PA4 | CB16 | 58 | 0.888 | 1.057 | 5.356 | -0.3476 | 0.2754  | -0.2645 |
| 1PA4 | CB17 | 59 | 0.958 | 0.996 | 5.234 | -0.1705 | -0.1503 | 0.048   |
| 1PA4 | CB18 | 60 | 0.849 | 0.974 | 5.128 | -0.337  | 0.4269  | 0.0979  |
| 1PA4 | CB19 | 61 | 0.916 | 0.971 | 4.99  | -0.5218 | -0.1256 | 0.0204  |
| 1PA4 | CB20 | 62 | 0.822 | 0.967 | 4.87  | -0.2558 | 0.1517  | -0.2    |
| 1PA4 | CB21 | 63 | 0.886 | 0.982 | 4.732 | 0.2413  | -0.6272 | -0.0592 |
| 1PA4 | C4D  | 64 | 1.041 | 0.807 | 6.017 | 0.1313  | 0.3079  | 0.4491  |
| 1PA4 | O4D  | 65 | 1.01  | 0.904 | 5.916 | -0.0804 | 0.3526  | 0.5555  |
| 1PA4 | HO4D | 66 | 0.911 | 0.913 | 5.908 | -0.8948 | -4.7714 | 1.4334  |
| 1PA4 | C3D  | 67 | 1.15  | 0.718 | 5.96  | -0.2149 | 0.1959  | -0.0414 |
| 1PA4 | O3D  | 68 | 1.096 | 0.645 | 5.848 | -0.0819 | -0.2853 | 0.2056  |
| 1PA4 | HO3D | 69 | 1.031 | 0.703 | 5.798 | -1.46   | -1.0666 | 1.0169  |
| 1PA4 | C2D  | 70 | 1.197 | 0.603 | 6.047 | 0.2855  | 0.0782  | -0.462  |
| 1PA4 | ND   | 71 | 1.288 | 0.509 | 5.979 | -0.4801 | -0.7409 | -0.3745 |
| 1PA4 | HND  | 72 | 1.27  | 0.527 | 5.882 | -1.2547 | 3.0889  | 0.2942  |
| 1PA4 | CD   | 73 | 1.346 | 0.4   | 6.027 | -0.2203 | -0.3917 | 0.1153  |
| 1PA4 | OCD  | 74 | 1.299 | 0.336 | 6.121 | -0.6009 | 0.3697  | 0.4484  |
| 1PA4 | CAD  | 75 | 1.44  | 0.35  | 5.947 | -0.0247 | -0.6268 | 0.4902  |
| 1PA4 | C5D  | 76 | 1.109 | 0.862 | 6.141 | 0.2921  | 0.5642  | 0.25    |
| 1PA4 | O5D  | 77 | 1.156 | 0.757 | 6.227 | -0.525  | -0.5563 | -0.6345 |
| 1PA4 | C1D  | 78 | 1.257 | 0.674 | 6.168 | 0.1423  | 0.0545  | -0.3767 |
| 1PA4 | OP1D | 79 | 1.382 | 0.74  | 6.151 | 0.2422  | -0.1217 | -0.3272 |
| 1PA4 | PD   | 80 | 1.449 | 0.769 | 6.295 | -0.2467 | 0.0137  | -0.1235 |
| 1PA4 | OP2D | 81 | 1.43  | 0.654 | 6.386 | 0.2989  | 0.0909  | 0.0921  |
| 1PA4 | OP3D | 82 | 1.423 | 0.904 | 6.35  | -0.3462 | -0.0615 | 0.0134  |
| 1PA4 | OP4D | 83 | 1.606 | 0.757 | 6.262 | -0.1733 | 0.8621  | -0.0956 |
| 1PA4 | HP4D | 84 | 1.653 | 0.838 | 6.226 | 1.6512  | -0.214  | -0.285  |

|      |     |    |       |       |       |        |         |         |
|------|-----|----|-------|-------|-------|--------|---------|---------|
| 1PA4 | CQ  | 85 | 1.391 | 0.223 | 5.877 | 0.3127 | -0.4338 | -0.0986 |
| 1PA4 | OQ  | 86 | 1.29  | 0.236 | 5.777 | 0.2789 | -0.3969 | -0.0597 |
| 1PA4 | CQ1 | 87 | 1.164 | 0.21  | 5.812 | 0.2225 | -0.2283 | -0.1339 |

