

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Química Fundamental
Programa de Pós-Graduação em Química

Gabriel Costa Alverni da Hora

**Simulações Computacionais do Peptídeo Híbrido
Plantaricina-Pediocina em Membranas
Fosfolipídicas Puras e Binárias Compostas por
POPC:POPG**

Tese de Doutorado

Recife
2016

GABRIEL COSTA ALVERNI DA HORA

**SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS DO PEPTÍDEO HÍBRIDO
PLANTARICINA-PEDIOCINA EM MEMBRANAS
FOSFOLIPÍDICAS PURAS E BINÁRIAS COMPOSTAS POR
POPC:POPG**

Orientadora: Profa. Dra. Thereza Amélia Soares

Tese apresentada como requisito complementar para obtenção do grau de Doutor em Química, do Programa de Pós-Graduação em Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco

Recife, 2016

Catálogo na fonte
Bibliotecária Joana D'Arc Leão Salvador CRB 4-572

D111s Da Hora, Gabriel Costa Alverni.
Simulações computacionais do peptídeo híbrido Plantaricina-Pedocina em membranas fosfolipídicas puras e binárias compostas por POPC: POPG / Gabriel Costa Alverni da Hora . – 2016.
146 f.: fig., tab.

Orientadora: Thereza Amélia Soares.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química Fundamental. Recife, 2016.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Físico-química. 2. Bioquímica . 3. Dinâmica molecular . I. Soares, Thereza Amélia (Orientador). II. Título.

541.3 CDD (22. ed.) UFPE-FQ 2016-38

GABRIEL COSTA ALVERNI DA HORA

*Simulações Computacionais do Peptídeo Híbrido Plantaricina-
Pediocina em Membranas Fosfolipídicas Puras e Binárias
Compostas Por POPC:POPG*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

Aprovado em: 01/04/2016.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Thereza Amélia Soares da Silva (Orientadora)

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Kaline Rabelo Coutinho

Departamento de Física Geral
Universidade de São Paulo

Prof. Maurício Domingues Coutinho Neto

Universidade Federal do ABC

Prof. Celso Pinto de Melo

Departamento de Física
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Alfredo Arnóbio de Souza da Gama

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

A meus pais e avós

*“...You, me, or nobody is gonna hit as hard as
life. But it ain’t about how hard you hit. It’s
about how hard you can get hit and keep
moving forward; how much you can take and
keep moving forward.
That’s how winning is done!”*

(Rocky Balboa, 2006)

Agradecimentos

Agradeço à Professora Dra. Thereza A. Soares pela orientação e ensinamentos ao longo do desenvolvimento deste trabalho e de meu doutoramento.

Agradeço também ao Prof. Dr. Roberto Lins pela contribuição e ajuda nos momentos de dificuldade que surgiram ao longo desta caminhada.

Agradeço à Maria Carolina Pacheco Lima que sempre contribuiu com discussões e conselhos valiosos. Também agradeço aos amigos do LQTC e do Biomat, (em especial Frederico Pontes, Júlio Cosme, Roberta Dias, Renaldo Júnior, Albano Neto, Paulo McMiller, Diego de Paula,) que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

Agradeço igualmente à minha família. Em especial, meus pais que sempre se esforçaram para que eu tivesse as oportunidades de “subir nos ombros dos gigantes”.

Por fim, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida ao longo do doutoramento.

Siglas e Abreviações

AMBER	<i>Assisted Model Building with Energy Refinement</i>
AMP	<i>Antimicrobial Peptides</i>
AOT	bis-(2-etilhexil)-sulfosuccinato de sódio
BOA	<i>Born-Oppenheimer Approximation</i>
CD	<i>Circular Dichroism</i>
CHARMM	<i>Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics</i>
CRF	<i>Coulomb with Reaction Field</i>
DMPC	Dimiristoil-fosfatidilcolina
DMPG	Dimiristoil-fosfatidilglicerol
DPPC	1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-Fosfatidilcolina
DPPG	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-rac-(1-glicerol)]
DSSP	<i>Dictionary of Protein Secondary Structure</i>
FTIR	<i>Fourier transform infrared</i>
GROMACS	<i>Groningen Machine for Chemical Simulations</i>
GROMOS	<i>Groningen Molecular Simulation</i>
GUV	<i>giant unilamellar vesicle</i>
LAB	<i>lactic acid bacteria</i>
LINCS	<i>Linear Constraint Solver</i>
LJ	Lennard-Jones
LPS	Lipopolisacarídeo
LUV	<i>large unilamellar vesicle</i>
MD	<i>Molecular Dynamics</i>
MIN	<i>Minimal inhibitory concentration</i>
MM	<i>Molecular Mechanics</i>
MTTK	Martyna-Tuckerman-Tobias-Klein
OPLS	<i>Optimized Potentials for Liquid Simulations</i>
PME	<i>Particle Mesh Ewald</i>
POPC	1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-Fosfatidilcolina
POPG	1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-rac-(1-glicerol)]
RMN	ressonância magnética nuclear
SPC	<i>Single Point Charge</i>
TFE	2,2,2-Trifloroetanol
UFF	<i>Universal Force Field</i>
USP	Universidade de São Paulo

Resumo

DA HORA, G.C.A. **Simulações Computacionais do Peptídeo Híbrido Plantaricina-Pediocina em Membranas Fosfolipídicas Puras e Binárias Compostas por POPC:POPG.** Tese de doutorado orientada pela Prof. Dr. Thereza Amélia Soares – Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil, 2016.

Peptídeos antimicrobianos são componentes importantes do sistema de defesa de diversos organismos contra possíveis invasores. Em geral, são pequenos (até 100 aminoácidos), catiônicos e anfipáticos. Eles têm despertado o interesse da comunidade científica por sua capacidade de atuação contra micróbios, que não conseguem desenvolver resistência a esses peptídeos. Ou seja, eles emergem como complemento e/ou alternativa ao uso dos antibióticos convencionais.

Este trabalho desenvolveu um modelo computacional de um peptídeo híbrido de pediocina A (N-terminal) e plantaricina 149a (C-terminal), dois peptídeos bactericidas. Dados experimentais obtidos pelo grupo da prof. Dra. Rosângela Itri do IFUSP foram utilizados para modelagem e comparação dos resultados. Foram feitas simulações de MD do peptídeo interagindo com membranas puras e mistas de POPC e POPG utilizando os parâmetros do campo de força GROMOS 53A6 e 54A7.

As simulações com uma unidade do peptídeo revelaram a atualização 54A7 era a mais adequado para modelagem desses sistemas. Os mapas de estrutura secundária mostraram que o peptídeo adquire configuração mais ordenada quando interage com membranas com maior quantidade de POPG em sua composição. As simulações com duas unidades do peptídeo sugeririam que o peptídeo interage e penetra na camada de POPG através da região C-terminal. Na simulação com membrana de POPC, nenhuma das porções terminais ficou estável no interior da membrana.

O efeito do aumento da concentração de peptídeos foi examinado colocando cinco e dez unidades do peptídeo para interagir com as membranas. Na membrana de POPC, os peptídeos não formam um único aglomerado e causam pouca perturbação na bicamada. Já na membrana de POPG, o efeito da interação do aglomerado de peptídeos é acentuado, provocando grandes deformações na bicamada lipídica, praticamente a destruindo. Esse fenômeno sugere um possível mecanismo carpete para ação do peptídeo sobre a membrana fosfolipídica de bactérias.

Palavras-chave: peptídeo híbrido, peptídeo antimicrobiano, POPG, POPC.

Abstract

DA HORA, G.C.A. **Computer Simulations of Plantaricin-Pediocin Hybrid Peptide in Pure and Binary Phospholipid Membranes Composed of POPC:POPG.** PhD's thesis oriented by Prof. Dr. Thereza Amélia Soares – Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil, 2016.

Antimicrobial peptides are important components of defense system in various organizations against possible invaders. They are generally small (100 aminoacids), cationic and amphipathic. They have stimulated the interest of the scientific community for its ability to act against microbes that cannot develop resistance to these peptides. That is, they emerge as complement and/or alternative to the use of conventional antibiotics.

This study developed a computational model of a hybrid peptide pediocin A (N-terminal) and plantaricin 149a (C-terminal), two bactericidal peptides. Experimental data obtained by the group of prof. Dr. Rosângela Itri (IFUSP) were used for modeling and compare the results. MD simulations were made of the peptide interacting with pure and mixed POPC and POPG membranes. These simulations were performed using the parameters of the force field GROMOS 53A6 and 54A7.

Simulations with a single copy of the peptide revealed that the force field 54A7 was the most appropriate for modeling these systems. The secondary structure maps showed that the peptide acquires a more ordered configuration when interacting with membranes with higher amounts of POPG in its composition. The simulations with two copies of the peptide suggest that the peptide interacts and penetrates the POPG layer via the C-terminal part. In the simulation with POPC membrane, none of the end portions remained stable within the membrane.

The effect of increasing the peptide concentration of was examined by placing five and ten copies of the peptide to interact with the membranes. In the POPC membrane, the peptides do not form a single cluster and they cause little disturbance in the bilayer. In the POPG membrane, the interaction of peptides cluster is enhanced, causing large deformation and practically destroying the lipid bilayer. This phenomenon suggests a possible carpet mechanism of action of the peptide on the phospholipid membrane of bacteria.

Keywords: hybrid peptide, antimicrobial peptide, POPG, POPC

Índice de Tabelas

Tabela 1.1.1: Valores (em nm) obtidos para comprimentos de onda de emissão inicial (λ_{inicial}), final (λ_{final}) e deslocamento para o azul (<i>blue shift</i>) do pico de fluorescência do triptofano do peptídeo híbrido para as diferentes composições das membranas lipídicas. ^{a)}	34
Tabela 1.1.2: Tipo de átomos e carga para os átomos da cabeça do fosfolípido POPG do modelo de Kukol. Adaptada da Ref. [65].	38
Tabela 3.1.1: Sistemas simulados e tempo de simulação (em ns).	70
Tabela 8.2.1: Descrição e tempo (em ns) de simulação para os sistemas estudados com campo de força GROMOS 54A7 e concentração NaCl 150 mM.	143

Índice de Figuras

Figura 1.1.1 Reação de condensação entre dois aminoácidos para formar um dipeptídeo. A ligação peptídeo é mostrada em vermelho. Baseada na Ref. [4].....	21
Figura 1.1.2 Os vinte aminoácidos essenciais que são constituintes primários de peptídeos e proteínas. Estão divididos em grupos de acordo com afinidade com a água e os subgrupos de acordo com a carga da cadeia. Em parênteses, estão o símbolo (3 letras) e a abreviação (1 letra). Figura adaptada da Ref. [5].....	22
Figura 1.1.3 Esquema com os possíveis mecanismos de ação dos peptídeos catiônicos antimicrobianos em bactérias Gram-negativas. Após iniciar a interação com a membrana (A) os peptídeos podem atravessá-la de acordo com o modelo barril (B), poro toroidal (C), agregado (D) ou tapete (E). Figura adaptada da Ref. [25].	27
Figura 1.1.4 Estrutura secundária proposta para a pediocina AcH (KYYGNGVTCGKHSCSVDWVGKATTCIINNGAMAWATGGHQGNHKC). Estrutura em folha- β é atribuída à região N-terminal, enquanto a região C-terminal (resíduos 19-32) se apresenta em hélice. Figura retirada da Ref. [38].....	28
Figura 1.1.5 Estrutura secundária proposta para a plantaricina 149a (YSLQMGATAIKQVKKLFKKKGG). (A) Vista lateral do peptídeo completo; (B) Visão frontal dos resíduos 10-19 (IKQVKKLFKK) correspondente a um trecho da região anfipática helicoidal. Resíduos polares carregados da hélice são mostrados em azul. Retirada da Ref. [54].....	30
Figura 1.1.6 Espectro CD para interação entre peptídeo híbrido e diferentes membranas lipídicas. Relações lipídicas DPPC:DPPG em mol%: peptídeo em solução tampão (preto); 100:0 (vermelho); 75:25 (verde); 50:50 (azul); 25:75 (rosa); 0:100 (laranja). Figura obtida da Ref. [3].....	33
Figura 1.1.7 Espectros de emissão de fluorescência do triptofano presente no peptídeo híbrido na presenças de membranas compostas pelos seguintes mol% de egg-PC:egg-PG: a) 100:0; b) 75:25; c) 25:75; d) 0:100. A curva em preto corresponde ao peptídeo livre em solução. As demais curvas foram obtidas após inserção de 30 μ M (vermelho) e 60 μ M (verde) de vesículas na solução. Espectros retirados da Ref. [3].	34
Figura 1.1.8 Cinética de vazamento da carboxifluoresceína para o peptídeo híbrido e membranas compostas pelos seguintes mol% de egg-PC:egg-PG: a) 100:0; b) 75:25; c) 25:75; d) 0:100. Em verde, a curva corresponde ao lipossomo controle utilizado (exceto na letra 'b', onde o lipossomo controle está em azul). As demais curvas foram obtidas usando soluções de peptídeo de 0,060 μ M (vermelho) e 0,125 μ M (preto). Curvas obtidas da Ref. [3].....	36
Figura 1.1.9 Fórmulas estruturais com a definição de Kukol [65] dos números dos átomos e ângulos torcionais para os modelos lipídicos: a) POPC; b) POPG.	37
Figura 1.1.10 GUV composta apenas por lipídios POPC sob efeito de 1 mM de solução de peptídeo híbrido. Todas as figuras possuem a mesma escala. Figura retirada da Ref. [3].....	39
Figura 1.1.11 GUV composta por lipídios 50%mol de POPG e 50%mol de POPC sob efeito de 1 mM de solução de peptídeo híbrido. Todas as figuras possuem a mesma escala. Figura retirada da Ref. [3].....	39

