



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Química Fundamental
Programa de Pós-Graduação em Química

Tese de Doutorado

A Influência de Cátions na Membrana de Lipopolissacarídeos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Agrinaldo Jacinto do Nascimento Junior

Recife-PE Brasil

Dezembro / 2013



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

A Influência de Cátions na Membrana de Lipopolissacarídeos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Agrinaldo Jacinto do Nascimento Junior*

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Química da UFPE como parte dos
requisitos necessários para a obtenção
do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Dias Lins Neto

Co-orientadora: Profa. Dra. Thereza Amélia Soares da Silva

***Bolsista CAPES**

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

Nascimento Júnior, Agrinaldo Jacinto do.
A influência de cátions na membrana de
lipopolissacarídeos de pseudomonas aeruginosa PAO1. /
Agrinaldo Jacinto Nascimento Júnior. – Recife: O Autor,
2013.

106f.: fig.

Orientador: Roberto Dias Lins Neto.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de
Pernambuco. CCEN. Química fundamental , 2013.
Inclui referências e apêndice.

1. Dinâmica molecular. 2. Físico Química. 3.
Lipopolissacarídeos. 4. Cátions. I. Lins Neto, Roberto
Dias. (orientador). II. Título.

547 (22. ed.)

FQ 2014-12

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

Aprovada:

Prof. Roberto Dias Lins Neto (Orientador)

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Marcelo Zaldini Hernandes

Departamento de Farmácia
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Marcos Antonio de Moraes

Departamento de Genética
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Alfredo Mayall Simas

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Luiz Carlos Gomide Freitas

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Universidade Federal de São Carlos

"A Influência de Cátions na Membrana de Lipopolissacarídeos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1"

Por

Agrinaldo Jacinto do Nascimento Junior

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

19 de Dezembro de 2013

*Dedico a Deus, o Criador da vida e a minha
família.*

Agradeco

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Dias Lins Neto não apenas pelas excelentes ideias e discussões sempre esclarecedoras, otimistas e cruciais para a conclusão deste trabalho, mas também pelo exemplo *sui generis* de humanidade e liderança sempre buscando com eficácia fornecer um bom ambiente de trabalho e apoio em diferentes situações que me ajudaram a buscar motivação para produzir a tese e no meu amadurecimento como pesquisador e cidadão.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Thereza Amélia Soares por toda sua dedicação, contribuições de alto valor para que as simulações fossem realizadas e ainda pelo grande auxílio no processo da tradução dos dados obtidos nas análises das simulações em informações relevantes redigidas no artigo em anexo. Agradeço ainda pelas valiosas lições e conselhos.

Ao companheiro de grupo Fred Pontes, por toda contribuição prestada diretamente no trabalho, pelas discussões e constante prestatividade.

Ao Prof. Dr. Klaus Brandenburg por ter cedido gentilmente às cópias de artigos, sobre membranas de lipopolissacarídeos, não disponíveis nos periódicos assinados pela CAPES.

Aos companheiros de grupo, o biólogo Rafael Maia e o biomédico Janilson da Silva Jr. por me ajudarem a compreender conceitos biológicos relacionados ao lipopolissacarídeo e sua atividade como antígeno.

À minha amiga Ana Carolina Santos Albuquerque por toda dedicação, incentivo e suporte prestado, crucial para o término deste trabalho.

Aos integrantes do Grupo *Biomaterial Modeling Group* (BIOMAT) que contribuíram dando suporte técnico ao cluster Barolo, e interagiram em algum momento sugerindo alterações no texto ou ainda nos slides da apresentação auxiliando na melhoria do trabalho tanto no aspecto estético quanto no conteúdo em si do trabalho.

Aos meus estimados amigos Marcelo B. Pereira, Josivandro do N. Silva e Fernanda Lira, pelo agradável convívio, apoio, trocas de ideias e de experiências que contribuíram para um estado de espírito criativo, importante para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao prof. Dr. Ernani Abicht Basso por ter me iniciado na pesquisa no Grupo de Estereoquímica de Compostos Orgânicos (ECO), em particular ao prof. Dr. Rodrigo Meneghetti Pontes por ter me apresentado a Química Teórica e por sua amizade, ainda agradeço aos demais professores da Universidade Estadual de Maringá (UEM) que participaram de minha formação.

Ao prof. Dr. Alfredo Mayall Simas e demais membros do Laboratório de Arquitetura Molecular (LAM) por somar boas experiências a minha formação científica, importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao prof. Dr. Ricardo de Carvalho Ferreira (*in memoriam*) pelos diálogos inspiradores, sua humanidade e por ter me recomendado trabalhar com seus ex-alunos, Dr. Roberto D. Lins Neto e Dra. Thereza A. Soares.

Aos colegas do Laboratório de Química Teórica e Computacional (LQTC), professores e funcionários do Departamento de Química Fundamental (DQF) que auxiliaram no término deste trabalho de alguma maneira.

Aos amigos distantes que me ajudaram direta ou indiretamente com este trabalho.

Ao INAMI, pelos auxílios, a FACEPE e CAPES pela bolsa concedida.

Ao *Environmental Molecular Sciences Laboratory* (EMSL), laboratório norte-americano aonde as simulações de dinâmica molecular foram realizadas, mantido pelo Departamento de Energia de pesquisas na área ambiental e biológica, localizado no Pacific Northwest National Laboratory (PNNL).

“Não devemos, portanto, sentir-nos desencorajados pela dificuldade de interpretar a vida a partir das leis comuns da física. Pois dificuldade é justamente o que se deve esperar do conhecimento que adquirimos da estrutura da matéria viva. Devemos estar preparados para um novo tipo de lei física. Ou devemos dizer uma lei não-física para não dizer superfísica?”

Schrödinger, Erwin¹

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – EM A, APRESENTAMOS UM ESQUEMA GENÉRICO DA MEMBRANA DE BACTÉRIA GRAM-NEGATIVA E EM B UMA GRAM-POSITIVA. AS BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS POSSUEM UMA CAMADA DE PEPTIDOGLICANO MAIS FINA DO QUE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E ALÉM DISSO, APRESENTAM UMA MEMBRANA EXTERNA COMPOSTA DE LIPOPOLISSACARÍDEOS.	24
FIGURA 2 – FORMULA ESTRUTURAL DO LIPÍDEO A PENTAACILADO DE <i>P. AERUGINOSA</i>	26
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DA UNIDADE DE KDO LIGADA AO GLCN.....	27
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MEMBRANA LAMELAR GENÉRICA NAS FASES GEL (L_B) E LÍQUIDO-CRISTALINA (L_A).	31
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO DE UMA MOLÉCULA CONSTITUÍDA DOS ÁTOMOS HIPOTÉTICOS A, B, C E D E SEUS ÂNGULOS.	36
FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DE UM DIEDRO FORMADO NA MOLÉCULA CONSTITUÍDA DOS ÁTOMOS HIPOTÉTICOS A, B, C E D.	37
FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO DE UM DIEDRO IMPRÓPRIO FORMADO NA MOLÉCULA CONSTITUÍDA DOS ÁTOMOS HIPOTÉTICOS A, B, C E D.....	38
FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO DAS INTERAÇÕES DE VAN DER WAALS.....	39
FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO DA INTERAÇÃO DE COULOMB.	41
FIGURA 10 –REPRESENTAÇÃO DA CAIXA DE SIMULAÇÃO DE FUNDO CINZA DE DIMENSÕES LxL E SUAS RÉPLICAS IDENTIFICADA POR LETRAS MAIÚSCULAS. A REPRESENTA UM ÁTOMO DA MOLÉCULA DO SISTEMA E A CIRCUNFERÊNCIA E O RAIO INDICADO POR RC, O RAIO DE CORTE.	47
FIGURA 11 – REPRESENTAÇÃO DOS INSTANTES AONDE SÃO CALCULADOS A VELOCIDADE E A POSIÇÃO DOS ÁTOMOS USANDO O ALGORITMO DE INTEGRAÇÃO DAS EQUAÇÕES DE MOVIMENTO <i>LEAP-FROG</i>	51
FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS MOLÉCULAS CONSTITUINTES DE UMA UNIDADE DE LIPOPOLISSACARÍDEO DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> DA CEPA PAO1. AS SIGLAS ACIMA FORAM USADAS PARA IDENTIFICAR OS RESÍDUOS DO LPS NA EXTENSÃO DO CAMPO DE FORÇA GLYCAM06 PARAMETRIZADA PARA MEMBRANA DE LIPOPOLISSACARÍDEO ⁵⁶ . A SEGUIR APRESENTAMOS A NOMENCLATURA FORMAL DENOTADA NAS SIGLAS: LP1, ÁCIDO DODECANOIL (12:0) ; LP2, ÁCIDO 3-HIDROXIDECANOIL (10:0); PO4, FOSFATO; XYA, 3-(ACETIL AMINO)-3-DEOXY-D-GLICOSE; 3H1, L-GLICERO-D-MANO-HEPTOSE -7-FORMAMIDA; SYB, VARANTE DA 3-(ACETIL AMINO)-3-DEOXY-D-GLICOSE; PH2, 2-(2-HIDROXIETIL)-6-DEOXI-D-MANO-HEPTOSE; WLL, 2-(2-L-ALANIL)-2-DEOXI-D-GALACTOSAMINA; OKO, ÁCIDO 3-DEOXI-D-MANO-OCT-2-ULOSÔNICO; LKO, VARIANTE DO ÁCIDO 3-DEOXI-D-MANO-OCT-2-ULOSÔNICO; 6GA, 6-A-D-GLUCOSE; 6GB, 6-B-D-GLUCOSE; 0GA, O-A-D-GLUCOSE ; 0GB, O-B-D-GLUCOSE; 2HA, 2-A-L-RAMNOSE.....	60
FIGURA 13 – GRÁFICOS DO POTENCIAL DE LENNARD JONES- 6-12, COULOMB E POTENCIAL TOTAL NÃO LIGADO DAS INTERAÇÕES DOS CÁTIOS K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} COM O O DE H_2O DO MODELO TIP3P UTILIZANDO OS PARÂMETROS Σ E E DO CAMPO DE FORÇA AMBER99.	62
FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA BICAMADA CONSTITUÍDA DE LPS E DPPE EM MEIO AQUOSO NA PRESENÇA DE CÁTIOS.	64
FIGURA 15 – REPRESENTAÇÃO BIDIMENSIONAL DA INTERAÇÃO DA PARTÍCULA DE REFERÊNCIA I, NA COR AZUL CENTRADA NA FIGURA COM SEU AMBIENTE.AS PARTÍCULAS DO TIPO J ESTÃO REPRESENTADO NA COR ROSA. O TERMO R REPRESENTA O RAIO COM ORIGEM NA PARTÍCULA I E ΔR É O ACRÉSCIMO RADIAL.....	69
FIGURA 16 – ESQUEMA REPRESENTANDO O ÂNGULO θ_z FORMADO ENTRE O EIXO Z DO SISTEMA DA BICAMADA É O EIXO Z DO SISTEMA CARTESIANO DEFINIDO NO ÁTOMO DE CARBONO DO TIPO CH_2	71
FIGURA 17 – REPRESENTAÇÃO DAS DIMENSÕES DO PLANO X E Y DA MONOCAMADA DE LPS E O RETÂNGULO PRETO RESTRINGE A UNIDADE DE LPS EM LARANJA.	72

FIGURA 18 – GRÁFICOS DO PERFIL DE DENSIDADE EM TERMOS DA MASSA E EM FUNÇÃO DO EIXO Z DA CAIXA DE SIMULAÇÃO CONSIDERANDO OS ÚLTIMOS 70 NS DA DINÂMICA. O GRÁFICO QUE REPRESENTA BICAMADA EM PRESENÇA DE K^+ APRESENTOU UM COMPORTAMENTO DIFERENCIADO DOS DEMAIS INDICANDO MUDANÇA ESTRUTURAL.....	74
FIGURA 19 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS CONFIGURAÇÕES NAS BICAMADAS ALCANÇADAS AO FINAL DE 210 NS DE SIMULAÇÃO. CADA BICAMADA SOFRE A INFLUÊNCIA DE APENAS UM TIPO DE ÍON. A SEGUIR DISPONHOS, A REFERÊNCIA DA CAIXA NA FIGURA MAIS O TIPO DE ÍON PRESENTE : (A), K^+ ; (B), Na^+ ; (C), Ca^{2+} ; (D), Mg^{2+} ; (E), Zn^{2+} ; (F), Ba^{2+}	77
FIGURA 20 – GRÁFICOS DA FUNÇÃO DISTRIBUIÇÃO RADIAL DE PARES. A COLUNA DE GRÁFICOS À ESQUERDA REPRESENTA MELHOR AS INTENSIDADES DAS FUNÇÕES DAS DISTRIBUIÇÕES RADIAIS PARA OS DIFERENTES PARES. JÁ A COLUNA DA DIREITA APRESENTA OS GRÁFICOS NUMA MESMA ESCALA.	80
FIGURA 21 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE POLIEDROS DE COORDENAÇÃO COM OS ÍONS Na^+ (A) E Zn^{2+} (B). O Na^+ NÃO INTERAGE TÃO ESPECIFICAMENTE COM O LPS QUANTO O Zn^{2+}	83
FIGURA 22 - REPRESENTAÇÃO DE UMA UNIDADE DE LPS E SEU AMBIENTE QUÍMICO APÓS 210 NS DE SIMULAÇÃO. ESFERAS DE COORDENAÇÃO E REDE DE HIDRATAÇÃO NA UNIDADE DE LPS NA PRESENÇA DOS ÍONS Ba^{2+} A UMA DISTÂNCIA MÍNIMA DE 0.3 NM DA UNIDADE DE LPS E A SUA ESFERA DE HIDRATAÇÃO.....	84
FIGURA 23 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS CADEIAS ALQUIL DO LPS. AS LETRAS (A) E (B) REPRESENTAM AS CADEIAS APOLARES DO LP1 E AQUI CHAMAMOS SN2 E SN1 RESPECTIVAMENTE ENQUANTO A LETRA (C) A PARTE APOLAR DO LP2 QUE CONVENCIONAMOS CHAMAR SN3.	86
FIGURA 24 – GRÁFICOS DAS ANÁLISES DOS PARÂMETROS DE ORDEM EM FUNÇÃO DOS ÁTOMOS DAS CADEIAS ALQUIL DO LIPÍDIO A: (A) SN1; (B) SN2; E (C) SN3. OS GRÁFICOS ESTÃO NA MESMA ESCALA, UMA VEZ QUE O INTERVALO PROJETADO NO EIXO DO PARÂMETRO DE ORDEM É DE 0.13. AS CADEIAS ALQUIL SN2 E SN3 NA PRESENÇA DO Zn^{2+} APRESENTARAM OS MAIORES VALORES DE PARÂMETROS DE ORDEM.	87
FIGURA 25 – GRÁFICO DA ÁREA POR LIPOPOLISSACARÍDEO EM FUNÇÃO DO TEMPO. O TEMPO TOTAL SIMULADO FOI DE 210 NS.	90

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – RAO IÔNICO EXPERIMENTAL (R)	34
TABELA 2 -VALORES DOS RAIOS DE VAN DER WAALS, Σ , E PROFUNDIDADE DO POÇO E_{ij} , DO POTENCIAL DE LENNARD-JONES 6-12 PARA O CAMPO DE FORÇA AMBER/GLYCAM	61
TABELA 3 - VALORES DOS RAIOS DE VAN DER WAALS, Σ_{ij} , E PROFUNDIDADE DO POÇO E_{ij} , DO POTENCIAL DE LENNARD-JONES 6-12 PARA O CAMPO DE FORÇA AMBER/GLYCAM, CONSIDERANDO I COMO SENDO O CÁTION E J O ÁTOMO DE O DE H ₂ O DO MODELO TIP3P.	61
TABELA 4 -NÚMERO DE MOLÉCULAS OU CÁTIONS E ÁTOMOS PRESENTES NAS CAIXAS DE SIMULAÇÃO CONTENDO LPS, DPPE E ÁGUA NA PRESENÇA DOS CÁTIONS MONOVALENTES (M^+) OU DIVALENTES (M^{2+}).....	65
TABELA 5 – NÚMERO DE COORDENAÇÃO DE PARES ATÔMICOS ENTRE: H ₂ O, PO ₄ ⁻ E COO ⁻ , E OS RESPECTIVOS ÍONS: NA ⁺ , MG ²⁺ , K ⁺ , CA ²⁺ , ZN ²⁺ E BA ²⁺	82
TABELA 6 – VALORES MÉDIOS DO S _{CD} DE POR CADEIA E DAS CADEIAS ALQUIL POR SISTEMA INDICADOS PELO TIPO DE CÁTION PRESENTE.	88

LISTA DE SIGLAS:

0GA -	O- α -D-glucose;
0GB -	O- β -D-glucose;
0KO -	Ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosônico;
2ha -	2- α -L-ramnose;
3H1 -	L-glicero-d-mano-heptose -7-formamida;
6GA -	6- α -D-glucose;
6GB -	6- β -D-glucose;
BF -	Modelo de H ₂ O Bernal-Fowler;
Dha -	Ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heptulosárico;
DM -	Dinâmica Molecular Clássica;
DPPE -	1-2,dipalmitoyl-3-phosphatidyl-ethanolamine;
DSC -	Calorimetria Diferencial de Varredura;
EM -	Espectroscopia de Massa;
EMSL -	<i>Environmental Molecular Sciences Laboratory</i> ;
FTIR -	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier;
FTIR-ATR -	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier e Reflectância Total Atenuada;
Gal -	Galactose;
g_density -	Programa do GROMACS que calcula a densidade parcial de um grupo constituinte qualquer através de um eixo da caixa de simulação;
GIXF -	Fluorescência de raio x de incidência rasante;
Glc -	Glicose;
GlcN -	2-amino-2-deoxi-D-glucose;
g_order -	Programa do GROMACS que calcula o parâmetro de ordem por átomo de carbono das cadeias alquil.
g_rdf -	Programa do GROMACS que calcula a função da distribuição radial dos pares;

GROMACS - Pacote utilizado para realizar a dinâmica molecular e as suas análises.

Hep -	L-glicero-D-mano-heptose;
KDO -	ácido 2-Ceto-3-Deoxi-D-mano-Octulosônico;
Ko -	D-glicero-D-talo-oct-2-ulosônico;
L -	Estado de agregação lamelar;
LKO -	Variante do ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosônico;
LPS -	Lipopolissacarídeo;
LP1 -	ácido dodecanoil (12:0);
LP2 -	ácido 3-hidroxidecanoil (10:0);
L_{α} -	Fase lamelar líquido cristalino;
L_{β} -	Fase lamelar gel;
M^{+}	Cátions monovalentes;
M^{2+}	Cátions divalentes;
MM -	Mecânica molecular clássica;
NAG -	N-Acetil-D-Glicosamina;
NAGal -	N-Acetil-Galactosamina;
NAM -	ácido N-Acetilmurânico;
NVT -	Número de partículas(N), volume da caixa (V) e temperatura (T) constantes;
NTP -	Número de partículas(N), temperatura (T) e pressão (P) constantes;

P. aeruginosa - *Pseudomonas Aeruginosa*;

PBMC -	Cultura de células mononucleares de sangue periférico;
PH2 -	2-(2-hidroxietil)-6-deoxi-D-mano-heptose;
PO4 -	Fosfato;
RMN -	Ressonância magnética nuclear;
SN1 -	Cadeia alquil do lipídio A contendo 9 átomos de C;
SN2 -	Cadeia alquil do lipídio A contendo 11 átomos de C;
SN3 -	Cadeia alquil do lipídio A contendo 7 átomos de C;
SPC -	Modelo de H ₂ O <i>simple point charge</i> ;
SYB -	Variante da 3-(acetil amino)-3-deoxy-D-glicose;

TLR4 -	Proteína Toll-like receptors 4;
VMD -	Programa <i>Visual Molecular Dynamics</i> ;
WAXS -	Espalhamento de raio X em ângulo alto;
WLL-	2-(2-L-alanil)-2-deoxi-D-galactosamina;
XYA -	3-(acetil amino)-3-deoxy-D-glicose;

LISTA DE SÍMBOLOS:

$4\pi r^2 \Delta r$ -	Elemento de volume da camada esférica;
$\vec{a}$ -	Aceleração;
A_C -	Área por lipopolissacarídeo;
C_{ij} -	Número de primeiros vizinhos j a partir do elemento i de referência;
C_{n-1} -	Carbono anterior ao carbono de referência C_n da cadeia alquil do lipídio A;
C_n	Carbono de referência C_n do tipo CH_2 da cadeia alquil do lipídio A;
C_{n+1}	Carbono posterior ao carbono de referência C_n da cadeia alquil do lipídio A;
d -	Distância de ligação química;
d_0 -	Distância de equilíbrio da ligação química;
D_n	É a constante do potencial Ryckaert- Bellemans;
$\bar{E}$ -	Energia cinética média dos átomos;
E -	Energia cinética média;
$g_{ij}(r)$ -	Função de distribuição radial dos pares de átomo i e j ;
h -	Altura;
i -	Índice do átomo;
j -	Índice do átomo;
K_d -	Constante elástica da ligação química;
K_χ e K_h -	Constantes elásticas de diedro impróprio em termos de ângulo ou altura;
K_θ -	Constante elástica angular;
$N_{ij}(r, r+\Delta r)$	número médio de átomos j encontrados na camada esférica de extensão r e $r + \Delta r$ centrada nos átomos de referência i ;
L_y -	Comprimento da membrana no sentido do eixo Y da caixa de simulação;
L_x -	Comprimento da membrana no sentido do eixo X da caixa de simulação;
m -	Massa;
N	É o número de graus de liberdade;

N -	O número total de unidades de LPS na caixa de simulação;
n -	Multiplicidade;
p -	Momento;
P-	Pressão;
P_0 -	Pressão de referência;
q_i -	Carga do átomo i;
q_j -	Carga do átomo j;
q_o -	Carga do átomo de oxigênio;
q_h -	Carga do átomo de hidrogênio;
$\mathbf{r}_0$ -	Posição inicial dos átomos da caixa de simulação;
r_{ij} -	Distância entre os átomos i e j;
r_c -	Raio de corte;
$\vec{r}_i$ -	Representa a posição do átomo i;
S_{CD} -	Parâmetro de ordem;
T -	Temperatura;
T_0 -	Temperatura de referência;
t -	Tempo;
T_m -	Temperatura de transição da fase gel para líquido-cristalino;
V-	Volume
$\mathbf{v}_0$ -	Velocidade inicial dos átomos da caixa de simulação;
V_C -	Potencial de Coulomb;
V_{Ccr} -	Potencial de Coulomb com campo de reação,.
V_{Intra} -	Potencial das interações intramoleculares;
V_{Inter} -	Potencial das interações intermoleculares;
V_{LJ} -	Potencial de Lennard- Jones 6-12;
V_ϕ -	Potencial de torção;
V_d -	Potencial harmônico de ligação;

V_{χ} ou V_h -	Potencial diedral impróprio;
V_{θ} -	Potencial harmônico angular;
V_n -	Altura da barreira de energia torcional;
Δt -	Incremento temporal;
Δr -	Incremento espacial;
$\vec{v}_l$ -	Velocidade;
ε -	Constante dielétrica do meio;
ε_0 -	Constante da permissividade no vácuo;
ε_{cr} -	Constante dielétrica após a região do raio de corte;
ε_{ij} -	Profundidade do poço da energia potencial do potencial Lennard-Jones 6-12;
θ -	Ângulo da ligação química;
θ_z -	Ângulo entre o eixo Z da caixa de simulação e o eixo atômico Z
φ -	Ângulo diedral próprio;
χ -	Ângulo diedral impróprio;
θ_0 -	Ângulo de equilíbrio;
θ_Z -	Representa o ângulo entre o eixo Z da caixa de simulação e o eixo molecular Z;
κ_B -	Constante de Boltzmann;
λ -	Fator de escalonamento;
ρ_j -	densidade numérica média do átomo j no líquido;
σ_{ij} -	raio de van der Waals entre os átomos i e j;
β -	Compressibilidade isotérmica do sistema;
φ -	Ângulo de diedro;
σ_{ij} -	Raio de van der Waals;
$\nu_s(\text{CH}_2)$	Frequência de vibração simétrica do grupo metila;
$\nu_{ass}(\text{CH}_2)$	Frequência de vibração assimétrica do grupo metila;
τ -	Parâmetro de acoplamento;
ψ	Fator de fase.

RESUMO

A membrana externa de bactérias Gram- negativas é constituída majoritariamente de lipopolissacárideo (LPS) e fosfolipídeo. Cada unidade de LPS é constituída por até três partes, o lipídeo A, o *Core* e outra nem sempre presente chamada antígeno-O. O lipídeo A tem um maior caráter apolar, embora possua grupos fosfatos. Já o core é a região mais carregada do LPS e possui não apenas açúcares fosforilados, mas também carboxilados. Desta maneira, a superfície da membrana de LPS é negativa e a interação com os cátions necessária para neutralizar a carga da membrana. Por isso, estas membranas possuem alta capacidade em adsorver cátions e assim são candidatas a serem utilizadas como agente biorremediadores, na captura por exemplo de radionuclídeos. Numa perspectiva de saúde, o LPS atua como um antígeno para o sistema imunológico de mamíferos e a sua ação pode auxiliar a causar não apenas febre, mas até levar a morte indivíduos imunocomprometidos. A bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* é um destes patógenos nosocomiais oportunistas e tem sido apontada como uma das principais responsáveis por provocar a morte de pacientes portadores de fibrose cística. A estrutura supramolecular das membranas de LPS afetam não apenas a sua permeabilidade, mas ainda a ativação do sistema imunológico do hospedeiro no momento da infecção. Para uma descrição a nível molecular da influência dos cátions, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} e Ba^{2+} na membrana de LPS utilizamos uma abordagem teórica baseada na dinâmica molecular clássica atômica. O modelo da membrana foi uma bicamada constituída de 72 unidades de LPS de *Pseudomonas aeruginosa* do quimiotipo PAO1 ancorados em 180 moléculas de 1,2-dipalmitoil-3-fosfatidiletanolamina (DPPE) considerando o pH = 7 e temperatura de 300K. Os resultados das análises das simulações indicaram que as membranas de LPS suportam um nível de hidratação maior do que as bicamadas de fosfolipídeos e além disso os cátions tendem a provocar a ligação cruzada entre as unidades de LPS. Ainda, o aumento do raio de hidratação dos cátions, bem como a diminuição da ligação cruzada entre as unidades de LPS tendem a promover a transição da membrana de um estado lamelar para não lamelar. Deste modo, os resultados sugerem que a escolha combinada da valência do cátion e sua capacidade relativa de coordenar os grupos fosfatos e moléculas de água podem servir como regra para modular propriedades das membranas de LPS como estrutura supramolecular, fluidez e hidratação.

Palavras-Chave: Membrana, Lipopolissacárideo, Cátions, *Pseudomonas aeruginosa*

ABSTRACT

The outer membrane of Gram-negative bacteria is mainly composed by lipopolysaccharide (LPS), and phospholipids. Each unit of LPS is composed of up to three parts, the lipid A, core and another not always present, the O-antigen. The lipid A has a nonpolar character, while possessing phosphate groups. The core is the most charged region of LPS and has not only phosphorylated sugars, but also carboxyl groups. Thus, the LPS membrane's surface is negative and its interaction with cations is required to neutralize the charge of the membrane. Therefore, these membranes have a high capacity for adsorbing cations and thus are candidates to be used as bioremediation agents, *e.g.*, capture of radionuclides. From a health perspective, bacterial LPS acts as an antigen to the immune system of mammals, even leading to death of immunocompromised individuals. Of special attention, the Gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic nosocomial pathogen and it has been identified as the main responsible for causing the death in patients with cystic fibrosis. The supramolecular structure of LPS membrane not only affects its permeability, but also the activation of the host's immune system at the infection time. To describe the influence of cations, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , and Zn^{2+} on the membrane of LPS in a molecular level, we have applied a theoretical approach based on atomistic classical molecular dynamics simulations. The membrane's model was a bilayer consisting of 72 units of LPS from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 chemotype anchored in 180 molecules of 1,2-dipalmitoyl-3-phosphatidyl-ethanolamine (DPPE), considering the pH = 7 and temperature of 300K. The simulations analyses indicated that the LPS membranes support a hydration level greater than phospholipids bilayers and moreover, the cations tend to cross-link LPS units. Also, increasing the radius of hydration of cations, as well as decreasing cross-linking between units of LPS tend to promote the transition of the membrane from a lamellar to non-lamellar state. Thus, the results suggest that the combined choice of ionic valence and hydration vs. LPS cross-linking can modulate properties of LPS membranes such as fluidity and supramolecular structure.

Palavras-Chave: Membrane, Lipopolysaccharide, Cations, *Pseudomonas aeruginosa*

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	21
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
2.1.	MEMBRANA DE BACTÉRIA GRAM-NEGATIVA	24
2.2.	OS CÁTIÓNS EM MEMBRANA DE LPS BACTERIANO.....	29
2.3.	MECÂNICA MOLECULAR	34
2.3.1.	POTENCIAL HARMÔNICO DE LIGAÇÃO.....	35
2.3.2.	POTENCIAL HARMÔNICO ANGULAR	36
2.3.3.	POTENCIAL DE TORÇÃO.....	37
2.3.4.	POTENCIAL DIEDRAL IMPRÓPRIO	38
2.3.5.	POTENCIAL DE LENNARD JONES	39
2.3.6.	POTENCIAL DE COULOMB	41
2.3.7.	CAMPO DE FORÇA.....	42
2.4.	DINÂMICA MOLECULAR CLÁSSICA	43
2.5.	SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR	45
2.5.1.	CAIXA DE SIMULAÇÃO E SUAS CONDIÇÕES	45
2.5.2.	INTERAÇÕES NÃO LIGADAS E DE LONGO ALCANCE	48
2.5.3.	SOLVENTE EXPLÍCITO	49
2.5.4.	EVOLUÇÃO TEMPORAL E O ALGORITMO <i>LEAP-FROG</i>	50
2.5.5.	TERMOSTATO DE BERENDSEN.....	52
2.5.6.	BAROSTATO DE BERENDSEN.....	54
2.6.	DINÂMICA MOLECULAR NO SISTEMA MEMBRANA DE LPS RUGOSO DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> -ÍON.....	56
3.	METODOLOGIA	64
3.1.	PROTOCOLO DA SIMULAÇÃO MOLECULAR	65
3.2.	ANÁLISE DE DADOS	67
3.2.1.	PERFIL DE DENSIDADE	67
3.2.2.	DISTRIBUIÇÃO RADIAL DE PARES.....	68
3.2.3.	PARÂMETRO DE ORDEM (S_{CD}).....	70
3.2.4.	ÁREA POR LIPOPOLISSACARÍDEO	72

4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1.	PERFIL DE DENSIDADE	73
4.2.	DISTRIBUIÇÃO RADIAL	79
4.3.	PARÂMETRO DE ORDEM	85
4.4.	ÁREA POR LIPOPOLISSACARÍDEO	89
5.	CONCLUSÃO.....	92
6.	PERSPECTIVA.....	93
	REFERÊNCIAS	95

1.INTRODUÇÃO

A membrana externa de bactérias Gram-negativas é majoritariamente constituída de moléculas de lipopolissacarídeos (LPS) ancorados em fosfolipídeos. O LPS é conhecido por ser um dos principais fatores de virulência em humanos e outros mamíferos, agindo como um antígeno fraco não específico pouco neutralizado por anticorpos. A grande quantidade de LPS presente nas colônias de bactérias Gram-negativas podem causar no hospedeiro choque séptico, febre e até levar à morte².

A *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia, baciliforme e pode ter como ambiente de origem tanto o solo quanto a água³. Esta bactéria é capaz de viver em ambientes hostis, principalmente quando presente nas colônias⁴⁻¹⁰. Pois, nestes arranjos constam canais aonde os nutrientes circulam¹¹ e chegam as bactérias, esta condição de habitat facilita a sobrevivência destes micro-organismos. As colônias de bactérias aderem a superfícies e podem se associar com fungos, algas e protozoários originando um complexo ecossistema denominado biofilme. A *P. aeruginosa*, ainda é conhecida como um patógeno nosocomial^{12,13} e oportunista, ataca principalmente pacientes imunocomprometidos¹⁴ podendo causar morbidez e ser letal principalmente para pacientes com fibrose cística^{15,16}.