|      |      |     |       |        |       |         |         |         |
|------|------|-----|-------|--------|-------|---------|---------|---------|
| 1PA4 | OQ1  | 88  | 1.14  | 0.111  | 5.881 | 0.2304  | 0.0478  | 0.2721  |
| 1PA4 | CQ2  | 89  | 1.074 | 0.271  | 5.712 | 0.021   | -0.2465 | 0.0356  |
| 1PA4 | CQ3  | 90  | 0.941 | 0.31   | 5.777 | 0.0575  | -0.0548 | -0.0072 |
| 1PA4 | CQ4  | 91  | 0.873 | 0.424  | 5.7   | 0.4384  | 0.1679  | -0.0187 |
| 1PA4 | CQ5  | 92  | 0.772 | 0.505  | 5.782 | 0.2815  | 0.2854  | -0.3295 |
| 1PA4 | CQ6  | 93  | 0.674 | 0.572  | 5.685 | 0.4034  | 0.4378  | -0.3471 |
| 1PA4 | CQ7  | 94  | 0.572 | 0.669  | 5.745 | -0.5371 | -0.5958 | -0.2348 |
| 1PA4 | CQ8  | 95  | 0.465 | 0.716  | 5.646 | -0.7549 | -0.1827 | 0.1937  |
| 1PA4 | CQ9  | 96  | 0.381 | 0.825  | 5.712 | -0.1105 | 0.2405  | 0.3288  |
| 1PA4 | CQ10 | 97  | 0.269 | 0.882  | 5.623 | 0.077   | 0.6495  | 0.3532  |
| 1PA4 | CQ11 | 98  | 0.166 | 0.955  | 5.709 | -0.961  | -0.6194 | 0.2078  |
| 1PA4 | CQ12 | 99  | 0.052 | 1.012  | 5.623 | 0.4699  | 0.9066  | -0.7474 |
| 1PA4 | CQ13 | 100 | 1.513 | 0.158  | 5.812 | -0.0073 | -0.6541 | -0.4839 |
| 1PA4 | CQ14 | 101 | 1.592 | 0.079  | 5.916 | 0.805   | 0.3821  | -0.2877 |
| 1PA4 | CQ15 | 102 | 1.714 | 0.02   | 5.845 | 0.6559  | -0.0056 | -0.2267 |
| 1PA4 | CQ16 | 103 | 1.755 | -0.11  | 5.915 | -0.4164 | -0.2214 | 0.0144  |
| 1PA4 | CQ17 | 104 | 1.858 | -0.192 | 5.838 | -0.1733 | -0.0603 | 0.1666  |
| 1PA4 | CQ18 | 105 | 1.942 | -0.292 | 5.917 | -0.331  | -0.2228 | 0.1279  |
| 1PA4 | CQ19 | 106 | 2.04  | -0.361 | 5.821 | -0.2347 | 0.4728  | -0.2794 |
| 1PA4 | CQ20 | 107 | 2.134 | -0.443 | 5.91  | 0.0309  | 0.8687  | -0.1924 |
| 1PA4 | CQ21 | 108 | 2.256 | -0.479 | 5.824 | 0.0567  | -0.6854 | 0.4717  |
| 1PA4 | C5F  | 109 | 0.344 | 0.781  | 6.882 | 0.3227  | -0.0343 | 0.4178  |
| 1PA4 | C5H  | 110 | 0.225 | 0.406  | 7.049 | -0.0076 | -0.1054 | 0.0038  |
| 1PA4 | O5H  | 111 | 0.182 | 0.517  | 6.968 | 0.1959  | -0.0718 | -0.0598 |
| 1PA4 | C1H  | 112 | 0.215 | 0.643  | 7.028 | 0.1955  | -0.2172 | 0.2503  |
| 1PA4 | O1H  | 113 | 0.347 | 0.686  | 6.989 | 0.2128  | -0.433  | 0.0706  |
| 1PA4 | C4F  | 114 | 0.368 | 0.729  | 6.741 | 0.2731  | -0.2126 | 0.4738  |
| 1PA4 | C6G  | 115 | 0.327 | 0.623  | 6.397 | -0.2287 | 0.4254  | -0.1105 |