Figura 2.2.1 Representação esquemática das contribuições intra e intermoleculares de um campo de força. Adaptado da Ref. [81].....	43
Figura 2.2.2 Cargas atômicas parciais (em e) e grupos de cargas no DPPC do: a) GROMOS 53A6; b) Chiu et. al. [136]. Em negrito, os grupos metil colina e os oxigênios não-ésteres do grupo fosfato. Também estão indicadas as posições dos metilenos no grupo colina em a e b e em d no grupo glicerol. Retirada da Ref. [125].....	52
Figura 2.3.1 Fluxograma mostrando os principais passos de um procedimento de simulação computacional.....	55
Figura 2.3.2 Exemplo de arquivo de entrada para as simulações computacionais dos sistemas completos (peptídeos, lipídios, água e íons) com as variáveis e algoritmos listados.....	56
Figura 2.3.3 Exemplo de caixa bidimensional no qual são aplicadas as condições periódicas de contorno. Figura obtida da referência [140].	57
Figura 3.1.1 Configuração inicial do peptídeo híbrido com toda sua estrutura em formato de hélice- α (em cinza).	65
Figura 3.1.2 Conformações iniciais do peptídeo na presença da membrana fosfolipídica: A) peptídeo na superfície da membrana; B) peptídeo imerso na membrana. Os lipídios são representados por uma superfície sólida em cinza com os grupamentos fosfatos em vermelho. O peptídeo é representado de acordo com o caráter hidrofílico (verde), carga positiva (azul), carga negativa (vermelho) hidrofóbico (branco) dos aminoácidos constituintes do mesmo. 67	67
Figura 3.1.3 Configuração inicial dos sistemas contendo duas unidades do peptídeo imerso em uma bicamada de POPG (100%) ou POPC (100%). As moléculas de água foram excluídas da representação para facilitar a visualização.....	68
Figura 3.1.4 Configurações iniciais dos sistemas contendo: a) cinco unidades de peptídeo híbrido; b) dez unidades do peptídeo interagindo com membrana 100% POPG. Moléculas de água e íons foram omitidas para facilitar a visualização.	69
Figura 3.2.1 a) Representação do vetor de inclinação α indicando a direção e posicionamento das cadeias lipídicas (adaptado da Ref. [175]); b) projeção do vetor de inclinação α na direção do vetor b	75
Figura 4.1.1 Mapas de estrutura secundária para grupo de simulações de peptídeo na superfície da membrana durante 5 ns. Foi utilizado o GROMOS 53a6, 0 mM, sem restrições nas ligações de hidrogênio do peptídeo para membrana composta por: a) 100% POPC; b) 75% POPG; c) 100% POPG. Legenda: hélice 3_{10} (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco).....	78
Figura 4.1.2 Mapas de estrutura secundária para grupo de simulações com peptídeo imerso membrana durante 5 ns. Foi utilizado o GROMOS 53a6, 0 mM, sem restrições nas ligações de hidrogênio do peptídeo para membrana composta por: a) 100% POPC; b) 75% POPG; c) 100% POPG. Legenda: hélice 3_{10} (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco)..	78
Figura 4.1.3 Mapas de estrutura secundária para grupo de simulações de peptídeo na superfície da membrana durante 30 ns. Foi utilizado o GROMOS 53a6, 0 mM, com restrições nas ligações de hidrogênio do peptídeo (restritas a 0,28-0,30 nm nos 5 ns iniciais) para membrana composta por: a) 100% POPC; b) 75% POPC; c) 75% POPG; d) 100% POPG. Legenda: hélice 3_{10} (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco).	79

Figura 4.1.4 Mapas de estrutura secundária para grupo de simulações de peptídeo imerso na membrana durante 30 ns. Foi utilizado o GROMOS 53a6, 0 mM, com restrições nas ligações de hidrogênio do peptídeo (5 ns iniciais) para membrana composta por: a) 100% POPC; b) 100% POPG. Legenda: hélice 3_{10} (**cinza**), hélice α (**azul**), hélice π (**roxo**), folha beta-ponte (**preto**), barril beta (**vermelho**), volta (**amarelo**), dobra (**verde**) e desestruturado (**branco**).. 80

Figura 4.2.1 Mapas de estrutura secundária para grupo de simulações de peptídeo na superfície da membrana durante 30 ns. Foi utilizado o GROMOS 54a7, 0 mM, com restrições nas ligações de hidrogênio do peptídeo (5 ns iniciais) para membrana composta por: a) 100% POPC; b) 75% POPC; c) 75% POPG; d) 100% POPG. Legenda: hélice 3_{10} (**cinza**), hélice α (**azul**), hélice π (**roxo**), folha beta-ponte (**preto**), barril beta (**vermelho**), volta (**amarelo**), dobra (**verde**) e desestruturado (**branco**). 82

Figura 4.2.2 Mapas de estrutura secundária para grupo de simulações de peptídeo imerso na membrana durante 30 ns. Foi utilizado o GROMOS 54a7, 0 mM, com restrições nas ligações de hidrogênio do peptídeo (5 ns iniciais) para membrana composta por: a) 100% POPC; b) 100% POPG. Legenda: hélice 3_{10} (**cinza**), hélice α (**azul**), hélice π (**roxo**), folha beta-ponte (**preto**), barril beta (**vermelho**), volta (**amarelo**), dobra (**verde**) e desestruturado (**branco**).. 82

Figura 4.2.3 Mapas de estrutura secundária para grupo de simulações de peptídeo na superfície da membrana durante 150 ns (250 ns para caso 100% POPG). Foi utilizado o GROMOS 54a7, 150 mM, com restrições nas ligações de hidrogênio do peptídeo (5ns iniciais) para membrana composta por: a) 100% POPC; b) 75% POPC; c) 75% POPG; d) 100% POPG. Legenda: hélice 3_{10} (**cinza**), hélice α (**azul**), hélice π (**roxo**), folha beta-ponte (**preto**), barril beta (**vermelho**), volta (**amarelo**), dobra (**verde**) e desestruturado (**branco**).. 83

Figura 4.2.4 Mapas de estrutura secundária para grupo de simulações de peptídeo imerso na membrana durante 150 ns. Foi utilizado o GROMOS 54a7, 150 mM, com restrições nas ligações de hidrogênio do peptídeo (5 ns iniciais) para membrana composta por: a) 100% POPC; b) 75% POPC; c) 75% POPG; d) 100% POPG. Legenda: hélice 3_{10} (**cinza**), hélice α (**azul**), hélice π (**roxo**), folha beta-ponte (**preto**), barril beta (**vermelho**), volta (**amarelo**), dobra (**verde**) e desestruturado (**branco**). 84

Figura 4.2.5 Evolução da área por cabeça de lipídio nos 15 ns finais para as simulações das membranas isoladas. Legenda: 100% POPC (**azul**), 75% POPC (**verde**), 75% POPG (**vermelho**) e 100% POPG (**preto**). Valores de referência: 0,54-0,68 nm² (POPC) e 0,55-0,67 nm² (POPG) [180–183]. 86

Figura 4.2.6 Representação das interações intramoleculares no POPG (a) e intermoleculares POPC:POPG (b). O hidrogênio do grupo glicerol do POPG sofre atração eletrostática com os oxigênios do grupo fosfato dos lipídios..... 87

Figura 4.2.7 Evolução da área por cabeça de lipídio nos 15 ns finais para as simulações das membranas interagindo com peptídeo na superfície. Legenda: 100% POPC (**azul**), 75% POPC (**verde**), 75% POPG (**vermelho**) e 100% POPG (**preto**). Valores de referência: 0,54-0,68 nm² (POPC) e 0,55-0,66 nm² (POPG) [180–183]. 88

Figura 4.2.8 Potencial eletrostático em relação ao eixo z dos sistemas com membranas isoladas (à esquerda) e membranas com peptídeo interagindo na superfície (à direita). As cabeças dos lipídios da membrana superior e da inferior ocupam a região por volta de 2-3 nm e 5-6, respectivamente. AS cadeias alifáticas estão posicionadas entre 3 e 5 nm. As moléculas de água se distribuem fora dessa região. Legenda: 100% POPC (**azul**), 75% POPC (**verde**), 75% POPG (**vermelho**) e 100% POPG (**preto**)..... 89

Figura 4.2.9 Densidade em número para as simulações das membranas sem interação com peptídeos. a) 100% POPC; b) 75% POPC; 75% POPG; d) 100% POPG. Legenda: água (azul); grupo glicerol (preto); PO ₄ (verde); CH ₃ (rosa); CH ₂ (laranja) e CH ₁ (azul claro). 90	90
Figura 4.2.10 Densidade em número para o sistema de um peptídeo interagindo com a membrana de 100% POPG durante: a) 0 a 50 ns; b) 200 a 250 ns de simulação..... 90	90
Figura 4.2.11 Gráficos de parâmetros de ordem para as cadeias palmitoil (a) e oleila (b) dos lipídios nas simulações de um peptídeo com membrana 100% POPC. 91	91
Figura 4.2.12 Gráficos de parâmetros de ordem para as cadeias palmitoil (a) e oleila (b) dos lipídios nas simulações de um peptídeo com membrana 100% POPG. 91	91
Figura 4.2.13 Mapas de estrutura secundária para grupo de simulações de peptídeo isolado durante 50ns. Foi utilizado o GROMOS 54a7 sem restrições nas ligações de hidrogênio do peptídeo para meio com concentração adicional de NaCl de: a) 0 M; b) 0,150 M. Legenda: hélice 3 ₁₀ (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco)...... 92	92
Figura 4.2.14 Mapas de estrutura secundária para grupo de simulações de peptídeo isolado. Foi utilizado o GROMOS 54a7 sem restrições nas ligações de hidrogênio do peptídeo para meio com concentração adicional de NaCl de: a) 0 M com arrefecimento simulado – 10 ns finais; b) 0,150 M – 50 ns. Legenda: hélice 3 ₁₀ (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco)...... 93	93
Figura 4.2.15 Representação da interação do peptídeo com a superfície da membrana 100% POPG no: a) início da simulação; b) fim da simulação. Lisinas são mostradas em laranja, triptofano em vermelho e membrana em cinza. Moléculas de água e íons foram omitidos para melhor visualização. 94	94
Figura 4.2.16 Representação da interação do peptídeo com a superfície da membrana 100% POPC no: a) início da simulação; b) fim da simulação. Lisinas são mostradas em laranja, triptofano em vermelho e membrana em cinza. Moléculas de água e íons foram omitidos para melhor visualização. 94	94
Figura 4.3.1 Evolução da distância entre centro de massa da membrana de 100% POPC e o centro de massa da região: a) N-terminal; b) C-terminal de cada peptídeo. A região N-terminal corresponde a uma lisina (K1) e a região C-terminal, uma glicina (G35). A curva em preto corresponde ao peptídeo UP; em vermelho , o peptídeo DOWN..... 95	95
Figura 4.3.2 Representação gráfica do início (a) e do final (b) da simulação com duas unidades do peptídeo na membrana 100% POPC. Os dois peptídeos foram expulsos do interior da membrana. Moléculas de água e íons foram omitidos para melhor visualização... 96	96
Figura 4.3.3 Mapas de estrutura secundária para simulação de dois peptídeos parcialmente imersos na membrana de 100% POPC. Região imersa: a) N-terminal; b) C-terminal. Legenda: hélice 3 ₁₀ (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco)...... 97	97
Figura 4.3.4 Evolução da distância entre centro de massa da membrana de 100% POPG e o centro de massa da região: a) N-terminal; b) C-terminal de cada peptídeo. A região N-terminal corresponde a uma lisina (K1) e a região C-terminal, uma glicina (G35). A curva em preto corresponde ao peptídeo UP; em vermelho , o peptídeo DOWN..... 97	97
Figura 4.3.5 Representação gráfica do início (a) e do final (b) da simulação com duas unidades do peptídeo na membrana 100% POPG. Apenas o peptídeo DOWN foi expulso do	

interior da membrana. O peptídeo UP permanece com sua região C-terminal no interior da membrana. Moléculas de água e íons foram omitidos para melhor visualização.	98
Figura 4.3.6 Mapas de estrutura secundária para simulação de dois peptídeos parcialmente imersos na membrana de 100% POPG. Região imersa: a) N-terminal; b) C-terminal. Legenda: hélice 3_{10} (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco).	99
Figura 4.4.1 Representação gráfica da simulação com cinco unidades do peptídeo na membrana 100% POPG (em cinza). a) Início da simulação; b) Final da simulação. Moléculas de água e íons foram omitidos para melhor visualização.	101
Figura 4.4.2 Mapas de estrutura secundária para as cinco unidades de peptídeo interagindo na superfície da membrana de POPG durante os últimos 400 ns de simulação. Legenda: hélice 3_{10} (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco).	102
Figura 4.4.3 Mudanças na estrutura da membrana de 100% POPG causadas pela interação com as cinco unidades do peptídeo ao longo da trajetória. As imagens referem-se ao tempo de trajetória de: a) 100 ns ; b) 200 ns; c) 300 ns; d) 400 ns. Membrana em verde, com oxigênios dos grupos fosfato em vermelho. Moléculas de água representadas por pontos em vermelho.	103
Figura 4.4.4 Densidade em número para o sistema de cinco peptídeos interagindo com a membrana de 100% POPG durante: a) 0-50 ns; b) 350-400 ns de simulação.	104
Figura 4.4.5 Gráficos de parâmetros de ordem para as cadeias palmitoil (a) e oleila (b) dos lipídios nas simulações de cinco unidades do peptídeo com membrana formada por lipídios POPG apenas.	105
Figura 4.4.6 Histograma mostrando a distribuição dos ângulos de inclinação dos lipídios para a simulação com cinco unidades do peptídeo na superfície da membrana de 100% POPG. Em preto , 10ns iniciais e em vermelho , os 10ns finais.	105
Figura 4.4.7 Representação gráfica da simulação com dez unidades do peptídeo na superfície da membrana 100% POPG (em cinza). a) Início da simulação; b) Final da simulação. Moléculas de água e íons foram omitidos para melhor visualização.	106
Figura 4.4.8 Mapas de estrutura secundária para as dez unidades de peptídeo interagindo na superfície da membrana de POPG para os 300 ns finais de simulação. Legenda: hélice 3_{10} (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco).	108
Figura 4.4.9 Mudanças na estrutura da membrana de 100% POPG causadas pela interação com as dez unidades do peptídeo ao longo da trajetória. As imagens referem-se ao tempo de trajetória de: a) 0 ns ; b) 100 ns; c) 200 ns; d) 300 ns. Membrana em verde, com oxigênios dos grupos fosfato em vermelho. Moléculas de água representadas por pontos em azul.	109
Figura 4.4.10 Densidade em número para o sistema de dez peptídeos interagindo com a membrana de 100% POPG durante: a) 0-50 ns; b) 350-400 ns de simulação.	110
Figura 4.4.11 Cavidade causada pela ação dos dez peptídeos sobre a membrana de POPG, indicando possível mecanismo carpet-like de rompimento. Membrana em branco, com grupos fosfatos destacados em vermelho indicando as cabeças lipídicas.	111