A literatura ainda relata da existência de *P. aeruginosa* multirresistentes^{13,17} coletadas em esgotos de hospitais e leitos de rios³. A presença destas bactérias nestes ambientes pode estar relacionada ao fato do descarte descontrolado de antibióticos nas pias dos hospitais¹⁸. O mecanismo de seleção natural pode justificar esta resistência, quando consideramos que as bactérias que sobrevivem ao ataque dos antibióticos^{19,20} geram descendentes e logo constituem novas colônias². Existe uma gama de modelos sugeridos de mecanismos para explicar a resistência das bactérias Gram-negativas aos antibióticos evitando por exemplo a lise da membrana externa²¹⁻²³, muitos destes mecanismos ainda não são bem esclarecidos. O tratamento mais eficaz para os pacientes contaminados por biofilmes bacterianos tem sido a administração de uma combinação de antimicrobianos¹⁷, que são substâncias capazes de matar ou inibir o desenvolvimento destes micro-organismos. A razão da administração deste conjunto de antimicrobianos é porque nestes biofilmes pode haver diferentes subpopulações fenotípicas de bactérias⁶, assim alguns indivíduos podem ser resistentes a um determinado antimicrobiano, mas

1.INTRODUÇÃO

a outro não. O reconhecimento destas bactérias multirresistentes combinado aos efeitos adversos do organismo aos antibióticos, tem motivado os pesquisadores a tentar obter antimicrobianos menos agressivos e mais eficazes, como por exemplo os peptídeos antimicrobianos²⁴⁻²⁷.

A *P. aeruginosa* também contamina materiais cirúrgicos, ambientes hospitalares e soluções ministradas à pacientes. Algumas das técnicas utilizadas para combater a contaminação são: assepsia, esterilização de materiais cirúrgicos, uso de autoclaves e salas limpas. Além disso, outra alternativa é o uso de materiais que inibam a formação de biofilmes²⁸⁻³⁰. O biofilme de *P. aeruginosa* também é um problema na área tecnológica, pois em geral são as primeiras bactérias que formam colônia nas superfícies de metais e canos dos sistemas de resfriamento à base de água. Desta maneira, a colônia de *P. aeruginosa* fornece as condições necessárias de hábitat para outras bactérias, fungos e protozoários. A presença de biofilmes em sistemas de resfriamento a base de água pode resultar numa menor eficiência do processo de resfriamento, entupimento das tubulações ou ainda no aumento das corrosões e por consequência em vazamentos³¹. Desta maneira, os biofilmes aumentam os gastos com a manutenção destes sistemas hidráulico. Muitos dos antioxidantes utilizados nos reservatórios de água são à base de nitritos e muitas vezes ao invés de inibirem a oxidação dos canos acabam atuando como fonte de nutrientes para as bactérias³².

O estudo da morfologia³³⁻³⁷, propriedades físicas e químicas da membrana externa da *P. aeruginosa*^{38,39} pode ajudar o pesquisador a entender os mecanismos de resistência, formação e crescimento da colônia. Além disso, a compreensão das variáveis que influenciam as propriedades que governam a estabilidade e estados supramoleculares da camada externa pode oferecer informações que auxilie o pesquisador a desenvolver novos materiais inspirados nesta membrana^{28,29,40,41}. Algumas das variáveis conhecidas por afetarem as propriedades da membrana externa da bactéria são o pH, concentração e tipo de íons, temperatura, substratos para adsorção e afins⁴²⁻⁴⁷. Ainda, uma importante propriedade da camada externa de *P. aeruginosa* é o seu grande potencial em adsorver cátions⁴⁸, isso devido aos sítios negativos presentes nas unidades de LPS. Por isso, estas bactérias podem ser utilizadas para coletarem íons de metais pesados ou radionuclídeos em leitos de rios^{49,50} atuando assim como agentes biorremediadores, uma vez que podem ajudar na descontaminação do meio ambiente⁵¹⁻⁵⁵.

No geral, membranas biológicas possuem alta desordem e descrever as propriedades macroscópicas a partir de uma compreensão ao nível molecular da organização das membrana de

1.INTRODUÇÃO

LPS é uma tarefa desafiadora. Nesse trabalho, utilizamos como ferramenta de abordagem uma modelagem baseada no método computacional de dinâmica molecular clássica atomística - para uma descrição a um nível molecular - considerando algumas propriedades da membrana como, fluidez, nível de hidratação ou estado de agregação. Para tanto, utilizamos um modelo de membrana de LPS⁵⁶ de *P. aeruginosa*, considerando um pH biológico e temperatura de 300K, sob a influência dos seguintes cátions: Na⁺; K⁺; Ca²⁺; Mg²⁺; Zn²⁺; e Ba²⁺. Com exceção do Ba²⁺, os demais íons são abundantes nos locais aonde a *P. aeruginosa* vive como, solo, leitos de rio e tecido celular. O primeiro trabalho que usou dinâmica molecular clássica para descrever a membrana de LPS de *P. aeruginosa* foi publicado em 2001⁵⁷, de lá pra cá muitos outros surgiram^{56,58-63}. Desde 2001, as simulações de membranas de LPS haviam considerado majoritariamente a influência do Ca²⁺.

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Nesta seção, descrevemos a composição geral de uma membrana externa de bactérias Gram-negativa, em particular o da *P. aeruginosa*. Tratamos sobre como diferentes cátions podem influenciar as propriedades estruturais das membranas de LPS. Além disso, apresentamos uma breve fundamentação teórica do método de mecânica e dinâmica molecular clássica e alguns dos resultados obtidos anteriormente utilizando este tipo de simulação para membranas de LPS.

2.1. MEMBRANA DE BACTÉRIA GRAM-NEGATIVA

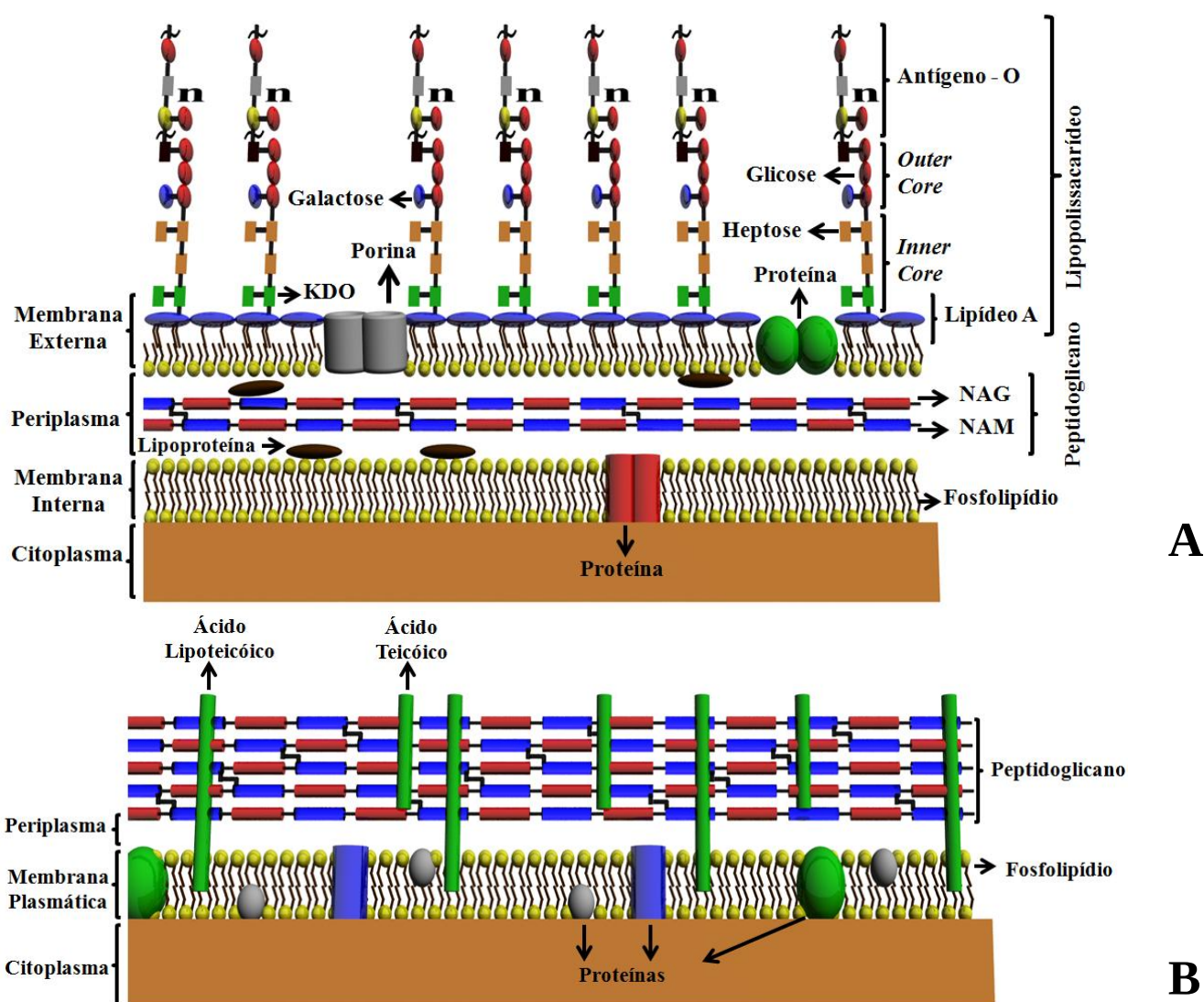


Figura 1 – Em A, apresentamos um esquema genérico da membrana de bactéria Gram-negativa e em B uma Gram-positiva. As bactérias Gram-negativas possuem uma camada de peptidoglicano mais fina do que bactérias Gram-positivas e além disso, apresentam uma membrana externa composta de lipopolissacarídeos.

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

As Bactérias Gram-negativas diferenciam-se das Gram-positivas principalmente por apresentarem uma membrana externa assimétrica constituída de LPS e fosfolipídio. Na Figura 1 apresentamos dois esquemas genéricos de membrana de bactéria, uma Gram-negativa (A) e a outra Gram-positiva (B). Como mostramos na Figura 1 (A), a membrana externa da bactéria Gram-negativa, pode possuir diferentes proteínas ancoradas ou que atravessem as membranas. Uma classe destas proteínas são as porinas, responsáveis pela difusão de íons, pequenos metabolitos e aminoácidos. A membrana externa é separada da membrana interna por um compartimento chamado periplasma⁶⁴, onde se encontra uma camada de peptidoglicano.

A membrana externa de bactéria Gram-negativa funciona como uma barreira seletivamente permeável^{2,20,65}. Tal permeabilidade tem a ver principalmente com a composição do LPS:

i) as interações entre as cadeias alquil do lipídeo A com as do fosfolipídio determinam na membrana uma região apolar semelhante a um gel de baixa fluidez contribuindo também na baixa permeabilidade de solutos hidrofóbicos⁶⁶. Esta região de domínio alifático é mostrada na Figura 1 A, a cabeça polar do lipídeo A e do fosfolipídio estão representadas respectivamente por elipses azuis e amarelas. As pernas marrons ligadas a estas elipses representam as cadeias alquil;

ii) a região do *core* do LPS, possui grupos fosfatos, PO_4^- , e carboxílicos, COO^- normalmente interagindo com cátions divalentes aumentando assim a interação lateral¹⁹ das unidades de LPS. Assim, esta região tende a ser um ambiente de baixa solubilidade para solutos hidrofóbicos⁶⁷. O *core* é subdividido em duas partes o *inner core* e o *outer core* como apresentado na Figura 1A. O *inner core* é constituído por unidades de ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosônico (KDO) e heptoses e estão representadas respectivamente por retângulos verdes e laranjas, o *outer core* no geral é composto por unidades de glicose e galactose, representadas respectivamente por elipses vermelhas e azuis.

iii) o LPS ainda pode se associar com proteínas da membrana externa, esquematizado na Figura 1A por elipses verdes, como por exemplo a FhuA⁶⁴, que é capaz de utilizar sideróforo - quelante com a finalidade de captar o íon Fe^{3+} do meio - do tipo hidroxamato. Ao se ligar ao lipídeo A esta proteína confere mais uma interação entre as moléculas de LPS vizinhas. Todas estas características ajudam no aumento da estabilidade, resistência e proteção da estrutura

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

contra sais biliares, detergentes, peptídeos antimicrobiais, antibióticos e ambientes hostis encontrados durante o processo de inflamação ou colonização em hospedeiro²⁰.

A composição química do LPS na bactéria pode variar sob a influência de estímulos ambientais como infecções ou outras condições de stress⁶⁸ do mesmo modo que as propriedades da membrana externa, tais mudanças costumam contribuir para a defesa da bactéria. Além disso, a composição química do LPS também varia de acordo com a cepa, ou mesmo em uma bactéria de uma mesma cepa. No geral, uma unidade de LPS pode ser dividida em três partes, o lipídeo A, seguido do *Core* e por fim a região do antígeno-O, como apresentado na Figura 1A. O lipídeo A é a âncora hidrofóbica do LPS, é constituído por dímeros de 2-amino-2-deoxi-D-glucose (GlcN) ligadas entre si por ligações do tipo β -(1 $\rightarrow$ 6) e fosforiladas nas posições 1 e 4', como representado na Figura 2 e apresenta substituições de ácidos graxos de cadeia longa nas posições restantes⁶⁹.

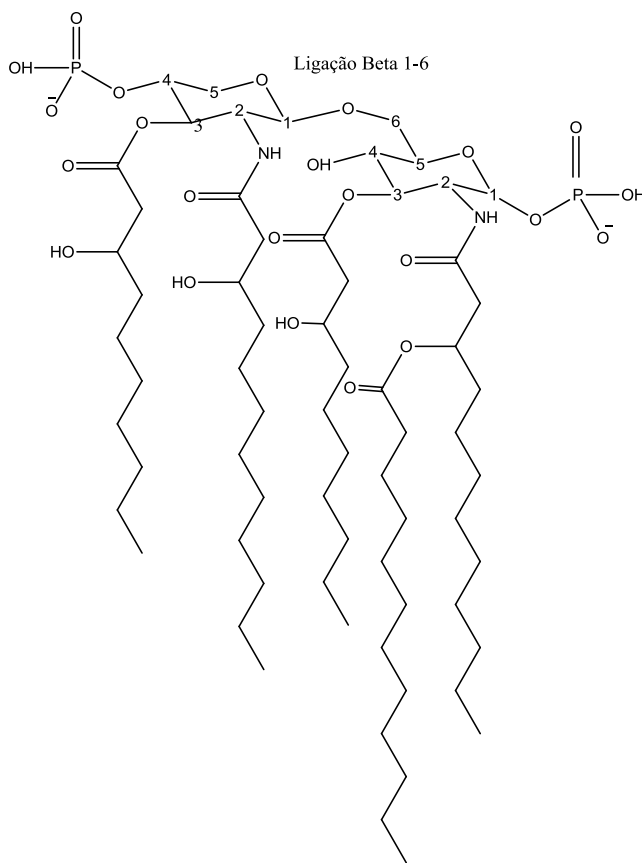


Figura 2 – Formula estrutural do lipídeo A pentaacilado de *P. aeruginosa*.

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O lipídeo A também é conhecido por endotoxina do LPS sendo o principal responsável pela toxicidade à maioria dos mamíferos causando doenças e infecções². O termo endotoxina foi criado por Richard Pfeiffer (1858-1945). Quando Pfeiffer estudava o vibrião da cólera percebeu que o tratamento térmico podia matar o vibrião, porém a solução final obtida deste procedimento ainda era tóxica para os mamíferos. Então, Pfeiffer demonstrou que esta toxicidade era devido a uma substância apolar da cólera resistente ao calor, que ele chamou de endotoxina - maior detalhamento pode ser obtido no artigo de revisão de Beutler e Rietschel⁷⁰. A literatura ainda relata que não apenas o número de cadeias alquil, mas a conicidade são variáveis correlacionadas a toxicidade do lipídeo A⁷¹. O organismo dos mamíferos possui receptores que sinalizam quando em contato com o lipídeo A. Nos humanos um destes receptores é a proteína “Toll-like receptors 4” (TLR4)⁷². Quando reconhecido pelo receptor o sistema imunológico é ativado e produz glóbulos específicos para destruírem o invasor.

A ligação do lipídeo-A com os oligossacarídeos quase sempre acontece a partir de uma unidade de ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosônico (KDO), ligada ao C-6 livre da glucosamina (GlcN)⁷³ como mostramos na Figura 3, este é o caso de ligação na *P. Aeruginosa*.

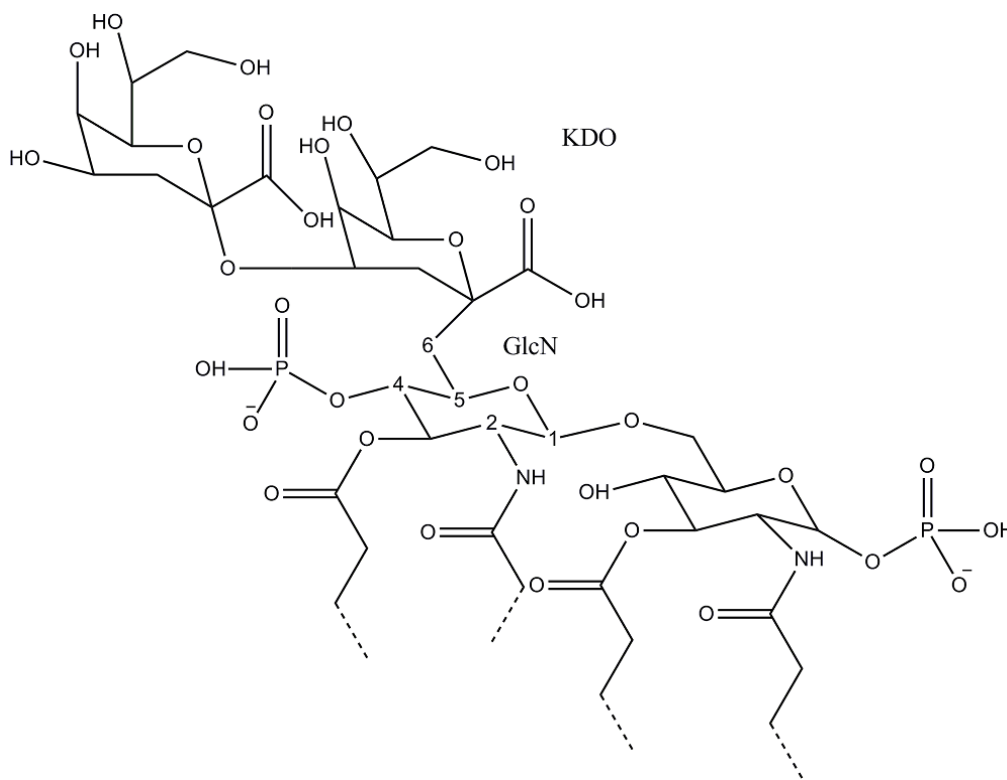


Figura 3 – Representação estrutural da unidade de KDO ligada ao GlcN

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O KDO pode ser eliminado da membrana externa na presença de supressores, podendo assim o lipídio A se ligar aos oligossacarídeos a partir de diferentes unidades. Este é o caso de alguns membros da família *Rhizobiaceae* que apresentam unidades de ácido D-glicero-D-talo-oct-2-ulosônico (Ko) e ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heptulosárico (Dha) ao invés do KDO⁷⁴. A região do *inner-core* começa com o KDO seguido de uma ou mais unidades de heptoses. A mais comum é a L-glicero-D-mano-heptose (Hep). Esta é a região da bactéria mais carregada devido a presença de grupos COO⁻ e PO₄⁻ substituídos nos açúcares. Assim, esses microorganismos têm uma grande capacidade de adsorver íons metálicos em suas paredes celulares^{19,49,50,75,76}. Essa característica é muito importante para explicar a variação fenotípica, mobilidade e biodisponibilidade dos metais no meio ambiente. O *outer-core*, parte externa do *core* é constituído normalmente por hexoses (galactose, glucose e N-Acetyl-D-Glucosamine). As hexoses estão na forma piranosídica, e estão ligados geralmente na configuração α -anomérica.^{64,65}

Depois do *core* pode ser encontrado o antígeno-O. A composição química e a estereoquímica desta última porção pode ser muito variada, o que torna seu estudo muito complexo (considerando ainda que na mesma bactéria pode haver diferentes composições do antígeno-O). Esta variação acaba por definir o sorotipo da bactéria. O termo “liso” e “rugoso” é usado para descrever o fenótipo segundo a composição do LPS⁶⁷. Esta classificação serve para indicar a presença do antígeno-O nas unidades de LPS de uma determinada cepa. O termo rugoso vem da ausência do antígeno-O. Normalmente este tipo de bactérias tende a ser mais vulnerável a antibióticos hidrofóbicos. A expressão semi-rugoso é usada para as bactérias cuja parte das unidades de LPS possuam o antígeno-O. A expressão lisa é aplicada para aquelas bactérias que no geral o antígeno-O está presente nas unidades de LPS. Esses polissacarídeos, constituintes do antígeno-O entram em contato direto com a célula hospedeira durante a infecção. Assim o hospedeiro passa a produzir anticorpo específico de acordo com o antígeno-O⁶⁸.

O periplasma corresponde a 10% do volume celular⁶⁵. É um compartimento viscoso altamente oxidativo contendo enzimas que participam de reações cruciais para a manutenção da célula. Proteínas periplasmáticas ainda podem realizar o transporte de moléculas⁷⁷.

A camada de peptidoglicano é constituído de dois derivados de açúcares: o ácido N-acetilmurâmico (NAM) e a N-acetilglicosamina (NAG) unidos alternadamente. O peptidoglicano

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

serve como citoesqueleto para a bactéria contribuindo não só para sua forma, mas prevenindo uma eventual lise⁷⁸.

A membrana interna - também chamada de membrana celular - é constituída de uma bicamada simétrica de fosfolipídios e proteínas integrais ou periféricas⁶⁸. As proteínas integrais estão imersas na membrana, normalmente com domínios alfa hélice e as periféricas estão ancoradas à camada externa da bicamada lipídica. A composição da bicamada lipídica não apenas determina a estrutura celular, mas também influencia numa variedade de processos celulares como adesão celular, condutância do canal iônico e sinalização celular mediada por proteínas da membrana.⁷⁹

2.2. OS CÁTIOS EM MEMBRANA DE LPS BACTERIANO

As membranas de LPS apresentam estrutura e ordenamento lateral diferenciado comparado as membranas lipídicas. Isto tem a ver com a composição diferenciada do LPS, que contém grupos como hidroxilas, aminas e além disso apresentam cátions interagindo diretamente com os grupos COO^- e PO_4^- da região do *core*. O entendimento do empacotamento e da transição de fase destes sistemas têm sido uma tarefa desafiadora a partir de dados experimentais⁴³. A literatura relata que a força iônica, pH, temperatura, tipo e quantidade de íons podem influenciar nas propriedades e estabilidade⁸⁰ das membranas de LPS^{19,43,44,46,76,81-91}.

A disponibilidade dos cátions metálicos depende diretamente do local aonde as bactérias se encontram. O efeito combinado das propriedades dos cátions como, carga, raio de hidratação e iônico tendem a influenciar na estabilidade, aderência e permeabilidade da membrana bacteriana. Nos seres humanos o Na^+ e K^+ são respectivamente os cátions mais abundantes⁹².

Abraham e autores⁸⁶ construíram uma bicamada de LPS de *P. aeruginosa* na presença de íon Na^+ e mostraram que nesse tipo de sistema a água penetra mais do que em sistema com cátions divalentes, chegando inclusive na região apolar – as medidas foram qualitativas. A explicação sugerida no trabalho é que a grande concentração de carga dos grupos COO^- e PO_4^- da unidade de LPS podem diminuir a interação lateral entre as moléculas de LPS facilitando assim a entrada da água. A presença de íons divalentes não apenas tende a diminuir

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

significativamente a penetração da água, mas aumenta a estabilidade da membrana. Ainda, Brandenburg e autores⁴³ relataram modos de empacotamento diferenciados da membrana de LPS em função da mudança da valência e força iônica na subfase aquosa. Os autores verificaram por exemplo, que o Ca^{2+} contribui mais no enrijecimento da membrana do que o Na^+ e sugeriram que essa observação tem a ver com a interação cruzada do Ca^{2+} com as unidades vizinhas de LPS.

Coughlin e autores⁹³ utilizaram a técnica de espectroscopia de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente, para quantificar os íons metálicos ligados ao LPS de cepas de *Escherichia coli* K12. O resultado indicou que na membrana externa da cepa selvagem havia mais íons Mg^{2+} do que Ca^{2+} . Já a cepa mutante *deep rough* D21f2 apresentou uma maior abundância de Ca^{2+} do que Mg^{2+} . Além disso, a quantidade dos íons Fe^{2+} , Al^{3+} e Zn^{2+} em ambas as cepas foram pequenas em comparação ao Ca^{2+} e Mg^{2+} , porém significativas. No mesmo estudo os autores prepararam sais com os diferentes tipo de LPS e relataram que o Ca^{2+} não conseguiu substituir o Na^+ do sal de LPS da cepa selvagem. Embora os autores reconheçam que os raios iônicos destes íons sejam semelhantes à razão pela qual o Ca^{2+} não conseguiu substituir o Na^+ não ficou clara. Entretanto, o íon Mg^{2+} que possui o raio muito menor foi capaz de substituir com eficácia o Na^+ . O estudo ainda indicou que os cátions com o menor raio iônico interagiram mais facilmente com o LPS da cepa selvagem enquanto que a cepa *deep-rough* mutante interagiu melhor com cátions maiores.

Schneck e autores⁸⁵ observaram a substituição catiônica do K^+ pelo Ca^{2+} na região do core do LPS. Eles criaram um modelo de membrana externa de bactéria Gram-negativa a partir da deposição de LPS Re (mutante) da *Salmonella enterica* sv. *minnesota* R595 em água comprimindo o filme de LPS com uma pressão superficial de 20 mN/m e temperatura de 20° C. Os autores utilizaram a técnica de fluorescência de raio x de incidência rasante (GIXF) para determinar a presença dos íons na monocamada de LPS. Nas análises identificou-se a presença do K^+ na região do core do LPS quando a monocamada estava numa solução tamponada contendo apenas o íon K^+ e depois quando adicionaram ao sistema o íon Ca^{2+} verificaram a substituição do K^+ pelo Ca^{2+} . Já é bem conhecido na literatura que a presença de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} na bactéria aumentam a estabilidade e rigidez da membrana e por sua vez a resistência da bactéria a peptídeos catiônico antimicrobiano⁹⁴.

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Quanto maior for a estabilidade da membrana no estado de agregação lamelar (L), maior também deverá ser a temperatura de transição de fase, T_m , de gel (L_β) para a fase líquido cristalino (L_α). Na fase L_β as cadeias alquil do lipídio estão mais organizadas, enquanto que na fase L_α há um aumento da desordem das cadeias alquil. Estes dois estados estão representados na Figura 4.

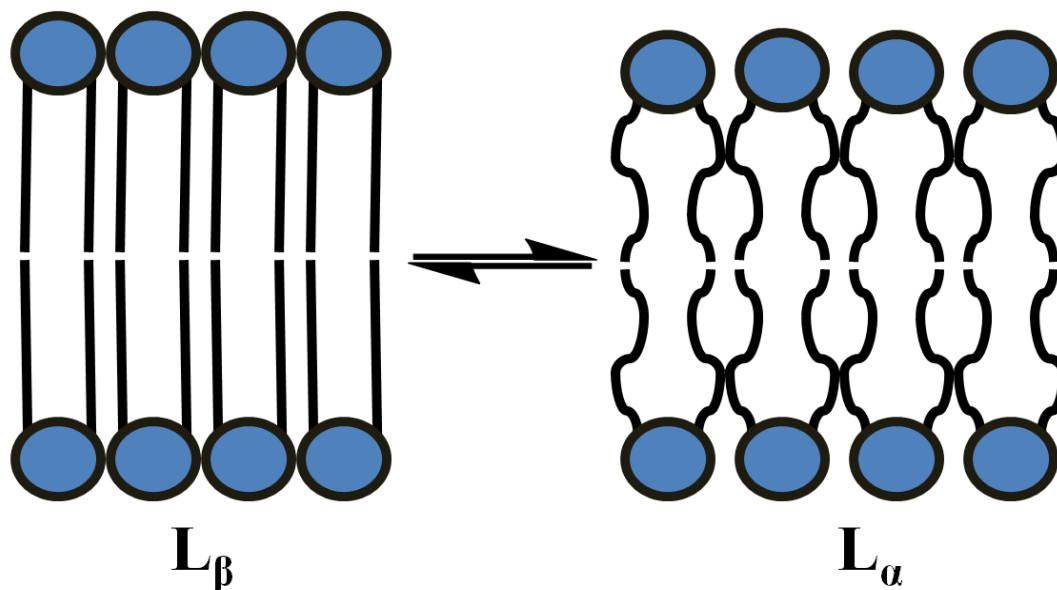


Figura 4 - Representação esquemática da membrana lamelar genérica nas fases gel (L_β) e líquido-cristalina (L_α).

Uma descrição mais detalhada sobre esta transição de fase e outras transições estruturais dos lipídeos são apresentadas no trabalho de Luzzati e Tardieu⁹⁵. Uma técnica frequentemente utilizada para determinar T_m é a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). A transição de fase é determinada quando ocorre a mudança da frequência de vibração simétrica, $\nu_s(\text{CH}_2)$ e assimétrica, $\nu_{\text{ass}}(\text{CH}_2)$, do grupo metila ao se variar a temperatura do sistema. Brandenburg e autores⁹⁶ usaram FTIR e a técnica de espalhamento de raio X em ângulo alto (WAXS) para investigar o empacotamento das cadeias alquil do fosfolipídio e LPS em condições próximas a fisiológica. Os dados de WAXS - obtidos das análises de diferentes amostras de suspensão dos fosfolipídios e LPS em água - indicaram que as cadeias alquil do LPS de *Salmonella minnesota* R595 têm um estado de ordem menor do que as cadeias de fosfolipídios saturados, mas apresentam ordem similar aos fosfolipídios com uma cadeia

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

insaturada, considerando cada sistema na fase gel. Somente com a técnica de FTIR os autores conseguiram observar o efeito da influência dos íons divalentes no enrijecimento das cadeias alquil. Ainda, observaram que a presença dos íons Mg^{2+} ou Zn^{2+} e o aumento das suas concentrações na suspensão resultaram num aumento da ordem nas cadeias alquil. Além disso, os autores relataram o maior aumento de T_m na suspensão de LPS na presença do Zn^{2+} .

Wellington e autores⁹⁷ confirmaram um maior empacotamento das cadeias alquil do LPS sob a influência do íon Zn^{2+} em relação aos íons Co^{2+} , Ni^{2+} e Mg^{2+} . Ainda, verificaram que a alteração da fluidez da membrana de LPS induziu o aumento da produção de monocina na cultura de células mononucleares de sangue periférico (PBMC). Inclusive, a orientação dos autores é de que é preciso revisar e investigar o uso terapêutico do Zn^{2+} para pacientes com baixa imunidade. Essa conclusão foi tomada considerando o seguinte: i) em baixas concentrações o Zn^{+} pode atuar melhorando a resposta imune do paciente; ii) em baixas concentrações o LPS não é eficiente na indução da secreção dos monócitos; iii) quando o LPS está associado com o íon Zn^{2+} , mesmo nas pequenas concentrações, ocorre um efeito sinérgico de indução dos monócitos para secretar monocina. Os íons Co^{2+} , Ni^{2+} e Mg^{2+} semelhantemente ao Zn^{2+} também induziram a produção de monocina, porém numa razão significativamente menor. Maiores informações sobre a bioatividade do LPS em relação a suas propriedades físico-químicas pode ser obtida no trabalho de revisão de Brandenburg e autores³⁹.

A influência da composição do LPS e do tipo de íon na T_m de membranas de LPS também foi relatada no trabalho de Neumann e autores⁹⁸. No estudo os autores utilizaram FTIR para medir a T_m das membranas constituídas apenas de: lipídio A; unidades modificadas de LPS de *Salmonella minnesota* R595 (conservando o lipídeo A); e unidades de LPS liso da *Citrobacter freundii* e *Salmonella abortus equi*. Somente a membrana de LPS liso de *Salmonella abortus equi* estava na presença de Ca^{2+} e as demais em presença de Na^{+} . A membrana constituída apenas de lipídio A apresentou um valor de T_m maior do que as membranas das demais unidades de LPS modificados. A título de comparação, os autores mediram a T_m da membrana de LPS liso da *Citrobacter freundii* e *Salmonella abortus equi* nas condições supracitadas. A estrutura química do lipídio A das bactérias *Citrobacter freundii* e *Salmonella abortus equi* eram a mesma. Os autores obtiveram respectivamente os valores aproximados de 38° C e 42° C. Embora a composição do lipídeo A fosse a mesma para as duas bactérias, o efeito da mudança do íon e da composição dos açúcares resultou numa diferença de 5° C na T_m .