|      |      |     |       |       |       |         |         |         |
|------|------|-----|-------|-------|-------|---------|---------|---------|
| 1PA4 | O6G  | 116 | 0.252 | 0.717 | 6.475 | 0.2645  | 0.2625  | 0.5618  |
| 1PA4 | C2G  | 117 | 0.176 | 0.662 | 6.584 | -0.0892 | -0.1859 | 0.0903  |
| 1PA4 | O2G  | 118 | 0.272 | 0.637 | 6.688 | 0.5202  | 0.0348  | -0.4142 |
| 1PA4 | C3G  | 119 | 0.096 | 0.539 | 6.541 | 0.0302  | -0.1701 | -0.1824 |
| 1PA4 | C7F  | 120 | 0.422 | 0.979 | 7.014 | 0.5519  | 0.0883  | 0.3822  |
| 1PA4 | O7F  | 121 | 0.501 | 0.938 | 7.127 | 1.075   | 0.6042  | 0.207   |
| 1PA4 | HO7F | 122 | 0.482 | 0.996 | 7.206 | -1.3342 | -1.207  | 1.0711  |
| 1PA4 | C8F  | 123 | 0.439 | 1.125 | 6.976 | 0.4938  | -0.109  | -0.4079 |
| 1PA4 | O8F  | 124 | 0.332 | 1.173 | 6.893 | 0.3708  | 0.7038  | 0.2019  |
| 1PA4 | HO8F | 125 | 0.366 | 1.229 | 6.818 | -0.8175 | -2.2294 | -2.8168 |
| 1PA4 | C1F  | 126 | 0.757 | 0.729 | 6.774 | -0.0475 | 0.3031  | 0.3584  |
| 1PA4 | O1AF | 127 | 0.813 | 0.681 | 6.673 | 0.0106  | -0.1298 | 0.5937  |
| 1PA4 | O1BF | 128 | 0.806 | 0.708 | 6.887 | 0.7259  | 0.4523  | 0.0531  |
| 1PA4 | C5G  | 129 | 0.248 | 0.505 | 6.342 | 0.4877  | 0.0174  | -0.2697 |
| 1PA4 | O5G  | 130 | 0.152 | 0.549 | 6.245 | -0.1881 | 0.0553  | 0.4098  |
| 1PA4 | HO5G | 131 | 0.083 | 0.477 | 6.235 | -0.7691 | 0.766   | -0.9836 |
| 1PA4 | C4G  | 132 | 0.181 | 0.441 | 6.462 | -0.1942 | 0.0094  | -0.6515 |
| 1PA4 | O4G  | 133 | 0.094 | 0.329 | 6.439 | 0.1503  | -0.3811 | -0.0785 |
| 1PA4 | HO4G | 134 | 0.004 | 0.366 | 6.415 | -1.0699 | -3.0369 | 0.0688  |
| 1PA4 | C7G  | 135 | 0.399 | 0.691 | 6.281 | -0.3542 | 0.0572  | -0.4094 |
| 1PA4 | O7G  | 136 | 0.43  | 0.828 | 6.312 | 0.1044  | -0.0246 | -0.4998 |
| 1PA4 | HO7G | 137 | 0.351 | 0.881 | 6.343 | 0.27    | -0.9194 | 1.6053  |
| 1PA4 | C8G  | 138 | 0.513 | 0.616 | 6.215 | 0.0017  | 0.0741  | 0.1733  |
| 1PA4 | O8G  | 139 | 0.608 | 0.563 | 6.309 | 0.3304  | -0.6492 | -0.5545 |
| 1PA4 | HO8G | 140 | 0.67  | 0.623 | 6.359 | -1.4384 | -0.2064 | 1.2079  |
| 1PA4 | C1G  | 141 | 0.069 | 0.763 | 6.623 | 0.1146  | -0.0221 | 0.2251  |
| 1PA4 | O1AG | 142 | 0.026 | 0.851 | 6.547 | 0.0549  | -0.01   | 0.2733  |

|      |      |     |        |       |       |         |         |         |
|------|------|-----|--------|-------|-------|---------|---------|---------|
| 1PA4 | O1BG | 143 | 0.026  | 0.753 | 6.74  | -0.3019 | 0.7859  | 0.1434  |
| 1PA4 | C4H  | 144 | 0.169  | 0.42  | 7.189 | -0.0875 | 0.2707  | -0.0625 |
| 1PA4 | O41H | 145 | 0.172  | 0.307 | 7.278 | -0.0379 | 0.281   | -0.051  |
| 1PA4 | P4H  | 146 | 0.038  | 0.257 | 7.351 | 0.1414  | -0.1509 | -0.0152 |
| 1PA4 | O42H | 147 | 0.076  | 0.126 | 7.409 | 0.6636  | 0.0924  | 0.2023  |
| 1PA4 | O43H | 148 | -0.08  | 0.247 | 7.263 | 0.084   | -0.8137 | 0.1329  |
| 1PA4 | O44H | 149 | 0.01   | 0.346 | 7.482 | 0.3604  | -0.4423 | 0.23    |
| 1PA4 | HO4H | 150 | -0.025 | 0.437 | 7.462 | -2.069  | -1.573  | -1.1326 |
| 1PA4 | C3H  | 151 | 0.247  | 0.542 | 7.237 | 0.1774  | 0.0466  | 0.0871  |
| 1PA4 | C5I  | 152 | 0.414  | 0.761 | 7.551 | 0.4783  | 0.1548  | 0.0368  |
| 1PA4 | O5I  | 153 | 0.449  | 0.648 | 7.47  | 0.3179  | -0.0857 | 0.2991  |
| 1PA4 | C1I  | 154 | 0.342  | 0.553 | 7.465 | 0.4084  | -0.1702 | -0.0874 |
| 1PA4 | O1I  | 155 | 0.234  | 0.581 | 7.375 | 0.3525  | 0.1466  | 0.0755  |
| 1PA4 | C2H  | 156 | 0.189  | 0.668 | 7.175 | 0.2122  | 0.1167  | 0.1979  |
| 1PA4 | O21H | 157 | 0.047  | 0.67  | 7.193 | 0.201   | 0.1305  | 0.1041  |
| 1PA4 | P2H  | 158 | -0.022 | 0.81  | 7.233 | -0.2126 | -0.0277 | -0.0415 |
| 1PA4 | O22H | 159 | -0.163 | 0.829 | 7.194 | -0.1669 | 0.5603  | 0.0741  |
| 1PA4 | O23H | 160 | 0.072  | 0.921 | 7.206 | 0.1671  | -0.331  | 0.0099  |
| 1PA4 | O24H | 161 | -0.022 | 0.802 | 7.394 | -0.3725 | -0.3204 | -0.0552 |
| 1PA4 | HO2H | 162 | -0.033 | 0.708 | 7.424 | 0.557   | 0.1159  | 1.7931  |
| 1PA4 | C6H  | 163 | 0.18   | 0.281 | 6.975 | 0.0905  | -0.182  | 0.0746  |
| 1PA4 | O61H | 164 | 0.039  | 0.272 | 6.957 | 0.0384  | 0.3255  | 0.2271  |
| 1PA4 | P6H  | 165 | -0.034 | 0.129 | 6.945 | 0.1532  | 0.2972  | -0.1626 |
| 1PA4 | O62H | 166 | 0.06   | 0.024 | 6.9   | 0.1187  | 0.1096  | 0.1963  |
| 1PA4 | O63H | 167 | -0.164 | 0.124 | 6.876 | 0.1357  | -0.3111 | -0.0933 |
| 1PA4 | O64H | 168 | -0.038 | 0.057 | 7.089 | 0.0842  | -0.0599 | -0.3429 |
| 1PA4 | HO6H | 169 | -0.052 | 0.126 | 7.159 | 1.3861  | -0.5683 | 0.458   |
| 1PA4 | C7H  | 170 | 0.27   | 0.222 | 6.868 | 0.263   | 0.1842  | 0.0148  |
| 1PA4 | O7H  | 171 | 0.387  | 0.165 | 6.929 | 0.2965  | 0.4824  | 0.2288  |
| 1PA4 | HO7H | 172 | 0.449  | 0.136 | 6.856 | 0.9778  | -1.7135 | 1.5836  |
| 1PA4 | C4I  | 173 | 0.363  | 0.732 | 7.691 | 0.1079  | -0.0289 | -0.1363 |