Figura 4.4.12 Gráficos de parâmetros de ordem para as cadeias palmitoil (a) e oleila (b) dos lipídios nas simulações de dez unidades do peptídeo com membrana formada por 100% POPG.	111
Figura 4.4.13 Gráficos da simulação com dez unidades do peptídeo na superfície da membrana de 100% POPG: a) Histograma mostrando a distribuição dos ângulos de inclinação dos lipídios. Em preto , 10 ns iniciais e em vermelho , os 10 ns finais; b) Evolução temporal da média dos ângulos de inclinação.	112
Figura 4.4.14 Representação gráfica da simulação com dez unidades do peptídeo na superfície da membrana gigante de 100% POPC (em cinza). a) Início da simulação; b) Final da simulação (100 ns). Moléculas de água e íons foram omitidos para melhor visualização.	113
Figura 4.4.15 Mapas de estrutura secundária para as dez unidades de peptídeo interagindo com a membrana de POPC para os 100 ns de simulação. Legenda: hélice 3_{10} (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco).	115
Figura 4.4.16 Evolução da estrutura da membrana de 100% POPC através da interação com as dez unidades do peptídeo ao longo da trajetória. As imagens referem-se ao tempo de trajetória de: a) 0 ns; b) 100 ns. Cadeias alifáticas estão em cinza, grupo colina em laranja e os oxigênios dos grupos fosfato em vermelho. Moléculas de água foram omitidas para melhor visualização.	116
Figura 4.4.17 Densidade em número para o sistema de dez peptídeos interagindo com a membrana gigante de 100% POPC durante: a) 0-10 ns; b) 90-100 ns de simulação.	117
Figura 4.4.18 Gráficos de parâmetros de ordem para as cadeias palmitoil (a) e oleila (b) dos lipídios nas simulações de dez unidades do peptídeo com membrana gigante formada por 100% POPC.	117
Figura 4.4.19 Gráficos da simulação com dez unidades do peptídeo na superfície da membrana de 100% POPC gigante: a) Histograma mostrando a distribuição dos ângulos de inclinação dos lipídios. Em preto , 10 ns iniciais e em vermelho , os 10 ns finais; b) Evolução temporal da média dos ângulos de inclinação.	118
Figura 4.4.20 Representação gráfica da simulação com dez unidades do peptídeo na membrana gigante de 100% POPG (em cinza). a) Início da simulação; b) Final da simulação. Moléculas de água e íons foram omitidos para melhor visualização.	119
Figura 4.4.21 Mapas de estrutura secundária para as dez unidades de peptídeo interagindo com a membrana gigante de POPG para os 100 ns de simulação. Legenda: hélice 3_{10} (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco).	120
Figura 4.4.22 Evolução da estrutura da membrana gigante de 100% POPG através da interação com as dez unidades do peptídeo ao longo da trajetória. As imagens referem-se ao tempo de trajetória de: a) 0 ns; b) 100 ns. Na membrana, os grupos glicerol estão em verde, as cadeias alifáticas em cinza e os oxigênios dos grupos fosfato em vermelho. Moléculas foram omitidas para melhor visualização.	121
Figura 4.4.23 Densidade em número para o sistema de dez peptídeos interagindo com a membrana gigante de 100% POPG durante: a) 0-10 ns; b) 90-100 ns de simulação.	122
Figura 4.4.24 Gráficos de parâmetros de ordem para as cadeias palmitoil (a) e oleila (b) dos lipídios nas simulações de cinco unidades do peptídeo com membrana gigante formada por lipídios POPG apenas.	123

Figura 4.4.25 Gráficos da simulação com dez unidades do peptídeo na superfície da membrana de 100% POPC gigante: a) Histograma mostrando a distribuição dos ângulos de inclinação dos lipídios. Em preto , 10 ns iniciais e em vermelho , os 10 ns finais; b) Evolução temporal da média dos ângulos de inclinação.	123
Figura 8.2.1 Exemplo de cálculo dos parâmetros C6 e C12 de Lennard-Jones com base na atualização do campo de força GROMOS 54A7.....	141
Figura 8.2.2 Exemplo de adição dos parâmetros C6 e C12 de Lennard-Jones no arquivo de interação não-ligada (ffnon-bonded.itp) para as modificações do campo de força GROMOS 54A7.	142
Figura 8.3.1 Trecho de arquivo de entrada do tipo .mdp do programa GROMACS para utilização da metodologia de arrefecimento simulado (simulated annealing) mostrando o tipo (periodic), o tempo (annealing-time, em ps) e as temperaturas de referência (annealing-temp, em K) para os grupos Proteína e Água com Íons.	144

Sumário

1. Introdução	19
1.1. Peptídeos Antimicrobianos	20
1.1.1 Mecanismos de Ação de Peptídeos Antimicrobianos	25
1.1.2 Pediocina A (PA-1)	27
1.1.3 Plantaricina 149a (pln 149a)	29
1.1.4 O Peptídeo Híbrido e os Dados Experimentais	31
2. Metodologia	41
2.1. Simulação Computacional e Dinâmica Molecular	41
2.2. Campos de Força	41
2.2.1. A Função Potencial do GROMOS	45
2.2.2. Ligações Covalentes	47
2.2.3. Ângulos de Ligação	47
2.2.4. Ângulos Diédricos de Torção	48
2.2.5. Ângulos Diédricos Impróprios	49
2.2.6. Interações de van der Waals	50
2.2.7. Interações Eletrostáticas	52
2.3. Simulação Computacional	54
2.3.1. Condições Periódicas	56
2.3.2. Ensembles	57
2.3.3. Algoritmo de Integração	58
2.3.4. Termostato	59
2.3.5. Barostato	60
2.3.6. LINCS: Algoritmo de Restrição	60
2.3.7. Longo Alcance: Campo de Reação Generalizado	61
3. Procedimento Computacional	64
3.1. Sistemas Simulados	64
3.1.1 Simulações de Sistemas Contendo uma Unidade do Peptídeo	64
3.1.2 Simulações de Sistemas Contendo Múltiplas Unidades do Peptídeo	67
3.2. Análises	71
3.2.1 Área por Cabeça de Lipídio	71
3.2.2 Mapas de Estrutura Secundária	71
3.2.3 Densidade em Número	72
3.2.4 Parâmetros de Ordem	73
3.2.5 Potencial Eletrostático	73
3.2.6 Distância entre Centros de Massa	74
3.2.7 Ângulo de Inclinação	74
3.2.8 Arrefecimento simulado (Simulated Annealing)	75
4. Resultados e Discussão	77
4.1. Simulações Exploratórias: Validação do Protocolo Computacional	77
4.2. Simulações Contendo Uma Única Unidade do Peptídeo: Conformação do Peptídeo após Interação com a Bicamada	81
4.2.1 Caracterização das Bicamadas Fosfolipídicas Puras e Binárias	85
4.2.2 Simulações de Uma Unidade do Peptídeo em Solução	92
4.3. Simulações Contendo Duas Unidades do Peptídeo: Preferência de Inserção do Peptídeo na Bicamada	95

4.4. Simulações Contendo Múltiplas Unidades do Peptídeo: Efeito da Concentração de Peptídeos	100
4.4.1 <i>Cinco Unidades do Peptídeo</i>	100
4.4.2 <i>Dez Unidades do Peptídeo</i>	106
4.4.3 <i>Membranas Gigantes com Dez Unidades do Peptídeo.....</i>	113
5. Conclusões	125
6. Perspectivas	127
7. Referências bibliográficas	128
8. Anexos	140
8.1. Lista de Aminoácidos.....	140
8.2. Metodologia	141
8.2.1. <i>Atualização para GROMOS 54A7.....</i>	141
8.2.2. <i>Descrição dos sistemas simulados.....</i>	143
8.2.3. <i>Campo de Força.....</i>	144
8.3. Procedimento Computacional	144
8.3.1. <i>Arrefecimento simulado – arquivo de entrada</i>	144
9. Apêndice	145
9.1. <i>Artigos em Preparação.....</i>	145
9.2. <i>Artigos Publicados</i>	145

1. Introdução

A Química Computacional utiliza as teorias e fundamentos da Química Teórica, ferramentas físicas e matemáticas, inseridos em programas de computador para calcular, descrever e prever o comportamento de átomos, moléculas, macromoléculas etc. e, assim, estudar e prever os fenômenos da natureza. A abordagem mais comum utilizada em Química Computacional para tratamento desses sistemas é através do uso de modelos.

Modelos são representações simplificadas de sistemas e que procuram descrever o comportamento de sistemas e fenômenos físicos reais associados a eles. Ou seja, a construção e manipulação de modelos dos elementos de estudo, com o objetivo de compreender mais detalhadamente e, na medida do possível, fazer previsões sobre as propriedades dos mesmos [1].

Na Química Computacional, a modelagem molecular consiste em gerar, manipular e/ou representar as estruturas dos compostos moleculares ou iônicos e, através do uso de computadores, calcular as propriedades físico-químicas associadas ao sistema de interesse. O avanço da tecnologia computacional e o desenvolvimento de ferramentas e softwares complexos permitem a visualização, construção, análise e armazenamento de modelos de sistemas moleculares cada vez maiores. Isso possibilita o estudo de sistemas cada vez maiores e mais precisos, além de auxiliar na interpretação das relações entre estruturas e atividade biológica.

Um trabalho de modelagem molecular envolve, basicamente, três etapas:

- Selecionar um modelo que descreva com determinada precisão uma propriedade de interesse (por exemplo, interações intra e intermoleculares de um sistema);
- Realizar os cálculos;
- Analisar os resultados, obtendo conclusões a respeito do trabalho ou do modelo em si.

Neste sentido, para realizar um trabalho de Química Computacional é necessário conhecer mais profundamente os sistemas a serem estudados para a escolha adequada do modelo. No presente trabalho, foram realizadas simulações de peptídeo catiônico híbrido de pediocina A e plantaricina 149A (antimicrobianos) em contato com membranas fosfolipídicas de POPG (1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-rac-(1-glicerol)]) e POPC

(1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-Fosfatidilcolina). Esse peptídeo híbrido teve dados experimentais obtidos recentemente [2, 3] que serão abordados nas seções **1.1.2** e **1.1.3**.

Baseado nessas informações, as subseções a seguir descrevem o plano de fundo contextual e trazem uma abordagem dos sistemas estudados (peptídeos precursores, peptídeo híbrido e suas características experimentais, mecanismo de ação, membranas fosfolipídicas).

1.1. *Peptídeos Antimicrobianos*

Peptídeos e proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células vivas. São constituídos por uma sequência de aminoácidos e apresentam diversas funções biológicas. Em geral, faz-se a distinção entre esses dois grupos pela quantidade de aminoácidos: até 100 aminoácidos, são chamados peptídeos ou polipeptídeos. Acima desse número, são conhecidos por proteínas.

O conjunto de aminoácidos que constituem a base para a construção de todos os peptídeos e proteínas é formado por 20 unidades monoméricas relativamente simples (Figura 1.1.2). Esses blocos são os responsáveis por formar os diversos peptídeos e proteínas através de ligações covalentes resultantes de sua condensação e formação de água. Daí deriva o nome “resíduo de aminoácido” (perda de água e constituição da ligação entre o grupo amino de um aminoácido com o grupo ácido carboxílico do outro). A Figura 1.1.1 mostra essa reação de condensação envolvendo dois aminoácidos genéricos.

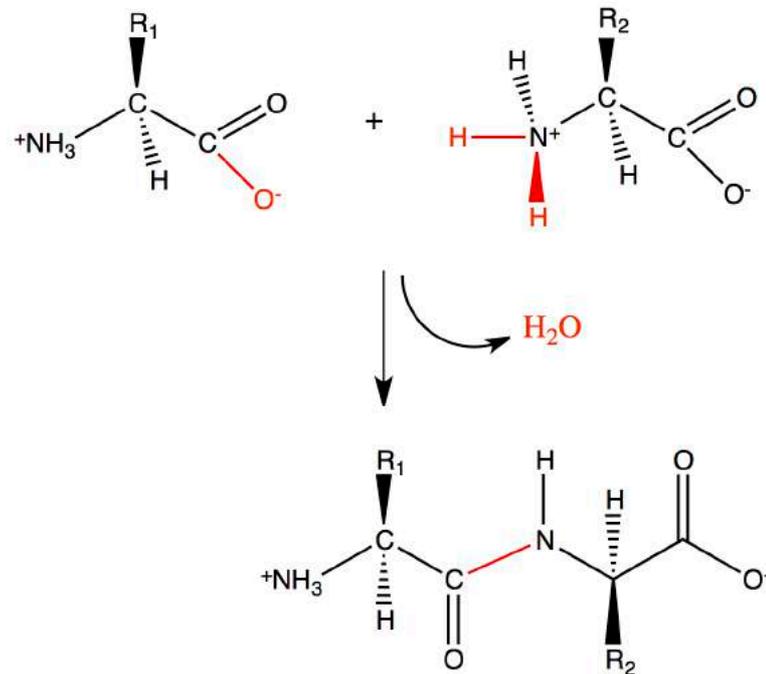


Figura 1.1.1 Reação de condensação entre dois aminoácidos para formar um dipeptídeo. A ligação peptídica é mostrada em vermelho. Baseada na Ref. [4]

Existem diversas formas de caracterizar os aminoácidos. As principais são através da sua afinidade ou não com a água (polaridade do grupo R) e através da carga que possuem, de acordo com o pH do meio (neutros, positivos ou negativos). Essas características dos aminoácidos permitem a construção de moléculas anfipáticas (ou anfifílicas – moléculas com uma região hidrofílica e outra parte hidrofóbica). A Figura 1.1.2 mostra os 20 aminoácidos essenciais e a classificação de acordo com esses critérios.