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O enrijecimento das cadeias alquil da membrana de LPS pode estar correlacionado não apenas ao tipo do cátion, mas a sua concentração. Esta relação é observada no trabalho de Brandenburg e Seydel⁹⁹ quando eles escolhem variar o pH e aumentar a concentração do íon Mg^{2+} nos sistemas contendo dispersão de lipídio A ou LPS rugoso das cepas mutantes de *Salmonella minnesota* e *Scherichia coli*. Os autores utilizaram as técnicas de FTIR e calorimetria diferencial de varredura (DSC) para investigar a transição de fase L_{β} para L_{α} . Os autores verificaram através de FTIR que a T_m é dependente do tamanho das cadeia de açúcares do LPS. Neste caso a T_m para o lipídio A foi de aproximadamente 45°C e o LPS rugoso aproximadamente 30°C. Ainda, a alta concentração do Mg^{2+} ou o baixo valor de pH provocaram um aumento da rigidez da membrana e da T_m . Além disso, os autores avaliaram o caráter liotrópico (formação da fase líquido-cristalino em função da concentração do solvente) dos sistemas utilizando DSC nas amostras contendo membranas de lipídeo A ou LPS rugoso diferentemente hidratadas. Os resultados mostraram que o valor da entalpia de fusão variou de acordo a hidratação do sistema enquanto que a T_m permaneceu constante.

Além das transições de fase L_{β} para L_{α} Garidel e autores¹⁰⁰ relataram que os íons divalentes Mg^{2+} , Ca^{2+} e Ba^{2+} são capazes de promover a transição estrutural da membrana de LPS Re da cepa de *Salmonella minnesota* R595. Os autores verificaram utilizando a técnica de difração de raio X usando radiação síncroton que, a adição de qualquer íon divalente na membrana poderia converter o agregado unilamelar/cúbico invertido em um multilamelar. E ainda observaram que o comprimento da bicamada contendo Ba^{2+} se mostrou maior do que na presença do Ca^{2+} .

Embora, nem todos os dados apresentados nesta seção se refiram a membranas de LPS de *P. aeruginosa* (ou de seus derivados) os princípios observados nas relações das membranas e o meio são considerados. Por exemplo, a influência do Zn^{2+} em diferentes amostras de membranas de lipídeo A ou LPS causou um maior enrijecimento das cadeias alquil do LPS em relação a duas séries diferentes de cátions. Outra observação comum é que os íons divalentes estabilizam melhor a membrana em comparação aos íons monovalentes aumentando inclusive a T_m . Combinando os resultados dos trabalhos acima percebemos que, embora a carga de alguns cátions sejam iguais os efeitos percebidos nas membranas foram diferentes. Assim, selecionamos três pares de cátions apresentados na Tabela 1 baseados não apenas em sua abundância, mas na semelhança dos seus raios e diferença nas cargas com o objetivo de investigar a influência destes

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

cátions na membrana de LPS rugoso de *P. aeruginosa* PAO1. Os valores experimentais do raio iônico dos cátions^{101,102} são apresentados abaixo:

Tabela 1 – Raio iônico experimental (r)

	Mg ²⁺	Zn ²⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	K ⁺	Ba ²⁺
r (nm)	0.065	0.075	0.099	0.095	0.133	0.135

Na próxima seção apresentamos alguns dos fundamentos da mecânica molecular, pois foi a abordagem escolhida para avaliar a influência desta série de cátions nas membranas de LPS.

2.3. MECÂNICA MOLECULAR

O uso de metodologias baseados na mecânica molecular clássica (MM) permite o estudo de propriedades de grandes sistemas químicos ou biológicos, que não são possíveis por razões práticas a partir de uma abordagem inteiramente quântica. Na abordagem clássica os átomos ou um grupo de átomos são tratados como esferas indivisíveis providas de massa, carga e outros parâmetros específicos. Desta maneira, a mecânica molecular clássica não é um modelo ideal para o estudo de propriedades dos sistemas aonde a distribuição eletrônica nas partículas variem. A implementação do modelo de MM através de algoritmos em pacotes de química computacional reduz significativamente a quantidade de operações realizadas no computador, quando comparado a uma abordagem de mecânica quântica. Por essa razão é possível o estudo de propriedades termodinâmicas de grandes sistemas como membranas e proteínas.

Uma molécula no modelo de MM pode ser definida como uma coleção de partículas ligadas entre si pela atuação de forças elásticas ou harmônicas. Parte da energia potencial desta molécula é descrita por um conjunto de funções de energia potencial classificadas como potencial das interações intramoleculares V_{Intra} também conhecido como potenciais ligados. Estes potenciais descrevem as deformações da molécula com respeito ao comprimento de ligação (r), ângulo de ligação (θ) e ao ângulo diedral próprio(ϕ) e impróprio(χ). Além das interações intramoleculares poderá haver outras interações com os constituintes do sistemas não ligados conhecida por interações intermoleculares. O potencial de interação intermolecular, V_{Inter} é

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

descrito em duas partes, o potencial de interação de Coulomb junto ao de Lennard-Jones(6-12). O conjunto destes potenciais define o campo de força. A seguir descrevemos cada um destes potenciais.

2.3.1. POTENCIAL HARMÔNICO DE LIGAÇÃO

O termo potencial harmônico de ligação, V_d , na MM considera a contribuição energética do estiramento da ligação química covalente. A ligação química nesta abordagem pode ser entendida como a ligação de duas partículas por uma mola. O comprimento desta ligação oscila em função do tempo, mas mesmo assim é possível definir uma distância média de ligação também chamada de distância de equilíbrio. Quando a distância de ligação é maior ou menor do que a distância de equilíbrio há um aumento da energia potencial do sistema. Este comportamento é modelado a partir da equação abaixo:

$$V_d = \frac{1}{2}K_d(d - d_0)^2, \quad (2.01)$$

onde d representa a distância da ligação química, d_0 é a distância de equilíbrio da ligação e K_d é a constante elástica e tem a ver com a rigidez da ligação. Os parâmetros, d_0 e K_d podem ser obtidos a partir de cálculos quânticos ou de medidas espectroscópicas de infravermelho. O valor de K_d aumenta com a rigidez da ligação e com a diminuição da flutuação da distância em torno da distância de equilíbrio. Por exemplo: nas ligações C-N e C=N onde os valores experimentais de d_0 são respectivamente 1,449 e 1,273 Å os valores de K_d são iguais a 337 e 570 $\frac{\text{Kcal}}{(\text{mol } \text{Å}^2)}$ ¹⁰³.

Apresentamos na Figura 5, quatro esferas representando uma molécula constituídas dos átomos hipotéticos A, B, C e D. O estiramento da ligação dos pares se dá na direção dos cilindros. As moléculas ainda podem apresentar modos vibracionais angulares como descrevemos a seguir.

2.3.2. POTENCIAL HARMÔNICO ANGULAR

O potencial harmônico angular, V_θ diz respeito a contribuição energética resultante da variação angular em torno do ângulo de equilíbrio, θ_0 formado entre duas ligações vizinhas. Representamos na Figura 5 os ângulos θ_{AC} e θ_{BD} definidos nas ligações: AB e BC ; e BC e CD.

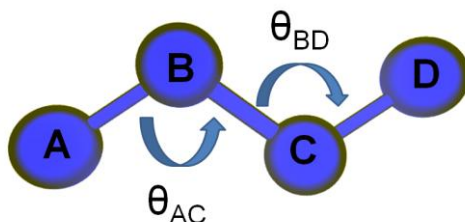


Figura 5 – Representação de uma molécula constituída dos átomos hipotéticos A, B, C e D e seus ângulos.

O modelo matemático que descreve esse potencial é análogo ao do potencial harmônico de estiramento. A constante elástica, K_θ deste potencial é dependente dos três átomos que formam o ângulo. A seguir apresentamos a equação:

$$V_\theta = \frac{1}{2} K_\theta (\theta - \theta_0)^2, \quad (2.02)$$

a variável θ nesta equação é o ângulo entre as duas ligações química vizinhas. Na práticas dois vetores são definidos para indicar as duas ligações e então se calcula o ângulo entre estes dois vetores. Os dois modelos apresentados até aqui são representações simples de potenciais, outras formulações matemáticas podem ser usadas.

2.3.3. POTENCIAL DE TORÇÃO

O potencial de torção, V_ϕ tem a ver com o arranjo conformacional de 4 átomos da molécula. Na Figura 6 os átomos A, B e C definem não apenas 2 ligações químicas mas um plano e os átomos B, C e D definem um segundo plano. O ângulo formado entre estes dois planos define o ângulo diedro próprio(ϕ) ou de torção. No exemplo abaixo o ângulo descrito é de 180° ou seja, representaria uma conformação trans (átomos em lado oposto) em relação aos átomos A e D.

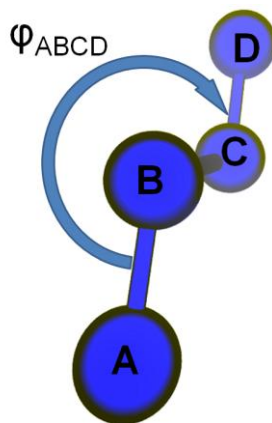


Figura 6 – Representação de um diedro formado na molécula constituída dos átomos hipotéticos A, B, C e D.

O ângulo diedro pode variar em 360° ou seja no intervalo de 0 a 2π . A curva do gráfico da energia potencial em função do ângulo diedro representa a barreira de energia rotacional. A forma destas barreiras pode variar de acordo com os átomos envolvidos na análise da torção. O modelo matemático padrão deste potencial pode ser descrito pela seguinte expansão em série de Fourier, normalmente truncado no terceiro termo:

$$V_\phi = \sum_{n=0}^N \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi + \psi)], \quad (2.03)$$

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

onde o termo V_n é frequentemente chamado de altura da barreira, apesar de outros termos contribuírem para altura da barreira como por exemplo a interação dos átomos 1-4 não ligados. O termo n da Equação 2.03 é a multiplicidade e indica o número de pontos de mínimo na função quando a ligação é rotacionada em 360° , ψ é o fator de fase e está associado ao deslocamento das barreiras e por fim ϕ é o ângulo de diedro. A equação conhecida como função de Ryckaert-Bellemans é uma forma análoga e mais eficiente computacionalmente de representar o potencial de torção. No pacote GROMACS¹⁰⁴, que utilizamos para realizar as simulações de dinâmica molecular deste trabalho, a função de Ryckaert-Bellemans é escrita para descrever a torção de alcanos da seguinte maneira:

$$V_\phi = \sum_{n=0}^5 D_n (\cos(\phi - 180))^n \quad (2.04)$$

nesta equação D_n é a constante do potencial Ryckaert- Bellemans expresso em KJ.mol^{-1} . O uso desta equação engloba a interação de van der Waals do primeiro e último átomo que formam o diedro.

2.3.4. POTENCIAL DIEDRAL IMPRÓPRIO

A energia do potencial diedral impróprio (V_χ ou V_h) diz respeito a quatro átomos não ligados sequencialmente. Na Figura 7 apresentamos um esquema deste caso de diedro, onde os átomos A, C e D estão num plano e B oscila em relação ao plano com um ângulo χ ou uma altura h .

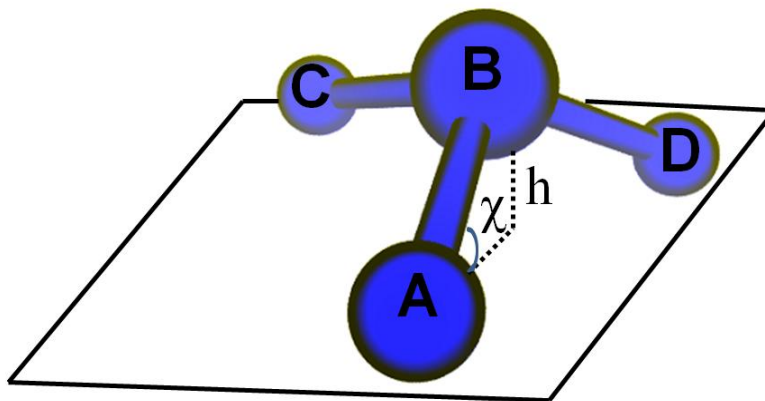


Figura 7 - Representação de um diedro impróprio formado na molécula constituída dos átomos hipotéticos A, B, C e D.

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Este tipo de potencial pode ser aplicado por exemplo quando se deseja manter uma conformação planar de 4 átomos. Este é o caso de uma molécula como o benzeno e aldeídos aonde carbono tem uma hibridização do tipo sp^2 . Este potencial pode ser descrito como harmônico, pois a energia cresce com o aumento da diferença conformacional no arranjo dos átomos em relação a aquela conformação considerada de equilíbrio. O referencial de equilíbrio pode ser dado tanto em termos do diedro χ apresentado na Figura 7 quanto em termo da distância h do átomo em relação ao plano. A seguir apresentamos dois modelos matemáticos equivalentes para representar esta modalidade de potencial:

$$V_{\chi} = K_{\chi}(\chi - \chi_0)^2 \quad \text{ou} \quad V_h = K_h(h - h_0)^2, \quad (2.05)$$

os termos K_{χ} e K_h são as constantes elásticas destas equações e variam de acordo com o tipo de átomo, hibridizado em sp^2 .

2.3.5. POTENCIAL DE LENNARD JONES

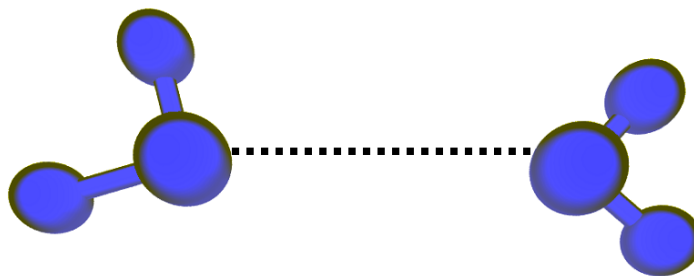


Figura 8 – Representação das interações de van der Waals.

O potencial não ligado de Lennard Jones é utilizado na descrição de interações do tipo de van der Waals representado na Figura 8. Este potencial com frequência é utilizado a partir dos terceiros vizinhos da molécula, representado na Figura 6 pelos átomos A-D, uma vez que os primeiros (A-B) e segundos vizinhos (A-C) são tratados por potenciais harmônicos. No caso aonde os terceiros vizinhos tem um caráter rígido como no caso dos átomos de um anel aromático a contribuição

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

desta interação pode ser considerada constante. A expressão matemática do potencial de Lennard Jones é apresentada a seguir:

$$V_{LJ} = 4\varepsilon_{ij} \left[\frac{\sigma_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma_{ij}^6}{r_{ij}^6} \right], \quad (2.06)$$

os termos σ_{ij} e ε_{ij} representam respectivamente o raio de van der Waals e a profundidade do poço da energia potencial. Estes termos são obtidos a partir das regras de seleção

$$\sigma_{ij} = \left(\frac{\sigma_i + \sigma_j}{2} \right) \quad e \quad \varepsilon_{ij} = \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_j}, \quad (2.07)$$

os índices i e j representam dois átomos diferentes. O V_{LJ} também é usualmente escrito do seguinte modo:

$$V_{LJ} = \frac{A}{r_{ij}^{12}} - \frac{B}{r_{ij}^6}, \quad (2.08)$$

onde,

$$A = 4\varepsilon\sigma^{12} \quad e \quad B = 4\varepsilon\sigma^6, \quad (2.09)$$

A primeira parcela da equação de Lennard Jones de ordem 12 modela a parte repulsiva da interação e a segunda parcela a parte atrativa. O termo r_{ij} é o raio de interação entre os átomos i e j . O raio de van der Waals varia de acordo com os átomos que estão interagindo. Graficamente σ_{ij} equivale à distância de interação mais próxima entre os átomos cujo potencial é igual a zero. Numa distância de interação menor do que o raio de van der Waals a repulsão entre os átomos é bastante alta, evitando assim a interpenetração dos dois átomos. O potencial de Lennard Jones é dito de curto alcance, uma vez que o potencial tende a zero rapidamente com o distanciamento entre os átomos.

2.3.6. POTENCIAL DE COULOMB

A energia potencial de Coulomb é resultante da interação não ligada de cargas e/ou dipolos.

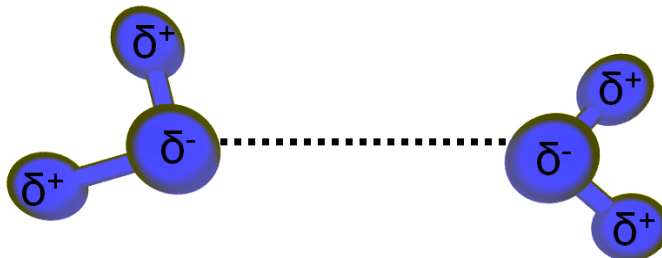


Figura 9 – Representação da interação de Coulomb.

Uma molécula neutra pode apresentar momento de dipolo dependendo da eletronegatividade dos seus átomos. Por exemplo, a molécula de H-F apresenta um valor de momento dipolo igual a $1,92 \text{ D}^{105}$ (Debye), maior do que o da molécula de H-Br que é $0,82 \text{ D}^{105}$, isso porque o átomo de flúor é mais eletronegativo do que o bromo. Nestas duas moléculas o átomo de hidrogênio apresenta uma maior densidade de carga positiva e tanto o bromo quanto o flúor apresentam uma maior densidade de carga negativa. Daí, para modelar a densidade eletrônica na molécula atribui-se cargas pontuais específicas para estes átomos. Estas cargas podem ser obtidas e atribuídas a partir de cálculos de mecânica quântica. O modelo matemático que descreve a energia resultante da interação de cargas pontuais em função da distância entre as cargas é apresentado na seguinte equação:

$$V_c = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon r_{ij}}, \quad (2.10)$$

onde q_i e q_j são os valores das cargas dos átomos i e j respectivamente, ϵ_0 é a constante da permissividade no vácuo, ϵ é a constante dielétrica do meio e por fim r_{ij} é a distância entre os átomos i e j .

No cálculo da energia potencial de interação eletrostática são desconsideradas as interações do átomo carregado i numa molécula com os seus primeiros e segundos vizinhos e de

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

acordo com o tipo de campo de força também os terceiros. A interação das partícula diminuem com o aumento da distância. Com a finalidade de melhorar a performance computacional este potencial é calculado dentro de uma raio definido chamado de raio de corte, r_c , para cada carga. Quando a distância é maior do que r_c , o átomo i interage com um meio contínuo.

2.3.7. CAMPO DE FORÇA

O campo de força é o conjunto de equações que descreve a energia potencial total das interações dos átomos num sistema. Estas equações visam reproduzir as curvas de energias potenciais experimentais como a de uma barreira torcional, ou ainda da vibração de uma ligação química como descrevemos acima.

As constantes destas equações são definidas como os parâmetros do campo de força e podem ser obtidas no processo de parametrização. A obtenção destes parâmetros é primordial e não é uma etapa trivial, pois para que estes parâmetros sejam válidos precisam reproduzir propriedades estruturais e termodinâmicas como por exemplo: a densidade de um líquido; fatores estruturais de um sólido obtidos por cristalografia de raios-X; a compressibilidade de um gás que é a variação do volume deste gás em função da pressão; a entalpia de vaporização; energia de solvatação no caso de um íon num líquido. Quando algumas propriedades são difíceis de serem obtidas experimentalmente pode-se optar por realizar cálculos de química quântica para auxiliar no processo de parametrização.

Difícilmente algum campo de força vai reproduzir ao mesmo tempo bem todas as propriedades estruturais e termodinâmicas de um determinado sistema, ainda mais quando a complexidade aumenta. Entretanto, é possível obter bons resultados de nível quantitativo em sistemas complexos e grandes, uma justificativa para este bom resultado é que grande parte da dinâmica é dominada por efeitos causados por fatores coletivos, como o empacotamento das moléculas e assim erros relativos à interação dos pares de átomos terminam sendo minimizados¹⁰⁶. Apresentamos a seguir a equação completa da energia potencial representando o campo de força aqui exemplificado:

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

$$V_{total} = V_d + V_\theta + V_\varphi + V_\chi + V_{LJ} + V_C, \quad (2.11)$$

nesta equação os quatro primeiros termos são contribuições do potencial ligado V_{inter} e os demais são do potencial não ligado, expandindo a equação pela substituição dos termos obtemos;

$$\begin{aligned} V_{total} = & \sum_{n=1}^N \frac{1}{2} K_{dn} (d_n - d_{0n})^2 + \sum_{n=1}^N \frac{1}{2} K_{\theta n} (\theta_n - \theta_{0n})^2 + \sum_{n=1}^N \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\varphi + \gamma)] \\ & + \sum_{n=1}^N \frac{1}{2} K_{\chi n} (\chi_n - \chi_{0n})^2 + \sum_{i < j}^{N'} 4\varepsilon_{ij} \left[\frac{\sigma_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma_{ij}^6}{r_{ij}^6} \right] + \sum_{i < j}^{N'} \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 \varepsilon r_{ij}}. \end{aligned} \quad (2.12)$$

2.4. DINÂMICA MOLECULAR CLÁSSICA

A dinâmica molecular clássica, DM trata de resolver as equações de movimento de Newton para um sistema contendo N átomos, considerando as suas interações em função do tempo sem desprezar a temperatura. O uso da dinâmica molecular clássica numa escala atômica pode ser justificada pela separação de Bohr-Openheimer, empregado na mecânica quântica que permite tratar a dinâmica dos prótons separadamente dos elétrons. A equação de força newtoniana é obtida derivando a energia potencial do sistema em termos da posição como apresentamos a seguir:

$$\vec{F}_i = - \frac{dV_{total}}{d\vec{r}_i}, \quad (2.13)$$

onde $i = 1 \dots N$ e i é o índice dos N átomos no sistema. Uma vez conhecida a força e a massa, m_i é possível encontrar a aceleração, $\vec{a}$, usando a segunda lei de Newton apresentada na próxima equação,

$$\vec{F}_i = m_i \vec{a}_i, \quad (2.14)$$

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

onde $\vec{a}$ é definido da seguinte maneira,

$$\vec{a}_i = \frac{d\vec{v}_i}{dt}, \quad (2.15)$$

nesta derivada t é o tempo e $\vec{v}_i$ é a velocidade que é dada por :

$$\vec{v}_i = \frac{d\vec{r}_i}{dt}, \quad (2.16)$$

$\vec{r}_i$ representa a posição do átomo i . Considerando a definição de velocidade e da aceleração, podemos reescrever a equação da força na seguinte forma,

$$\vec{F}_i = m_i \frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2}. \quad (2.17)$$

Essas equações de movimento são resolvidas numericamente e iterativamente, para cada átomo constituinte do sistema em função do acréscimo de intervalos de tempo, Δt . O valor deste incremento temporal é fixo e deve ser menor do que o tempo necessário gasto para acontecer o fenômeno do qual deseja ser observado na dinâmica. Caso esta condição seja desconsiderada a dinâmica irá resultar em artefatos computacionais, que são resultados falsos devido a erro de concepção do método ou no protocolo da simulação. Normalmente o incremento de tempo é da ordem de femtossegundo (10^{-15} s) e o termo número de passos de integração surge para definir o número de vezes do qual o acréscimo acontece para alcançar um tempo total t . Em cada passo são registrados dados como energia, velocidade, as novas coordenadas dos átomos, definindo assim a trajetória dos átomos. De posse das informações de cada um desses passos podem ser obtidas propriedades termodinâmicas macroscópicas usando a termodinâmica estatística. Os efeitos de temperatura não podem ser desconsiderados na dinâmica molecular e a ordem da energia envolvida nos processos deve estar na faixa onde as interações clássicas sejam dominantes. A energia nestes sistemas é da ordem de $\kappa_B T$, onde κ_B representa a constante de Boltzmann e T a temperatura

2.5. SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR

Para a realização de simulação da dinâmica molecular é necessário ter um software que realize as integrações das equações newtonianas de movimento. Neste estudo optamos por usar o GROMACS. Além disso, é necessário conhecer e buscar mimetizar na simulação as condições do sistema em estudo como por exemplo: temperatura, pressão, densidade, concentração ou outras propriedades importantes. Estas condições devem ser mantidas constantes e podem ser mimetizadas nas simulações usando diferentes tratamentos ou algoritmos. A seguir descrevemos alguns dos métodos e filosofias usadas na concepção e construção dos algoritmos usados pelos pacotes de dinâmica molecular.

2.5.1. CAIXA DE SIMULAÇÃO E SUAS CONDIÇÕES

A caixa de simulação é descrita em um espaço tridimensional e pode ter diferentes formatos geométricos, por exemplo cúbico ou ortorrômbico. Dentro da caixa são colocados os átomos, moléculas, íons ou solvente que constituem o sistema. A razão da quantidade de partículas dentro da caixa por volume também deve ser considerada, por exemplo no caso de líquidos puros o número de moléculas por volume deve representar a densidade numérica do sistema real.

A caixa deve ter uma dimensão mínima que seja maior do que os raios de corte de atuação dos potenciais não ligados de curto alcance, para que não surjam artefatos. Essa condição de tamanho da caixa tende a ser problema normalmente para sistemas pequenos. Outro problema é com relação às moléculas que estão beirando as fronteiras da caixa tendendo inclusive a escapar. Pois estas estariam interagindo em parte com o vácuo ao invés de com outras partículas do sistema, por ser uma representação finita, resultando deste modo num potencial

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

diferente ao que deveria ser obtido considerando um sistema contínuo. Assim, a soma destas medidas indesejáveis implicam na obtenção de artefato.

O artifício usado para resolver o problema com as moléculas desta região de fronteira é usar replicas da própria caixa de simulação em torno dela mesma, computando apenas as propriedades das partículas contida na caixa central não desprezando as suas interações com as caixas vizinhas. Também é importante que a partícula da caixa central não interaja de modo algum com a partícula análoga a ela da outra caixa. Para se manter o número de partículas constante na caixa e resolver o problema do raio de corte faz-se com que quando uma partícula saia da caixa outra entre no seu lugar, isso porque o movimento relativo das partículas em cada caixa é o mesmo em cada passo da simulação. O ajuste eficaz do número de réplicas no espaço tridimensional para evitar os artefatos, junto com o dimensionamento da caixa corresponde a dizer que o sistema atendeu as condições periódicas de contorno. A ideia deste procedimento é representada na Figura 10.

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

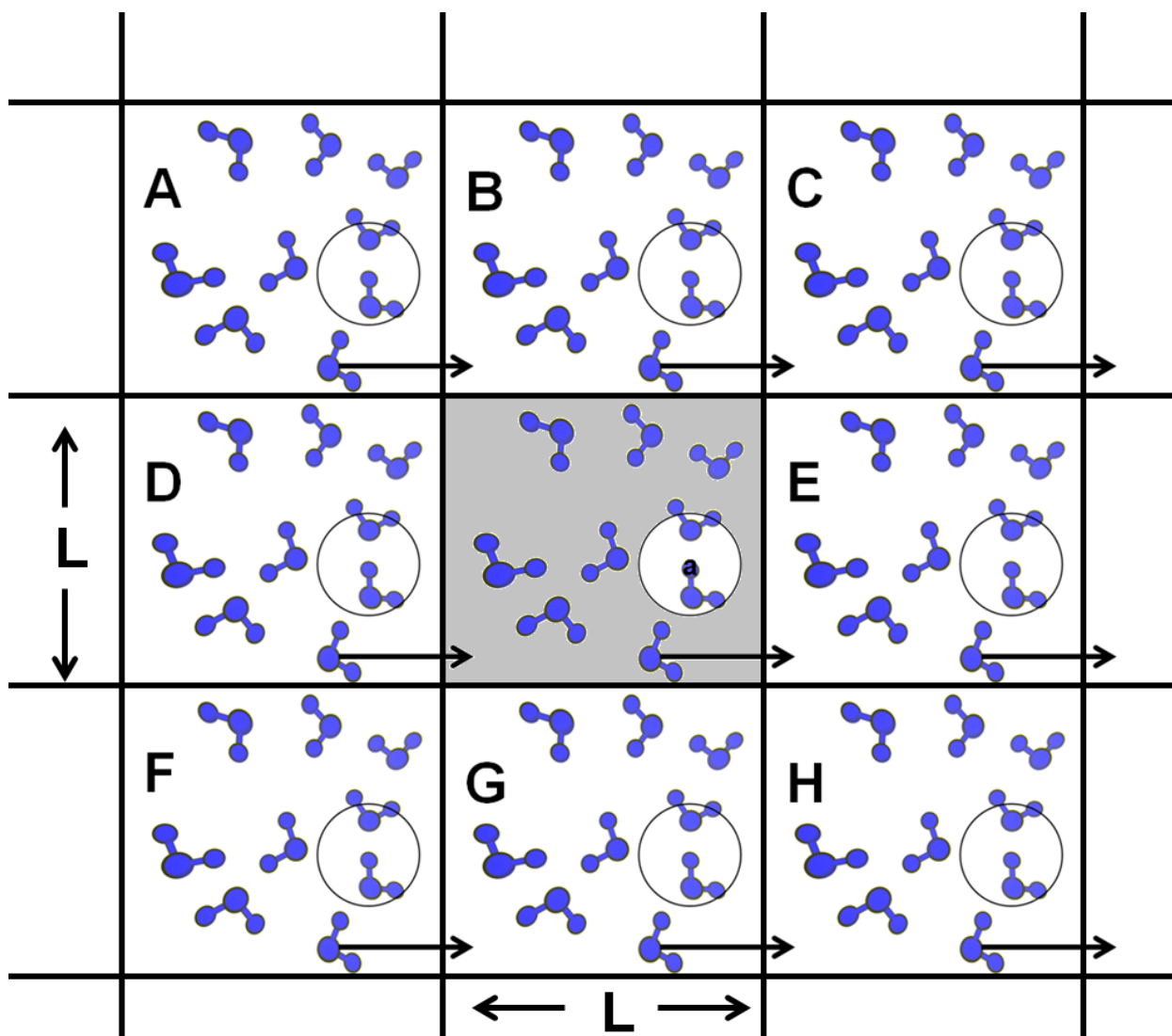


Figura 10 –Representação da caixa de simulação de fundo cinza de dimensões $L \times L$ e suas réplicas identificada por letras maiúsculas. a representa um átomo da molécula do sistema e a circunferência e o raio indicado por R_c , o raio de corte.

No centro da Figura 10 está a representação bidimensional de uma caixa com o fundo cinza de dimensões $L \times L$. Esta caixa contém várias moléculas, ao redor do átomo a está uma circunferência indicando o raio de corte das interações de curto alcance. Na base da caixa cinza, uma seta indica o movimento translacional de uma molécula para a caixa do lado direito, referenciada pela letra **E**. É interessante notar que a configuração relativa de todas as moléculas nas caixas representadas pelas letras de **A** a **H** são as mesmas, isso porque elas são réplicas da

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

caixa cinza em todos os passos de simulação. O custo operacional do computador tende a crescer com o aumento proporcional da caixa com a quantidade de partículas.

2.5.2. INTERAÇÕES NÃO LIGADAS E DE LONGO ALCANCE

De todos os cálculos de interações na simulação de DM, as não ligadas são as que mais consomem o tempo computacional. Uma maneira de tentar minimizar esse custo é facilitar a identificação dos pares de interação através por exemplo, de uma lista de vizinhos criada a partir de uma malha (*grid*). O uso de malha trata em considerar a caixa de simulação como sendo constituída por vários cubos de mesma dimensão. A idéia é de que os átomos do sistema sejam endereçados nestes cubos, por pelo menos um número de passos - normalmente um período de 5 a 20 passos. O propósito deste endereçamento é identificar univocamente as partículas que estão no raio onde o programa deve calcular diretamente a interação de van der Waals e eletrostática de Coulomb. Entretanto, para evitar problemas de cálculo das interações com os átomos que possam ter entrado ou saído do raio de corte, dentro do intervalo de passos determinado, considera-se na lista átomos que estejam num raio um pouco maior do que o raio de corte.