|      |      |     |        |       |       |         |         |         |
|------|------|-----|--------|-------|-------|---------|---------|---------|
| 1PA4 | O4I  | 174 | 0.324  | 0.846 | 7.768 | 0.126   | -0.165  | 0.0767  |
| 1PA4 | HO4I | 175 | 0.283  | 0.812 | 7.853 | -0.1236 | 1.7379  | 0.7668  |
| 1PA4 | C3I  | 176 | 0.248  | 0.633 | 7.676 | -0.1667 | 0.2624  | 0.0436  |
| 1PA4 | C5J  | 177 | -0.046 | 0.41  | 7.857 | -0.487  | 0.008   | -0.0741 |
| 1PA4 | O5J  | 178 | -0.022 | 0.523 | 7.772 | -0.129  | -0.233  | -0.2959 |
| 1PA4 | C1J  | 179 | 0.059  | 0.619 | 7.842 | 0.3907  | -0.9014 | 0.0322  |
| 1PA4 | O1J  | 180 | 0.199  | 0.616 | 7.81  | 0.4638  | -0.0431 | 0.2373  |
| 1PA4 | C2I  | 181 | 0.296  | 0.509 | 7.603 | -0.0069 | 0.3775  | -0.0482 |
| 1PA4 | O2I  | 182 | 0.402  | 0.434 | 7.665 | -0.6413 | -0.0168 | 0.5782  |
| 1PA4 | HO2I | 183 | 0.427  | 0.353 | 7.611 | -1.7011 | -1.2833 | 1.9006  |
| 1PA4 | C6I  | 184 | 0.54   | 0.843 | 7.572 | 0.4535  | 0.2386  | -0.146  |
| 1PA4 | O6I  | 185 | 0.661  | 0.786 | 7.623 | 0.4641  | 0.6421  | 0.2848  |
| 1PA4 | HO6I | 186 | 0.736  | 0.852 | 7.635 | -0.89   | 2.1826  | 0.6552  |
| 1PA4 | C7I  | 187 | 0.58   | 0.914 | 7.443 | 0.16    | 0.2327  | -0.2416 |
| 1PA4 | O7I  | 188 | 0.673  | 1.022 | 7.455 | 0.3725  | 0.0438  | -0.1802 |
| 1PA4 | C8I  | 189 | 0.678  | 1.127 | 7.374 | -0.0946 | -0.3101 | -0.6709 |
| 1PA4 | O8I  | 190 | 0.601  | 1.147 | 7.279 | -0.3373 | -0.1374 | -0.4419 |
| 1PA4 | N9I  | 191 | 0.77   | 1.216 | 7.409 | -0.3081 | -0.1898 | -0.4095 |
| 1PA4 | H91I | 192 | 0.826  | 1.199 | 7.49  | 1.3598  | -0.6433 | -1.5889 |
| 1PA4 | H92I | 193 | 0.777  | 1.308 | 7.37  | -0.3874 | 0.2453  | 0.5664  |
| 1PA4 | C4J  | 194 | -0.093 | 0.436 | 7.999 | 0.2     | 0.0922  | 0.1433  |
| 1PA4 | C5M  | 195 | -0.36  | 0.628 | 8.242 | -0.5577 | -0.0552 | -0.0592 |
| 1PA4 | O5M  | 196 | -0.297 | 0.5   | 8.237 | 0.0104  | 0.2342  | -0.3897 |
| 1PA4 | C1M  | 197 | -0.312 | 0.441 | 8.107 | 0.1466  | -0.2514 | -0.1908 |
| 1PA4 | O1M  | 198 | -0.223 | 0.498 | 8.01  | 0.1563  | 0.0318  | -0.018  |