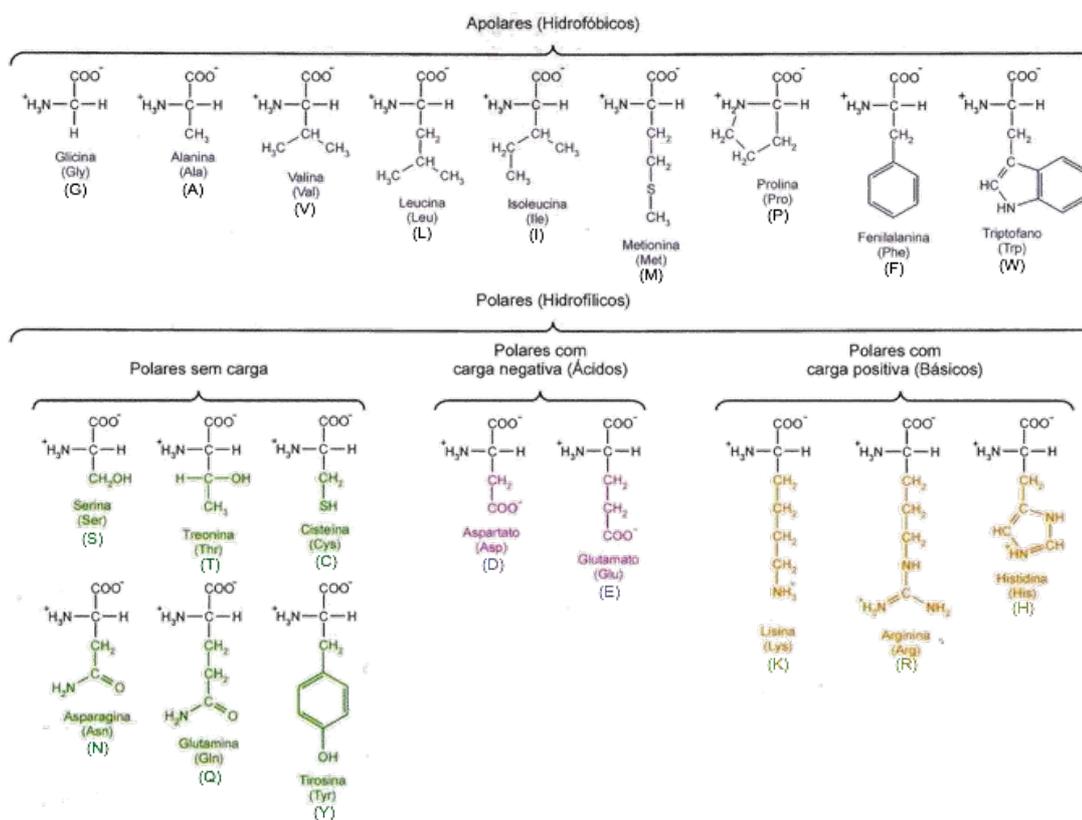


Figura 1.1.2 Os vinte aminoácidos essenciais que são constituintes primários de peptídeos e proteínas. Estão divididos em grupos de acordo com afinidade com a água e os subgrupos de acordo com a carga da cadeia. Em parênteses, estão o símbolo (3 letras) e a abreviação (1 letra). Figura adaptada da Ref. [5].

Além desses vinte aminoácidos, existem outros que são chamados de não-essenciais. Muitos deles são constituintes de algumas proteínas e processos biológicos [4]. Entretanto, por não fazerem parte do escopo deste trabalho, não serão aqui abordados.

Uma vez conhecida a sequência de ligações peptídicas, a cadeia principal do peptídeo revela alguns aspectos importantes. As ligações peptídicas, por exemplo, são rígidas e planas. Desta forma, seis átomos situam-se no mesmo plano nesse tipo de ligação: o carbono α com o grupamento CO do primeiro aminoácido e o grupamento NH com o carbono α do segundo aminoácido. Devido à sua natureza química com forte caráter de ligação dupla (comprimento C-N = 1,32 Å; simples = 1,49 Å, dupla = 1,27 Å), a ligação peptídica apresenta elevada barreira de rotação interna (E_a entre 64.6 e 99.2 kJ.mol⁻¹) [6]. Essa rotação interna restrita limita a conformação ao redor da ligação e explica sua estrutura no plano. Efeitos estéricos fazem com que a maioria das ligações em peptídeos e proteínas assumam conformação anti, com os dois carbonos α em lados opostos da ligação peptídica. Já as ligações entre a amina e o carbono α e da carbonila com esse carbono α têm caráter simples. Isso permite que os grupos ao redor dessas ligações possam rodar quase livremente, assumindo diversas

conformações possíveis. O ângulo em torno da ligação entre a amina (N) e o carbono α é conhecido por ângulo ϕ , enquanto o ângulo de rotação ao redor da ligação carbono α e carbonila é chamado de ângulo ψ . É através dos ângulos ϕ e ψ que a estrutura peptídica pode se enovelar e assumir diversas formas em sua estrutura secundária [7, 8].

A estrutura secundária de um peptídeo ou proteína é a representação tridimensional geral da sequência de aminoácidos, sem especificar exatamente a posição de cada átomo no espaço tridimensional (estrutura terciária).. Em geral, a classificação quanto ao tipo de estrutura secundária se dá através das ligações de hidrogênio que se formam no esqueleto do biopolímero. Ela também pode ser definida com base no padrão regular de ângulos diédricos do esqueleto em uma determinada região do diagrama de Ramachandran. Nesse diagrama todas as combinações possíveis de ângulos diédricos Ψ e Φ nos aminoácidos de um polipeptídeo, e que contribuem para a conformação das estruturas das proteínas. [9]. As estruturas mais comuns e também mais conhecidas são a hélice- α e folha- β . Outras hélices, como hélice- 3_{10} e hélice- π , também são energeticamente favoráveis, apesar de serem menos observadas. Existem ainda hélices mais raras como a poliprolina e folhas- α . Também são identificadas estruturas de folha beta-ponte, barril beta, voltas e curvaturas. A ausência de estrutura é classificada como vazio. Essas estruturas e o método de definição de estrutura secundária DSSP (do inglês *Dictionary of Protein Secondary Structure*) [10] serão discutidos mais detalhadamente no Capítulo 3, seção 3.2.2. Várias proteínas contêm mais de uma cadeia polipeptídica, apresentando um quarto nível de organização estrutural. Cada cadeia nessas proteínas corresponde a uma subunidade e o arranjo espacial dessas subunidades, aliada à natureza de suas interações, formam a estrutura quaternária [7].

Os peptídeos contêm apenas um grupo amino livre (região N-terminal) e um grupo carboxila livre (região C-terminal), um em cada extremidade da cadeia. A ionização desses grupos ocorre da mesma forma que nos aminoácidos livres, apesar de possuírem valores de ionização diferentes. Devido a esse comportamento, essas regiões se destacam por serem sítios de reação ou de ancoragem para os peptídeos.

Através de seu comportamento químico e estrutura, os peptídeos e proteínas assumem diversas funções biológicas, desde uso como adoçante artificial (éster metílico de L-aspartil-L-fenilalanina ou aspartame) até aplicações medicinais, como a bradicina (mediador de inflamação) [7, 8]. Neste trabalho, o principal objeto de estudo é um peptídeo híbrido de pediocina A e plantaricina 149a que possui função antimicrobiana [3]. Logo, é importante entender em detalhes esses tipos de peptídeos para formulação e desenvolvimento do trabalho.

Os peptídeos antimicrobianos (AMP, do inglês *antimicrobial peptides*), também conhecidos como peptídeos de defesa, são parte inerente dos sistemas imunológicos encontrados em diversos seres vivos. Em geral, esses peptídeos são pequenos (entre 12 a 100 aminoácidos, massa molecular < 10 kDa), possuem carga positiva (catiônicos) e podem ser produzidos ou isolados a partir de micro-organismos unicelulares, insetos, invertebrados, plantas, aves, peixes, mamíferos, inclusive humanos [11, 12] ou sintetizados no laboratório [13].

A diversidade de peptídeos antimicrobianos descobertos até hoje é muito grande, [14]. No APD (do inglês *Antimicrobial Peptides Database* - <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), existem mais de 2300 peptídeos registrados com atividades antimicrobianas [11, 15]. Eles podem ser classificados de acordo com seu tamanho, sua estrutura conformacional e a predominância de determinado aminoácido em sua composição [12, 16]:

- Peptídeos α -helicoidais;
- Peptídeos ricos em cisteína;
- Peptídeos folha- β ;
- Peptídeos ricos em aminoácidos regulares;
- Peptídeos ricos em aminoácidos raros e modificados.

Entretanto, muitas vezes eles são divididos de acordo com o tipo específico de atividade que apresentam: antivirais, fungicida, bactericida, parasiticida e antitumoral.

Os peptídeos bactericidas têm despertado maior interesse pelo seu crescente uso como alternativa ou em associação aos antibióticos convencionais [16, 17]. Esse crescimento no uso de peptídeos antimicrobianos como antibióticos é devido à menor resistência que os micróbios apresentam a esses peptídeos. Ao contrário dos antibióticos normais, como a penicilina, que são facilmente inativados por diversas bactérias, o desenvolvimento de resistência contra peptídeos antimicrobianos é improvável. Por exemplo, pesquisa recente [18] apresentou relatório sobre uso clínico de pexiganan, um peptídeo antimicrobiano análogo da magainina [19], e os resultados indicaram que as espécies bacterianas apresentaram alta susceptibilidade ao uso do peptídeo. Foram feitas também tentativas de induzir resistência ao pexiganan em mutagênicos de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, porém não deram resultado. Igualmente não foram encontradas evidências de resistência cruzada entre o pexiganan e qualquer outro antibiótico clínico.

Dentre os peptídeos bactericidas, o mais estudado é a nisina. Ele é produzido por uma bactéria (*Lactococcus lactis*) e é bastante utilizado como conservante de alimentos há vários anos. Além disso, a nisina é um antibiótico extremamente potente, apresentando grande atividade contra bactérias do tipo Gram-positivas (grande quantidade de peptidoglicano na sua parede celular) mesmo em concentrações muito baixas (nano-molar) [13]. Outro destaque é a mersacidina, um peptídeo tetracíclico que apresenta atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus* a níveis comparados ao da vancomicina, o antibiótico de último recurso (grande espectro de atuação). Essa bactéria não desenvolve resistência à mersacidina [20]. As bactérias Gram-negativas possuem uma membrana exterior constituída por lipopolissacarídeos (LPS), que é estabilizada por íons cálcio e magnésio ligados aos grupos negativos dos açúcares fosforilados. Os peptídeos catiônicos, então, deslocam os íons metálicos, desestabilizando a membrana exterior, o que facilita a entrada de novas moléculas vindas do meio exterior [21]. Evidências sugerem que os peptídeos de defesa, usualmente básicos, reconhecem os fosfolipídios ácidos da superfície membranosa das bactérias [22]. No caso das bactérias, os lipídios aniônicos estão presentes na parte externa da superfície, ao contrário do que ocorre nas células de mamíferos em que aparecem no lado citoplasmático [16]. Conhecer o mecanismo pelo qual esses peptídeos interagem e perturbam a membrana é importante para auxiliar na compreensão desse fenômeno e permitir o desenvolvimento de técnicas ou melhoramentos nesses peptídeos, potencializando seus efeitos bactericidas e diminuindo os possíveis efeitos colaterais. A seção a seguir desenvolve a temática dos possíveis mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos em membranas de parede celular.

1.1.1 Mecanismos de Ação de Peptídeos Antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos provocam o rompimento seletivo das membranas celulares. O arranjo estrutural anfipático dos peptídeos tem um papel significativo no mecanismo de ação. Os grupos carregados da cabeça dos fosfolipídios e a distribuição de carga contribuem fortemente, através de interações eletrostáticas, para a aproximação e as interações peptídeo-membrana [23, 24]. Entretanto, existem diversos modelos propostos para os modos de ação dos diversos tipos de peptídeos bactericidas e isso vai depender da estrutura de cada peptídeo. Essa gama de alternativas emerge devido ao potencial de interação diverso que o peptídeo tem, dada sua natureza catiônica e anfifílica [25]. Essencialmente, os

mecanismos pelos quais os peptídeos catiônicos provocam a destruição da membrana podem ser classificados como: modelo barril (*barrel-stave*), modelo agregado (*aggregate*), modelo carpete (*carpet-like*) e poro toroidal (*toroidal pore*). Cada um desses mecanismos pode levar a um desses eventos: formação de um canal transiente na membrana, micelização ou dissolução da membrana, ou translocação através da membrana [13].

No modelo **barril**, também chamado de pacote helicoidal (*helical bundle*), os peptídeos se orientam perpendicularmente à membrana, formando um barril abrangendo os lipídios (Figura 1.1.3 (B)). Nessa orientação, as cadeias laterais hidrofóbicas do peptídeo ficam na direção da região hidrofóbica dos lipídios. Já as cadeias laterais polares ficam voltadas para dentro da membrana, criando um poro hidrofílico que compreende a largura da membrana. É através desse poro em formato de barril que pode ocorrer o vazamento do conteúdo celular. Entretanto, esse modelo não explica em quais situações a formação do poro pode ocorrer, uma vez que o tamanho, duração e/ou seletividade catiônica não são específicas [25, 26].

O modelo **poro toroidal**, ou modelo buraco de minhoca (*wormhole model*), propõe que os peptídeos se liguem à membrana e provoquem um enovelamento dos lipídios, formando um canal alinhado às cabeças lipídicas. Nesse modelo, os peptídeos se associam na interface membranosa, criando um caminho contínuo entre a parte interna e a parte externa (Figura 1.1.3 (C)). Os peptídeos permanecem interagindo com as cabeças polares durante todo o processo (no modelo barril, essa ligação acontece apenas no início do processo, depois os peptídeos interagem com as cadeias alifáticas) [27, 28].