A interação de partículas não ligadas diminui à medida que a distância do par aumenta, a interação de van der Waals é um tipo de interação de curto alcance, enquanto a interação eletrostática é de longo alcance, uma vez que o potencial de Coulomb é inversamente proporcional a r_{ij} . Desta maneira, o raio de corte identifica a região onde as interações eletrostática são mais intensas. As duas abordagens mais usadas para tratar as interações de longo alcance são baseadas nas somas de Ewald ou na interação de Coulomb com campo de reação, V_{CCR} . Em termos de custo computacional o método de campo de reação é mais barato do que os métodos baseado na soma de Ewald. Além disso, em um artigo de revisão sobre modelagem biomolecular, Gunsteren e autores¹⁰⁷ realizaram o cálculo de energia livre de hidratação do íon Na^+ usando solvente explícito (modelo de água usado foi o *simple point charge*, SPC¹⁰⁸) para testar os modelos particle-particle/particle-mesh (P^3M) – baseado em soma de Ewald – e o de campo de reação. Os resultados obtidos indicaram que, uma caixa contendo 512 moléculas de água tratada com o método de campo de reação, já apresentou um resultado semelhante ao sistema contendo 2048 moléculas de água tratados com P^3M . Desta maneira,

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

optamos em usar o modelo de campo de reação para tratar das interações de longo alcance. A ideia deste modelo é tratar as interações eletrostáticas de longo alcance através de um dielétrico contínuo. A seguir apresentamos a equação representante deste modelo:

$$V_{Ccr} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \left[1 + \frac{\epsilon_{cr} - \epsilon}{2\epsilon_{cr} + \epsilon} \frac{r_{ij}^3}{r_c^3} \right] - \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{\epsilon r_c} \frac{3\epsilon_{cr}}{2\epsilon_{cr} + \epsilon}, \quad (2.18)$$

onde r_c é o raio de corte e ϵ_{cr} é a constante dielétrica após a região do raio de corte, os demais termos já foram definidos na equação de Coulomb.

2.5.3. SOLVENTE EXPLÍCITO

A simulação de dinâmica molecular permite o tratamento explícito do solvente. O solvente utilizado em nosso estudo é a água e atualmente é possível escolher alguns modelos para representa-la. Por exemplo, Bernal-Fowler (BF), SPC, ST2, TIPS2, TIP3P e TIP4P. Jorgensen e autores¹⁰⁹ compararam os valores experimentais da água como entalpia de vaporização, capacidade calorífica e propriedades estruturais obtidos via difração de nêutron com os valores atingidos nas simulações utilizando estes diferentes modelos. Nestas simulações o número de moléculas de água foi mantido constante, bem como a temperatura de 25° C e pressão de 1 atm. Os autores relataram que com exceção do modelo de água BF, os demais reproduziram satisfatoriamente os dados experimentais.

Estes modelos de água são rígidos podendo haver três, quatro ou cinco sítios de interação. O modelo de água mais barato em termos de custo computacional é o de três sítios, uma vez que o número de sítios de interação é menor, reduzindo assim o número de cálculos no computador. Os tipos de água TIPS, TIP3P e SPC possuem três sítios de interação. Assim, a carga do oxigênio, q_o é igual a $-2q_h$ aonde, q_h é a carga do hidrogênio. Neste trabalho optamos por usar o tipo de água TIP3P. Pois os parâmetros do campo de força usados neste trabalho⁵⁶ foram obtidos considerando este modelo de água. No modelo TIP3P q_h é igual a 0.417 C e consequentemente q_o assume o valor -0.834 C. O ângulo HOH é de 104.52 graus e a distância da ligação OH é igual a 0.972 Å. O modelo TIP3P foi obtido da reparametrização do modelo de água TIPS por

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Jorgensen e autores, da mesma forma que Berendsen e autores reparametrizaram o modelo TIPS obtendo o tipo de água SPC. Ambos modelos de água, SPC e TIP3P, foram parametrizados para reproduzir as propriedades da água líquida a 1 atm e 25° C.

2.5.4. EVOLUÇÃO TEMPORAL E O ALGORITMO *LEAP-FROG*

Uma vez estabelecido o sistema de estudo, satisfeitas as condições de contorno da caixa, número de passos e todas as demais condições referentes a dinâmica estabelece-se a posição inicial $\mathbf{r}_0$ e velocidade inicial, $\mathbf{v}_0$ de todos os átomos do sistema. Daí, a força é calculada para cada átomo usando a Equação 2.13. Ainda, devem ser calculadas a energia potencial utilizando a Equação 2.12 e a energia cinética que é obtida a partir da próxima equação:

$$E(p; m) = \sum_{i=1}^N \frac{p_i^2}{2m_i} = \sum_{i=1}^N \frac{m_i v_i^2}{2}, \quad (2.19)$$

onde p é o momento. Em seguida as novas posições, velocidades são obtidos pela integração das equações de movimento de Newton para cada incremento temporal Δt . No fim de cada passo todas estas informações são computadas para escrever a trajetória. Essas etapas ocorrem iterativamente e a condição de parada é quando o tempo de total de simulação é atingido.

É necessário optar por um algoritmo de integração das equações de movimento. Neste estudo escolhemos usar o algoritmo *leap-frog*¹¹⁰ (passo da rã). Este algoritmo é uma variação do algoritmo de Verlet que tem como base o método das diferenças finitas, onde a integração é realizada em pequenos intervalos de tempo, Δt . A seguir apresentamos as equações utilizadas para calcular as coordenadas (r) e velocidades dos átomos (v):

$$r(t + \Delta t) = r(t) + v\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) \Delta t \quad e \quad (2.20)$$

$$v\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = v\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{F(t)}{m} \Delta t. \quad (2.21)$$

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O cálculo da posição dos átomos do sistema, $\mathbf{r}$ para o intervalo $t+\Delta t$ considera a velocidade do instante $t + \frac{\Delta t}{2}$. O termo *leap-frog* vem da analogia do salto de duas rãs, quando a primeira aterrissa a segunda salta, ou seja, para se calcular a posição dos átomos é preciso obter anteriormente a velocidade e o inverso também é verdade. A próxima figura representa esta analogia num gráfico unidimensional em função dos passos de simulação indicado pelos números inteiros.

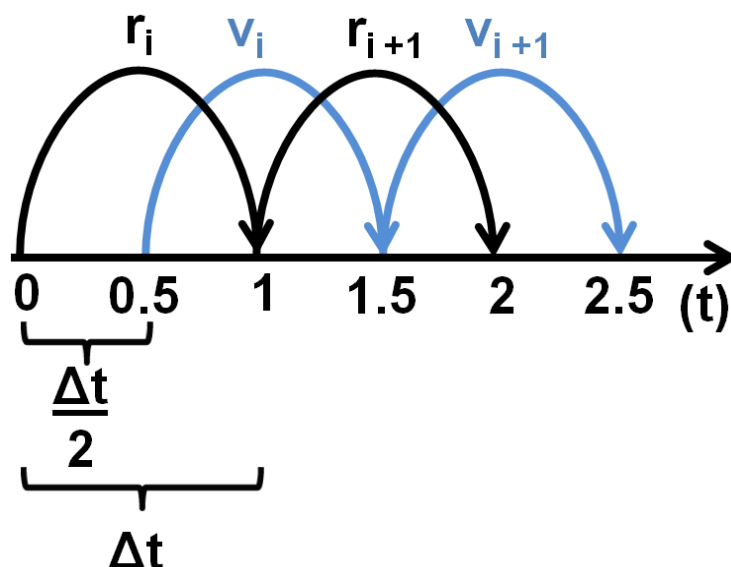


Figura 11 – Representação dos instantes aonde são calculados a velocidade e a posição dos átomos usando o algoritmo de integração das equações de movimento *leap-frog*.

A vantagem de usar o algoritmo de *leap-frog* no lugar do de Verlet está no fato de que a velocidade é considerada explicitamente, essa característica é importante no momento de gerar os ensembles mantendo a temperatura ou a pressão constante. Além disso, o algoritmo de Verlet apresenta a desvantagem numérica de possuir o último termo diretamente proporcional a Δt^2 como apresentamos a seguir:

$$r(t + \Delta t) = [2r(t) - r(t - \Delta t)] + a(t)\Delta t^2, \quad (2.22)$$

a soma do valor da diferença de dois números relativamente grande- quando comparado a Δt - ao último termo da equação pode resultar em erros de truncamento devido a precisão no cálculo ser

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

finita. Uma desvantagem encontrada no algoritmo *leap-frog* é que a posição e a velocidade andam defasadas em função do tempo, isto implica na impossibilidade de obter para um mesmo tempo a energia potencial e cinética. Um artifício usado para contornar esta dificuldade é calcular a média das duas velocidades em torno do tempo desejado como apresentamos a seguir:

$$v(t) = \frac{v\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + v\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right)}{2}, \quad (2.23)$$

os algoritmos derivados do de Verlet tendem a ser bastante utilizados, pois comparado a outros mais precisos gasta significativamente menos memória RAM e ainda possibilita o estudo de sistemas por um tempo mais longo.

2.5.5. TERMOSTATO DE BERENDSEN

Um termostato no geral tem a função de manter a temperatura de um sistema constante. Entretanto, na DM o maior objetivo do termostato é evitar com que a temperatura nos sistemas variem bruscamente em torno da temperatura desejável, T_0 . O aquecimento indesejável é observado através da variação da energia total do sistema. Este aquecimento tende a ser causado pela atuação de forças externas, atrito, ou ainda por flutuações numéricas resultantes do processo de equilíbrio do sistema ou por erros ocasionais surgidos nos passos de integração. A temperatura é descrita como uma variável da energia cinética média do sistema que por sua vez é diretamente relacionada com a velocidade dos átomos como visto nas equações seguintes:

$$(\bar{E})_{NVT} = \frac{3}{2} N \kappa_B T, \quad (3.24)$$

$$E = \sum_{i=1}^N \frac{m_i v_i^2}{2}, \quad (2.25)$$

onde $\bar{E}$ é a energia cinética média dos átomos no ensemble do tipo canônico (NVT) que possui o número de partículas(N), volume da caixa (V) e temperatura (T) constantes. N é o número de

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

graus de liberdade, κ_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura. Assim, a equação de temperatura é obtida isolando o T , quando as duas equações acima são igualadas. Considerando que a variação da temperatura pode ser descrita como o resultado do escalonamento da velocidade podemos escrever ΔT da seguinte maneira:

$$\Delta T = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \frac{2}{3} \frac{m_i (\lambda v_i)^2}{N \kappa_B} - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \frac{2}{3} \frac{m_i (v_i)^2}{N \kappa_B}, \quad (2.26)$$

$$\Delta T = (\lambda^2 - 1)T(t), \quad (2.27)$$

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

$$\lambda = \sqrt{\frac{T_0}{T(t)}}, \quad (2.28)$$

onde T_0 é a temperatura de referência. Um artifício usado na simulação de DM para evitar a variação brusca de temperatura é o uso de um banho térmico que funciona como uma fonte termal adicionando ou removendo calor de acordo com a necessidade na simulação. O termostato de Berendsen, usado neste estudo, tem essa filosofia de banho térmico e matematicamente isto significa estabelecer uma relação entre a evolução temporal do sistema com a temperatura de referência T_0 , esse conceito pode ser expresso na próxima equação:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T(t)}{\tau}, \quad (2.29)$$

onde a temperatura T é derivada em relação ao tempo t e τ é o parâmetro de acoplamento e tem unidade de tempo, este termo indica o quanto o banho e o sistema estão acoplados. Assim a variação da temperatura em dois passos consecutivos é dada por:

$$\Delta T = \frac{\Delta t}{\tau} (T_0 - T_t). \quad (2.30)$$

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Considerando o algoritmo de integração *leap-frog* e a Equação 2.30 o fator λ é escrito da seguinte maneira:

$$\lambda = \left[1 + \frac{\Delta t}{\tau} \left\{ \frac{T_0}{T \left(t - \frac{\Delta t}{2} \right)} - 1 \right\} \right]^{1/2}, \quad (2.31)$$

se o valor de τ for grande significa que o acoplamento é fraco e se igual a Δt o τ se iguala ao fator de escalonamento de velocidade simples. A maior vantagem desse método é que ele permite a flutuação sobre a temperatura desejada, desta maneira o ensemble gerado não é canônico. Entretanto uma desvantagem é que o escalonamento artificial da velocidade pode prolongar as diferenças de temperatura entre os componentes do sistema podendo resultar por exemplo no fenômeno conhecido como “solvente quente e soluto frio”, onde a temperatura do soluto é menor do a do solvente. Uma solução para resolver este problema é acoplar o termostato de Berendsen separadamente para estes diferentes constituintes do sistema, todavia o problema ainda pode persistir.

2.5.6. BAROSTATO DE BERENDSEN

O método de controle de pressão utilizado no barostato de Berendsen é análogo ao do termostato. O sistema é acoplado a um banho de pressão. A variação da pressão em função do tempo é dado pela seguinte equação:

$$\frac{dP(t)}{dt} = \frac{P_0 - P(t)}{\tau_p}, \quad (2.32)$$

Onde τ_p é a constante de tempo de relaxação do barostato, P_0 é a pressão de referência e $P(t)$ é a pressão no tempo t . A equação da pressão está logo abaixo, é obtida ao utilizar o teorema do virial,

$$P(t) = \frac{2}{3V} (E - \mathcal{E}), \quad (2.33)$$

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

onde Ξ é o virial interno do potencial aditivo de pares:

$$\Xi = -\frac{1}{2} \sum_{i < j} r_{ij} \cdot F_{ij} , \quad (2.34)$$

F_{ij} é a força na partícula i devido a interação com a partícula j e r_{ij} é a distância entre as partículas i e j. Logo, a manutenção de $P(t)$ em torno de P_0 depende da variação do volume da caixa e da variação na posição das partículas. Assim, as equações modificadas para o movimento e a variação do volume são descritas respectivamente a seguir,

$$\dot{R} = v + \zeta R , \quad (2.35)$$

e

$$\dot{V} = 3\zeta V , \quad (2.36)$$

v é o vetor velocidade do sistema, R as coordenadas da partícula e o termo de escalonamento ζ está relacionado a isoterma de compressibilidade β .

$$\frac{dP}{dt} = -\frac{1}{\beta V} \frac{dV}{dt} = \frac{3\zeta}{\beta} , \quad (2.37)$$

igualando e rearranjando as equações 2.37 e 2.32 obtemos o termo ζ como descrito abaixo:

$$\zeta = -\frac{\beta(P_0 - P(t))}{3\tau_p} . \quad (2.38)$$

Substituindo ζ nas equações modificadas do movimento e volume temos:

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

$$\dot{R} = v - \frac{\beta(P_0 - P(t))}{3\tau_P} R, \quad (2.39)$$

e

$$\dot{V} = -\frac{\beta(P_0 - P(t))}{\tau_P} V. \quad (2.40)$$

No algoritmo do Barostato de Berendsen, considerando o sistema isotrópico, o volume da caixa de simulação é escalonado pelo fator η , bem como as coordenadas dos átomos. O fator η é descrito a seguir:

$$\eta = 1 - \frac{\Delta t}{\tau_P} \beta(P_0 - P(t)), \quad (2.41)$$

O sistema tende a ser mais facilmente comprimido quanto maior for o valor de β . Semelhante ao termostato de Berendsen, quanto maior for τ_P mais fraco será o acoplamento.

2.6. DINÂMICA MOLECULAR NO SISTEMA MEMBRANA DE LPS RUGOSO DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*-ÍON

Em 2001⁵⁷ Lins e Straatsma publicaram o primeiro trabalho onde foi utilizado a dinâmica molecular clássica atomística para simular uma membrana de lipopolissacarídeo rugoso de *P. aeruginosa* PAO1. A membrana foi construída com base na estrutura química do LPS rugoso da *P. aeruginosa* PAO1 elucidada experimentalmente por Sadovskaya e autores¹¹¹, para a caracterização utilizaram técnicas de cromatografia, ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia de massa (EM). Até aquele momento, não havia sido publicado parâmetros em um campo de força que descrevesse os açúcares constituintes do LPS de *P. aeruginosa*. A unidade original do LPS possuía carga igual a -13, por isso foram adicionados seis íons Ca^{2+} e um íon Na^+ para neutralizar a carga da unidade. Lins e Straatsma otimizaram a geometria desta unidade e em seguida calcularam as carga parciais dos átomos utilizando uma abordagem de

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

química quântica. Em seguida, os valores obtidos das cargas atômicas foram associados a combinação de parâmetros dos campos de forças AMBER95¹⁰³ e GLYCAM_93¹¹². Esta primeira bicamada continha 16 unidades de LPS num arranjo espacial 4x 4 numa monocamada, na outra 40 unidades de fosfatidietanolamina (PE) e 3080 moléculas de água. Um modelo de grade eletrostática foi utilizado na adição dos 104 Ca^{2+} . O tempo de simulação gasto foi de 1 ns. Já neste primeiro estudo, os autores relataram que a membrana se mostrou pouco flexível durante a simulação no geral. Ainda verificaram, que os cátions foram importantes na simulação para estabilizar a membrana, ao interagirem especificamente com a região do *inner core* da membrana altamente negativa. Estas observações permitiram aos autores sugerir o uso desta membrana para a finalidade de meio para biorremediação na coleta de íons pesados ou radionuclídeos.

De posse do modelo acima, Shroll e Straatsma¹¹³ realizaram uma nova simulação incluindo no campo de força as alterações sugeridas por Cheatham e autores¹¹⁴ (visando melhorar a descrição dos açúcares) e enfraqueceram 2 ordens de magnitude o potencial de restrição aplicado para manter a cabeça polar do lipídeo no plano. A conformação inicial da membrana, desta nova simulação, foi a última configuração da simulação descrita anteriormente. Depois de 1 ns de simulação a membrana se mostrou equilibrada. Os autores observaram a interação diferenciada do Ca^{2+} com os grupos PO_4^- , COO^- e água através do número de coordenação e ainda a água penetrou a superfície da membrana em aproximadamente 30 Å.

Em 2007 Soares e Straatsma apresentaram os primeiros resultados em conferência⁶³ de uma simulação de membrana de LPS contendo uma porina OprF. Esta membrana continha 64 moléculas de LPS e 160 moléculas de PE e foi utilizada na simulação o mesmo campo de força híbrido do modelo de Lins⁵⁷. Os autores relataram que faz diferença significativa utilizar uma membrana de LPS ao invés de uma bicamada de lipídeo para investigar proteínas de membranas externas de *P. aeruginosa* como a OprF. Em 2009 Soares e Straatsma publicaram os resultados de uma nova simulação⁵⁹ caracterizando com maiores detalhes a interação da proteína OprF com a membrana de LPS. Os autores compararam os seus resultados com os obtidos na simulação da mesma proteína inserida numa bicamada lipídica realizada por Khalid e autores¹¹⁵. Uma das diferenças observadas na caracterização da porina, desta simulação com a bicamada assimétrica contendo LPS, foi que o poro se mostrou mais fechado. Em 2008 Soares e Straatsma⁶⁰ ainda investigaram a convergência de propriedades da membrana em função do tempo de 10 ns de simulação. Os autores realizaram duas simulações do mesmo sistema partindo de configurações

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

diferentes e observaram que não houve convergência para um ensemble de configurações em comum. Essa observação pode estar associada ao fato da baixa difusão lateral do LPS em relação às membranas de fosfolípido. Além disso, nessa escala de tempo propriedades como o potencial eletrostático através da membrana e densidade molecular tendem a convergir. Observamos que nestas três simulações o Ca^{2+} continuou sendo o único tipo de cátion utilizado para estabilizar a membrana de LPS.

Em 2008 foi a primeira vez que outros íons a não ser o Ca^{2+} foram levados em consideração neste tipo de sistema. Lins e autores⁶², calcularam o perfil de energia livre para a captação dos íons Cl^- , Na^+ , Ca^{2+} , UO_2^{2+} e de uma molécula de água pela membrana de LPS da *P. aeruginosa*. O resultado indicou que a captação da UO_2^{2+} é o processo energeticamente mais favorável em relação aos outros íons investigados. Para realizar este cálculo foi necessário substituir apenas uma molécula de água pelo íon investigado em cada caixa de simulação permanecendo assim a quantidade de íons de Ca^{2+} inalterada. Neste mesmo ano, Soares e autores⁶¹ publicaram numa edição especial do *Journal Brazilian Chemical Society* - em homenagem aos 80 anos do prof. Ricardo de Carvalho Ferreira – os resultados das análises obtidos de uma simulação de 12 ns da membrana de LPS rugoso contendo uma unidade de LPS liso na presença de uma solução aquosa contendo íons Ca^{2+} . Os autores relataram que a banda B induziu uma expansão da membrana não observada anteriormente. Esta expansão tende a afetar tanto o potencial eletrostático através da membrana quanto a distribuição das cargas na superfície da membrana.

Em 2012, Pontes e autores¹¹⁶ construíram dois modelos de bicamada constituído de lipídio A de *P. aeruginosa*, num modelo o lipídeo A é pentacilado e no outro hexaacilado. Estas membranas foram colocadas sobre a influência dos íons Na^+ e Ca^{2+} na temperatura de 300K. Os autores também simularam a bicamada de lipídio A hexaacilado sobre a influência do íon Ca^{2+} , na temperatura de 328 K. Para tanto utilizaram o campo de força GROMOS 53A6^{117,118} para tratar da parte alquil do lipídio A e o conjunto de parâmetros do GROMOS 45A4¹¹⁹ para tratar dos açúcares. Os autores relataram que a presença do Na^+ foi capaz de induzir a transição estrutural da membrana de lamelar para uma estrutura não lamelar. Além disso, o aumento da temperatura do sistema, sobre a influência do íon Ca^{2+} , não foi capaz de promover a transição estrutural da bicamada.

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O campo de força GLYCAM06¹²⁰ publicado em 2007 foi desenvolvido para ser um campo de força generalizado para moléculas como açúcares do LPS. Entretanto a *P. aeruginosa* possui açúcares modificados em seu *inner core* diferenciados que não eram bem descritos por esse campo de força. Daí em 2012, foram publicados novos parâmetros⁵⁶ por Soares e autores compatível com o campo de força GLYCAM06 tratando de açúcares que não eram descritos. Os parâmetros foram então validados considerando o LPS rugoso de *P. aeruginosa*. A validação dos parâmetros se deu pela capacidade do modelo reproduzir o comportamento e propriedades da membrana obtidas experimentalmente como: a penetração da água na região alquil; o potencial elétrico na membrana; a área por LPS; e os parâmetros de ordem das cadeias lipídicas.

O modelo tridimensional da membrana de LPS rugoso de *P. aeruginosa* de Soares e co-autores⁵⁶ possui uma monocamada contendo 72 unidades de LPS, 34488 átomos e a outra com 180 moléculas de 1,2-dipalmitoil-3-fosfatidil-etanolamina (DPPE), 12600 átomos. Neste modelo, os autores também consideraram a estrutura química do monômero extraído da cepa de *P. aeruginosa* PAO1, elucidado por Sadovskaya e autores^{111,121} ao construir a unidade de LPS da monocamada. No primeiro modelo de membrana de LPS publicado, os autores⁵⁷ consideraram a membrana estando em um meio básico, assim o estado de protonação da unidade do LPS era igual -13 e. Já neste último modelo, Soares e autores⁵⁶ ao construir a unidade do LPS consideraram o pH do meio neutro (que é o pH biológico), logo a valência do fosfato ficou igual a -1 e. Cada unidade de LPS possui 5 grupos fosfato e 3 carboxilas conferindo assim a bicamada uma carga total de - 576 e. Logo, foi necessário adicionarem 288 Ca²⁺ para neutralizar a carga total do sistema. Devido à distribuição específica das cargas neste sistema, foi desenvolvido um protocolo não convencional de vários passos para a construção desta membrana⁶⁰. A compactação da membrana foi realizada com o objetivo de atingir o valor de área por LPS inicial próximos à medida experimental⁸⁷. A termalização do solvente foi realizada a partir do 0 K com um incremento de 100K a cada 100ps. Quando em 500 ns de simulação a membrana foi aquecida a 350 K completando um tempo de 1μs. Ao final os autores verificaram que a membrana foi conservada no estado lamelar. Na Figura 12 apresentamos um esquema com o esqueleto da unidade de LPS e as suas subunidades representados por suas respectivas fórmulas estruturais. As siglas apresentadas na Figura 12 são as mesmas presentes no artigo⁵⁶ e na legenda estão os nomes das estruturas químicas que cada sigla representa.

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

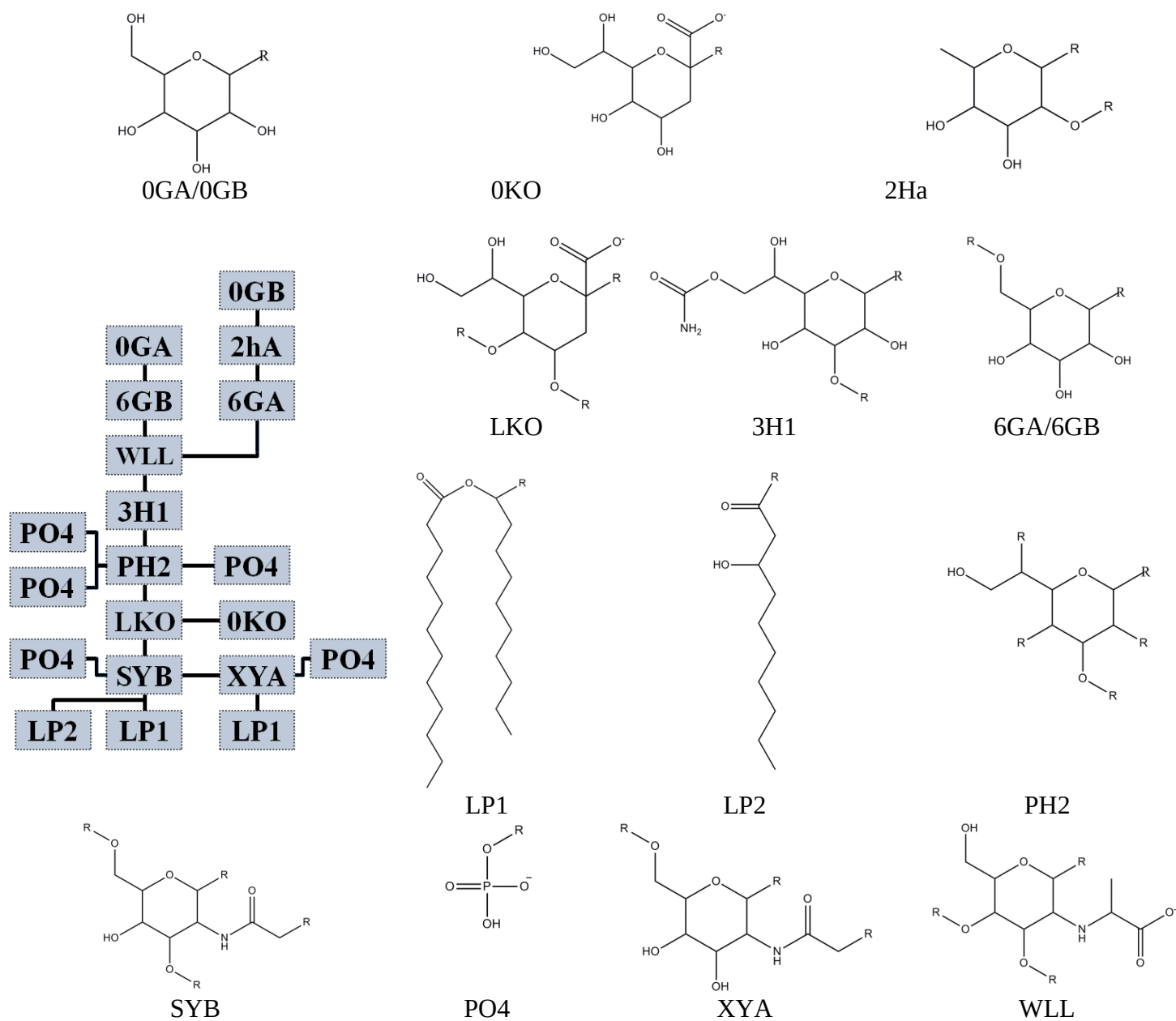


Figura 12 - Representação esquemática das moléculas constituintes de uma unidade de lipopolissacarídeo de *Pseudomonas aeruginosa* da cepa PAO1. As siglas acima foram usadas para identificar os resíduos do LPS na extensão do campo de força Glycam06 parametrizada para membrana de lipopolissacarídeo⁵⁶. A seguir apresentamos a nomenclatura formal denotada nas siglas: LP1, ácido dodecanoil (12:0); LP2, ácido 3-hidroxidecanoil (10:0); PO4, fosfato; XYA, 3-(acetil amino)-3-deoxy-D-glicose; 3H1, L-glicero-d-mano-heptose -7-formamida; SYB, variante da 3-(acetil amino)-3-deoxy-D-glicose; PH2, 2-(2-hidroxietil)-6-deoxy-D-mano-heptose; WLL, 2-(2-L-alanil)-2-deoxy-D-galactosamina; 0KO, ácido 3-deoxy-D-mano-oct-2-ulosônico; LKO, variante do ácido 3-deoxy-D-mano-oct-2-ulosônico; 6GA, 6- α -D-glucose; 6GB, 6- β -D-glucose; 0GA, O- α -D-glucose; 0GB, O- β -D-glucose; 2HA, 2- α -L-ramnose.

Não encontramos na literatura relatos sobre o estudo de membranas de LPS rugoso de *P. aeruginosa* na presença dos íons K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} e Ba^{2+} . A razão pela qual escolhemos

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

esses íons foi apresentada em maior detalhe na seção 2.2. Neste trabalho optamos utilizar os parâmetros do campo de força publicado por Soares e autores⁵⁶, pois foi desenvolvido considerando o LPS de *P.aeruginosa*. Os cátions são tratados como esferas de van der Waals com cargas fixas. Utilizamos o potencial de Lennard Jones 6-12 para modelar as esferas com os parâmetros de van der Waals do AMBER99¹²², uma vez que são compatíveis com o GLYCAM.

Tabela 2 -Valores dos raios de van der Waals, σ , e profundidade do poço ϵ , do potencial de Lennard-Jones 6-12 para o campo de força AMBER/GLYCAM

	Mg ²⁺	Zn ²⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	K ⁺	Ba ²⁺
σ (nm)	0.141225	0.195998	0.305240	0.332840	0.473602	0.378472
ϵ (KJ/mol)	3.743420	0.052300	1.923760	0.011590	0.001372	0.197050

A mudança dos parâmetros de LJ ou das cargas das partículas interagentes tendem a afetar significativamente o perfil do potencial total não ligado. Um exemplo de interação é a coordenação dos cátions com o O de H₂O. Para obter o perfil total não ligado desta coordenação, primeiro definimos i como sendo o cátion e j o átomo de O do modelo de H₂O do tipo TIP3P, este possui respectivamente os valores de σ e ϵ iguais a 0.315058 nm e 0.636386 KJ/mol e a carga de -0.834. Os parâmetros σ_{ij} e ϵ_{ij} , calculados a partir da Equação 2.07, são dados logo abaixo.

Tabela 3 - Valores dos raios de van der Waals, σ_{ij} , e profundidade do poço ϵ_{ij} , do potencial de Lennard-Jones 6-12 para o campo de força AMBER/GLYCAM, considerando i como sendo o cátion e j o átomo de O de H₂O do modelo TIP3P.

	Mg ²⁺	Zn ²⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	K ⁺	Ba ²⁺
σ_{ij} (nm)	0.228141	0.255528	0.310149	0.323949	0.394330	0.346765
ϵ_{ij} (KJ/mol)	1.543458	0.182436	1.106460	0.085882	0.029549	0.354119
A (nm ¹² KJ/mol)	1.22745x10 ⁻⁷	5.65499x10 ⁻⁸	3.50622x10 ⁻⁶	4.58861x10 ⁻⁷	1.67076x10 ⁻⁶	4.28185x10 ⁻⁶
B (nm ⁶ KJ/mol)	8.70522x10 ⁻⁴	2.03143x10 ⁻⁴	39.3929x10 ⁻⁴	3.97028 x10 ⁻⁴	4.44382x10 ⁻⁴	24.6275x10 ⁻⁴

Depois de obtidos os parâmetros calculamos, no intervalo de 0 a 0.5 nm de distância entre i e j, o potencial de Lennard- Jones, Coulomb e o total não ligado. Apresentamos os gráficos destes potenciais na Figura 13, considerando por vez a interação do átomo de O de H₂O com cada um dos 6 cátions.