|      |      |     |        |       |       |         |         |         |
|------|------|-----|--------|-------|-------|---------|---------|---------|
| 1PA4 | C3J  | 199 | 0.022  | 0.514 | 8.061 | 0.703   | -0.2404 | -0.3637 |
| 1PA4 | C5K  | 200 | 0.341  | 0.604 | 8.349 | 0.2513  | 0.4517  | -0.1796 |
| 1PA4 | O5K  | 201 | 0.227  | 0.613 | 8.261 | -0.1766 | -0.3268 | 0.2748  |
| 1PA4 | C1K  | 202 | 0.139  | 0.5   | 8.268 | -0.1456 | -0.3572 | 0.1738  |
| 1PA4 | O1K  | 203 | 0.012  | 0.52  | 8.204 | 0.16    | -0.2236 | -0.398  |
| 1PA4 | C2J  | 204 | 0.023  | 0.647 | 7.987 | 0.2304  | -0.1147 | -0.1515 |
| 1PA4 | N2J  | 205 | 0.109  | 0.748 | 8.05  | -0.0202 | 0.055   | -0.0816 |
| 1PA4 | HN2J | 206 | 0.157  | 0.709 | 8.129 | -0.5008 | -2.3912 | -0.9195 |
| 1PA4 | C7AJ | 207 | 0.048  | 0.881 | 8.046 | -0.3553 | -0.0969 | -0.0573 |
| 1PA4 | C7BJ | 208 | 0.006  | 0.922 | 8.188 | 0.0927  | 0.5165  | -0.0968 |
| 1PA4 | C8J  | 209 | 0.136  | 0.993 | 7.989 | -0.4212 | -0.2165 | -0.3926 |
| 1PA4 | O81J | 210 | 0.086  | 1.097 | 7.94  | -0.561  | -0.4362 | -0.7203 |
| 1PA4 | O82J | 211 | 0.254  | 0.995 | 8.029 | -0.5081 | 0.7803  | -0.1713 |
| 1PA4 | C6J  | 212 | -0.13  | 0.31  | 7.779 | -0.622  | -0.0005 | 0.0829  |
| 1PA4 | O6J  | 213 | -0.15  | 0.194 | 7.86  | 0.3451  | -0.4691 | -0.3308 |
| 1PA4 | HO6J | 214 | -0.199 | 0.124 | 7.808 | -1.4809 | -1.1016 | 2.0192  |
| 1PA4 | C4K  | 215 | 0.425  | 0.482 | 8.314 | -0.1869 | -0.0641 | 0.5261  |
| 1PA4 | O4K  | 216 | 0.541  | 0.474 | 8.398 | -0.043  | 0.4618  | 0.3806  |
| 1PA4 | HO4K | 217 | 0.611  | 0.409 | 8.372 | 2.2982  | 1.5416  | 3.3125  |
| 1PA4 | C3K  | 218 | 0.331  | 0.366 | 8.343 | -0.1447 | -0.1529 | 0.312   |
| 1PA4 | O3K  | 219 | 0.402  | 0.243 | 8.328 | -0.0132 | -0.0273 | -0.1108 |
| 1PA4 | HO3K | 220 | 0.337  | 0.167 | 8.337 | 0.506   | -0.5698 | -0.8214 |
| 1PA4 | C2K  | 221 | 0.21   | 0.367 | 8.25  | 0.0585  | -0.2323 | 0.0461  |
| 1PA4 | O2K  | 222 | 0.119  | 0.257 | 8.266 | -0.4195 | 0.2021  | 0.3587  |
| 1PA4 | HO2K | 223 | 0.05   | 0.272 | 8.337 | 0.9012  | -0.5478 | 1.8956  |
| 1PA4 | C6K  | 224 | 0.421  | 0.733 | 8.346 | -0.0348 | 0.646   | 0.3865  |
| 1PA4 | C5L  | 225 | 0.75   | 0.756 | 8.172 | -0.6693 | -0.7239 | 0.0524  |
| 1PA4 | O5L  | 226 | 0.692  | 0.834 | 8.277 | 0.2465  | 0.3496  | -0.2229 |
| 1PA4 | C1L  | 227 | 0.568  | 0.896 | 8.242 | 0.0722  | 0.2222  | 0.1576  |
| 1PA4 | O1L  | 228 | 0.465  | 0.798 | 8.226 | 0.5448  | -0.2655 | 0.0946  |
| 1PA4 | C4L  | 229 | 0.782  | 0.845 | 8.054 | -0.1195 | -0.3569 | 0.4702  |