No modelo **carpete** (também conhecido como mecanismo detergente – do inglês, *detergent-like*), ao contrário dos modelos anteriores, os peptídeos catiônicos não penetram na membrana, mas permanecem associados (em paralelo) à parte externa da membrana. Em um dado momento crítico, os peptídeos formam uma massa (lembrando um carpete) que induz o enfraquecimento da bicamada através da perturbação e destruição da membrana. Esse carpete, então, provoca o rompimento da membrana levando à formação de micelas, como pode ser visualizado na Figura 1.1.3 (E). O conteúdo celular escapa através do buraco causado na membrana e a célula morre. Em geral, acredita-se que, para que o mecanismo ocorra dessa maneira, é necessária uma concentração crítica de peptídeo para causar o colapso da membrana. [13, 25, 29, 30].

O modelo **agregado** possui algumas similaridades com o modelo carpete na medida em que os peptídeos se posicionam em paralelo à superfície. Todavia, após se ligarem à

superfície da membrana em concentração suficiente, os peptídeos se reorientam, permitindo a formação de complexos com os lipídios (Figura 1.1.3 (D)). Esses complexos peptídeo-lipídios, que abrangem toda largura da bicamada, juntamente com a água formam um canal para a saída de íons da célula. A morte celular pode ser causada pelo vazamento do conteúdo do citoplasma ou pela entrada de peptídeos catiônicos [26, 31].

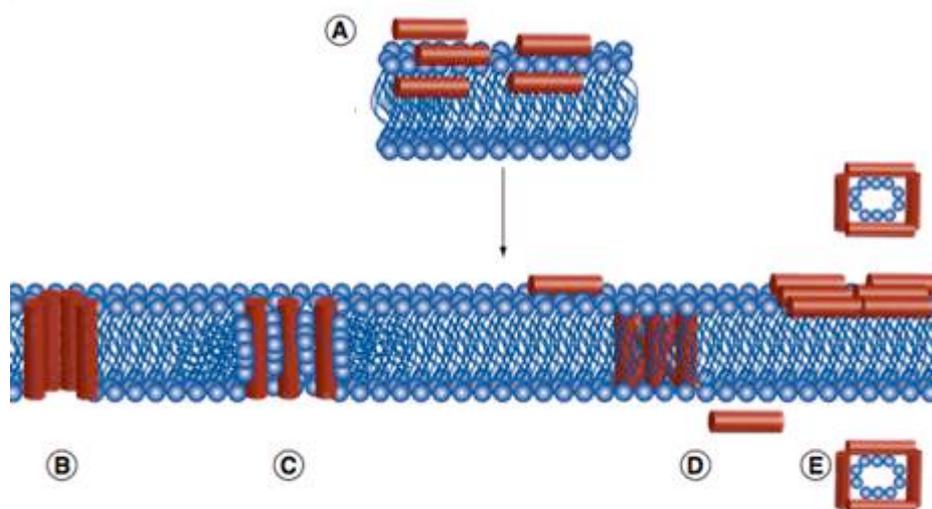


Figura 1.1.3 Esquema com os possíveis mecanismos de ação dos peptídeos catiônicos antimicrobianos em bactérias Gram-negativas. Após iniciar a interação com a membrana (A) os peptídeos podem atravessá-la de acordo com o modelo barril (B), poro toroidal (C), agregado (D) ou tapete (E). Figura adaptada da Ref. [25].

Uma vez conhecidos os possíveis mecanismos pelos quais os peptídeos antimicrobianos podem atuar, é importante conhecer mais detalhes sobre os peptídeos precursores e o peptídeo catiônico híbrido, para que se realize a correta modelagem para os estudos e previsão de possível mecanismo de ação desse novo peptídeo.

1.1.2 *Pediocina A (PA-I)*

A pediocina A ou pediocina AcH é um peptídeo catiônico (carga = +3 em pH 7,0) formado por sequência de 44 aminoácidos e massa molecular $4628,2 \text{ g mol}^{-1}$: $\text{NH}_2\text{-Lys-Tyr-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Thr-Cys-Gly-Lys-His-ser-Cys-Ser-Val-Asp-Trp-Gly-Lys-Ala-Thr-Thr-Cys-Ile-Ile-Asn-Asn-Gly-Ala-Met-Ala-Trp-Ala-Thr-Gly-Gly-His-Gln-Gly-Asn-His-Lys-Cys-COOH}$ (Figura 1.1.4). [32]

Esse peptídeo é produzido por *Pediococcus acidilactici* e pertence à classe IIa das bacteriocinas, que constitui o maior grupo das bactérias produtoras de ácido lático (LAB, do

inglês *lactic acid bacteria*) [33]. Além disso, é bastante utilizado como conservante não-tóxico para melhorar a qualidade e a segurança de derivados laticínios e de carne, pois apresenta grande atividade bactericida contra o patógeno psicotrópico *Listeria monocytogenes* [34–36]. A concentração mínima de inibição (MIC, do inglês *Minimal inhibitory concentration*) de cepas desse patógeno é 25 nM aproximadamente. MIC é definida como a menor concentração de um antimicrobiano que inibe o crescimento visível de um micro-organismo após uma incubação noturna. Além disso, o peptídeo não apresenta atividade hemolítica (HC_{50} – do inglês, *Hemolytic concentration*), ou seja, não provoca o rompimento de hemácias [37].

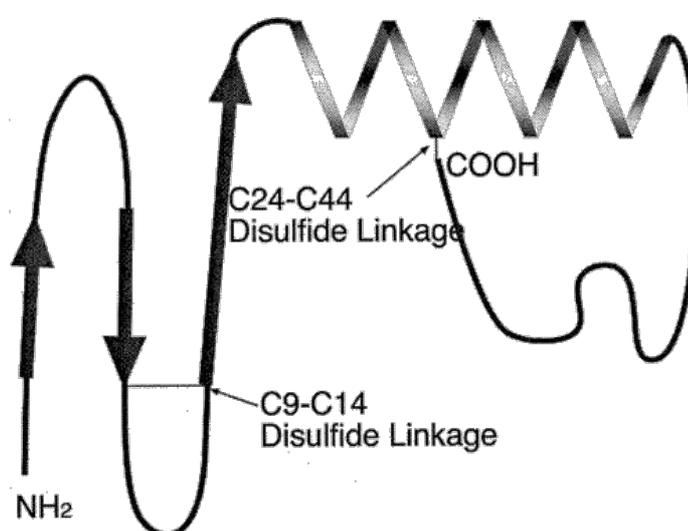


Figura 1.1.4 Estrutura secundária proposta para a pediocina AcH (KYYGNGVTCGKHSCSVDWGKATTTCIINNGAMAWATGGHQGNHKC). Estrutura em folha- β é atribuída à região N-terminal, enquanto a região C-terminal (resíduos 19-32) se apresenta em hélice. Figura retirada da Ref. [38].

Em termos de estrutura, os integrantes dessa classe apresentam (ao menos) uma ligação de dissulfeto, a sequência N-terminal YGNGV altamente conservada e um domínio C-terminal moderadamente hidrofóbico [39, 40]. Através de dicroísmo circular (CD, do inglês *Circular Dichroism*) [38] e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier transform infrared*) [32], é observado que o peptídeo apresenta estrutura desordenada em ambiente aquoso. Entretanto, no processo de adsorção a vesículas, um rearranjo estrutural, pode ser observado via CD [38]: os peptídeos formam domínios e assumem a forma da Figura 1.1.4. Essa diferença estrutural ocorre de acordo com a natureza do fosfolipídio constituinte da membrana (estruturada na presença de DMPG, desordenada na presença de DMPC) [41].

Diversos estudos, como os citados acima, foram realizados na tentativa de indicar o mecanismo de ação da pediocina nas membranas celulares. Um dos mecanismos propostos envolve a inserção da porção C-terminal do peptídeo, após uma ancoragem inicial feita pela região N-terminal na membrana através de interações eletrostáticas. Essa inserção induz a formação de um poro e a consequente morte celular [42]. Entretanto, o potencial de interação da estrutura da pediocina e a capacidade da região C-terminal em participar do reconhecimento, e em assegurar a especificidade da parede celular da bactéria [43], sugerem outro mecanismo. Em seu trabalho, Gaussier e colaboradores [41] observam que o aumento da temperatura de transição de fase, o deslocamento da vibração da ligação C=O do éster do lipídio DMPG e o comportamento da pediocina indicam que o mecanismo não ocorre via formação de poro. Esses resultados sugerem que o mecanismo envolve a desestabilização da membrana, seguida de ruptura, levando à morte celular. Diversos casos similares acontecem com outros peptídeos antimicrobianos como a nisina [44, 45], dermaseptina [29, 46], melitina [28, 47, 48] e magainina [49, 50], por exemplo. É sugerido, então, que a permeação dos peptídeos ocorra via mecanismo *carpete* (*carpet-like*) [46, 51].

1.1.3 Plantaricina 149a (pln 149a)

A plantaricina 149a é um peptídeo catiônico (carga = +7) sintético bactericida análogo da plantaricina 149, produzida pelo *Lactobacillus plantarum* NRIC 149 (isolado do abacaxi). Trata-se de um peptídeo formado por sequência de 22 aminoácidos: NH₂-Tyr-Ser-Leu-Gln-Met-Gly-Ala-Thr-Ala-Ile-Lys-Gln-Val-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Lys-Gly-Gly-COOH [52, 53]. A massa molecular para essa sequência é 2423,96 g·mol⁻¹ [54].

O peptídeo sintético apresenta efeito inibitório contra duas espécies de bactérias que são agressivas ao ser humano: *Listeria monocytogenes* (meningite) e *Staphylococcus aureus* (pneumonia, gastroenterite estafilocócica, entre outras). Em recente trabalho [54], a plantaricina 149a mostrou-se capaz de inibir todas as cepas dessas bactérias em pH 5,5 e 7,4 (fisiológico). As concentrações mínimas de inibição encontradas foram consideradas altas: 264 μM e 528 μM para *L. monocytogenes* e *S. aureus*, respectivamente. A possível explicação é que foi utilizado um meio (caldo) de cultura de Mueller-Hinton (30% de infusão de carne, 1,75% de caseína hidrolisada, 0,15% de amido e 1,7% de ágar, em pH 7 e 25 °C [55]) e que os peptídeos tenham interagido fortemente com componentes desse meio, causando diminuição de suas atividades. Entretanto, a atividade hemolítica (menor concentração de peptídeos

antimicrobianos que provoca 50% de hemólise) da pln 149a foi considerada baixa ($HC_{50} = 16\%$) para todas as concentrações utilizadas (10 – 165 μM). Ou seja, a plantaricina 149a apresenta seletividade contra membranas de bactérias.

A estrutura secundária foi proposta com base em análises de dicroísmo circular do peptídeo e da vizinhança da tirosina com espectros de fluorescência [54]. Os dados de CD mostraram grande percentual de estrutura desordenada para o peptídeo em água (pH 7,4 e 5,5). Na presença de TFE (2,2,2-Trifloroetanol) ou de micelas reversas de AOT (bis-(2-etilhexil)-sulfosuccinato de sódio), o peptídeo apresenta estrutura secundária enovelada, com aumento dos elementos helicoidais. A Figura 1.1.5 mostra o modelo molecular obtido por Müller e colaboradores [54] usando o programa SP³ [56] para a plantaricina 149a. Esse programa é baseado em um método de reconhecimento de enovelamento que incorpora informação estrutural obtida através de geração sequencial dos fragmentos da proteína.

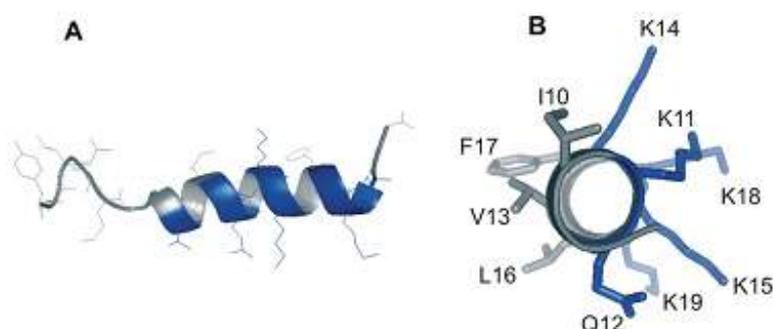


Figura 1.1.5 Estrutura secundária proposta para a plantaricina 149a (YSLQMGATAIKQVKKLFKKGG). (A) Vista lateral do peptídeo completo; (B) Visão frontal dos resíduos 10-19 (IKQVKKLFKK) correspondente a um trecho da região anfipática helicoidal. Resíduos polares carregados da hélice são mostrados em azul. Retirada da Ref. [54]

A estrutura geral apresenta como característica uma região helicoidal que compreende os aminoácidos 7 a 20 (ATAIKQVKKLFKK), contendo resíduos que conferem um caráter anfipático ao peptídeo. Outro aspecto interessante é o posicionamento das lisinas (aminoácidos polares) de um lado da hélice, enquanto os resíduos não-polares (isoleucina, valina, leucina e fenilalanina) se posicionam do outro lado [54]. Esses dados estruturais somados à característica do peptídeo, isto é, a mudança estrutural de grande desordenamento para resíduos em hélice e o caráter catiônico são compatíveis com peptídeos de ação via mecanismo carpete [57]. Outro destaque é que esse comportamento e mecanismo são também observados para plantaricina A [58].

Uma vez conhecidas as principais características dos peptídeos precursores, a próxima seção trata do peptídeo híbrido que foi modelado e utilizado no conjunto de simulações deste trabalho.

1.1.4 O Peptídeo Híbrido e os Dados Experimentais

A busca por novos produtos para serem utilizados como antibióticos e conservantes de alimentos é a força motriz para o estudo e desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos. O principal objetivo de construir peptídeo híbrido é obter um peptídeo com sequência de aminoácidos menor, porém com maior atividade bactericida que seus formadores. A construção de peptídeos com cadeias menores é muito importante, pois a síntese de novos peptídeos não é simples e apresenta custo elevado. Neste trabalho, modelou-se o peptídeo híbrido de pediocina A e plantaricina 149a com base nos dados experimentais obtidos em colaboração com laboratório da professora Dra. Rosângela Itri, do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (USP), Brasil [2, 3].