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

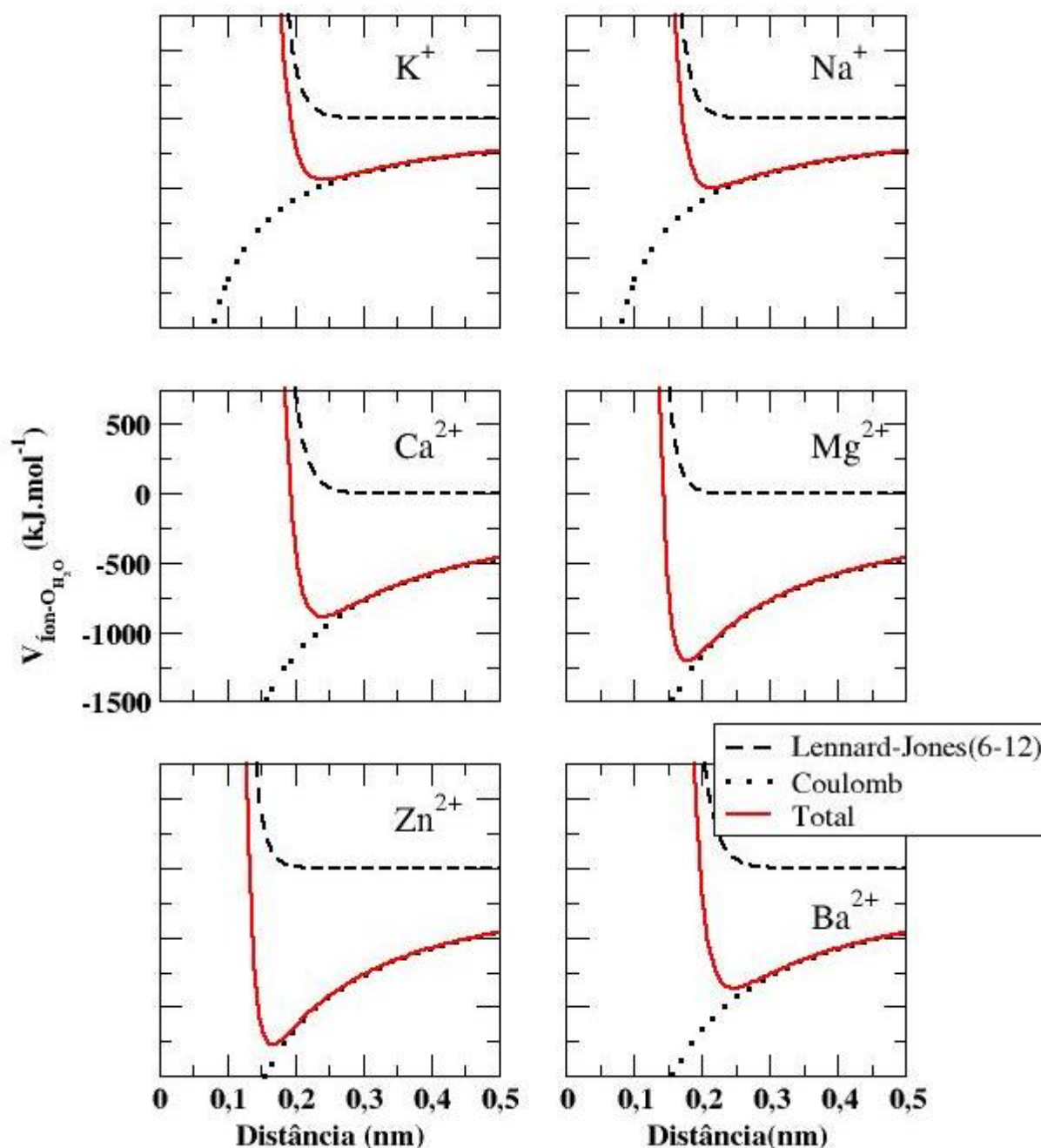


Figura 13 – Gráficos do potencial de Lennard Jones- 6-12, Coulomb e potencial total não ligado das interações dos cátions K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} com o O de H_2O do modelo TIP3P utilizando os parâmetros σ e ϵ do campo de força AMBER99.

O potencial coulômbico tem os valores das cargas como parâmetros no numerador da equação, por isso o valor absoluto do potencial cresce com o aumento da carga. O valor negativo indica que os sinais das cargas são diferentes, o que resulta num potencial atrativo, pois tende a ser mais negativo quando o raio diminui. Por essa razão é que o potencial coulombico do cátion monovalente cresce mais

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

rápido em função do aumento da distancia de interação quando comparado ao cátion divalente. O padrão entre os potenciais de Lennard Jones são semelhantes, uma vez que partem da mesma equação. No instante igual a zero não observamos nenhum valor pois representa exatamente o centro da esfera. Somente a partir de um instante de crescimento do raio é que percebemos o gráfico explodir na assíntota vertical indicando a alta energia necessária para penetrar na esfera. O raio de van der Waals é obtido no instante quando o valor da energia se iguala a zero. O mínimo em cada poço indica a distância de interação de menor energia. A região negativa do gráfico representa o domínio da segunda parcela do potencial. Quando o raio de interação aumenta, o potencial rapidamente tende a zero, isso porque o potencial é diretamente proporcional a $1/r^{12}$, por isso esse potencial é tido como de curto alcance. A contribuição do potencial de Lennard-Jones mais o de Coulomb determina o potencial total não ligado de interação. Observamos os poços mais profundos nos gráficos dos potenciais totais do Mg^{2+} e Zn^{2+} , ainda, a contribuição eletrostática se torna dominante a partir do raio aproximado de 0.15 nm, enquanto o Ba^{2+} e o Ca^{2+} na distância de 0.25 nm. No caso do K^+ e Na^+ a contribuição coulômbica passa a ser dominante respectivamente nos raios aproximados de 0.25 nm e 0.21nm e ainda, o poço do K^+ é mais raso quando comparado ao Na^+ .

3.METODOLOGIA

Optamos por utilizar uma abordagem clássica atômica para investigar a influência dos cátions na membrana de LPS rugoso de *P. aeruginosa*. O modelo tridimensional da membrana utilizado foi o de Soares e autores⁵⁶ e está representado na figura abaixo.

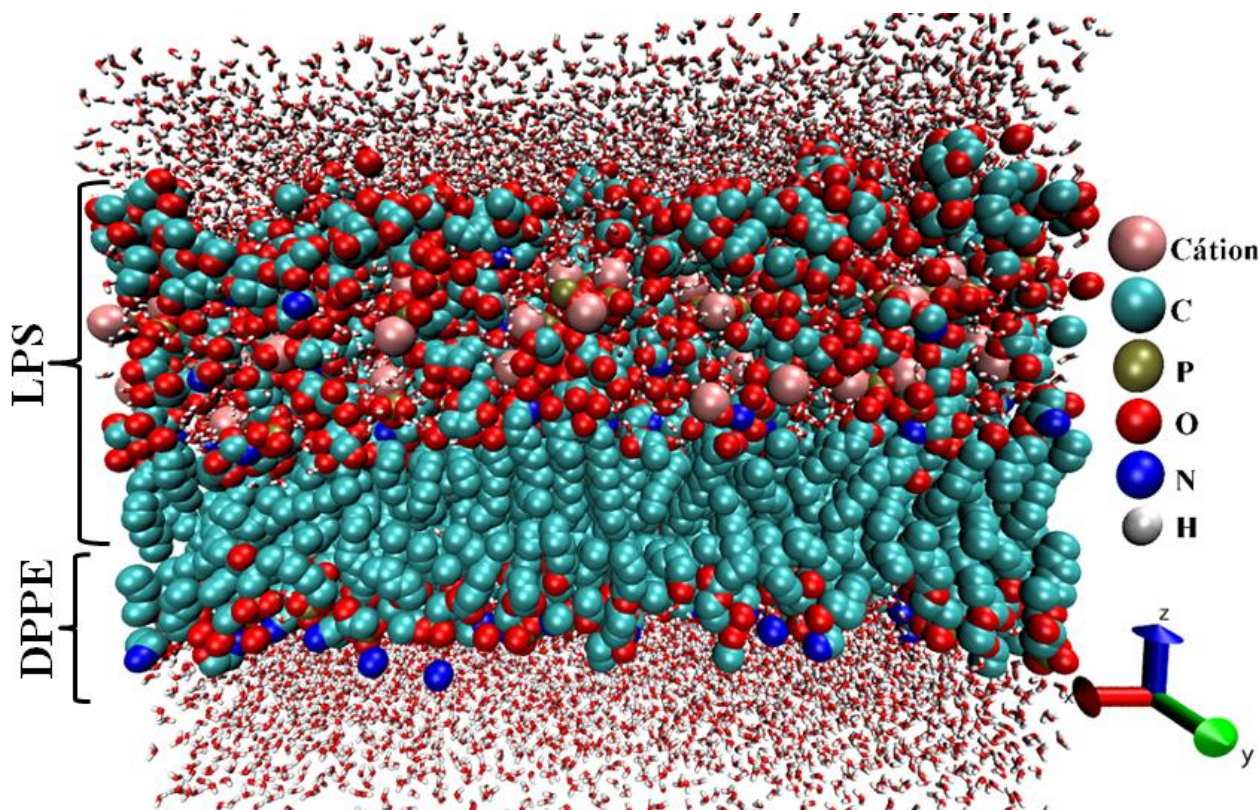


Figura 14 - Representação esquemática da bicamada constituída de LPS e DPPE em meio aquoso na presença de cátions.

A parte inferior da Figura 14 representa a camada de DPPE, logo acima da mesma figura está a camada de LPS, a região aonde as esferas em ciano são dominantes indicam a região apolar da membrana. A região superior do LPS determina o *core*, nela identificamos moléculas de água no modelo de bastão e cátions interagindo com os grupos COO^- e PO_4^- .

3.METODOLOGIA

O campo de força utilizado para tratar do LPS é descrito na ref.⁵⁶ e faz uso de parâmetros de Lennard-Jones extraídos do campo força AMBER99¹²². O modelo de água descrito nos sistemas foi o TIP3P¹⁰⁸ O protocolo de simulação foi o mesmo para todos os sistemas.

3.1. PROTOCOLO DA SIMULAÇÃO MOLECULAR

As cinco configurações iniciais das caixas de simulação foram preparadas substituímos o Ca^{2+} do modelo de membrana de LPS previamente equilibrado por 0.6 μs . Nas caixas com K^+ , ou Na^+ ainda trocamos 288 moléculas de água pelos respectivos cátions, considerando o potencial eletrostático mais favorável, deste modo, mantivemos a carga neutra nos sistemas. No instante inicial da simulação cada caixa continha apenas um tipo dos seguintes cátions: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} e Zn^{2+} . A seguir, apresentamos a Tabela 4 com o número dos cátions e das moléculas de LPS, DPPE, H_2O constituintes dos sistemas.

Tabela 4 -Número de moléculas ou cátions e átomos presentes nas caixas de simulação contendo LPS, DPPE e água na presença dos cátions monovalentes (M^+) ou divalentes (M^{2+}).

	LPS/Átomos	DPPE/Átomos	Cátions/Átomos	Água/Átomos	Total de átomos
M^+	72/34488	180/12600	576	15720/47160	94824
M^{2+}	72/34488	180/12600	288	16008/48024	95400

A caixa utilizada para a dinâmica é retangular com dimensões iniciais 11.3 x 8.14 x 10.01 nm. Condição periódica de contorno foi aplicada nas três direções e o *ensemble* do sistema é do tipo NTP – número de partículas (N), temperatura (T) e pressão constantes (P). O acoplamento da pressão escolhido foi do tipo semi-isotrópico com um tempo de acoplamento de 0.4 ps, pressão de 1 bar nos eixos x e y controlada por um barostato de Berendsen¹²³ e compressibilidade de $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$. Para o controle da temperatura de 300K se usou um termostato Berendsen¹²³ acoplado individualmente a membrana, água e aos íons com um tempo de relaxação de 0.4 ps utilizando o algoritmo velocity rescale¹²⁴. O centro de massa de translação do sistema foi removido com uma frequência de 1 passo. Com o propósito de agilizar o tempo de cálculo aplicamos algoritmo de *constraints* nas ligações envolvendo átomos de hidrogênio a partir do algoritmo *linear constraint solver*¹²⁵. O integrador escolhido para as equações de movimento de Newton foi o *leap-frog*¹¹⁰ com um passo de 2 fs. A interação de longo alcance foi

3.METODOLOGIA

tratada com campo de reação, utilizando a constante dielétrica (ϵ_{cr}) com valor de 66. Os valores do raio de corte (*cut-off*) de van de Waals e de Coulomb foram iguais a 1.4 nm.

Tanto as simulações quanto as análises descritas nas próximas seções foram realizadas com o pacote GROMACS na versão 4.0.4¹⁰⁴, já para as visualizações dos sistemas utilizamos o programa *Visual Molecular Dynamics*, VMD¹²⁶. O tempo total simulado foi de 210 ns. Os últimos 70 ns foram utilizados para as análises; considerando-se assim os 140 ns iniciais como período de equilíbrio, a menos que explicitado.

Realizar todas estas simulações em um computador convencional de mesa seria inviável pois poderia gastar anos, por isso foi aprovado um projeto junto ao *Environmental Molecular Sciences Laboratory*, EMSL para que pudéssemos ter acesso ao uso do supercomputador Chinook. Foi a oportunidade de uso da Chinook que nos permitiu simular a membrana de LPS sobre a influência dos cátions em tempo hábil. Em nossas simulações escolhemos utilizar o GROMACS com 30 nós da Chinook, o que equivale a 240 núcleos de processamento. O uso desta quantidade de nós equivaleu a obtenção média de 0,39 ns de simulação por hora. O tempo total de simulação em todos sistemas foi de 1.260 ns. Isso equivale a um tempo contínuo de cálculo de aproximadamente 3230,7 horas, ou 134 dias. A Chinook está na lista dos 500 supercomputadores mais rápidos do mundo e possui a seguinte configuração:

- ✓ 2310 placas mães HP™ *dual-socket*, cada nó com 2 processadores *quad-core* AMD™, 32 GB de memória por nó e cada núcleo de processamento tem 4 GB disponível;
- ✓ 74 TB de memória, 350 GB para o disco de trabalho local por nó e 250 TB para o sistema de fila paralelo com um pico de performance de 163 TeraFLOPs;
- ✓ Rede para cálculos paralelos *InfiniBand* interconectados com switches Voltaire e placas de interface de redes Mellanox;
- ✓ A Chinook funciona com uma versão modificada do sistema Linux Red Hat;
- ✓ O gerenciamento dos cálculos nas filas é feito pelo programa SLURM.

3.2 ANÁLISE DE DADOS

A termodinâmica estatística fornece uma conexão entre propriedades macroscópicas e a descrição microscópica de um sistema em equilíbrio. A simulação de dinâmica molecular escreve a cada passo 3 coordenadas cartesianas e 3 momentos para cada partícula do sistema definindo um estado microscópico. O conjunto dos sistemas idênticos em composição e em condições macroscópicas, mas em diferentes estados microscópicos ou pontos representativos define um ensemble. Quando o número de partículas (N), pressão (P) e temperatura (T) no sistema são constantes temos um *ensemble* conhecido como isotérmico-isobarico, caso N, T e o volume (V) sejam constantes o tipo de ensemble é o canônico. A escolha do cálculo de uma propriedade termodinâmica define também o tipo de *ensemble*. Uma propriedade termodinâmica observável é uma média no *ensemble* de estados microscópicos de um sistema. Utilizamos alguns programas de análise de trajetória do pacote GROMACS, com base na termodinâmica estatística, para transformar os dados em informação. A seguir apresentamos os programas utilizados e explicamos um pouco sobre os conceitos e quais informações úteis estes podem oferecer.

3.2.1. PERFIL DE DENSIDADE

O *g_density* é o programa do GROMACS que calcula a densidade parcial através da caixa de qualquer um dos seus constituintes, por exemplo água, cátions ou ainda um átomo de uma determinada molécula. Os perfis das densidades parciais apresentados neste trabalho foram determinados em termo da massa (Kg/m^3) em função ao eixo Z da caixa. Este eixo é paralelo as cadeias alquil da bicamada assimétrica DPPE-LPS como indicado na Figura 14. Com esta análise é possível comparar o efeito dos íons na membrana de LPS pela diferença da intensidade da curva de densidade de um mesmo grupo nos diferentes sistemas. Quanto maior for o pico maior também é a densidade local daquele grupo na caixa. O alargamento da curva pode estar associada ao aumento da desordem do grupo analisado em função do tempo. Assim, a membrana

com as curvas do perfil de densidade mais alargadas tendem a possuir também um maior volume.

3.2.2. DISTRIBUIÇÃO RADIAL DE PARES

O `g_rdf` é o programa que calcula a função da distribuição radial dos pares. É uma ferramenta que pode ajudar a compreender como se dá a distribuição e a interação entre duas partículas genéricas do tipo **i** e **j**. A função de distribuição radial, $g_{ij}(r)$ determina a densidade relativa das partículas do tipo **j** (considerando a sua densidade padrão) em função do raio de distância de partículas do tipo **i**. Esta função é definida na equação a seguir:

$$g_{ij}(r) = \frac{N_{ij}(r, r + \Delta r)}{4\pi r^2 \Delta r \rho_j}, \quad (3.01)$$

aonde o termo **r** é a variável e representa a separação entre os átomos do tipo **i** e **j**, já $N_{ij}(r, r + \Delta r)$ diz respeito ao número médio de átomos **j** encontrados na camada esférica de extensão **r** e **r** + Δr centrada nos átomos de referência **i** tendo como elemento de volume da camada esférica $4\pi r^2 \Delta r$, restando ρ_j como a densidade numérica média do átomo **j** no líquido. O conceito desta equação está representado na Figura 15.

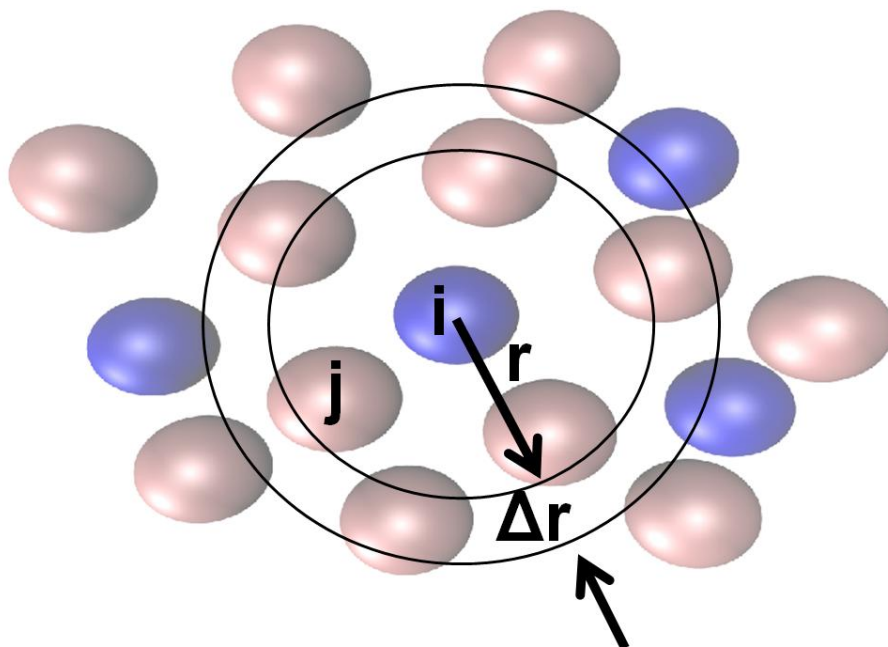


Figura 15 – Representação bidimensional da interação da partícula de referência *i*, na cor azul centrada na figura com seu ambiente. As partículas do tipo *j* estão representado na cor rosa. O termo *r* representa o raio com origem na partícula *i* e Δr é o acréscimo radial.

O valor de $g_{ij}(r)$ é adimensional, uma vez que é a razão de densidades. No gráfico de $g_{ij}(r)$, o pico do gráfico representa quantas vezes a densidade média relativa é maior ou menor do que a densidade padrão naquele raio de distância da partícula de referência. Assim o $g_{ij}(r)$ tende a 1 a medida que o raio tende ao infinito. Uma vez conhecido o $g_{ij}(r)$ é possível quantificar o número de entidades *j* ao redor da partícula de referência *i* calculando o número de primeiros vizinhos, C_{ij} , utilizando a próxima equação:

$$C_{ij}(R_c) = \int_0^{R_c} \rho_j g_{ij}(r) 4\pi r^2 dr, \quad (3.02)$$

uma vez definido o raio de corte, R_c , integra-se a equação partindo do centro de referência da partícula *i* de coordenada 0 até o R_c . É possível obter o número de coordenação a partir do número de primeiros vizinhos. Neste estudo, calculamos o número de coordenação utilizando o R_c equivalente ao *r* do primeiro poço do $g(r)$. É importante ressaltar que os números calculados aqui equivalem a uma média em função do tempo.

3.2.3. PARÂMETRO DE ORDEM (S_{CD})

O `g_order` é um programa do GROMACS que calcula o parâmetro de ordem por átomo de carbono das cadeias alquil. O parâmetro de ordem é uma medida que está diretamente relacionado não apenas a flexibilidade da cadeia lipídica, mas também a sua direção na cadeia lipídica. O seu valor é influenciado pela variação da temperatura. A seguir apresentamos equação que define o parâmetro de ordem: .

$$S_{CD} = \overline{\left(\frac{3}{2}\cos^2\theta_z - \frac{1}{2}\right)} , \quad (3.03)$$

a barra em cima do lado direito da equação significa que o parâmetro de ordem, S_{CD} é um valor médio dos valores obtidos durante a simulação. O θ_z é o ângulo entre o eixo Z da caixa de simulação e o eixo atômico Z - representamos θ_z na Figura 16. A regra de definição do eixo no sistema cartesiano atômico só é permitido para carbono $n^{118,127}$, C_n , do tipo CH_2 , onde n identifica a sua posição na cadeia lipídica. A definição do sistema cartesiano atômico é dado da seguinte maneira: O eixo Z é definido pelo vetor que parte do carbono C_{n-1} para o carbono C_{n+1} . O eixo Y é dado no plano formado por C_{n-1} , C_n e C_{n+1} na direção do C_n e é perpendicular ao eixo Z. Por fim X é definido perpendicular na intersecção dos dois eixos. A regra da mão direita é utilizada para definir o sentido unívoco do sistema

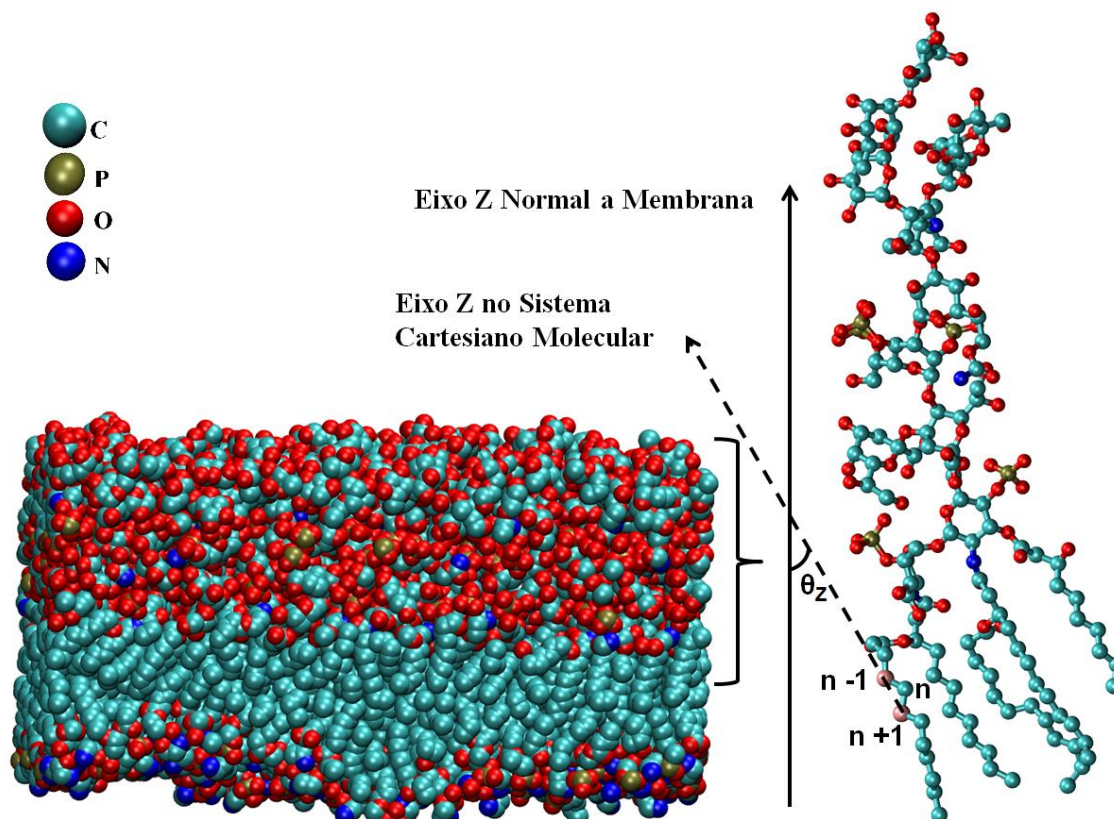


Figura 16 – Esquema representando o ângulo θ_z formado entre o eixo Z do sistema da bicamada e o eixo Z do sistema cartesiano definido no átomo de carbono do tipo CH_2 .

A equação $\cos^2(\theta_z)$ é uma função periódica com o conjunto imagem variando no intervalo de zero a um. Quando consideramos θ_z igual a 0 ou 180, que é a situação aonde o sistema estão paralelos, obtemos o máximo da função cosseínodal e também o S_{CD} igual a um. Quando o eixo atômico está totalmente perpendicular ao eixo Z da caixa (90°) a função cosseínodal dá zero e o S_{CD} resultante é igual a -0.5. O valor de S_{CD} igual a zero pode indicar tanto uma orientação isotrópica (desordenada), ou ainda experimentalmente um sistema perfeitamente ordenado no ângulo aproximado de 54.7° em relação ao campo magnético do aparelho de RMN (ressonância magnética nuclear), Bydder e autores¹²⁸ detalham esse assunto.

3.2.4. ÁREA POR LIPOPOLISSACARÍDEO

A área média por LPS (A_c) na membrana é calculada em função do tempo. Quando A_c começa a variar pouco em torno de um valor é um indicativo de que o sistema está equilibrado. Além disso, A_c é uma medida importante para verificar transições estruturais e o empacotamento da membrana. O cálculo da A_c em nosso estudo considera o plano XY da caixa de simulação. A Figura 17 representa esse plano e o retângulo preto limita a área de um lipopolissacarídeo na cor laranja. A equação que calcula a área média destes lipopolissacarídeos é dada a seguir:

$$A_c = \frac{L_x \times L_y}{N} , \quad (3.04)$$

sendo L_x e L_y respectivamente a medida do comprimento da membrana no sentido do eixo X e Y da caixa de simulação e N é o número total de LPS, nesse caso são 72.

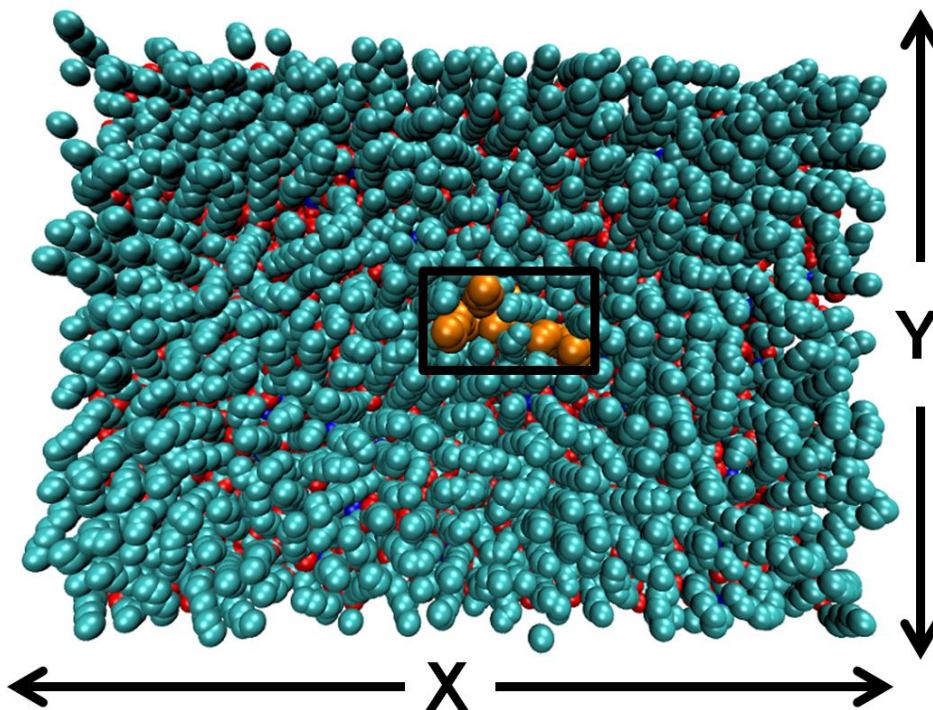


Figura 17 – Representação das dimensões do plano X e Y da monocamada de LPS e o retângulo preto restringe a unidade de LPS em laranja.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um padrão adotado nesta seção com o intuito de estabelecer um sistema referencial unívoco para os grupos aniônicos foi: i) definir o grupo de COO^- por seu átomo de C; ii) e definir o grupo PO_4^- tanto do LPS quanto do DPPE por seus átomos de P. Logo, as discussões a seguir consideram estas definições.

4.1. PERFIL DE DENSIDADE

Calculamos para cada caixa de simulação o perfil de densidade parcial da água, cátions, COO^- , PO_4^- e cadeias alquil tanto do LPS quanto do DPPE. Os gráficos do perfil de densidade parcial de cada um destes grupos são apresentados na Figura 18. Estes gráficos mostram que as áreas das curvas dos cátions não são iguais, isso porque a quantidade de cátions pode variar e as massas dos átomos são diferentes. A seguir dispomos os cátions segundo a sua contribuição no aumento desta área: Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} , K^+ e Ba^{2+} . A área da curva da água varia de um sistema para outro apenas quando a carga do íon presente no sistema varia. Esta diferença deve-se à substituição de moléculas de água por cátions, realizada no preparo da caixa de simulação contendo cátions monovalentes. Todas as demais áreas permaneceram constantes, já que não houve mais nenhuma alteração na quantidade dos demais constituintes dos sistemas.