|      |      |     |        |       |              |         |         |         |
|------|------|-----|--------|-------|--------------|---------|---------|---------|
| 1PA4 | O4L  | 230 | 0.824  | 0.766 | 7.941        | 0.4392  | 0.0918  | 0.3567  |
| 1PA4 | HO4L | 231 | 0.836  | 0.83  | 7.866        | 0.0495  | 2.8278  | 2.4489  |
| 1PA4 | C3L  | 232 | 0.661  | 0.929 | 8.013        | 0.1852  | -0.1402 | 0.0051  |
| 1PA4 | O3L  | 233 | 0.675  | 1.037 | 7.919        | -0.2237 | -0.2804 | -0.2198 |
| 1PA4 | HO3L | 234 | 0.731  | 0.998 | 7.846        | -0.235  | -0.3699 | -0.1807 |
| 1PA4 | C2L  | 235 | 0.597  | 0.997 | 8.132        | 0.3699  | -0.004  | 0.0282  |
| 1PA4 | O2L  | 236 | 0.485  | 1.083 | 8.103        | 0.0382  | -0.0178 | 1.208   |
| 1PA4 | HO2L | 237 | 0.395  | 1.039 | 8.1020.2478  | -0.4952 | 2.2277  |         |
| 1PA4 | C6L  | 238 | 0.882  | 0.694 | 8.216-0.2041 | 0.2134  | -0.0076 |         |
| 1PA4 | O6L  | 239 | 0.885  | 0.612 | 8.334-0.1802 | -0.2098 | -0.3017 |         |
| 1PA4 | HO6L | 240 | 0.863  | 0.516 | 8.317-2.0934 | 0.2668  | -0.7067 |         |
| 1PA4 | C4M  | 241 | -0.507 | 0.639 | 8.205-0.3673 | 0.2633  | -0.7387 |         |
| 1PA4 | O4M  | 242 | -0.548 | 0.775 | 8.218-0.3359 | 0.2042  | 0.0017  |         |
| 1PA4 | HO4M | 243 | -0.636 | 0.779 | 8.17 0.3634  | -2.3902 | -1.6864 |         |
| 1PA4 | C3M  | 244 | -0.527 | 0.581 | 8.065-0.2817 | -0.3622 | -0.4948 |         |
| 1PA4 | O3M  | 245 | -0.658 | 0.588 | 8.006-0.2772 | -0.0177 | -0.4624 |         |
| 1PA4 | HO3M | 246 | -0.693 | 0.495 | 8.008-0.6141 | 0.1146  | 0.8409  |         |
| 1PA4 | C2M  | 247 | -0.459 | 0.445 | 8.066-0.105  | -0.2778 | 0.6883  |         |
| 1PA4 | O2M  | 248 | -0.473 | 0.355 | 7.9550.464   | -0.2846 | 0.6158  |         |
| 1PA4 | HO2M | 249 | -0.438 | 0.263 | 7.9690.7128  | -0.3694 | -0.4609 |         |
| 1PA4 | C6M  | 250 | -0.35  | 0.672 | 8.388-0.2479 | 0.3621  | -0.204  |         |
| 1PA4 | C5N  | 251 | -0.161 | 0.938 | 8.587-0.2281 | 0.2659  | 0.1289  |         |
| 1PA4 | O5N  | 252 | -0.273 | 0.851 | 8.6040.0557  | -0.1622 | -0.1934 |         |
| 1PA4 | C1N  | 253 | -0.247 | 0.71  | 8.595-0.2719 | -0.2162 | -0.3228 |         |
| 1PA4 | O1N  | 254 | -0.233 | 0.647 | 8.467-0.0522 | 0.2466  | -0.5262 |         |
| 1PA4 | C4N  | 255 | -0.049 | 0.904 | 8.684-0.0442 | 0.2026  | -0.1059 |         |
| 1PA4 | O4N  | 256 | 0.067  | 0.974 | 8.636-0.1304 | 0.4713  | 0.0757  |         |
| 1PA4 | HO4N | 257 | 0.14   | 0.92  | 8.6770.9776  | 0.8627  | -1.3195 |         |

|      |      |     |        |       |              |         |         |
|------|------|-----|--------|-------|--------------|---------|---------|
| 1PA4 | C3N  | 258 | -0.017 | 0.756 | 8.6690.2695  | 0.2241  | 0.3146  |
| 1PA4 | O3N  | 259 | 0.102  | 0.717 | 8.7380.0217  | -0.0235 | 0.6024  |
| 1PA4 | HO3N | 260 | 0.13   | 0.625 | 8.711-0.5584 | 0.0833  | -0.4046 |
| 1PA4 | C2N  | 261 | -0.141 | 0.672 | 8.697-0.0827 | 0.5529  | -0.2265 |
| 1PA4 | C5O  | 262 | -0.208 | 0.331 | 8.931-0.3734 | -0.4233 | -0.3351 |
| 1PA4 | O5O  | 263 | -0.239 | 0.446 | 8.85 -0.1421 | 0.1664  | 0.3957  |
| 1PA4 | C1O  | 264 | -0.182 | 0.562 | 8.9130.2149  | 0.2576  | -0.0863 |
| 1PA4 | O1O  | 265 | -0.191 | 0.679 | 8.831-0.2142 | 0.1132  | -0.2509 |
| 1PA4 | C6N  | 266 | -0.205 | 1.081 | 8.615-0.7862 | 0.1933  | -0.3797 |
| 1PA4 | C4O  | 267 | -0.299 | 0.334 | 9.0530.0727  | 0.1358  | -0.0092 |
| 1PA4 | O4O  | 268 | -0.258 | 0.226 | 9.138-0.2879 | -0.0664 | -0.0875 |
| 1PA4 | HO4O | 269 | -0.329 | 0.221 | 9.208-1.0836 | 0.6361  | -0.8331 |
| 1PA4 | C3O  | 270 | -0.255 | 0.46  | 9.125-0.0784 | 0.6249  | -0.7632 |
| 1PA4 | O3O  | 271 | -0.339 | 0.488 | 9.2380.4402  | -0.5476 | -0.0768 |
| 1PA4 | HO3O | 272 | -0.318 | 0.576 | 9.28 0.0854  | -0.2163 | -0.5834 |
| 1PA4 | C2O  | 273 | -0.259 | 0.587 | 9.041-0.6763 | 0.659   | -0.689  |
| 1PA4 | O2O  | 274 | -0.197 | 0.696 | 9.11 0.1514  | -0.2369 | 0.015   |
| 1PA4 | HO2O | 275 | -0.207 | 0.789 | 9.0730.3444  | 0.0677  | 0.7044  |
| 1PA4 | C6O  | 276 | -0.223 | 0.197 | 8.862-0.112  | -0.5166 | -0.2102 |
| 1PA4 | O6O  | 277 | -0.163 | 0.15  | 8.74 0.2981  | 0.2674  | -0.3144 |
| 1PA4 | HO6O | 278 | -0.199 | 0.061 | 8.7141.6063  | -1.0303 | 1.9735  |