Como abordado anteriormente, o peptídeo foi construído a partir de regiões de outros dois peptídeos: a região N-terminal da pediocina A (aminoácidos 1 a 18) e a região C-terminal da plantaricina 149a (resíduos 6 a 22). A ideia consistiu em obter um peptídeo com a capacidade de ancoragem da plantaricina (via região C-terminal) e com a maior ação seletiva contra bactérias da pediocina. As sequências dos peptídeos precursores e do peptídeo híbrido são mostradas a seguir (em **vermelho**, resíduos da pediocina; e em **azul**, resíduos da plantaricina).

KYYGNGVTCGKHSCSVDWGKATTCIINNGAMAWATGGHQGNHKC

Pediocina A (44 aminoácidos)

YSLQMGATAIKQVKKLFKKKGG

Plantaricina 149 (22 aminoácidos)

KYYGNGVTCGKHSCSVDW**ATAIKQVKKLFKKKGG**

Peptídeo híbrido (35 aminoácidos)

Com um total de 35 resíduos, o peptídeo híbrido apresenta massa molecular de 3587,5 g mol⁻¹. Apresenta atividade contra tipos de bactérias como *Listeria monocytogenes* e *Listeria seeligeri*. A MIC desse peptídeo para *L. monocytogenes* foi realizada da mesma forma que a

técnica empregada para a plantaricina 149a (seção 1.1.3) e o valor obtido foi 338 μM . O valor foi considerado alto e ocorre por causa das interações dos peptídeos com o meio de cultura, assim como observado para a MIC da plantaricina 149a [54]. A atividade hemolítica, por outro lado, foi zero nas concentrações de 25 e 80 μM , em um indicativo de que o peptídeo apresenta seletividade frente a membranas de bactérias [3].

Com objetivo de levantar informações sobre a estrutura secundária, realizaram-se análises de dicroísmo circular do peptídeo interagindo com vesículas puras e misturas de DPPC (1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-Fosfatidilcolina) e DPPG (1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-rac-(1-glicerol)]). O dicroísmo é o fenômeno onde a absorção da luz circularmente polarizada por um centro quiral é distinta para diferentes direções de polarização. Uma luz plana polarizada pode ser vista como a união de duas componentes circularmente polarizadas, de magnitudes iguais e que giram em sentidos opostos: uma no sentido anti-horário (*left handed, L*) e outra no sentido horário (*right handed, R*). Equipamentos de CD medem a diferença na absorção (*A*) entre as duas componentes R e L [59–61]. Os lipídios apresentam cabeça polar zwitteriônica (PC) e negativa (PG). A razão de utilizar lipídios com cabeças polares diferentes está na composição das células: membranas de bactérias apresentam lipídios PG em sua parede celular, enquanto membranas de eritrócitos de mamíferos apresentam lipídios PC e colesterol [62, 63]. Nos experimentos, foi utilizada uma concentração de lipídio de 2 mM e a concentração de peptídeo 50 μM , um valor considerado baixo, com o objetivo de evitar a possível destruição das membranas. Logo, em todas as análises a relação peptídeo:lipídio foi de 0,025 [2, 3]. Os dados obtidos mostram que a estrutura do peptídeo é sensível à composição da membrana que está interagindo. Na solução tampão e ao interagir com vesículas ricas em DPPC, os dados de CD indicam configuração estendida para o peptídeo com estrutura secundária randômica. O aumento gradativo do percentual de lipídios com cabeças polares PG faz com que o peptídeo adote configurações menos flexíveis e com maior conteúdo em hélice. Na membrana pura de DPPG, o CD apresenta banda positiva em torno de 195 nm e duas bandas negativas em 209 e 223 nm (Figura 1.1.6), características de grande quantidade de conteúdo helicoidal no peptídeo [3]. Isso sugere que esse peptídeo híbrido apresenta maior conteúdo em hélice quando interage com membranas carregadas negativamente.

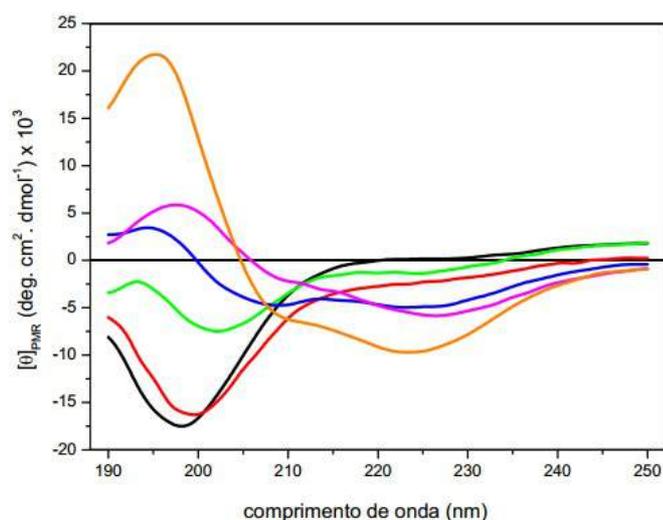


Figura 1.1.6 Espectro CD para interação entre peptídeo híbrido e diferentes membranas lipídicas. Relações lipídicas DPPC:DPPG em mol%: peptídeo em solução tampão (preto); 100:0 (vermelho); 75:25 (verde); 50:50 (azul); 25:75 (rosa); 0:100 (laranja). Figura obtida da Ref. [3].

Utilizando a análise de emissão de fluorescência do triptofano do peptídeo [3], inferiu-se sobre a vizinhança do mesmo. Isso é possível, pois ao ser excitado no comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$), o triptofano emite um sinal característico com máximo de emissão em $\lambda_{\text{em}} = 353 \text{ nm}$ quando em água em pH neutro. Ao mudar do meio aquoso (polaridade alta) para um dielétrico menos polar, o comprimento de onda de emissão diminui, num efeito conhecido por deslocamento para o azul (*blue shift*) [64]. Essa análise mostrou que ao se aproximar das membranas lipídicas das Vesículas Unilamelares Grandes (LUV, do inglês *large unilamellar vesicle* – diâmetro entre 100 e 500 nm), o máximo de emissão se desloca na direção do azul. Esse deslocamento é maior quando a vesícula é composta por lipídios com cabeças negativamente carregadas (PG), mostrando que o triptofano deixa de interagir com a camada de água (polaridade mais alta) e passa a interagir de forma mais intensa com a membrana (menor polaridade). As vesículas grandes foram construídas usando lipídios *egg-PC* e *egg-PG*, ou seja, constituídos por uma mistura de lipídios, que possuem a mesma cabeça polar, mas diferentes cadeias acilas. Novamente, foi utilizada uma concentração baixa de peptídeos para evitar o rompimento das vesículas. A Tabela 1.1.1 mostra os valores para esses deslocamentos e a Figura 1.1.7 mostra a variação da intensidade de fluorescência do triptofano do peptídeo ao interagir com as LUVs de diferentes composições lipídicas.

Tabela 1.1.1: Valores (em nm) obtidos para comprimentos de onda de emissão inicial (λ_{inicial}), final (λ_{final}) e deslocamento para o azul (*blue shift*) do pico de fluorescência do triptofano do peptídeo híbrido para as diferentes composições das membranas lipídicas.^{a)}

Composição das Vesículas (<i>egg-PC:egg-PG</i>)	λ_{inicial}	λ_{final}	<i>Blue shift</i>
100:0	348,0	342,0	6,0
75:25	348,0	335,0	12,0
50:50	348,0	333,0	15,0
25:75	348,0	330,0	18,0
0:100	348,0	328,0	20,0

^{a)} Valores obtidos da Ref. [3].

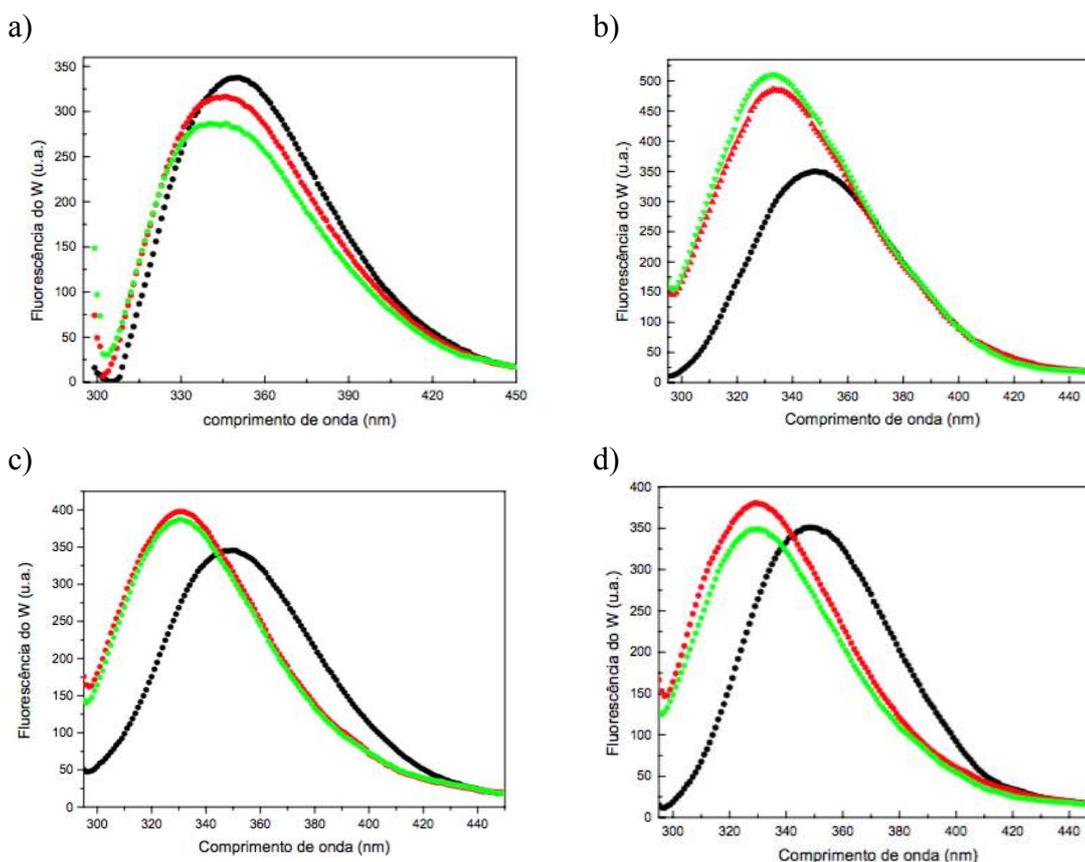


Figura 1.1.7 Espectros de emissão de fluorescência do triptofano presente no peptídeo híbrido na presença de membranas compostas pelos seguintes mol% de *egg-PC:egg-PG*: a) 100:0; b) 75:25; c) 25:75; d) 0:100. A curva em preto corresponde ao peptídeo livre em solução. As demais curvas foram obtidas após inserção de 30 μM (vermelho) e 60 μM (verde) de vesículas na solução. Espectros retirados da Ref. [3].

O aumento do sinal (Figura 1.1.7) indica que o triptofano apresenta menor mobilidade, especialmente no caso da membrana com lipídios PG. Quando possui maior grau de liberdade, parte da energia de excitação recebida pode ser utilizada como energia cinética na movimentação do aminoácido. Isso faz com que emita fótons com menor energia ao decair para o estado fundamental. Todavia, quando está “preso” na membrana, apresenta menor mobilidade, ou seja, não perde tanta energia através de movimentos. Isso se reflete, portanto, num aumento da intensidade de fluorescência devido à emissão de fótons com maior energia.

Com base nos espectros de emissão de fluorescência e nas informações obtidas pela espectroscopia CD, foi sugerido que o peptídeo híbrido tenha configuração helicoidal entre os aminoácidos 16 e 32 e que essa região seja a responsável tanto pela penetração na membrana quanto pelo início do mecanismo de ação desse peptídeo. Estudo de cinética de vazamento de carboxifluoresceína em função do tempo foi realizado para investigar a ação do peptídeo híbrido nas vesículas grandes [3]. Os resultados reforçaram a ideia de que o peptídeo apresenta seletividade, preferindo interagir com as membranas com cabeças lipídicas carregadas e que essa carga é importante para o mecanismo de ação do rompimento da membrana: a variação inicial da interação entre peptídeo e as membranas com lipídios PC foi cerca de cem vezes menor que a variação inicial de interação do peptídeo com membranas com carga negativa.

Realizou-se também a análise de cinética de vazamento de carboxifluoresceína (vazamento espontâneo *versus* ação dos peptídeos) em função do tempo para as diferentes membranas compostas por *egg*-PC e *egg*-PG. A Figura 1.1.8 apresenta as curvas de cinética de vazamento obtidas.