O perfil de densidade dos grupos COO^- e PO_4^- representa a região do *inner core* da membrana, indicado no intervalo aproximado de 4 a 7 nm nos gráficos, exceto para o gráfico da caixa contendo o íon K^+ . A separação dos picos dos grupos PO_4^- e COO^- é devido à distribuição diferenciada destes grupos na unidade de LPS que contém 5 grupos PO_4^- e 3 COO^- . Por exemplo, o segundo pico do grupo PO_4^- (da esquerda para a direita) na região do *inner core* é maior do que o primeiro por apresentar uma unidade adicional de PO_4^- . O grupo PO_4^- no intervalo de 1 a 3 nm indica a cabeça polar do DPPE. As nossas simulações mostram que membranas de LPS são mais hidratadas que membranas fosfolipídicas como indicado pela penetração de moléculas de água até a região terminal das cadeias alquil.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

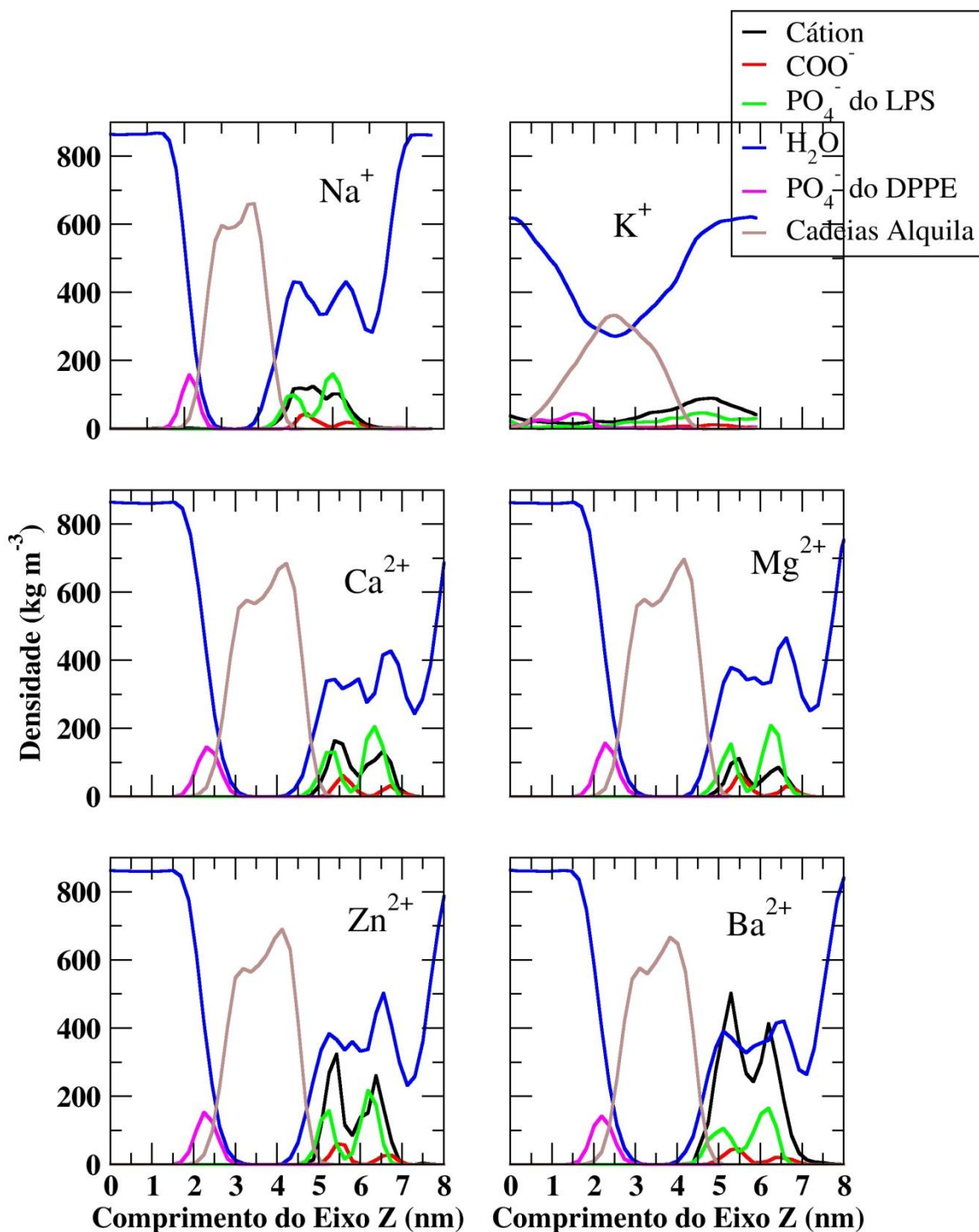


Figura 18 – Gráficos do perfil de densidade em termos da massa e em função do eixo Z da caixa de simulação considerando os últimos 70 ns da dinâmica. O gráfico que representa bicamada em presença de K^+ apresentou um comportamento diferenciado dos demais indicando mudança estrutural.

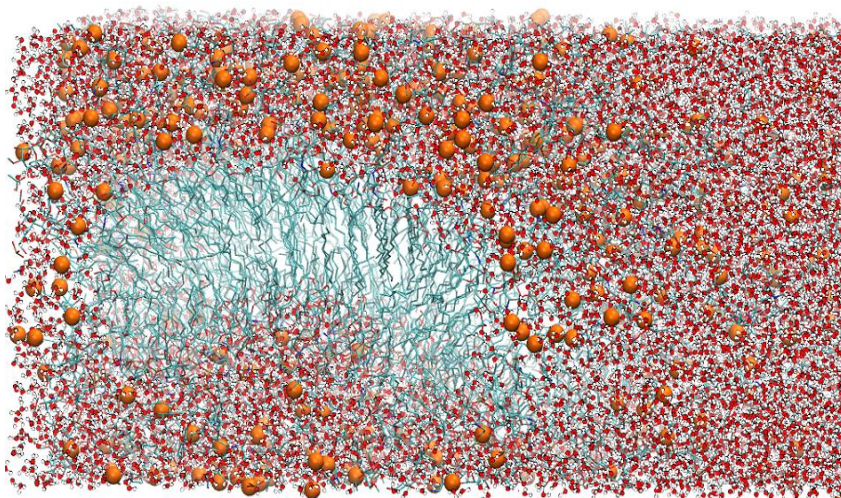
O perfil de densidade para os diferentes sistemas mostram uma maior densidade de moléculas de água na superfície da membrana com um decréscimo gradual ao longo do eixo Z

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

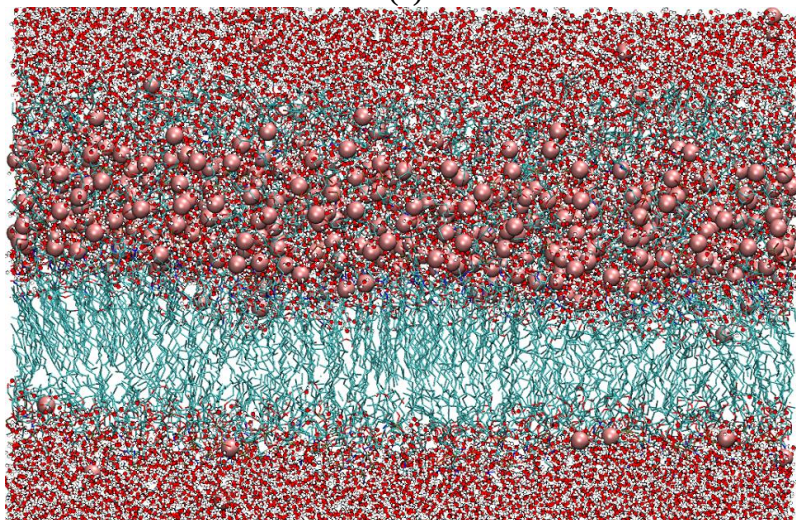
em direção ao centro da bicamada (indicada pelas curvas das cadeias alquil). Este perfil é distinto apenas para o sistema contendo o íon K^+ . Assim, o perfil de densidade da água mostra que independentemente do tipo de íon, a água penetra profundamente a região apolar da bicamada. Esta penetração da água na região alquil foi experimentalmente observada por Ktsaras e co-autores¹²⁹ e experimentalmente reproduzida em simulação de dinâmica molecular por Soares e autores⁵⁶. Ktsaras e autores relataram ainda a partir de dados obtidos por difração de raio-x que, a água penetrou menos na bicamada de LPS de *P. aeruginosa* contendo íons Ca^{2+} do que noutra contendo os íons Mg^{2+} e Na^+ . O perfil de densidade da água que obtivemos para estes íons indicaram esta mesma observação.

Observamos ainda na Figura 18 que o padrão da distribuição da água na região do *inner core* variou de acordo com o tipo de cátion. Os sistemas contendo Mg^{2+} e Zn^{2+} apresentaram um perfil de densidade semelhante, entretanto estes dois cátions possuem raios de van der Waals semelhantes e cargas iguais. Já os sistemas contendo os demais pares de cátions de raios semelhantes e cargas diferentes apresentaram padrões da distribuição de água diferentes. Esta observação indicou uma prevalência do efeito da carga em relação ao raio de van der Waals na distribuição da água no *inner core*.

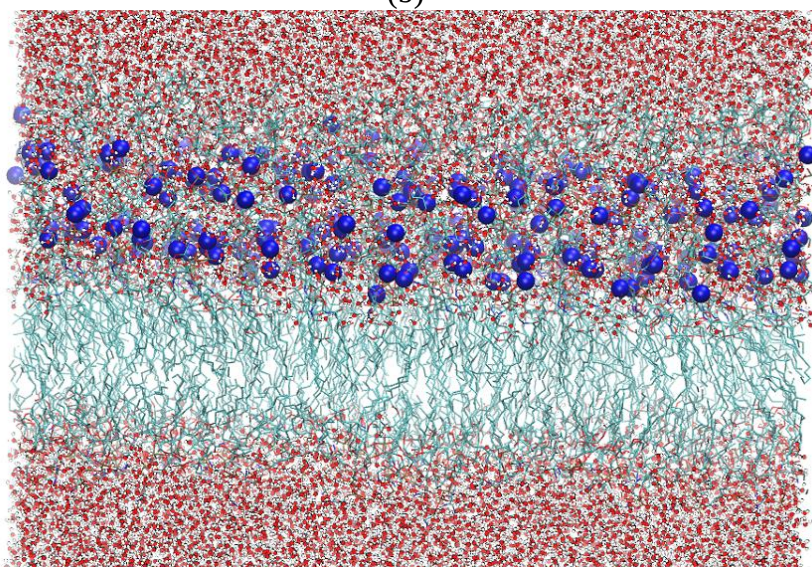
O sistema contendo o íon K^+ foi o único em que a água exibe uma grande densidade ao longo de todo eixo Z. Além disso, o seu perfil de densidade se mostrou distinto dos demais indicando uma mudança estrutural da membrana. O perfil padrão observado nas demais caixas apresentam os grupos COO^- e PO_4^- posicionados na margem direita do grupamento alquil, com os íons majoritariamente localizados próximos a estes grupos, na margem esquerda das curvas da cadeia alquil estão as curvas da cabeça polar do DPPE. Este padrão indica uma estrutura lamelar. Apresentamos na Figura 19 a representação da configuração final de cada um destes sistemas equivalentes ao tempo de 210 ns de simulação.



(a)



(b)



(c)

Continua na próxima página

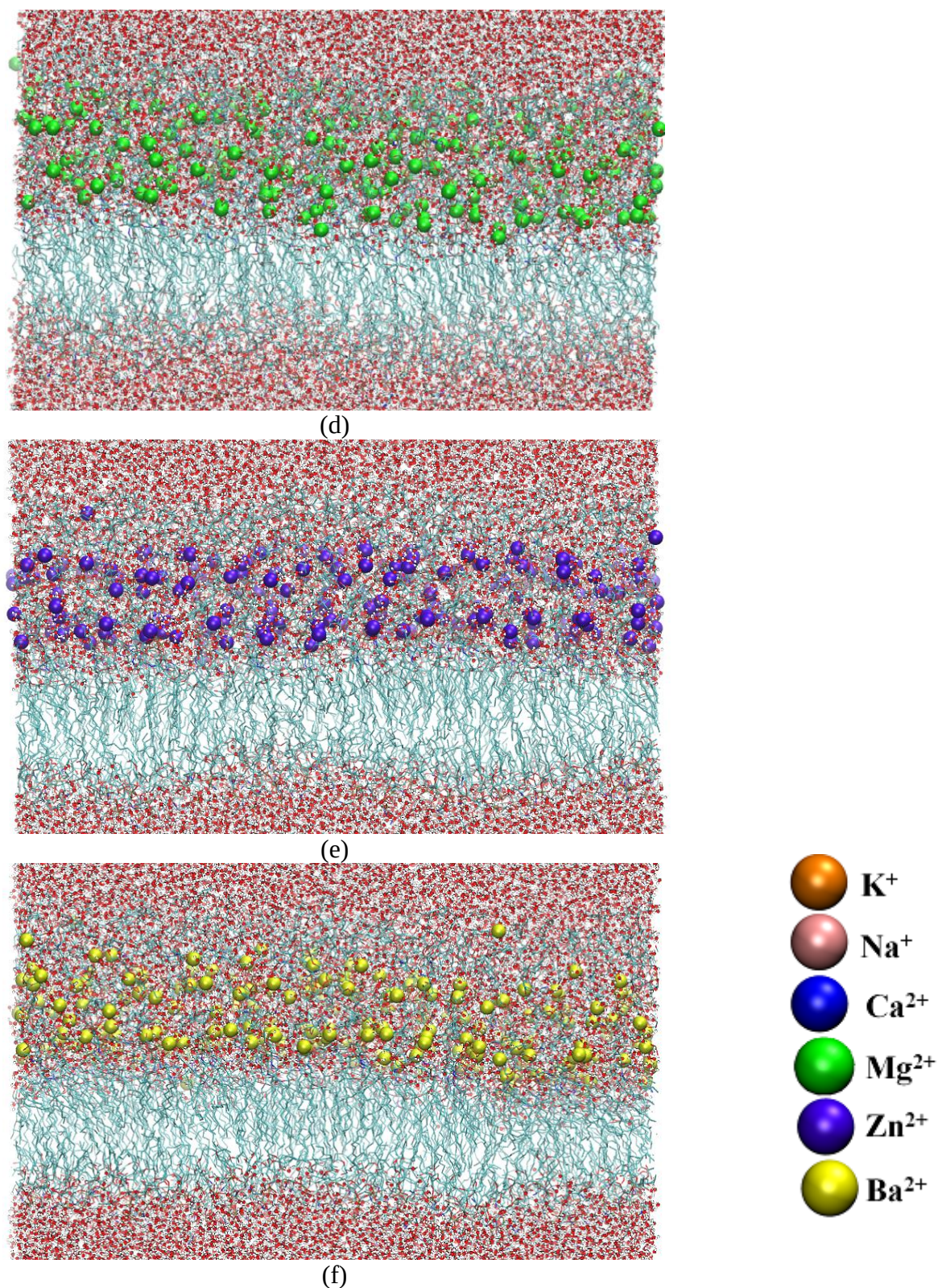


Figura 19 – Representação esquemática das configurações nas bicamadas alcançadas ao final de 210 ns de simulação. Cada bicamada sofre a influência de apenas um tipo de íon. A seguir dispomos, a referência da caixa na figura mais o tipo de íon presente : (a), K^+ ; (b), Na^+ ; (c), Ca^{2+} ; (d), Mg^{2+} ; (e), Zn^{2+} ; (f), Ba^{2+} .

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

O formato diferenciado da distribuição das curvas no gráfico que representa a caixa contendo o íon K^+ da Figura 18 aponta para a formação de um estado de agregação não lamelar. O alargamento da curva da cadeia alquil no gráfico indica que a membrana está se dobrando no sentido perpendicular ao eixo Z. O deslocamento da curva do PO_4^- do DPPE para dentro da região das cadeias alquil, indica que a camada de DPPE está acompanhando o deslocamento da camada de LPS, atuando assim como uma camada interna curvada. A persistência significativa dos picos dos grupos PO_4^- e COO^- no lado direito da região alquil indicam a manutenção do *inner core* da membrana. A curva do K^+ espalhada por toda a caixa junto com a curva dos grupos PO_4^- e COO^- , indica que algumas unidades de LPS podem ter se espalhado na caixa durante a formação do novo estado de agregação e o K^+ deve estar se associando a estas unidades. Esta descrição é confirmada na Figura 19 (a). A análise do gráfico que representa a caixa contendo o íon K^+ da Figura 18, indica que não apenas a carga tende a influenciar na transição estrutural de uma membrana, mas também o raio de van der Waals, uma vez que o Na^+ tendo a mesma carga do K^+ não foi capaz de alterar o estado lamelar da membrana.

A comparação entre os íons monovalentes e divalentes mostra que os primeiros tendem a interagir não especificamente com as unidades de LPS resultando em um sistema mais fluido ou menos ordenado. Esse comportamento foi observado nos gráficos da Figura 18 que apontaram a presença de íons monovalentes pela tendência da distribuição homogênea dos íons mostrado na região do *inner core*. Ainda assim, o perfil de densidade da caixa contendo Na^+ indicou que a membrana simulada se manteve estável no estado de agregação lamelar. No geral, o perfil dos íons divalentes apresentam dois picos bem definidos indicando a coordenação específica a sítios negativos dos LPS vizinhos. Em termos do grupo fosfato os sistemas contendo os íons Mg^{2+} e Zn^{2+} apresentam os picos mais separados e são semelhantes ao do íon Ca^{2+} . A intensidade bem definida destes picos reflete uma coordenação mais perene tanto dos grupos fosfato e carboxila com estes íons.

Segundo Naumann e autores⁹⁸ a determinação da temperatura de transição de fase, em teoria deve estar correlacionada aos seguintes fatores : i) o número e tamanho das cadeias alquil ligadas no mesmo grupo polar; ii) a densidade de carga localizada na cabeça polar; iii) ligação dos cátions divalentes na membrana; iv) e por fim parâmetros geométricos como área da cabeça polar e a região alquil. Além destes, outro fator importante é a carga do cátion, hidratação do íon e *a priori* o raio iônico. Garidel e autores¹⁰⁰ mediram a diferença entre a capacidade calorífica de

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

uma membrana de LPS Re de *Salmonella minnesota* cepa R595 contendo íons Mg^{2+} , Ca^{2+} e Ba^{2+} . Os autores reportaram que cátions divalentes induzem mudanças significativas nas propriedades físico-químicas destas membranas como por exemplo mobilidade de cadeias alquil e supra-estrutura da bicamada comparativamente com cátions monovalentes.

4.2. DISTRIBUIÇÃO RADIAL

O modo de interação dos íons, moléculas de água com a membrana de LPS pode afetar as suas propriedades e inclusive contribuir para a estabilidade da membrana. A análise de distribuição radial contribui para o entendimento dos dados apresentados na análise do perfil de densidade. Pois relaciona não apenas o número de vizinhos mas a distâncias de interação dos grupos em contato observados no gráfico do perfil de densidade.

Em geral, os maiores valores de $g(r)$ foram obtidos para a interação dos grupos COO^- e PO_4^- com os íons Mg^{2+} e Zn^{2+} , seguidos pelos pares Ca^{2+} e Ba^{2+} , e Na^+ e K^+ , respectivamente (Figura 20). Esta diferença pode estar correlacionada com a carga e o raio dos íon, pois embora os íons Ca^{2+} e Ba^{2+} sejam divalentes, não apresentaram qualitativamente a mesma intensidade que o Mg^{2+} e Zn^{2+} . Além disso, a interação entre pares de cargas opostas tende a aumentar com o aumento da carga e a diminuição do raio do cátion, uma vez que o potencial de interação é inversamente proporcional à distância. Como regra geral o aumento do potencial de interação é diretamente proporcional à intensidade do $g(r)$. Somente a membrana de LPS contendo K^+ não manteve o estado de agregação lamelar, indicando que a estabilidade do sistema é um efeito possivelmente correlacionado à propriedades como carga e raio atômico.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

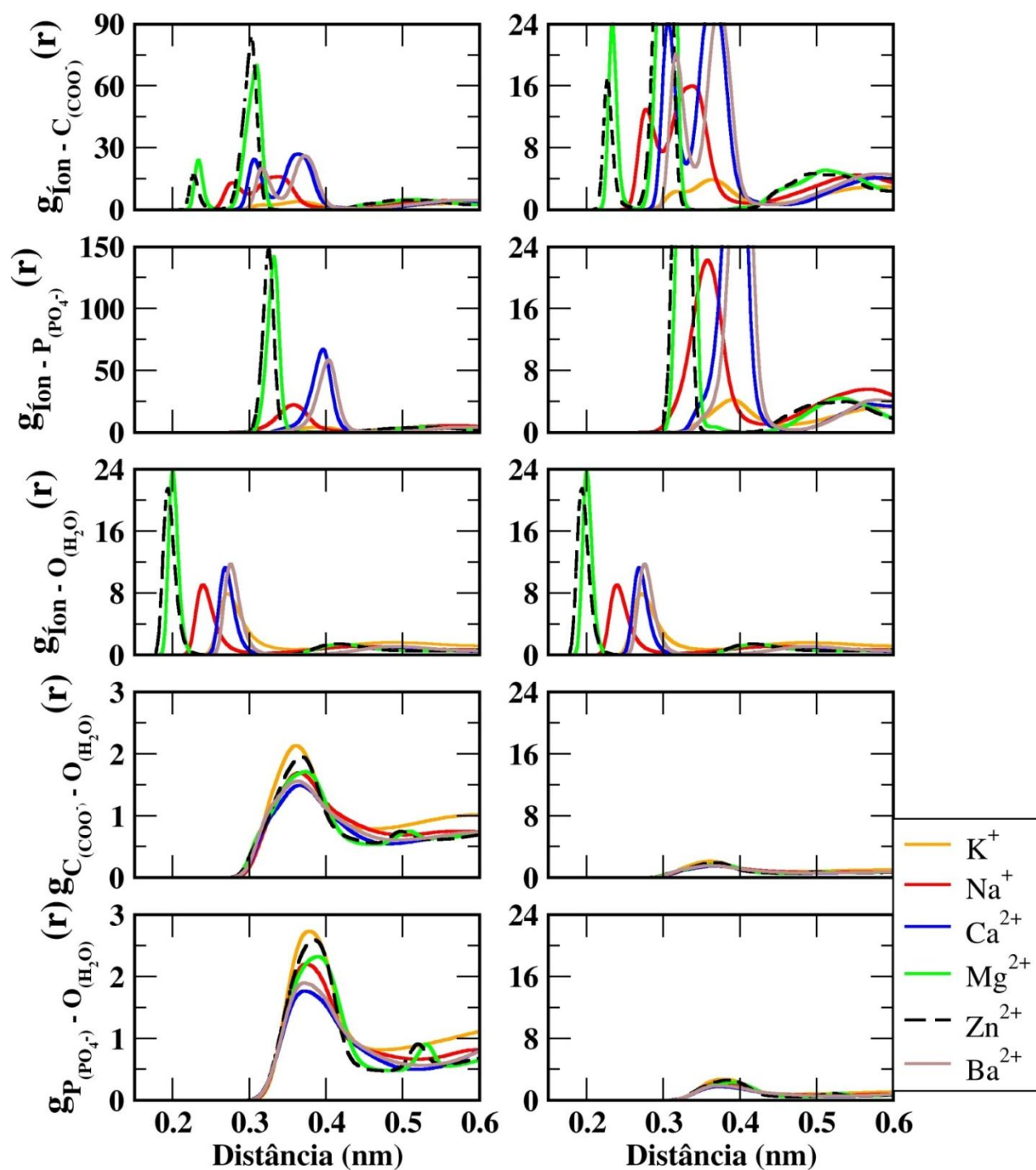


Figura 20 – Gráficos da função distribuição radial de pares. A coluna de gráficos a esquerda representa melhor as intensidades das funções das distribuições radiais para os diferentes pares. Já a coluna da direita apresenta os gráficos numa mesma escala.

A primeira análise da Figura 20 diz respeito à interação do COO^- com os cátions. As curvas do Zn^{2+} e Mg^{2+} não se sobrepõem, indicando dois tipos de interação bem distintas,

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

enquanto os outros íons sofrem sobreposição. A função de distribuição radial trata de três grupos carboxilas diferentes da unidade de LPS, onde cada carboxila não possui necessariamente o mesmo ambiente químico local e a distribuição calculada é uma média em função do tempo. Assim, interpretamos o primeiro pico das curvas do Mg^{2+} e Zn^{2+} como sendo uma densidade relativa preferencial para algumas poucas carboxilas enquanto que a maioria tende a segunda distância. A intensidade das curvas do Ca^{2+} e Ba^{2+} equivalem a aproximadamente 40% da intensidade da curva do íon Zn^{2+} e indicam um $g(r)$ semelhante nos dois picos. Os pequenos valores atribuídos às intensidades do $g(r)$ da interação COO^- com os íons Na^+ e K^+ indicam a maior dispersão dos íons monovalentes no LPS quando comparado aos íons divalentes.

O gráfico do perfil de densidade (Figura 18) mostrou um maior número de moléculas de água na região das carboxilas próximas à superfície do LPS, em concordância com os resultados apresentados na Figura 20. Desta forma as duas carboxilas mais internas ao longo da estrutura do LPS são provavelmente as principais responsáveis pelas intensidades do $g(r)$ para os íons divalentes.

O segundo gráfico de cima para baixo da Figura 20 apresenta o $g(r)$ para a interação do PO_4^- com os íons de cada sistema. Diferente dos demais íons, o Na^+ apresentou uma maior quantidade de íons no *core* e o menor valor de $g(r)$. A curva mais alargada indica uma interação mais fraca quando comparada aos íons menores, resultando em uma maior desordem estrutural da matriz lipídica, em concordância com a literatura⁴³.

O número de moléculas de água coordenando os diferentes cátions imersos na membrana de LPS diferem como mostrado pelo $g(r)$ para os pares íon-água (Figura 20). Este comportamento é esperado, pois no primeiro e segundo gráficos de cima para baixo da Figura 20 o sistema contendo o íon K^+ não apresentou valores significativos de $g(r)$ quando comparados aos demais íons, indicando um baixo número de coordenação com os grupos PO_4^- e COO^- . Desta maneira, conclui-se que a maioria dos íons K^+ estão solvatados. Qualitativamente é esperado que íons carboxílicos tendam a se ligar mais fortemente a íons divalentes; de fato a maioria dos sais de carboxilatos com íons divalentes são insolúveis a temperatura ambiente, enquanto que os sais de carboxilatos com íons monovalentes tendem a ser solúveis. Logo, a coordenação transiente da água com os grupos COO^- e PO_4^- devem ser maiores para o sistema do íon K^+ , resultando assim num maior valor de intensidade do $g(r)$ para os pares formados pelos grupos COO^- e PO_4^- com a água. Os dois últimos gráficos da Figura 18 mostram justamente esta relação.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

As curvas dos últimos gráficos da Figura 20 para cada caso têm a mesma origem, pois o raio da água é o mesmo. Estes gráficos dão uma ideia da hidratação da região do *core* do LPS. O número de moléculas de água interagindo com os grupos COO^- e PO_4^- nos sistemas contendo os íons Na^+ e Ba^{2+} tenderam a ser maior que nos demais sistemas, mas o estado de agregação lamelar destas duas bicamadas foi conservado. Observamos que a partir de um raio de 0,6 nm o $g(r)$ assume valores maiores que 1 para o K^+ . Estes resultados são consistentes tanto com o perfil de densidade (Figura 18) como com medidas experimentais descritas na literatura¹³⁰. É interessante notar que no intervalo 0.3 a 0.4 nm existem pequenos picos de intensidade menor do que 1 possivelmente indicativo de uma segunda esfera de coordenação da água ao redor de grupos COO^- e PO_4^- . Os números de coordenação estimados a partir das funções de distribuição radial para os diferentes sistemas são apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Número de coordenação de pares atômicos entre: H_2O , PO_4^- e COO^- , e os respectivos íons: Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} e Ba^{2+} .

	Na^+	Mg^{2+}	K^+	Ca^{2+}	Zn^{2+}	Ba^{2+}
H_2O	3,70	3,23	5,80	4,40	3,46	5,20
PO_4^-	0,73	1,44	0,26	1,65	1,37	1,49
COO^-	0,54	0,56	1,89	0,72	0,54	0,70
$\text{COO}^-/\text{H}_2\text{O}$	6,81	5,09	5,43	5,52	5,32	6,23
$\text{PO}_4^-/\text{H}_2\text{O}$	7,82	6,89	7,42	7,19	6,70	8,00

De acordo com a literatura experimental, o Na^+ interage de forma inespecífica com moléculas de LPS, enquanto que o íon cálcio liga-se de modo específico e simultâneo à duas moléculas de LPS vizinhas. A título de exemplo, apresentamos na Figura 21 duas ilustrações de poliedros de coordenação formados dentro de um raio de 0,24 nm dos íons Na^+ e Mg^{2+} , após 210 ns de simulação. Embora estas ilustrações representem uma conformação em um *ensemble* estrutural uma vez que sistemas biológicos em fases condensadas são dinâmicos, é possível compará-los às medidas experimentais complementares e realizar inferências qualitativas sobre o arranjo de interações essenciais à estabilidade estrutural da bicamada lipídica.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

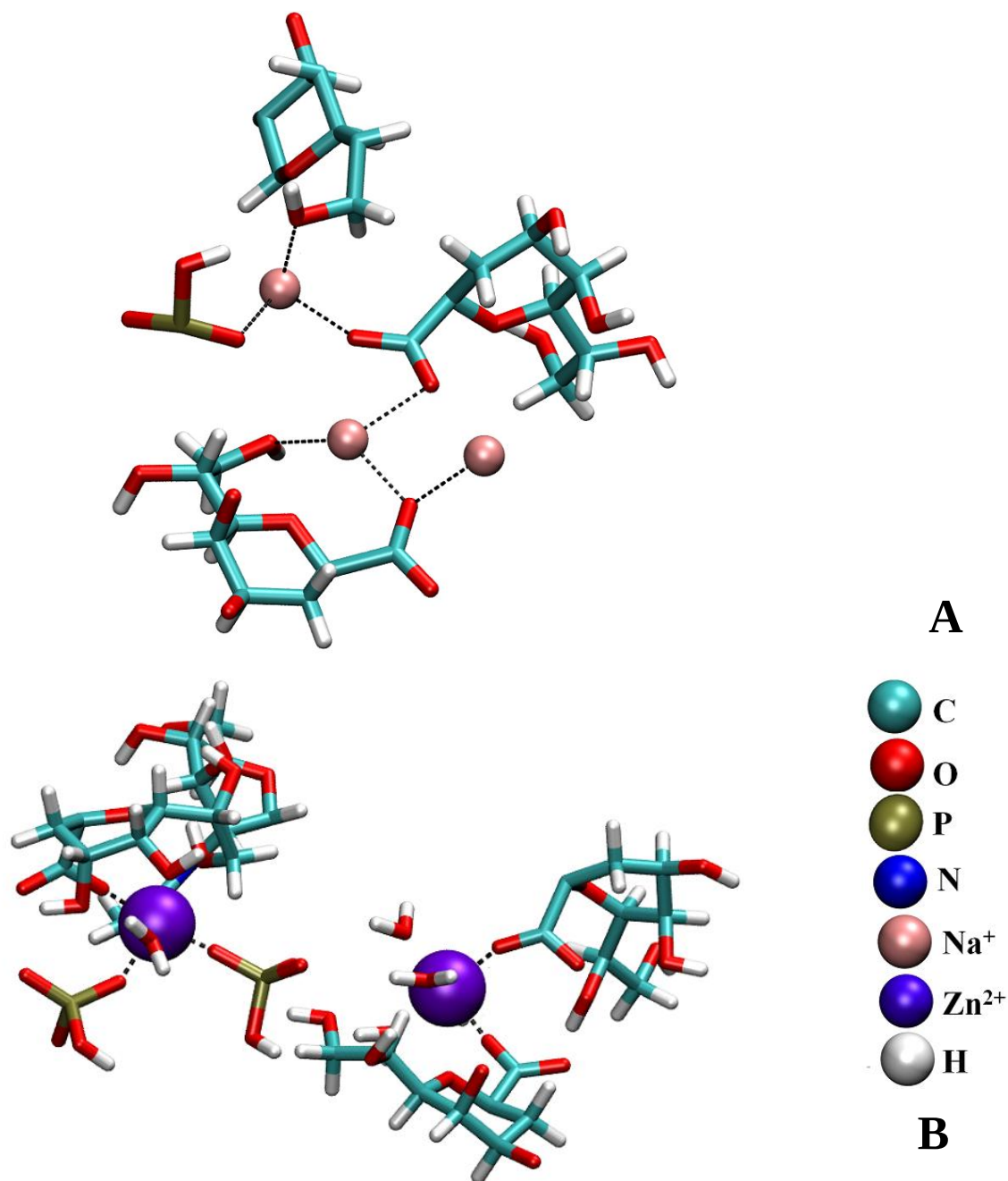


Figura 21 – Representação esquemática de poliedros de coordenação com os íons Na⁺ (A) e Zn²⁺ (B). O Na⁺ não interage tão especificamente com o LPS quanto o Zn²⁺.

Na imagem representando a interação do LPS com o íon Na⁺ observa-se dois átomos de O dos grupos COO⁻ de LPS vizinhos interagindo com dois cátions e um destes interagindo com dos átomos de O de um grupo PO₄⁻. Esse não é um padrão de interação tão rígido quando comparado a interação bidentada dos íons divalentes confirmada nos poliedros de coordenação

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

do Zn^{2+} e observado tanto em LPS de *P. aeruginosa* quanto para outros tipos de bactérias por exemplo *Escherichia coli*.

Além das moléculas de água, é possível também observar a participação de alguns grupos hidroxilas dos açúcares e oxigênios de carbonilas na esfera de coordenação dos íons.