## APÊNDICE E – ANÁLISE TEMPORAL

## E.1 Sistema com 800ns de simulação

Tem-se por objetivo a comparação dos valores obtidos nas análises de cada um dos parâmetros selecionados nos sistemas SPC-PME, SPC/E-PME e suas duplicatas.

Tabela 15 – Representação temporal cumulativa para a análise  $A_L$  em presença de SPC-PME e SPC/E-PME no sistema LPS/DPPE e contra-íons  $Ca^{2+}$

|       | $A_L$      |            |
|-------|------------|------------|
|       | SPC-PME    | SPC/E-PME  |
| 100ns | 1,53(0,01) | 1,50(0,02) |
| 200ns | 1,54(0,01) | 1,51(0,02) |
| 300ns | 1,54(0,01) | 1,52(0,02) |
| 400ns | 1,54(0,01) | 1,52(0,02) |
| 500ns | 1,54(0,01) | 1,52(0,02) |
| 600ns | 1,54(0,01) | 1,53(0,02) |
| 700ns | 1,54(0,01) | 1,53(0,02) |
| 800ns | 1,54(0,01) | 1,53(0,02) |

Tabela 16 – Representação temporal a cada 100ns para a análise  $A_L$  em presença de SPC-PME e SPC/E-PME no sistema LPS/DPPE e contra-íons  $Ca^{2+}$

|           | $A_L$        |            |
|-----------|--------------|------------|
|           | SPC-PME      | SPC/E-PME  |
| 0-100ns   | 1,53(0,01)   | 1,50(0,02) |
| 100-200ns | 1,55(0,01)   | 1,52(0,01) |
| 200-300ns | 1,55(0,01)   | 1,53(0,01) |
| 300-400ns | 1,54(0,01)   | 1,54(0,01) |
| 400-500ns | 1,540(0,008) | 1,54(0,01) |
| 500-600ns | 1,534(0,009) | 1,54(0,01) |
| 600-700ns | 1,53(0,01)   | 1,55(0,01) |
| 700-800ns | 1,53(0,009)  | 1,55(0,01) |

Tabela 17 – Representação temporal cumulativa para a análise  $D_{HH}$  em presença de SPC-PME e SPC/E-PME no sistema LPS/DPPE e contra-íons  $Ca^{2+}$

|       | $D_{HH}$   |            |
|-------|------------|------------|
|       | SPC-PME    | SPC/E-PME  |
| 100ns | 3,18(0,01) | 3,20(0,03) |
| 200ns | 3,18(0,01) | 3,20(0,02) |
| 300ns | 3,17(0,01) | 3,17(0,02) |
| 400ns | 3,17(0,01) | 3,18(0,02) |
| 500ns | 3,18(0,02) | 3,18(0,02) |
| 600ns | 3,18(0,02) | 3,17(0,02) |
| 700ns | 3,18(0,02) | 3,17(0,02) |
| 800ns | 3,18(0,02) | 3,17(0,02) |

Tabela 18 – Representação temporal cumulativa para a análise "Order" em presença de SPCPME e SPC/E-PME no sistema LPS/DPPE e contra-íons  $Ca^{2+}$

|       | Order        |              |
|-------|--------------|--------------|
|       | SPC-PME      | SPC/E-PME    |
| 100ns | 0,913(0,005) | 0,906(0,008) |
| 200ns | 0,913(0,005) | 0,910(0,007) |
| 300ns | 0,912(0,005) | 0,910(0,007) |
| 400ns | 0,913(0,005) | 0,910(0,007) |
| 500ns | 0,912(0,005) | 0,912(0,007) |
| 600ns | 0,913(0,005) | 0,914(0,008) |
| 700ns | 0,913(0,005) | 0,916(0,009) |
| 800ns | 0,913(0,005) | 0,918(0,01)  |