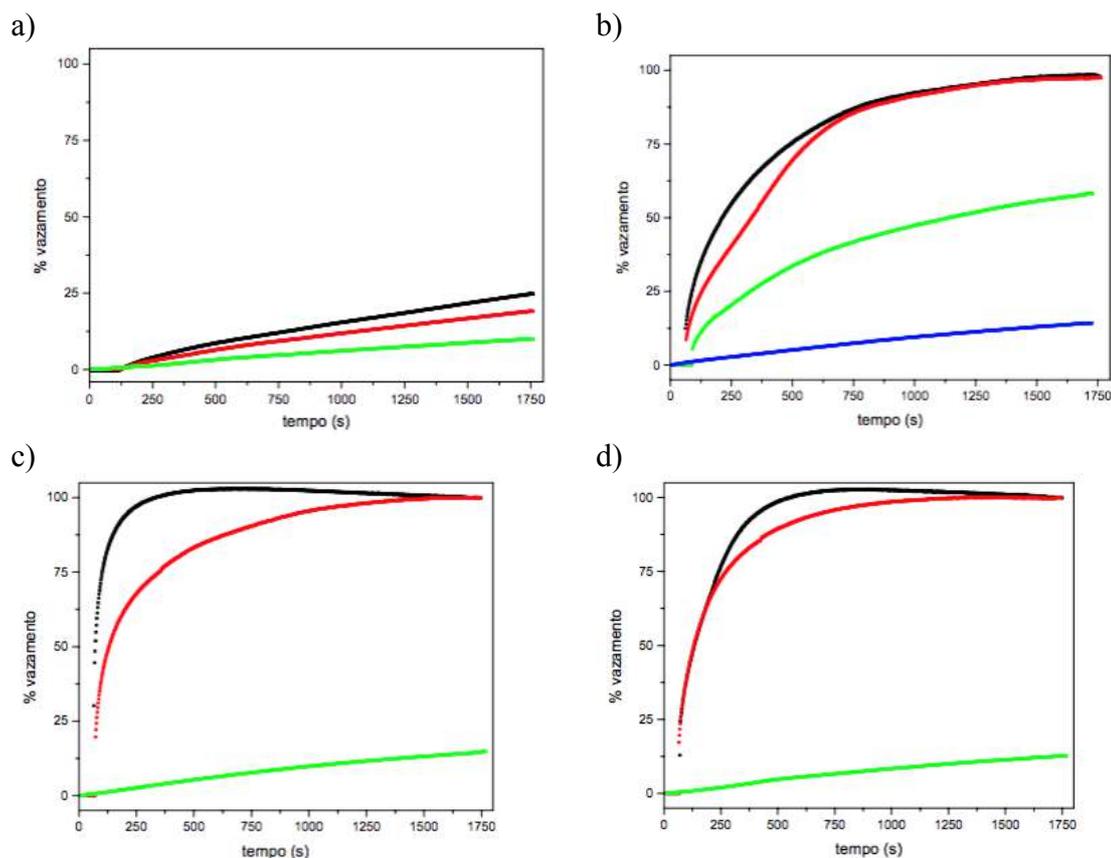


Figura 1.1.8 Cinética de vazamento da carboxifluoresceína para o peptídeo híbrido e membranas compostas pelos seguintes mol% de *egg*-PC:*egg*-PG: a) 100:0; b) 75:25; c) 25:75; d) 0:100. Em verde, a curva corresponde ao lipossomo controle utilizado (exceto na letra ‘b’, onde o lipossomo controle está em azul). As demais curvas foram obtidas usando soluções de peptídeo de 0,060 μ M (vermelho) e 0,125 μ M (preto). Curvas obtidas da Ref. [3].

O percentual de vazamento de carboxifluoresceína (utilizado para demonstrar a ação lítica do peptídeo induzindo a formação de poros nas membranas, independentemente de sua composição) para membranas contendo *egg*-PG foi próximo a 100%. Não foi possível calcular o total para as membranas zwitteriônicas, pois o tempo de vazamento para vazamento da metade foi superior a 1750 s (tempo adotado na experiência). Esses resultados indicam a preferência do peptídeo por interações com membranas compostas por lipídios negativamente carregados. Foram também realizadas medidas de microscopia ótica para visualizar o efeito da ação do peptídeo híbrido em Vesículas Unilamelares Gigantes (GUV, do inglês *giant unilamellar vesicle* – diâmetro entre 10 e 100 μ m), compostas por lipídios POPC e POPG em diferentes proporções. A Figura 1.1.9 mostra as fórmulas estruturais (com definição dos números dos átomos e ângulos torcionais) desses lipídios que foram adotados como modelos, segundo o modelo de Kukol [65], para construção das membranas deste trabalho. A Tabela

1.1.2 lista as definições de tipos de átomos (segundo o padrão adotado no GROMOS 53A6 [66]) e suas respectivas cargas para a cabeça do fosfolípido POPG.

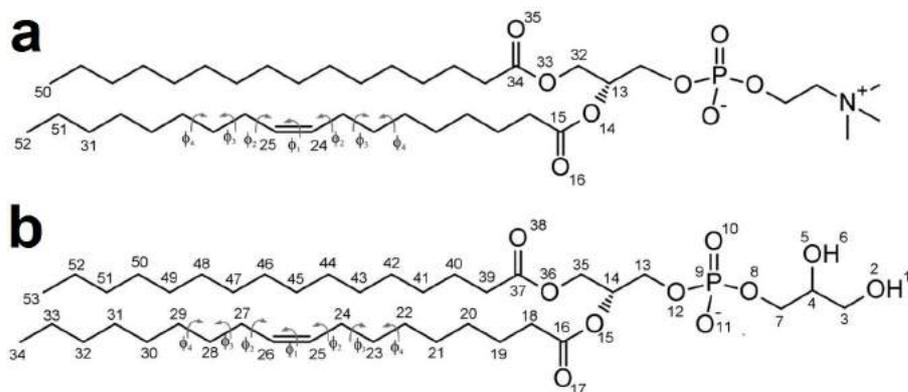


Figura 1.1.9 Fórmulas estruturais com a definição de Kukol [65] dos números dos átomos e ângulos torcionais para os modelos lipídicos: a) POPC; b) POPG.

Tabela 1.1.2: Tipo de átomos e carga para os átomos da cabeça do fosfolípido POPG do modelo de Kukol. Adaptada da Ref. [65].

Número do átomo ^{a)}	Tipo do átomo ^{a)}	Carga
1	H	0,4170
2	OA	-0,5740
3	CH2	0,1570
4	CH1	0,1570
5	OA	-0,5740
6	H	0,4170
7	CH2	0,4000
8	OE	-0,8000
9	P	1,7000
10	OM	-0,8000
11	OM	-0,8000
12	OE	-0,7000
13	CH2	0,4000
14	CH1	0,3000
15	OE	-0,7000
16	CH0	0,7000
17	O	-0,7000

^{a)} Definição dos números e tipos de átomo obtidas do campo de força GROMOS 53A6 [66].

Para o lipídio POPC, as definições utilizadas para tipo e carga dos átomos foram as do campo de força GROMOS 53A6 com as atualizações que serão apresentadas no **Capítulo 2**.

O objetivo de utilizar a microscopia ótica de contraste consistiu em tentar observar a atuação do peptídeo no rompimento das membranas dessas vesículas, possibilitando inferir sobre o possível mecanismo de ação de forma qualitativa. As Figuras 1.1.10 e 1.1.11 apresentam fotos de dois dos casos de inserção de solução de peptídeos em GUVs analisados no trabalho [3].

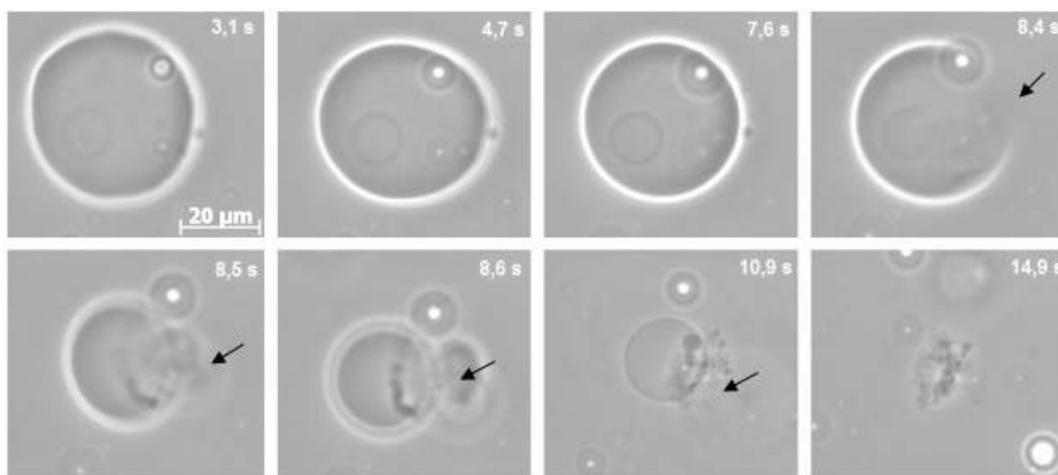


Figura 1.1.10 GUV composta apenas por lipídios POPC sob efeito de 1 mM de solução de peptídeo híbrido. Todas as figuras possuem a mesma escala. Figura retirada da Ref. [3].

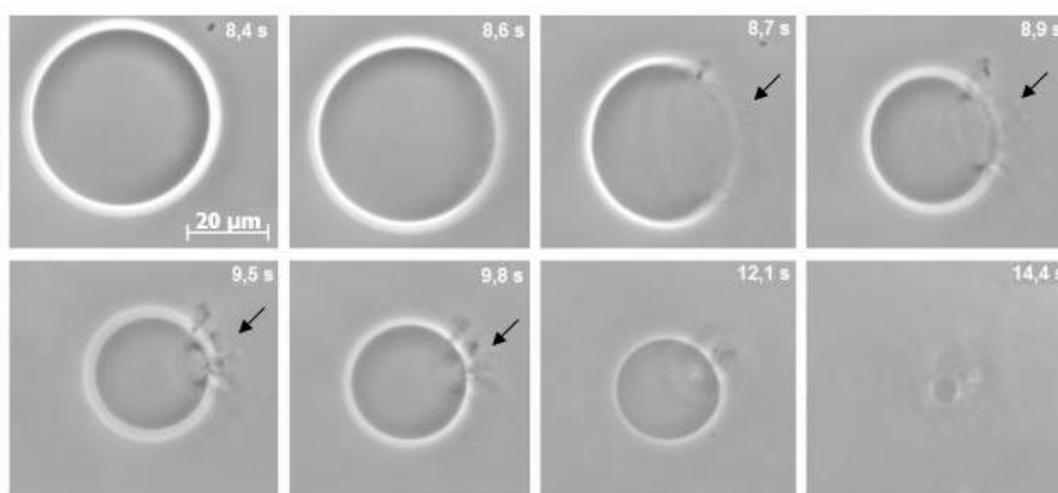


Figura 1.1.11 GUV composta por lipídios 50%mol de POPG e 50%mol de POPC sob efeito de 1 mM de solução de peptídeo híbrido. Todas as figuras possuem a mesma escala. Figura retirada da Ref. [3].

Tanto para o caso com apenas lipídios POPC, quanto para o caso que apresenta percentual de lipídios POPG, o rompimento da membrana ocorre de maneira muito rápida. Nos dois casos, há a formação de uma grande abertura na membrana em aproximadamente 8s após a exposição ao peptídeo híbrido. Os pontos escuros restantes após a explosão da GUV são associados à formação de complexos peptídeo-lipídio que permanecem ligados ainda à vesícula. Em ambos os casos, a vesícula é completamente destruída e solubilizada ao final. De modo geral, acredita-se que os peptídeos interajam com a monocamada externa da GUV até que o número de peptídeos adsorvidos seja suficiente para causar a perturbação da membrana [3]. Entretanto, a partir dos dados experimentais levantados, não fica evidente qual tipo de mecanismo de ação os peptídeos realizam ao provocar o rompimento da membrana

fosfolipídica. Novas informações são necessárias para sugestão de um possível mecanismo de ação e a química computacional pode ser uma ferramenta para obtenção dessas informações através de simulações computacionais.

A hipótese investigada no presente trabalho refere-se à adequabilidade de simulações de dinâmica molecular clássica associadas a modelos atomísticos para a elucidação do mecanismo molecular de ação de peptídeos antimicrobianos em membranas biológicas. Estas simulações emulam o comportamento molecular de uma sequência de aminoácidos construída a partir das regiões biologicamente ativas de dois peptídeos antimicrobianos, plantaricina 149a e a pediocina A. Os resultados serão descritos no **Capítulo 4** e sua relação com a observação experimental de que, a partir de uma dada concentração, o peptídeo híbrido causa uma rápida ruptura de membranas ricas em POPG mas não de membranas ricas em POPC. A interpretação destes resultados e a comparação com a literatura experimental leva à proposição de um mecanismo de ação. Para isto, foram investigados o efeito da composição da bicamada lipídica e da força iônica do meio sobre a conformação do peptídeo, a preferência de orientação do peptídeo ao penetrar na bicamada e o efeito da concentração do peptídeo sobre a estabilidade física da membrana. Para realizar o estudo desses sistemas macromoleculares, cujas propriedades são governadas por processos que envolvem energias da ordem de $k_B T$ (em que k_B é a constante de Boltzmann e T a temperatura em Kelvin), realizamos simulações de Dinâmica Molecular (MD, do inglês *Molecular Dynamics*). O capítulo seguinte descreve sucintamente a fundamentação teórica da metodologia de dinâmica molecular e de análise de propriedades físico-químicas de relevância para o fenômeno estudado.

2. Metodologia

2.1. *Simulação Computacional e Dinâmica Molecular*

A simulação computacional se desenvolveu como uma ferramenta de máquina eletrônicas de computação durante e após a Segunda Guerra Mundial. As máquinas computacionais foram desenvolvidas para realizar cálculos pesados envolvidos no desenvolvimento de armas nucleares e descriptação de códigos. Uma das máquinas mais famosas foi criada por Alan M. Turing, pai da computação, para analisar e decifrar a comunicação naval alemã [67, 68]. Apenas na década de 1950 que os computadores eletrônicos começaram a serem utilizados para fins não-militares. Los Alamos MANIAC, por exemplo, iniciou sua fase operacional em Março de 1952 com o método de Monte Carlo para solução de diversos problemas, de modo a demonstrar sua capacidade [69]. Com o avanço da tecnologia ao longo das décadas seguintes, sistemas químicos mais complexos (não apenas pequenas e poucas moléculas) como líquidos e sólidos [70] puderam ser estudados através de simulações computacionais.

Em simulações computacionais de sistemas químicos e, em particular de biomoléculas, é necessário descrever o movimento das partículas representativas destes sistemas. De acordo com os recursos computacionais disponíveis e do tipo de fenômeno a ser observado, os potenciais analíticos podem ser usados para difundir-se a trajetória dos átomos tanto quanticamente (equação de Schrödinger dependente do tempo) quanto classicamente (equações de Newton). Para o estudo de propriedades dinâmicas de biomoléculas, o cálculo das trajetórias utilizando mecânica clássica é significativamente mais rápido. Métodos de campo de força (também conhecidos como métodos de Mecânica Molecular) emergem como metodologia para esse tipo de sistemas, com baixo custo computacional e resultados com alta acurácia.