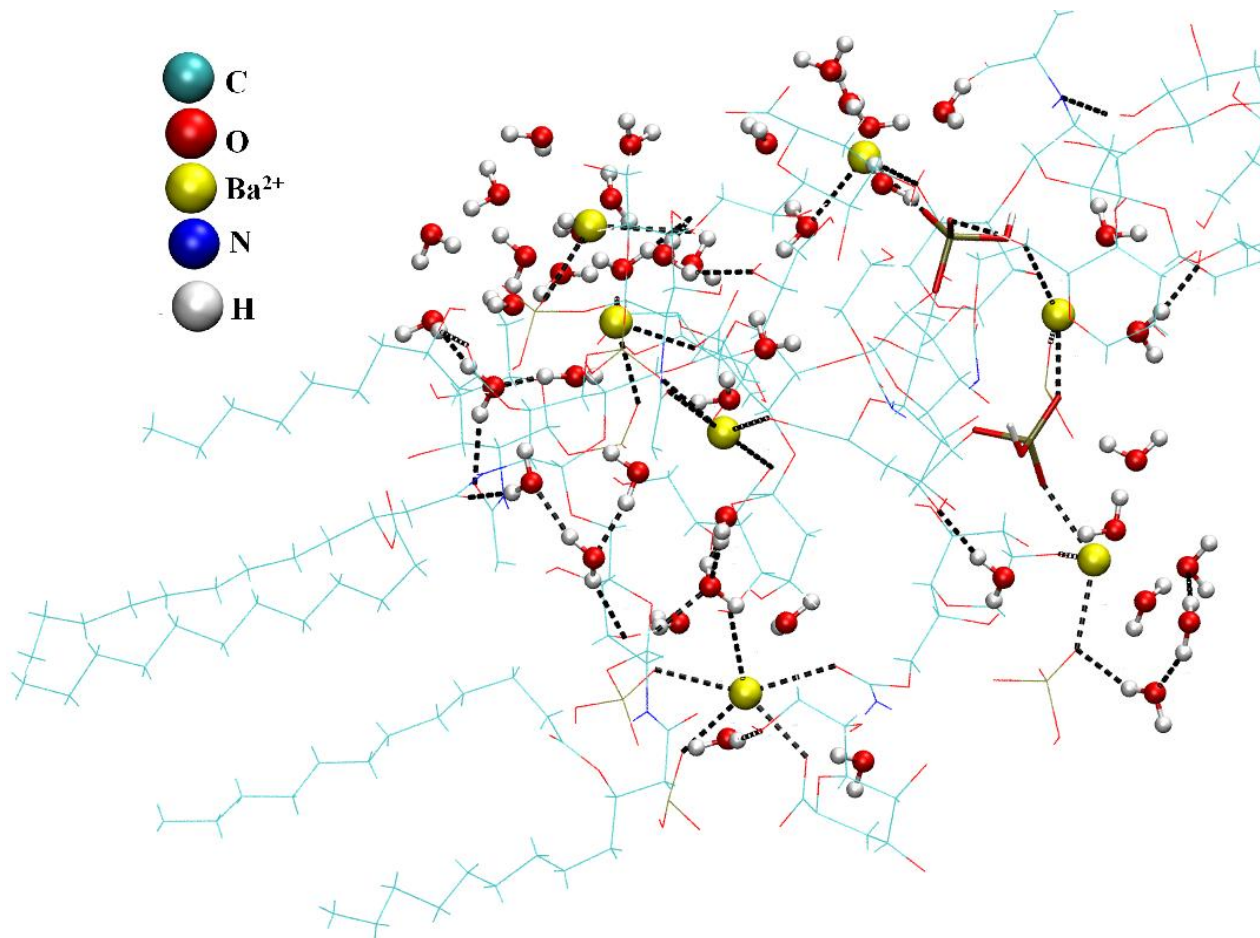


Figura 22 - Representação de uma unidade de LPS e seu ambiente químico após 210 ns de simulação. Esferas de coordenação e rede de hidratação na unidade de LPS na presença dos íons Ba^{2+} a uma distância mínima de 0.3 nm da unidade de LPS e a sua esfera de hidratação.

Na Figura 22 apresentamos um panorama geral de uma molécula de LPS do sistema contendo água e o íon Ba^{2+} . Não apenas a literatura¹³⁰, mas as nossas análise do perfil de densidade mostraram uma tendência de moléculas de água penetrarem a região alquil – a qual é representada em nosso modelo pela área próxima aos fragmentos LP1 e LP2.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a imagem, a água não interage apenas com os grupos hidroxilas mas também com os átomos de oxigênios de grupos carbonilas e entre si. Interações desta natureza são bastantes importantes em meio biológico e são conhecidas como ligações de hidrogênio¹³¹.

Encontramos na literatura estudos^{132,133} apresentando dados obtidos a partir de análises de RMN acompanhado de simulação computacional que indicam a presença de ligações de hidrogênio transiente intramolecular em polissacarídeos de *Escherichia coli* dissolvidos em água. Tais interações são dadas entre os grupos vizinhos -NH...OC, -OH...OOC, HO...HN semelhante às interações apresentadas na Figura 22.

Resultados de simulações anteriores¹¹³ demonstraram a importância de ligações de hidrogênio entre hidroxilas na membrana de LPS em presença do íon Ca^{2+} para diminuir a fluidez da membrana. Nossos resultados corroboram com estas observações, e indicam que interações de ligação de hidrogênio na região polissacarídica da membrana de LPS desempenham um papel relevante na organização da sua estrutura tridimensional.

4.3. PARÂMETRO DE ORDEM

Uma cadeia lipídica de uma membrana flexível pode realizar vários movimentos que acontecem em diferentes escalas de tempo como rotação ao redor da ligação química, flip-flop¹²¹, isomerização trans e gauche e outros¹²². Estes movimentos moleculares produzem um grau de desordem das cadeias alquil o qual está associada a fluidez da membrana. Vários efeitos biológicos estão associados à variação da fluidez, e também da temperatura da transição de fase. Wellingshausen⁹⁷ correlacionou a capacidade do Zn^{2+} de induzir a fluidez de quimiotipos do LPS a 37° C com a sua capacidade de aumentar a secreção de monocinas (TNF_α e $\text{IL1}\beta$) de monócitos humanos. Descrevemos abaixo os três tipos de cadeias alquil presentes em cada unidade de LPS de *P. Aeruginosa* simulados neste trabalho.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

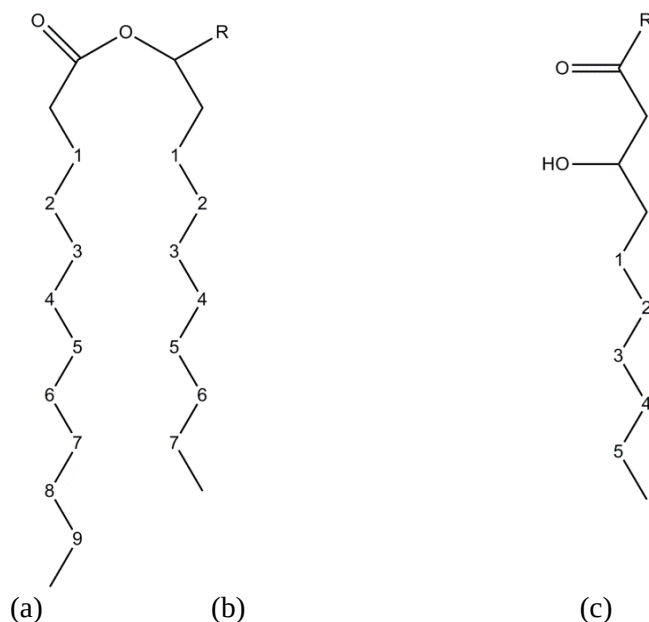


Figura 23 – Representação esquemática das cadeias alquil do LPS. As letras (a) e (b) representam as cadeias apolares do LP1 e aqui chamamos SN2 e SN1 respectivamente enquanto a letra (c) a parte apolar do LP2 que convencionamos chamar SN3.

Em nossos sistemas as cadeias lipídicas do LP1 e LP2 são determinadas por SN1, SN2 e SN3. e estão representadas na Figura 23. Em bicamadas (estado de agregação lamelar), as cadeias alquil adotam uma conformação paralela em relação ao eixo Z perpendicular a superfície da membrana. O grau de alinhamento destas cadeias com o eixo Z pode ser qualificado através do parâmetro de ordem S_{CD} . Portanto, quando a cadeia está perfeitamente alinhada ao eixo Z, esta assume o valor de -0,5. Um sistema lipídico em um estado de agregação lamelar possui valores de S_{CD} entre -0,5 e 1. Nos gráficos são apresentados o módulo de S_{CD} calculados para cada uma das cadeias alquil durante os últimos 70 ns de simulações

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

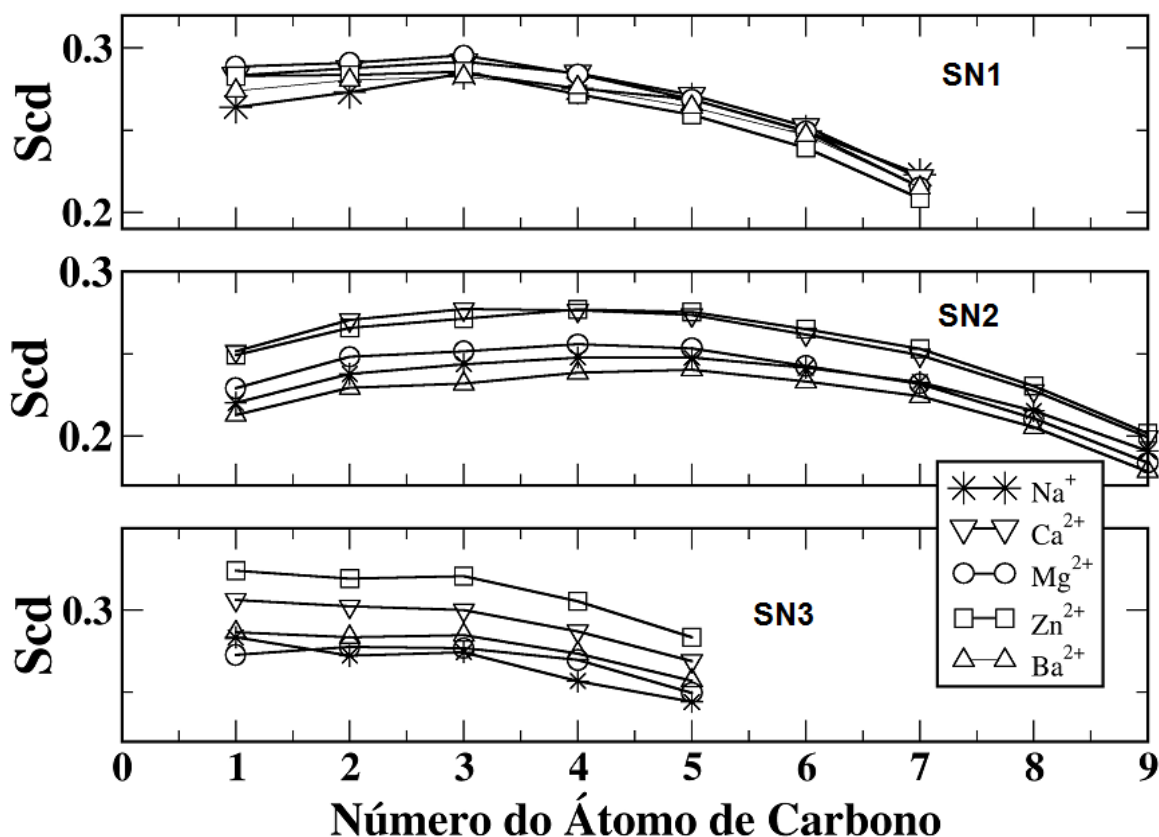


Figura 24 – Gráficos das análises dos parâmetros de ordem em função dos átomos das cadeias alquil do lipídio A: (a) SN1; (b) SN2; e (c) SN3. Os gráficos estão na mesma escala, uma vez que o intervalo projetado no eixo do parâmetro de ordem é de 0.13. As cadeias alquil SN2 e SN3 na presença do Zn²⁺ apresentaram os maiores valores de parâmetros de ordem.

As cadeias alquil da membrana de LPS contendo K⁺ apresentaram um valor médio para S_{CD} aproximado a 0.1 indicando um estado de agregação não lamelar da membrana, por isso representamos na Figura 24 a descrição comparativa apenas dos sistemas com o estado de agregação lamelar. O valor de S_{CD} ~ 0.1 para o sistema contendo K⁺ é esperado, uma vez que o

gráfico do perfil de densidade e o da distribuição radial indicam valores bastantes diferentes dos padrões obtidos para uma membrana no estado de agregação lamelar. Segundo a literatura^{99,134-136}, os valores do S_{CD} apresentados nos gráficos para os demais sistemas estão dentro da faixa apresentada por bicamadas lamelares em estado fluido cristalino. Nas curvas dos gráficos observamos que os átomos de carbono ao longo da cadeia vão aumentando o valor de S_{CD} até um momento de máximo e depois eles começam a diminuir novamente. Nesse caso o átomo com o

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

maior parâmetro de ordem é o que tende a menos se mover em relação a todo sistema e a desordem cresce ao seu redor. O quarto átomo de todas as cadeias SN1, tendem ao maior valor de S_{CD} enquanto em SN2 a tendência está entre o átomo 4 e 5 e por fim em SN3 é átomo 2.

Dentre todos os sistemas com estrutura lamelar, o sistema contendo o íons Na^+ mostrou-se o mais desordenado. Este comportamento pode estar relacionado à maneira diferenciada da qual íons monovalentes interagem com o LPS. Para uma melhor comparação da desordem entre as cadeias alquil os valores médios de S_{CD} para cada cadeia nos diferentes sistemas são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Valores médios do S_{CD} de por cadeia e das cadeias alquil por sistema indicados pelo tipo de cátion presente.

	K^+	Na^+	Ca^{2+}	Ba^{2+}	Mg^{2+}	Zn^{2+}
SN1	0,10	0,26	0,27	0,26	0,27	0,26
SN2	0,10	0,23	0,25	0,22	0,23	0,25
SN3	0,09	0,27	0,29	0,28	0,27	0,31
Média	0,10	0,25	0,27	0,25	0,26	0,28

Os três sistemas que apresentaram na média as cadeias alquil da membrana de *P. aeruginosa* mais ordenadas estavam respectivamente sobre a influência dos íons Zn^{2+} , Ca^{2+} e Mg^{2+} (Tabela 6).

O parâmetro de ordem de carbono assim como a medida da área por lipídeo podem ser medidas experimentalmente¹³⁷. Entretanto não existem na literatura indexada valores de S_{CD} experimentais concernentes a cadeias lipídicas de *P. aeruginosa*. Todavia a orientação das cadeias lipídicas podem ser medidas também a partir de um parâmetro de ordem S análogo ao S_{CD} , mas obtidos através de medidas espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e reflectância total atenuada (FTIR-ATR)¹³⁸. Como o S_{CD} , o parâmetro S varia de 0 a 1. Quando o sistema está totalmente desordenado apresenta valor igual a 0 e ordenado 1.

Brandenburg e Seydel calcularam o S das cadeias alquil de uma membrana de LPS de *Salmonella minnesota* e *Escherichia coli* hidratada em presença do íon Mg^{2+} , em temperaturas abaixo e acima de 40°C – considerado a temperatura de transição de fase- obtendo respectivamente os valores aproximados de $0,70 \pm 0,05$ e $0,25 \pm 0,05$ ¹³⁶.

Em 2005 Brandenburg e autores num artigo de revisão apresentaram vários valores de temperatura de transição de fase e de S a 37° C. Estes autores mostram que membranas de LPS

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

P. aeruginosa não possui uma temperatura de transição de fase bem definida e a 37° C apresentou um S igual a 0,28, indicando estar em estado de agregação lamelar.

4.4 ÁREA POR LIPOPOLISSACARÍDEO

O gráfico da A_c em função do tempo permite identificar se as membranas entraram em equilíbrio estrutural assim como serve como base para a caracterização de outras propriedades estruturais que podem ser comparadas diretamente à esta medida experimental. Por exemplo, o sistema contendo o íon K^+ foi o que se mostrou mais hidratado e não permaneceu no estado lamelar, logo apresentou o maior valor de A_c . A estabilização da membrana não garante o ajuste fino dos íons nos sítios da membrana.

É interessante notar na Figura 25 que no geral as membranas contendo os íons divalentes apresentaram no final da simulação áreas por lipopolissacarídes bastante semelhantes. Depois do K^+ , a segunda maior área obtida foi para o sistema contendo o íon Na^+ . Esse resultado tem a ver com a sua distribuição não homogênea na região do *inner core* da membrana, esta distribuição diferenciada dos cátions também aumenta a solvatação da membrana.

Os valores apresentados na Figura 25 para a área por unidade de LPS pentacilado na fase líquido cristalina em presença dos íons divalentes estão próximos de 1,3 nm², valor experimental obtido na literatura⁸⁸. A curva indicando o sistema em presença do íon K^+ foi o único a apresentar um valor de área por LPS maior do que 2 nm². Este crescimento indica que a membrana não se manteve na mesma fase das demais. A interpretação de A_c do sistema contendo o K^+ foi interpretada com o auxílio do gráfico de perfil de densidade aplicando a respectiva relação: i) O crescimento da curva indicou uma transição estrutural; ii) A curva começa a diminuir a sua inclinação indicando uma possível estabilização da membrana e por consequência o surgimento de uma nova estrutura de membrana, também representado na Figura 18.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

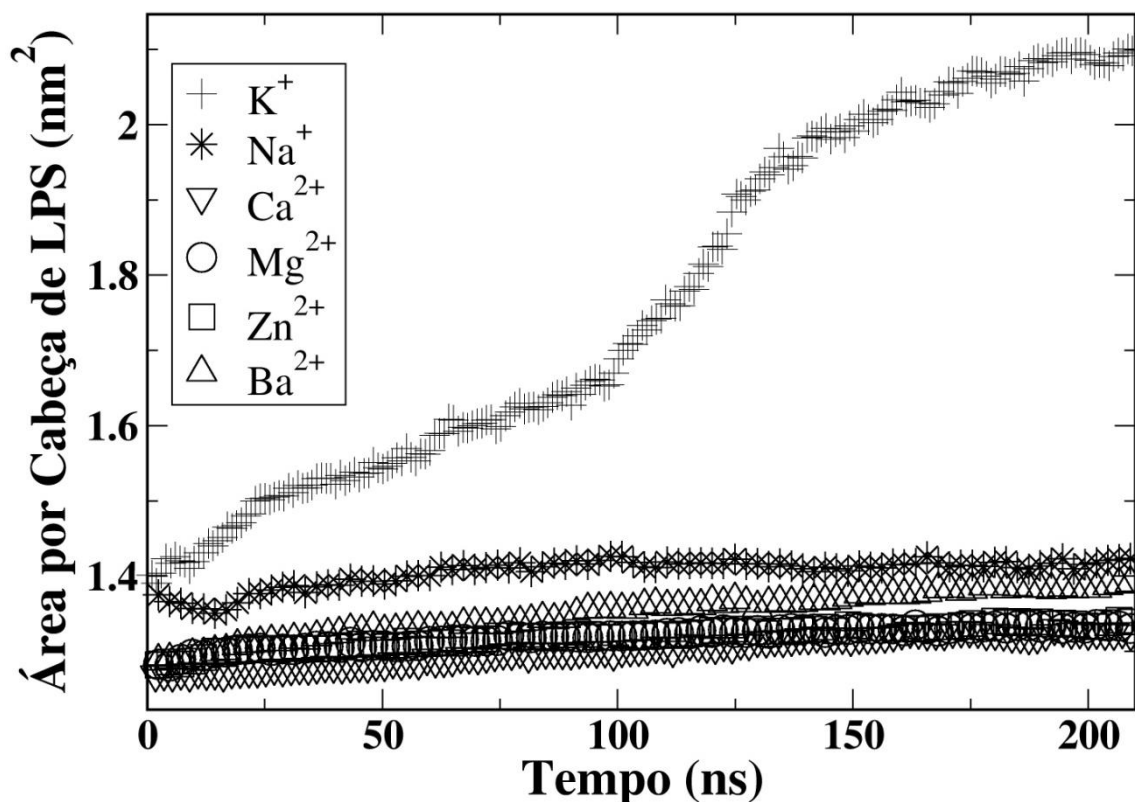


Figura 25 – Gráfico da área por lipopolissacarídeo em função do tempo. O tempo total simulado foi de 210 ns.

Todos os sistemas contendo íons divalentes se mantiveram no estado de agregação lamelar. Esta observação está de acordo tanto com o perfil de densidade quanto com a literatura, pois nesta temperatura a membrana de LPS na presença de qualquer íon divalente tenderá a se manter num arranjo lamelar. Tal conformação vem sendo justificada principalmente pela interação cruzada dos íons com os sítios carregados das unidades de LPS vizinhos.

Na Figura 25 é difícil diferenciar a área por LPS dos sistemas contendo os íons Zn^{2+} , Mg^{2+} e Ca^{2+} , já quando em presença do Ba^{2+} o valor é bem maior. Este resultado é análogo ao apresentado por Garidel e autores¹⁰⁰ para a membrana de LPS Re da cepa de *Salmonella minnesota* R595, aonde o comprimento da bicamada de LPS se mostrou maior em presença do Ba^{2+} em relação ao Ca^{2+} .

As análises das simulações a 300 K usando a extensão do campo de força Glycam06 para construir um modelo da membrana de LPS de *P. aeruginosa* sob a influência de uma série de

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

íons indicaram que: o raio e a carga dos íons combinados podem influenciar na interação das unidades de LPS e por consequência na manutenção das fases. Ainda, esses parâmetros também influenciam na solvatação. Mostramos o K^+ com raio iônico semelhante ao Ba^{2+} influenciando a membrana para uma disposição não lamelar, já o íon Na^+ com o raio iônico semelhante ao Ca^{2+} manteve o estado de agregação lamelar.

5. CONCLUSÃO

Através das análises das simulações computacionais do modelo da membrana de LPS da camada externa (rough deep) da *P. aeruginosa* PAO1 na presença dos cátions K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} e Ba^{2+} verificamos que no geral, o nível de hidratação da membrana de LPS se mostrou maior em relação às bicamadas de fosfolipídios. Esta diferença no nível de hidratação pode ser atribuída não apenas as moléculas de água ligadas aos grupos hidroxilas da região do Core no LPS, mas de acordo com nossos resultados dependem diretamente do cátion associado.

O aumento no valor da área por LPS foi diretamente proporcional ao aumento no nível de hidratação da membrana. Os menores valores de área por LPS, foram atribuídos para a membrana na presença dos íons Mg^{2+} , Zn^{2+} e Ca^{2+} seguidos do Ba^{2+} e Na^+ , e por fim K^+ . Destes cátions, apenas o K^+ apresentou um padrão de curva diferenciada das demais, indicando que a variação do cátion pode provocar uma mudança não apenas no nível de hidratação da membrana, mas inclusive no próprio estado de agregação. Neste caso, a presença dos íons K^+ provocou um estado de agregação não lamelar na membrana e conseqüentemente um aumento na fluidez da membrana. Observamos ainda que tanto a diminuição da coordenação do cátion com as unidades de LPS vizinhas da membrana quanto o aumento da hidratação do cátion podem induzir a transição da membrana do estado de agregação lamelar para outro não lamelar.

A análise do perfil de densidade indicou os cátions Na^+ mais espalhados na região do *inner core* interagindo assim não tão especificamente com os grupos negativos quando comparado aos íons divalentes. Todavia, ainda assim a membrana se manteve no estado de agregação lamelar, indicando ainda que a relação carga e raio iônico não deve ser negligenciada. Notamos através da análise do perfil de densidade também que os menores íons Zn^{2+} e Mg^{2+} interagem mais rigidamente com as unidades de LPS. Ao analisarmos o valor médio do parâmetro das cadeias alquil para cada sistema percebemos que o íon Zn^{2+} provocou um maior ordenamento e rigidez da membrana seguido do íon Ca^{2+} .

Em suma, os resultados obtidos sugerem que as propriedades da membrana de LPS como fluidez, estado de agregação e hidratação podem ser moduladas por meio de cátions considerando o efeito combinado do raio e carga.

6.PERSPECTIVA

Concluimos este trabalho tendo a certeza de um avanço na compreensão de que propriedades como fluidez, hidratação e o estado de agregação das membranas de LPS podem ser modulados ao escolher o cátion de acordo com a relação raio/carga. Ainda há muito a se compreender sobre os mecanismos que governam as transições dos diferentes estados de agregação de membranas de LPS e ainda outras possíveis transições de fase dentro de um mesmo estado de agregação. Um exemplo é a mudança da fase gel (L_{β}) para a fase líquido cristalino (L_{α}) dentro do estado de agregação lamelar. Embora tenhamos indícios de que a relação raio e carga do cátion podem ser suficientes para modular transição de estado de agregação junto com a hidratação da membrana, consideramos até agora apenas um pH, e temperatura, sem contar que normalmente a membrana por exemplo em meio biológico sofre a influência de mais de um tipo de cátion. Desta maneira, algum dos estudos sistemáticos que podem ser realizados são:

- Verificar qual a influência que diferentes concentrações binárias de íons provocariam na membrana de LPS, pois em o meio biológico há grande quantidade de íons Na^+ e Ca^{2+} ;
- Determinar a influência de antibióticos na membrana de LPS e a possibilidade do uso de outras moléculas, que poderiam provocar a lise da membrana, utilizando o critério de seleção inicial do raio e carga. Ultimamente tem se dado atenção a por exemplo ao uso de peptídeos antimicrobianos;
- Reproduzir o estado de agregação micelar de monocamadas de LPS. Até agora as simulações indicaram a mudança de um estado de agregação lamelar para outro não lamelar da membrana DPPE/LPS. As bactérias Gram-negativas quando infectam um hospedeiro liberam LPS que se arranjam em um estado de agregação de micela.
- Avaliar o efeito direto da temperatura nas propriedades físico-químicas e estado de agregação. A adesão de bactérias a materiais e a formação das colônias são afetadas pelo ambiente. Como exemplo de microorganismo resistente a altas temperaturas temos a bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa*. Estas colonizam encanamentos de metal de sistemas de aquecimento, contribuindo com a sua corrosão.

6.PERSPECTIVA

Podemos observar que ainda há muito a ser elucidado sobre os mecanismos que provocam a mudança dos estados de agregação das membranas de LPS, bem como a alteração das propriedades físico-químicas destes sistemas. Por isso, é necessário realizar mais investigações detalhadas para compreender melhor tais mecanismos. Temos a certeza de que mais ideias de estudo surgirão, pois a elucidação das interações do LPS com as variáveis citadas acima podem auxiliar a entender melhor problemas relacionados a bactérias Gram-negativas como resistência antibiótica e da adesão a materiais.

REFERÊNCIAS

- (1) Schrödinger, E. *O que é vida?: O aspecto físico da célula viva seguido de Mente e matéria e Fragmentos autobiográficos*; Fundação Editora da UNESP: São Paulo, 1997.
- (2) Costerton, J. W. *Science* (80-.). **1999**, 284, 1318–1322.
- (3) Mena, K.; Gerba, C. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol 201 SE - 3*; Whitacre, D. M., Ed.; Springer US, 2009; Vol. 201, pp. 71–115 LA – English.
- (4) Hentzer, M.; Eberl, L.; Givskov, M. *Biofilms* **2005**, 2, 37–61.
- (5) Kreft, J.-U. *Biofilms* **2004**, 1, 265–276.
- (6) Chiang, W.-C.; Pamp, S. J.; Nilsson, M.; Givskov, M.; Tolker-Nielsen, T. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2012**, 65, 245–256.
- (7) Beveridge, T. J.; Makin, S. A.; Kadurugamuwa, J. L.; Li, Z. *FEMS Microbiol. Rev.* **2006**, 20, 291–303.
- (8) Ubbink, J.; Schär-Zammaretti, P. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2007**, 12, 263–270.
- (9) Otto, K. *Res. Microbiol.* **2008**, 159, 415–422.
- (10) Gordesli, F. P.; Abu-Lail, N. I. *Langmuir* **2012**, 28, 1360–1373.
- (11) De Beer, D.; Stoodley, P.; Lewandowski, Z. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, 44, 636–641.
- (12) Obritsch, M. D.; Fish, D. N.; MacLaren, R.; Jung, R. *Pharmacotherapy* **2005**, 25, 1353–1364.
- (13) Cao, B.; Wang, H.; Sun, H.; Zhu, Y.; Chen, M. *J. Hosp. Infect.* **2004**, 57, 112–118.
- (14) Pier, G. B. *Int. J. Med. Microbiol.* **2007**, 297, 277–295.
- (15) Accurso, F. J. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2007**, 175, 754–757.
- (16) Ernst, R. K. *Science* (80-.). **1999**, 286, 1561–1565.
- (17) Pamp, S. J.; Gjermansen, M.; Johansen, H. K.; Tolker-Nielsen, T. *Mol. Microbiol.* **2008**, 68, 223–240.
- (18) Odjadjare, E. E.; Igbinsosa, E. O.; Mordi, R.; Igere, B.; Igeleke, C. L.; Okoh, A. I. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2012**, 9, 2092–2107.
- (19) Pink, D. a.; Truelstrup Hansen, L.; Gill, T. a.; Quinn, B. E.; Jericho, M. H.; Beveridge, T. J. *Langmuir* **2003**, 19, 8852–8858.

-
- (20) Delcour, A. H. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, 1794, 808–816.
- (21) Chen, R.; Mark, A. E. *Eur. Biophys. J.* **2011**, 40, 545–553.
- (22) Teixeira, V.; Feio, M. J.; Bastos, M. *Prog. Lipid Res.* **2012**, 51, 149–177.
- (23) Nikaido, H. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, 78, 119–146.
- (24) Piggot, T. J.; Holdbrook, D. a; Khalid, S. *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115, 13381–13388.
- (25) Brandenburg, K.; Howe, J.; Sanchez-Gomez, S.; Garidel, P.; Roessle, M.; Andra, J.; Jerala, R.; Zweytick, D.; Lohner, K.; Rappolt, M.; Blondelle, S.; Moriyon, I.; de Tejada, G. *Antinfect. Agents Med. Chem.* **2010**, 9, 9–22.
- (26) Schuerholz, T.; Brandenburg, K.; Marx, G. *Crit. Care* **2012**, 16, 207.
- (27) Gutschmann, T.; Razquin-Olazarán, I.; Kowalski, I.; Kaconis, Y.; Howe, J.; Bartels, R.; Hornef, M.; Schürholz, T.; Rössle, M.; Sanchez-Gómez, S.; Moriyon, I.; Martinez de Tejada, G.; Brandenburg, K. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54, 3817–3824.
- (28) Lopez-Lopez, G.; Pascual, A.; Perea, E. J. *J. Med. Microbiol.* **1991**, 34, 349–353.
- (29) O’Grady, N. P.; Alexander, M.; Burns, L. a; Dellinger, E. P.; Garland, J.; Heard, S. O.; Lipsett, P. a; Masur, H.; Mermel, L. a; Pearson, M. L.; Raad, I. I.; Randolph, A. G.; Rupp, M. E.; Saint, S. *Clin. Infect. Dis.* **2011**, 52, e162–93.
- (30) Cirioni, O.; Ghiselli, R.; Silvestri, C.; Minardi, D.; Gabrielli, E.; Orlando, F.; Rimini, M.; Brescini, L.; Muzzonigro, G.; Guerrieri, M.; Giacometti, A. *J. Antimicrob. Chemother.* **2011**, 66, 1318–1323.
- (31) Mansouri, H.; Alavi, S.; Yari, M. In *2nd International Conference on Chemical, Ecology and Environmental Sciences (ICCEES’2012)*; 2012; pp. 42–46.
- (32) Wiatr, C. L. *CTI J.* **2006**, 27, 46–59.
- (33) Kocíncová, D.; Lam, J. S. *Biochem. Biokhimiia* **2011**, 76, 755–760.
- (34) Jiang, W.; Saxena, A.; Song, B.; Ward, B. B.; Beveridge, T. J.; Myneni, S. C. B. *Langmuir* **2004**, 20, 11433–11442.
- (35) Kabanov, D. S.; Prokhorenko, I. R. *Biochem.* **2010**, 75, 383–404.
- (36) Fensom, A. H.; Gray, G. W. *Biochem. J.* **1969**, 114, 185–196.
- (37) Banoub, J. H.; El Aneed, A.; Cohen, A. M.; Joly, N. *Mass Spectrom. Rev.* **2010**, 29, 606–650.
- (38) Ivanov, I. E.; Kintz, E. N.; Porter, L. a; Goldberg, J. B.; Burnham, N. a; Camesano, T. a. *J. Bacteriol.* **2011**, 193, 1259–1266.