Tabela 19 – Representação temporal a cada 100ns para a análise  $D_{HH}$  em presença de SPC-PME e SPC/E-PME no sistema LPS/DPPE e contra-íons  $Ca^{2+}$

| <i>DHH</i> |            |            |
|------------|------------|------------|
|            | SPC-PME    | SPC/E-PME  |
| 0-100ns    | 3,18(0,01) | 3,20(0,03) |
| 100-200ns  | 3,17(0,01) | 3,19(0,02) |
| 200-300ns  | 3,17(0,01) | 3,17(0,02) |
| 300-400ns  | 3,19(0,01) | 3,17(0,01) |
| 400-500ns  | 3,20(0,01) | 3,16(0,02) |
| 500-600ns  | 3,19(0,01) | 3,16(0,01) |
| 600-700ns  | 3,20(0,01) | 3,15(0,01) |
| 700-800ns  | 3,19(0,01) | 3,15(0,01) |

Tabela 20 – Número de coordenação do  $Ca^{2+}$ -OW na primeira camada de solvatação a cada 100ns de simulação.

| RDF $Ca^{2+}$ -OW |             |            |
|-------------------|-------------|------------|
|                   | SPC-PME     | SPC/E-PME  |
| 100ns             | 6,14(0,06)  | 5,2(0,4)   |
| 200ns             | 6,20(0,03)  | 5,8(0,1)   |
| 300ns             | 6,30(0,04)  | 6,20(0,08) |
| 400ns             | 6,39(0,02)  | 6,34(0,03) |
| 500ns             | 6,38(0,02)  | 6,40(0,03) |
| 600ns             | 6,39(0,01)  | 6,46(0,04) |
| 700ns             | 6,393(0,02) | 6,58(0,03) |
| 800ns             | 6,45(0,02)  | 6,64(0,01) |

Tabela 21 – Número de coordenação do  $Ca^{2+}$ - $PO_4$  na primeira camada de solvatação a cada 100ns de simulação.

| RDF $Ca^{2+}$ - $PO_4$ |              |            |
|------------------------|--------------|------------|
|                        | SPC-PME      | SPC/E-PME  |
| 100ns                  | 1,00(0,04)   | 1,33(0,1)  |
| 200ns                  | 0,94(0,02)   | 1,02(0,05) |
| 300ns                  | 0,89(0,02)   | 0,82(0,04) |
| 400ns                  | 0,82(0,01)   | 0,76(0,02) |
| 500ns                  | 0,82(0,01)   | 0,74(0,02) |
| 600ns                  | 0,805(0,008) | 0,70(0,02) |
| 700ns                  | 0,80(0,02)   | 0,64(0,02) |
| 800ns                  | 0,76(0,01)   | 0,61(0,01) |

Tabela 22 – Número de coordenação do OW-OW na primeira camada de solvatação a cada 100ns de simulação.



| RDF OW-OW |              |               |
|-----------|--------------|---------------|
|           | SPC-PME      | SPC/E-PME     |
| 100ns     | 3,583(0,002) | 3,607(0,002)  |
| 200ns     | 3,581(0,002) | 3,607(0,002)  |
| 300ns     | 3,582(0,002) | 3,61(0,002)   |
| 400ns     | 3,584(0,002) | 3,612(0,002)  |
| 500ns     | 3,582(0,002) | 3,614 (0,002) |
| 600ns     | 3,582(0,002) | 3,62(0,002)   |
| 700ns     | 3,583(0,002) | 3,615(0,002)  |
| 800ns     | 3,585(0,002) | 3,62(0,002)   |

Tabela 23 – Número de coordenação do OW-PO<sub>4</sub> na primeira camada de solvatação a cada 100ns de simulação.

| RDF OW-PO <sub>4</sub> |                |                |
|------------------------|----------------|----------------|
|                        | SPC-PME        | SPC/E-PME      |
| 100ns                  | 0,0865(0,0008) | 0,0774(0,003)  |
| 200ns                  | 0,0873(0,0004) | 0,082(0,0009)  |
| 300ns                  | 0,0876(0,0005) | 0,084(0,0007)  |
| 400ns                  | 0,088(0,0005)  | 0,086(0,0008)  |
| 500ns                  | 0,088(0,0006)  | 0,0847(0,0005) |
| 600ns                  | 0,088(0,0006)  | 0,0865(0,0005) |
| 700ns                  | 0,088(0,0006)  | 0,086(0,0005)  |
| 800ns                  | 0,088(0,0006)  | 0,086(0,0005)  |

## ANEXO A – PUBLICAÇÕES E EVENTOS

### A.1 Publicações

Lima, M. P., Nader, M., Santos, D. E., Soares, T. A. (2019). Compatibility of GROMOSDerived 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*, 30(10), 2219-2230.

### F.2 Eventos

XLIV Congress of the Brazilian Biophysical Society. A Comparative Study of Simulations of Lipopolysaccharide and Atom-based Charge Schemes. Santos, 2019.

V Congresso Regional da Sociedade Brasileira de Biofísica. Compatibilidade de parâmetros do campo de força GROMOS para lipopolissacarídeo com modelo de água SPC/E, raio de corte simples para termos não-ligados e cargas atômicas.