-
- (39) Brandenburg, K.; Andrä, J.; Müller, M.; Koch, M. H. .; Garidel, P. *Carbohydr. Res.* **2003**, 338, 2477–2489.
- (40) Geurtsen, J. Improving pertussis vaccines by lipopolysaccharide engineering, University of Utrecht, 2007, p. 303.
- (41) Chen, X.; Zhou, G.; Peng, X.; Yoon, J. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 4610–4630.
- (42) Borrok, D. M.; Fein, J. B. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, 286, 110–126.
- (43) Jeworrek, C.; Evers, F.; Howe, J.; Brandenburg, K.; Tolan, M.; Winter, R. *Biophys. J.* **2011**, 100, 2151–2159.
- (44) Shephard, J. J.; Savory, D. M.; Bremer, P. J.; McQuillan, a J. *Langmuir* **2010**, 26, 8659–8665.
- (45) Parikh, S. J.; Chorover, J. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2007**, 55, 241–250.
- (46) Shephard, J.; McQuillan, a J.; Bremer, P. J. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, 74, 6980–6986.
- (47) Giotta, L.; Mastrogiacomo, D.; Italiano, F.; Milano, F.; Agostiano, A.; Nagy, K.; Valli, L.; Trotta, M. *Langmuir* **2011**, 27, 3762–3773.
- (48) Das, N.; Vimala, R.; Karthika, P. *Indian J. Biotechnol.* **2008**, 7, 159–169.
- (49) Volesky, B.; Holan, Z. R. *Biotechnol. Prog.* **1995**, 11, 235–250.
- (50) González, A. G.; Shirokova, L. S.; Pokrovsky, O. S.; Emnova, E. E.; Martínez, R. E.; Santana-Casiano, J. M.; González-Dávila, M.; Pokrovski, G. S. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, 350, 305–314.
- (51) Malik, A. *Environ. Int.* **2004**, 30, 261–278.
- (52) Ribeiro-dos-Santos, G.; Biondo, R.; Quadros, O. de F.; Vicente, E. J.; Schenberg, A. C. G. *Biotechnol. Bioeng.* **2010**, 107, 469–477.
- (53) Choudhary, S.; Sar, P. *J. Hazard. Mater.* **2011**, 186, 336–343.
- (54) Moreno, D. C. *Tecnol. QUÍMICA* **2006**, 26, 70–77.
- (55) Vijayaraghavan, K.; Yun, Y.-S. *Biotechnol. Adv.* **2008**, 26, 266–291.
- (56) Kirschner, K. N.; Lins, R. D.; Maass, A.; Soares, T. A. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, 8, 4719–4731.
- (57) Lins, R. D.; Straatsma, T. P. *Biophys. J.* **2001**, 81, 1037–1046.
- (58) MORARU, A.; SVAB, I.; MIHAILESCU, D. F. *Rev. Roum. Chim.* **2009**, 54, 799–805.
- (59) Straatsma, T. P.; Soares, T. a. *Proteins* **2009**, 74, 475–488.
-

-
- (60) Soares, T. A.; Straatsma, T. P. *Mol. Simul.* **2008**, *34*, 295–307.
- (61) Soares, T. a.; Straatsma, T. P.; Lins, R. D. *J. Braz. Chem. Soc.* **2008**, *19*, 312–320.
- (62) Lins, R. D.; Vorpagel, E. R.; Guglielmi, M.; Straatsma, T. P. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 29–35.
- (63) Soares, T. a.; Straatsma, T. P. In *AIP Conference Proceedings*; AIP, 2007; Vol. 963, pp. 1375–1378.
- (64) Sperandeo, P.; Dehò, G.; Polissi, A. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1791*, 594–602.
- (65) Ruiz, N.; Kahne, D.; Silhavy, T. J. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 57–66.
- (66) Sperandeo, P.; Dehò, G.; Polissi, A. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1791*, 594–602.
- (67) Rocchetta, H. L.; Burrows, L. L.; Lam, J. S. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1999**, *63*, 523–553.
- (68) Nikaido, H. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67*, 593–656.
- (69) Raetz, C. R. H.; Guan, Z.; Ingram, B. O.; Six, D. a; Song, F.; Wang, X.; Zhao, J. *J. Lipid Res.* **2009**, *50 Suppl*, S103–8.
- (70) Beutler, B.; Rietschel, E. T. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 169–176.
- (71) Schromm, a B.; Brandenburg, K.; Loppnow, H.; Moran, a P.; Koch, M. H.; Rietschel, E. T.; Seydel, U. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 2008–2013.
- (72) Mansell, A.; Reinicke, A.; Worrall, D. M.; O'Neill, L. A. *FEBS Lett.* **2001**, *508*, 313–317.
- (73) Schleiff, R. H. and M. I. and M. S. and R. B. and E. The properties of the outer membrane localized Lipid A transporter LptD. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2010, *22*, 454124.
- (74) Banaszek, A.; Mlynarski, J. In *Bioactive Natural Products (Part K)*; Chemistry, A.-R. B. T.-S. in N. P., Ed.; Elsevier, 2005; Vol. Volume 30, pp. 419–482.
- (75) Selvarengan, P.; Kubicki, J. D.; Guégan, J.-P.; Châtellier, X. *Chem. Geol.* **2010**, *273*, 55–75.
- (76) Kang, S.-Y.; Bremer, P. J.; Kim, K.-W.; McQuillan, a J. *Langmuir* **2006**, *22*, 286–291.
- (77) Stephens, D. L.; Choe, M. D.; Earhart, C. F. *Microbiology* **1995**, *141* (Pt 7, 1647–1654.
- (78) Vollmer, W.; Höltje, J. J. *Bacteriol.* **2004**, *186*, 5978–5987.
- (79) Yang, H.; Xu, Y.; Gao, Z.; Mao, Y.; Du, Y.; Jiang, H. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 16978–16988.
- (80) Heinrich, H. T. M.; Bremer, P. J.; Daughney, C. J.; McQuillan, A. J. *Langmuir* **2007**, *23*, 2731–2740.

-
- (81) Faunce, C. a; Reichelt, H.; Paradies, H. H.; Quitschau, P.; Zimmermann, K. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 214727.
- (82) Atabek, A.; Liu, Y.; Pinzón-Arango, P. a; Camesano, T. a. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2008**, *67*, 115–121.
- (83) Makin, S. a; Beveridge, T. J. *Microbiology* **1996**, *142* (Pt 2, 299–307.
- (84) Reichelt, H.; Faunce, C. a; Paradies, H. H. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 3290–3293.
- (85) Schneck, E.; Schubert, T.; Konovalov, O. V; Quinn, B. E.; Gutschmann, T.; Brandenburg, K.; Oliveira, R. G.; Pink, D. A.; Tanaka, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 9147–9151.
- (86) Abraham, T.; Schooling, S. R.; Nieh, M.-P.; Kucerka, N.; Beveridge, T. J.; Katsaras, J. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 2477–2483.
- (87) Snyder, S.; Kim, D.; McIntosh, T. J. *Biochemistry* **1999**, *38*, 10758–10767.
- (88) Kubiak, J.; Brewer, J.; Hansen, S.; Bagatolli, L. a. *Biophys. J.* **2011**, *100*, 978–986.
- (89) Patrick Garidel, B. S. P.; Jorg Andra, B. S. P.; Jorg Howe, B. S. P.; Thomas Gutschmann, B. S. P.; Klaus Brandenburg, B. S. P. *Antiinfect. Agents Med. Chem.* **2007**, *6*, 185–200.
- (90) Kato, N. *Micron* **1993**, *24*, 91–114.
- (91) Sikkema, J.; de Bont, J. A.; Poolman, B. *Microbiol. Rev.* **1995**, *59*, 201–222.
- (92) Freitas, R. *Nanomedicine, volume I: Basic capabilities*; 1st ed.; Landes Bioscience: AUSTIN, 1999; Vol. I, p. 509.
- (93) Coughlin, R. T.; Tonsager, S.; McGroarty, E. J. *Biochemistry* **1983**, *22*, 2002–2007.
- (94) Rosenfeld, Y.; Shai, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 1513–1522.
- (95) Luzzati, V.; Tardieu, A. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1974**, *25*, 79–94.
- (96) Brandenburg, K.; Funari, S. S.; Koch, M. H.; Seydel, U. *J. Struct. Biol.* **1999**, *128*, 175–186.
- (97) Wellinghausen, N.; Schromm, A. B.; Seydel, U.; Brandenburg, K.; Luhm, J.; Kirchner, H.; Rink, L. *J. Immunol.* **1996**, *157*, 3139–3145.
- (98) Naumann, D.; Schultz, C.; Sabisch, A.; Kastowsky, M.; Labischinski, H. *J. Mol. Struct.* **1989**, *214*, 213–246.
- (99) Brandenburg, K.; Seydel, U. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *191*, 229–236.
- (100) Garidel, P.; Rappolt, M.; Schromm, A. B.; Howe, J.; Lohner, K.; Andrä, J.; Koch, M. H. J.; Brandenburg, K. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1715*, 122–131.
-

-
- (101) Marcus, Y. *Chem. Rev.* **1988**, 88, 1475–1498.
- (102) Slater, J. C. *J. Chem. Phys.* **1964**, 41, 3199.
- (103) Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. a. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5179–5197.
- (104) Van Der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A. E.; Berendsen, H. J. C. *J. Comput. Chem.* **2005**, 26, 1701–1718.
- (105) Jr, R. N.; Jr, D. L.; Maryott, A. *Selected values of electric dipole moments for molecules in the gas phase, NSRDS-NBS10, National Bureau of Standards*; 1967.
- (106) Morgon, N.; Coutinho, K.; Coutinho, K. *Métodos de química teórica e modelagem molecular*; 2007.
- (107) Van Gunsteren, W. F.; Bakowies, D.; Baron, R.; Chandrasekhar, I.; Christen, M.; Daura, X.; Gee, P.; Geerke, D. P.; Glättli, A.; Hünenberger, P. H.; Kastenholz, M. a; Oostenbrink, C.; Schenk, M.; Trzesniak, D.; van der Vegt, N. F. a; Yu, H. B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, 45, 4064–4092.
- (108) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; Van Gunsteren, W. F.; Hermans, J. *Intermol. Forces* **1981**, 11, 331–342.
- (109) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. *J. Chem. Phys.* **1983**, 79, 926.
- (110) Hockney, R. W. *Methods Comput. Phys.* **1970**, 9, 135–211.
- (111) Sadovskaya, I.; Brisson, J. R.; Lam, J. S.; Richards, J. C.; Altman, E. *Eur. J. Biochem.* **1998**, 255, 673–684.
- (112) Woods, R. J.; Dwek, R. A.; Edge, C. J.; Fraser-Reid, B. *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 3832–3846.
- (113) Shroll, R. M.; Straatsma, T. P. *Biopolymers* **2002**, 65, 395–407.
- (114) Cheatham, T. E.; Cieplak, P.; Kollman, P. A. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1999**, 16, 845–862.
- (115) Khalid, S.; Bond, P. J.; Deol, S. S.; Sansom, M. S. P. *Proteins* **2006**, 63, 6–15.
- (116) Pontes, F. J. S.; Rusu, V. H.; Soares, T. a.; Lins, R. D. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, 120605104628005.
- (117) Oostenbrink, C.; Soares, T. a; van der Vegt, N. F. a; van Gunsteren, W. F. *Eur. Biophys. J.* **2005**, 34, 273–284.
- (118) Chandrasekhar, I.; Kastenholz, M.; Lins, R. D.; Oostenbrink, C.; Schuler, L. D.; Tieleman, D. P.; van Gunsteren, W. F. *Eur. Biophys. J.* **2003**, 32, 67–77.
- (119) Lins, R. D.; Hünenberger, P. H. *J. Comput. Chem.* **2005**, 26, 1400–1412.
-

-
- (120) Kirschner, K. N.; Yongye, A. B.; Tschampel, S. M.; González-Outeiriño, J.; Daniels, C. R.; Foley, B. L.; Woods, R. J. *J. Comput. Chem.* **2008**, 29, 622–655.
- (121) Sadovskaya, I.; Brisson, J.-R.; Thibault, P.; Richards, J. C.; Lam, J. S.; Altman, E. *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 1640–1650.
- (122) Wang, J.; Cieplak, P.; Kollman, P. a. *J. Comput. Chem.* **2000**, 21, 1049–1074.
- (123) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. *J. Chem. Phys.* **1984**, 81, 3684.
- (124) Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. *J. Chem. Phys.* **2007**, 126, 014101.
- (125) Hess, B. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, 4, 116–122.
- (126) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. *J. Mol. Graph.* **1996**, 14, 33–38.
- (127) Egberts, E.; Berendsen, H. J. C. *J. Chem. Phys.* **1988**, 89, 3718.
- (128) Bydder, M.; Rahal, A.; Fullerton, G. D.; Bydder, G. M. *J. Magn. Reson. Imaging* **2007**, 25, 290–300.
- (129) Kucerka, N.; Papp-Szabo, E.; Nieh, M.-P.; Harroun, T. a; Schooling, S. R.; Pencer, J.; Nicholson, E. a; Beveridge, T. J.; Katsaras, J. *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 8057–8062.
- (130) Kucerka, N.; Papp-Szabo, E.; Nieh, M.-P.; Harroun, T. a; Schooling, S. R.; Pencer, J.; Nicholson, E. a; Beveridge, T. J.; Katsaras, J. *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 8057–8062.
- (131) Wahl, M. *Trends Biochem. Sci.* **1997**, 22, 97–102.
- (132) Norris, S. E.; Landström, J.; Weintraub, A.; Bull, T. E.; Widmalm, G.; Freedberg, D. I. *Biopolymers* **2012**, 97, 145–154.
- (133) Landersjö, C.; Widmalm, G. *Biopolymers* **2002**, 64, 283–291.
- (134) Nagle, J. F.; Tristram-Nagle, S. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **2000**, 1469, 159–195.
- (135) Brandenburg, K.; Mayer, H.; Koch, M. H.; Weckesser, J.; Rietschel, E. T.; Seydel, U. *Eur. J. Biochem.* **1993**, 218, 555–563.
- (136) Brandenburg, K.; Seydel, U. *Eur. Biophys. J.* **1988**, 16, 83–94.
- (137) Petrache, H. I.; Dodd, S. W.; Brown, M. F. **2000**, 79, 3172–3192.
- (138) Tamm, L. K.; Tatulian, S. a. *Q. Rev. Biophys.* **1997**, 30, 365–429.
- (139) Snyder, S.; Kim, D.; McIntosh, T. J. *Biochemistry* **1999**, 38, 10758–10767.

ANEXO

Hydration, ionic valence and cross-linking propensities of cations determine the stability of lipopolysaccharide (LPS) membranes†

Cite this: DOI: 10.1039/c3cc46918b

Received 10th September 2013,

Accepted 24th October 2013

DOI: 10.1039/c3cc46918b

www.rsc.org/chemcomm

Agrinaldo Nascimento Jr., Frederico J. S. Pontes, Roberto D. Lins and
Thereza A. Soares*

The supra-molecular structure of LPS aggregates governs outer membrane permeability and activation of the host immune response during Gram-negative bacterial infections. Molecular dynamics simulations unveil at atomic resolution the subtle balance between cation hydration and cross-linking ability in modulating phase transitions of LPS membranes.

Lipopolysaccharides (LPSs) are the major components of bacterial outer membranes where they act as effective permeability barrier against xenobiotic agents, antibiotics and the host cell defence system. LPS is also a potent activator of the mammalian immune system which is elicited by as little as fmol amounts of this endotoxin.¹ Variations in the LPS structure contribute to bacterial virulence either by dampening early innate immune defence responses to infection² or by exacerbating systemic inflammatory responses that ensue when local infection is not contained as in Gram-negative sepsis.³

Variable external conditions prompt structural and chemical modifications of the bacterial outer membrane, enhancing the organism ability to evade the host immune defence and colonize specific tissues.⁴ Changes in temperature and/or specific ion concentration have been shown to trigger lamellar to non-lamellar transitions in LPS membranes.^{5,6} In host cells, bacteria exist under conditions where Ca^{2+} , Na^+ , K^+ and Mg^{2+} are the most common cations. However, only specific divalent cations lead to LPS aggregation and increased resistance against antimicrobial peptides.^{7–9} Divalent cations induce considerable changes in the physico-chemical behaviour of LPS membranes (hydration, fluidity and aggregate structure), which are accompanied by a decrease of biological activity (e.g. LPS-induced cytokine production) and unilamellar/cubic to multilamellar transitions.^{5,8–13} The chemical nature of divalent cations is also an important factor to consider as indicated by distinct bilayer geometries and hydration patterns of

LPS in the presence of distinct divalent cations.^{9,13} LPS aggregates but not the LPS monomers are recognized by the LPS-binding protein, which triggers the host immune response.¹⁴ Furthermore, lamellar LPS aggregates have been shown to exhibit low or no endotoxic activity compared to cubic inverted aggregate structures.¹⁵

Therefore the supra-structure of LPS aggregates is crucial for its recognition by the host cell immune system.^{14,15} The ability to control LPS biological activity – be it as a permeability barrier or an activator of the host immune system – *via* modulation of aggregate structures has important applications for the development of antimicrobials,¹⁶ direct anti-tumor agents¹⁷ and vaccine adjuvants.¹⁸ In this communication we have applied atomistic molecular dynamics (MD) simulations to describe for the first time the effect of alkali (Na^+ and K^+), alkaline earth (Mg^{2+} , Ca^{2+} and Ba^{2+}) and transition (Zn^{2+}) metals on LPS polymorphism at atomic resolution. We show that the balance between effective membrane hydration, ionic valence and aptness to cross-link neighbouring molecules underlies LPS membrane stability. We further show that the shift in one of these physical-chemical parameters triggers lamellar to non-lamellar transitions of LPS aggregates.

The chemical and structural complexity of LPS molecules imposes great challenges to the experimental characterization of time-dependent dynamics of LPS membranes at atomic resolution. In order to minimize this issue, we have previously developed and validated an atomistic model for LPS membranes.¹⁹ This model relies on an improved set of specific parameters compatible with the GLYCAM and AMBER force fields.²⁰ It comprises an outer leaflet of LPS and an inner leaflet of 1,2-dipalmitoyl-3-phosphatidylethanolamine (DPPE). Previous MD simulations of LPS membranes have successfully described the structure,²¹ dynamics¹⁰ and free energy profile for the uptake of several ions.²² Ions were treated as van der Waals spheres with fixed charge and Lennard-Jones parameters taken from the AMBER force field.²⁰ A detailed description of the setup procedure and the MD protocol used in our simulations can be found in the ESI†

The area per lipid (A_L) is a property that describes the micro-structure of a membrane as a function of molecular packing.²³ In our simulations A_L converges slowly for the LPS membranes containing divalent cations (Fig. 1). It reaches a plateau after 150 ns,

Department of Fundamental Chemistry, Federal University of Pernambuco, Cidade Universitária, 50740-560, Recife, Brazil. E-mail: thereza.soares@ufpe.br

† Electronic supplementary information (ESI) available: A computational protocol and a movie of the lamellar to nonlamellar transition of K^+ -containing LPS membranes. See DOI: 10.1039/c3cc46918b

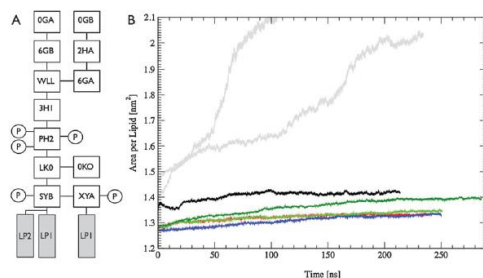


Fig. 1 (A) Schematic representation of the chemical structure of the rough LPS molecule¹⁹ where residue names stand for 6- α -D-glucose (6GA), 0- β -D-glucose (6GB), 2- α -L-rhamnose (2HA), 3-(acetyl amino)-3-deoxy-D-glucose (XYB and variant SYB), 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (OKO and variant LKO), L-glycero-D-manno-heptose-7-formamide (3H1), 2-(2-hydroxyethyl)-6-deoxy-D-manno-heptose (PH2), 2-(2-L-alanyl)-2-deoxy-D-galactosamine (WLL), dodecanoyl acid (12:0) (LP1) and 3-hydroxydodecanoyl acid 10:0 (3-OH) (LP2). (B) Area per lipid as a function of the time. Counter-ions are represented in grey (K^+), black (Na^+), dark green (Ba^{2+}), blue (Ca^{2+}), red (Mg^{2+}) and light green (Zn^{2+}). Values are averaged over 72 LPS and 180 DPPE molecules, respectively.

or after 200 ns in the case of Ba^{2+} . In the presence of Na^+ , A_L converges within 100 ns. Remarkably, the system containing K^+ shows a sharp increase in A_L , indicative of a lamellar to non-lamellar transition. In order to reproduce such behaviour, a duplicate run has been performed starting from LPS membrane coordinates with different K^+ cation distributions. Comparison of A_L for different cation-containing LPS membranes shows a coupled effect of ionic radius and valence on the membrane molecular packing (Fig. 1). Divalent cations with smaller ionic radius such as Ca^{2+} , Zn^{2+} and Mg^{2+} lead to an increase in molecular packing of LPS units whereas the opposite effect is seen in the presence of monovalent cations (Na^+ , K^+) as well as the divalent cation Ba^{2+} . The latter three ions have comparatively larger ionic radii.

The mass density profile for selected chemical groups further shows that the LPS membrane maintains a lamellar structure in the presence of different cations, with the exception of K^+ (Fig. 2). Both mono- and divalent cations bind to the phosphate groups, but display a distinct distribution pattern. Divalent cations are spatially distributed in two layers around the phosphate groups in the inner core and in the lipid-A regions whereas monovalent cations present a more scattered distribution between these two regions (Fig. 2). Solvent molecules penetrate deeper into the LPS hydrophobic core in the presence of larger size cations such as K^+ (Fig. 2). Nevertheless, K^+ -containing LPS membranes maintained a fairly compact hydrophobic core. This is possible due to an increase of the LPS membrane curvature to form a micelle-like aggregate structure after 230 ns of simulation (Fig. 3). We note that the severe change in the curvature of non-lamellar aggregates renders the 2D representation of the water density profile inaccurate. However, inspection of the respective MD trajectories asserts that water molecules remain chiefly in the polysaccharide region of the non-lamellar systems (Fig. 3).

We have also estimated the hydration regime of the LPS membranes through the calculation of water molecules and LPS functional groups coordinating the respective cations (Table 1). We observed that the relationship between ionic radius and hydration

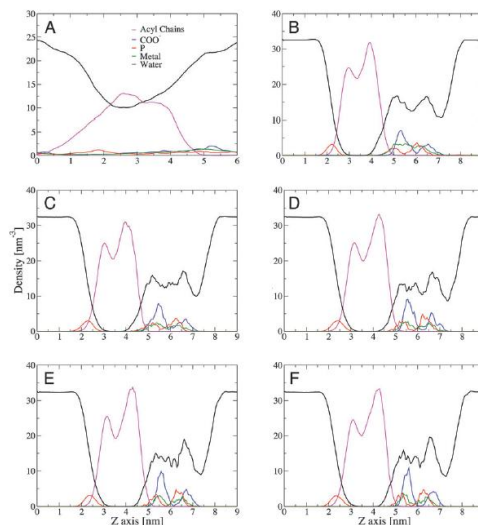


Fig. 2 Partial density of selected chemical groups along the axis normal to the LPS membrane containing (A) K^+ , (B) Na^+ , (C) Ba^{2+} , (D) Ca^{2+} , (E) Mg^{2+} and (F) Zn^{2+} .

is preserved within the membrane environment so that larger cations are more hydrated. Consistent with this observation, similar size cations displayed a comparable number of coordinating water molecules. Furthermore, the number of phosphate groups coordinating different cations varies with ionic valence (Table 1). In the LPS structure used in our model there are three phosphate groups

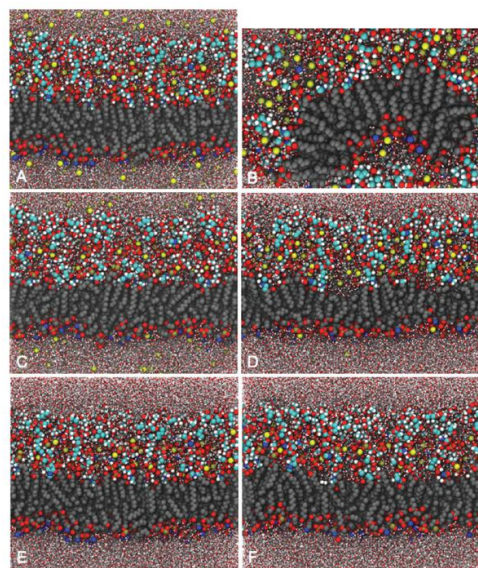


Fig. 3 Initial (pre-equilibrated for 0.6 μ s) and final MD configurations (after 0.2 μ s) for selected systems: K^+ , (A and B), Na^+ (C and D) and (E and F) Ca^{2+} , respectively. Different cations are represented in yellow balls.

Table 1 Number^a of coordinating water molecules and negatively charged groups per cation

Atom-pair	K ⁺	Na ⁺	Ba ²⁺	Ca ²⁺	Zn ²⁺	Mg ²⁺
M-OW	5.80	3.70	5.20	4.40	3.46	3.23
M-PO ₄ ⁻³	0.26	0.73	1.49	1.65	1.37	1.44
M-COO ⁻	1.89	0.54	0.07	0.72	0.54	0.56
Total	7.55	4.97	6.76	6.77	5.37	5.23

^a Values correspond to the integration up to the first peak in the radial distribution function for the atom pair. M is the symbol for the metal.

bound to the outer core residue 2-(2-hydroxyethyl)-6-deoxy-D-manno-heptose (PH2) and two others bound to the inner core residues 3-(acetyl amino)-3-deoxy-D-glucose (XYB and variant SYB).¹⁹ Divalent cations can effectively cross-link two phosphate groups from distinct LPS molecules, and therefore act as 'anchors' stabilizing the lamellar arrangement of the membrane. Monovalent cations are less apt to cross-link neighbouring LPS molecules as confirmed by their higher values of A_L (Fig. 1). This behaviour is also consistent with grazing incidence X-ray diffraction measurements for LPS membranes which show much lower compressibility for Ca²⁺ than for Na⁺-containing monolayers.¹² Only K⁺ ions interact significantly with carboxylate groups, binding chiefly to inner core residues (6- α -D-glucose and 0- β -D-glucose), and less to residues in the outer core. The large number of water molecules coordinated to K⁺ ions disrupts the outer core region, but cannot penetrate the hydrophobic core in the time length of our simulations. The carboxylate groups in the inner core constitute the next cluster of negative charges before the hydrophobic lipid-A region where K⁺ can bind.

Deuterium order parameters S_{CD} have been calculated for the simulated systems in order to assess the effect of cations on membrane fluidity (Fig. 4). A qualitative correlation between LPS membrane fluidity and the number of coordinated phosphate groups per cation can be inferred (Table 1). The more phosphate groups coordinated to a single cation, the less fluid is the LPS membrane. This is consistent with the fact that divalent cations cross-link LPS units, increasing molecular packing and decreasing the fluidity of the acyl chains.

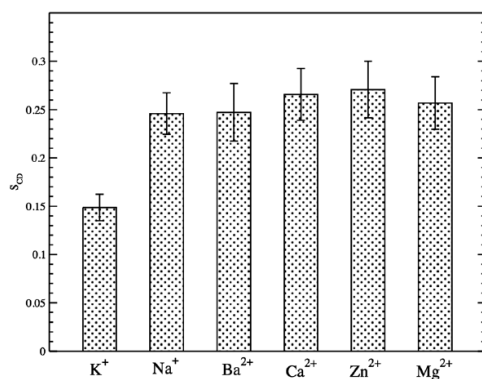


Fig. 4 Deuterium order parameters S_{CD} for LPS membranes containing different cations. S_{CD} were averaged over all acyl chains of 72 LPS molecules over the last 150 ns of simulations.

Our simulations indicate that LPS membranes can tolerate much higher hydration levels than phospholipid bilayers as long as LPS molecules are strongly cross-linked by counter-ions. An increase of the hydration/cross-link aptness ratio induces lamellar to non-lamellar transitions whereas its reduction stabilizes the lamellar state. Our findings offer an atom-level description of the critical role of polysaccharides in counterbalancing the high hydration levels and structural stability of LPS membranes. It further suggests that the choice of cation valence and ionic radius can be used to modulate LPS membrane properties such as hydration and fluidity.

This research was supported by the Brazilian funding agencies FACEPE, CNPq, CAPES and by the Swedish funding agency STINT. Partial computational resources were provided by the Environmental Molecular Sciences Laboratory, a national scientific user facility of the U.S. Department of Energy, and the Swedish National Infrastructure for Computing (SNIC) at High Performance Computing Center North (HPC2N).

Notes and references

- A. Aderem and R. J. Ulevitch, *Nature*, 2000, **406**, 782.
- S. I. Miller, R. K. Ernst and M. W. Bader, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005, **3**, 36.
- B. Beutler and E. T. Rietschel, *Nat. Rev. Immunol.*, 2003, **3**, 169.
- K. Brandenburg, J. Andra, M. Muller, M. H. Koch and P. Garidel, *Carbohydr. Res.*, 2003, **338**, 2477; R. K. Ernst, E. C. Yi, L. Guo, K. B. Lim, J. L. Burns, M. Hackett and S. I. Miller, *Science*, 1999, **286**, 1561.
- K. Brandenburg, M. H. Koch and U. Seydel, *J. Struct. Biol.*, 1990, **105**, 11; U. Seydel, M. H. J. Koch and K. Brandenburg, *J. Struct. Biol.*, 1993, **110**, 232.
- K. Brandenburg, *Biophys. J.*, 1993, **64**, 1215.
- K. Brandenburg and U. Seydel, *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, **775**, 225; J. Tong and T. J. McIntosh, *Biophys. J.*, 2004, **86**, 3759; A. G. Walsh, M. J. Matewish, L. L. Burrows, M. A. Monteiro, M. B. Perry and J. S. Lam, *Mol. Microbiol.*, 2000, **35**, 718.
- S. Snyder, D. Kim and T. J. McIntosh, *Biochemistry*, 1999, **38**, 10758.
- P. Garidel, M. Rappolt, A. B. Schromm, J. Howe, K. Lohner, J. Andra, M. H. J. Koch and K. Brandenburg, *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, **1715**, 122.
- F. J. S. Pontes, V. H. Rusu, T. A. Soares and R. D. Lins, *J. Chem. Theory Comput.*, 2012, **8**, 3830.
- U. Seydel, K. Brandenburg, M. H. Koch and E. T. Rietschel, *Eur. J. Biochem.*, 1989, **186**, 325.
- C. Jeworrek, F. Evers, J. Howe, K. Brandenburg, M. Tolan and R. Winter, *Biophys. J.*, 2011, **100**, 2169.
- N. Kucerka, E. Papp-Szabo, M. P. Nieh, T. A. Harroun, S. R. Schooling, J. Pencier, E. A. Nicholson, T. J. Beveridge and J. Katsaras, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 8057.
- M. Mueller, B. Lindner, S. Kusumoto, K. Fukase, A. B. Schromm and U. Seydel, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 26307.
- K. Brandenburg, H. Mayer, M. H. Koch, J. Weckesser, E. T. Rietschel and U. Seydel, *Eur. J. Biochem.*, 1993, **218**, 555; U. Seydel, L. Hawkins, A. B. Schromm, H. Heine, O. Scheel, M. H. Koch and K. Brandenburg, *Eur. J. Immunol.*, 2003, **33**, 1586.
- J. Andra, M. H. Koch, R. Bartels and K. Brandenburg, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, **48**, 1593.
- J. F. Jeannin, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2009, **667**, 133.
- C. R. Casella and T. C. Mitchell, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2008, **65**, 3231; J. T. Evans, C. W. Cluff, D. A. Johnson, M. J. Lacy, D. H. Persing and J. R. Baldrige, *Expert Rev. Vaccines*, 2003, **2**, 219.
- K. N. Kirschner, R. D. Lins, A. Maass and T. A. Soares, *J. Chem. Theory Comput.*, 2012, **28**, 14849.
- K. N. Kirschner, A. B. Yongye, S. M. Tschampel, J. Gonzalez-Outeirino, C. R. Daniels, B. L. Foley and R. J. Woods, *J. Comput. Chem.*, 2008, **29**, 622; W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell and P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 5179.
- T. A. Soares and T. P. Straatsma, *Mol. Simul.*, 2008, **34**, 295; T. P. Straatsma and T. A. Soares, *Proteins: Struct., Funct., Genet.*, 2009, **74**, 475; T. A. Soares, R. D. Lins and T. P. Straatsma, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2008, **19**, 312.
- R. D. Lins, E. R. Vorpapel, M. Guglielmi and T. P. Straatsma, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 29.
- H. I. Petrache, S. W. Dodd and M. F. Brown, *Biophys. J.*, 2000, **79**, 3172.