2.2. *Campos de Força*

Baseando-se nas propriedades das ligações químicas covalentes e nas interações intermoleculares, é possível tratar núcleos e elétrons em moléculas de forma efetiva através de campos de força. De forma sucinta, é possível definir campo de força como um conjunto de

equações analíticas com parâmetros ajustáveis utilizados para descrever a energia potencial de um sistema de partículas atômicas. O objetivo de um campo de forças é descrever os fenômenos atômicos de diferentes classes de moléculas para as quais os parâmetros foram desenvolvidos. Em geral, os parâmetros do potencial clássico são ajustados de forma a reproduzir algumas propriedades estruturais e/ou termodinâmicas como, por exemplo: densidade e entalpia de vaporização (líquidos); energia livre de solvatação de íons em solução; coeficientes de transporte, constante dielétrica, entre outras.

A parametrização de biomoléculas como proteínas e lipídios é complexa, devido à dificuldade de desenvolvimento de um potencial que reproduza todas as classes de propriedades simultaneamente. Por este motivo, a parametrização de um campo de forças envolve desde dados experimentais (quando disponíveis) até cálculos *ab-initio* para reprodução de dados estruturais e/ou energéticos. Logo, a qualidade de um campo de força depende da complexidade do sistema estudado e dos dados utilizados para a sua parametrização. Uma vantagem associada aos sistemas de grande complexidade (elevado número de átomos) é que grande parte da dinâmica é governada por fatores coletivos (hidrofobicidade, efeito cooperativo, por exemplo) e os erros associados aos detalhes das interações entre pares de átomos são minimizados [71–73]. A qualidade de um campo de força está associada aos parâmetros incorporados nas funções de potencial energético empregados nos cálculos moleculares. Portanto, os potenciais de interação intra e intermoleculares devem ser escolhidos de forma criteriosa, levando-se em consideração o fenômeno a ser estudado. No entanto, é importante ressaltar que a qualidade de um campo de força pode ser avaliada através da comparação entre propriedades calculadas e medidas experimentalmente [74–80]. O rápido progresso de técnicas experimentais com resolução espacial atômica, como a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), possibilitou não apenas o refinamento dos parâmetros atômicos contidos nos campos de força, mas especialmente a validação de propriedades moleculares calculadas com relação a medidas experimentais em solução. Atualmente campos de força são parte de todos os programas utilizados para determinação da estrutura tridimensional de biomoléculas via cristalografia de Raios-X (*X-ray*) e RMN. As interações representadas em funções de energia constituintes dos campos de força mais comuns estão ilustradas na Figura 2.2. Estes termos descrevem, via um potencial harmônico, interações entre átomos ligados (ligações, ângulos, torsões próprias e impróprias) e interações entre átomos não-ligados.

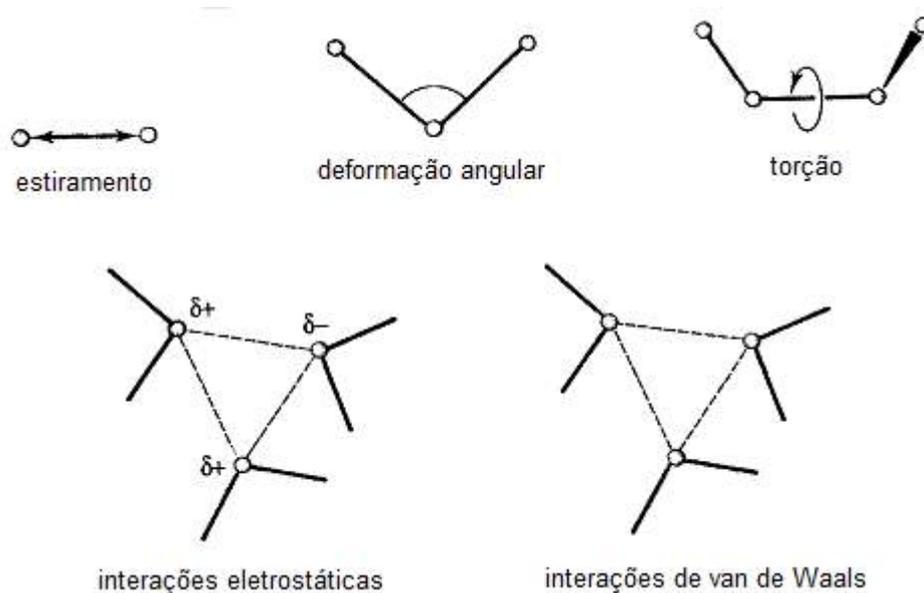


Figura 2.2.1 Representação esquemática das contribuições intra e intermoleculares de um campo de força. Adaptado da Ref. [81].

Além desses termos, um conceito comum entre os campos de força é o “tipo de átomo” (do inglês *atom type*) que se refere à geometria do estado de hibridação e do ambiente químico ao redor do átomo em consideração. Os modelos MM2, MM3 e MM4, por exemplo, distinguem os tipos de átomo de carbono em sp^3 , sp^2 , sp , carbonila, ciclopropano, radicalar, ciclopropeno e íon carbônio [82–87].

Nos últimos 30 anos, diversos tipos de campo de forças foram desenvolvidos independentemente para as mais diversas aplicações. Esta diversidade decorre do fato de campos de força serem desenvolvidos seguindo diferentes filosofias para o cálculo e validação dos parâmetros atômicos e métodos para o tratamento de interações de longa distância.

Um dos primeiros campos de força desenvolvidos para biomoléculas é o AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*) [88, 89]. O AMBER é parametrizado através do conceito de pares de cargas precisas, sendo a unidade de carga definida na forma de um aminoácido. À cada resíduo é atribuída uma unidade carga, derivada através do método RESP (*Restrained Electrostatic Potential*) [90]. Um segundo campo de força amplamente utilizado em simulações de biomoléculas é o OPLS (*Optimized Potentials for Liquid Simulations*), parametrizado a partir de cálculos de propriedades termodinâmicas em solução

via simulações de Monte Carlo de líquidos orgânicos [91]. Atualmente o OPLS possui dois conjuntos de parâmetros: OPLS-UA (*United Atoms* – em inglês, átomos unidos) para átomos agrupados (hidrogênios são tratados implicitamente nos carbonos) [92, 93] e o OPLS-AA (*All Atoms* – em inglês, todos os átomos) que trata todos os átomos explicitamente [94, 95]. Uma curiosidade do OPLS é que os termos ligados (ligação, ângulo e torção) foram importados e adaptados do campo de força AMBER [91]. Um terceiro campo de força bastante utilizado em estudos de biomoléculas é o CHARMM (*Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics*), desenvolvido no grupo do Martin Karplus [96, 97], laureado com o prêmio Nobel de Química em 2013 [98]. Como o OPLS, o CHARMM também possui conjuntos de parâmetros distintos para a representação do modelo átomos-unidos (CHARMM19) [99, 100] e do modelo com todos os átomos explícitos (CHARMM22) [101, 102]. Ambos foram parametrizados para simulação de proteínas, enquanto o CHARMM27 [103] foi desenvolvido para o estudo de DNA, RNA e lipídios. O GLYCAM06 [104] é um campo de força desenvolvido para ser compatível com o AMBER e é específico para simulações de carboidratos [105]. Recentemente, o GLYCAM serviu de base para o desenvolvimento de parâmetros para novos monossacarídeos e lipídios específicos para a classe dos lipopolissacarídeos (LPS) [106], principal constituinte da membrana externa de bactérias Gram-negativas. Além dos campos de força para biomoléculas já mencionados, existem alguns campos de força bastante populares para simulações atomísticas de materiais inorgânicos como, por exemplo, o Dreiding [107] e o Universal Force Field (UFF, do inglês *Universal Force Field*) [108, 109]. Ambos são parametrizados para um grande número de elementos (o UFF inclui todos os elementos), possibilitando o estudo de uma grande variedade de sistemas. Comparações detalhadas entre diversos campos de força e suas parametrizações podem ser encontradas nas referências [110–118].

Neste trabalho foi utilizado o campo de força GROMOS (*Groningen Molecular Simulation*) com uma representação átomos-unidos para os hidrogênios apolares [119–121]. O GROMOS tem sido parametrizado ao longo dos anos para reproduzir propriedades termodinâmicas de líquidos puros, moléculas polares e apolares pequenas, além de entalpias de solvatação entre diferentes ambientes [89, 91, 94, 96, 103, 122]. O GROMOS tem sido também extensivamente validado através da comparação entre as propriedades calculadas com propriedades experimentais para biomoléculas em solução [74, 77, 106, 121, 123]. Assim, o GROMOS foi escolhido para as simulações descritas nesta monografia pelo seu

desempenho em reproduzir propriedades estruturais e termodinâmicas obtidas experimentalmente para peptídeos e membranas biológicas. Para uma validação sistemática do desempenho do GROMOS em reproduzir medidas experimentais de alta resolução em membranas fosfolipídicas, ver referências [77, 124, 125]. Dois conjuntos de parâmetros foram utilizados inicialmente: GROMOS 53A6 [66] e GROMOS 54A7 [126]. Este último conjunto contém as seguintes modificações: i. adição de um novo tipo de átomo carregado (CH3p) para lipídios baseados na molécula de fosfatidilcolina; ii. adição de dois novos termos para os ângulos rotacionais próprios ϕ e ψ ; iii. modificação do termo de repulsão para interações entre os grupos N-H e C=O; iv. novos parâmetros de van der Waals para os íons Na^+ e Cl^- ajustados para reproduzir a energia livre de hidratação; v. quatro novos termos para ângulos diédricos para uso em cálculos de energia livre envolvendo mudanças de quiralidade. Apenas modificações listadas nos itens ii, iii e iv são relevantes para as simulações discutidas neste trabalho. Desta forma, o refinamento do conjunto de parâmetros GROMOS 53A6 para GROMOS 54A7 corrige a tendência à desestabilização de conformações em hélices- α [126]. O peptídeo híbrido estudado neste trabalho possui percentuais de hélice estimado através de medidas experimentais de espectroscopia de dicroísmo circular [3]. Por esta razão, foi necessário atualizar os novos parâmetros para o campo de força GROMOS 54A7 baseado nas modificações propostas nas referências [125, 127, 128]. As subseções seguintes apresentam uma descrição da função de energia potencial do GROMOS e dos parâmetros atômicos para o GROMOS 53A6 e modificações do GROMOS 54A7.

2.2.1. A Função Potencial do GROMOS

Nas simulações de dinâmica molecular clássica (baseado no formalismo do Hamiltoniano), a função Hamiltoniana que descreve o sistema pode ser dividido em uma parte cinética e uma parte de energia potencial. A contribuição cinética depende apenas do momento, p , e das massas, m , dos N átomos do sistema:

$$K(p, m) = \sum_{i=1}^N \frac{p_i^2}{2m_i} = \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} m_i v_i^2 \quad \text{Eq. 2.1}$$

Em que v_i é a velocidade do átomo i . No GROMOS, as massas são descritas de acordo com os átomos da tabela periódica (tipo de átomo – do inglês, *atom type*). As exceções ficam por

conta dos carbonos alifáticos que são tratados como átomos unidos: o carbono e os hidrogênios ligados a ele são tratados com um único átomo [119, 120, 129–131]. Por sua vez, a contribuição da energia potencial descreve a energia entre os átomos em termos das coordenadas atômicas, r , e dos parâmetros do campo de força, s . Em simulações de dinâmica molecular, é necessário calcular as forças que atuam sobre os átomos, movimentando-os. A força (\vec{f}_i) que atua sobre um átomo i é o negativo da derivada da energia potencial em relação às coordenadas atômica r_i :

$$\vec{f}_i = - \frac{\partial}{\partial \vec{r}_i} V(r_1, r_2, \dots, r_N; s) \quad \text{Eq. 2.2}$$

sendo o potencial descrito como a soma das contribuições das interações de curto e de longo alcance. O potencial associado às energias de interações físicas pode ser dividido em termos ligados e termos não-ligados, na forma:

$$V^{fis}(r; s) = V^{ligado}(r; s) + V^{não-ligado}(r; s) \quad \text{Eq. 2.3}$$

No campo de força GROMOS, o potencial do termo ligado é a soma das contribuições dos potenciais associados à ligação ($V^{ligação}$), ângulo de ligação ($V^{ângulo}$), ângulo diédrico harmônico ou impróprio (V^{imp}) e ângulo diédrico trigonométrico ou torsional (V^{tor}).

$$V^{ligado}(r; s) = V^{ligação}(r; s) + V^{ângulo}(r; s) + V^{imp}(r; s) + V^{tor}(r; s) \quad \text{Eq. 2.12}$$

Já o termo correspondendo às interações não-ligadas é dado pela soma das interações de van der Waals (do tipo Lennard-Jones, LJ) e das interações eletrostáticas (Coulômbicas). Nesta trabalho, para o tratamento de interações eletrostáticas de longa distância entre os pares de átomos do sistema foi utilizada a metodologia do Campo de Reação Generalizado RF (do inglês *Generalized Reaction Field*) [132] e a soma direta até um certo raio (V^C):

$$V^{não-ligado}(r; s) = V^{LJ}(r; s) + V^C + V^{RF}(r; s) \quad \text{Eq. 2.4}$$

Nas seções seguintes, cada termo potencial será descrito de forma individual.

2.2.2. Ligações Covalentes

Na versão 53A6 do campo de força, a energia potencial devida aos estiramentos das ligações covalentes entre os átomos é calculada como a soma de todas as ligações (N_b) e é dependente dos parâmetros K_b e b_0 , na forma:

$$V^{ligação}(r; s) = V^{ligação}(r; K_b, b_0) = \sum_{n=1}^{N_b} \frac{1}{4} K_{b_n} [b_n^2 - b_{0_n}^2]^2 \quad \text{Eq. 2.5}$$

Trata-se de uma função anarmônica escolhida por diminuir o número de operações de raízes quadráticas, reduzindo o tempo computacional do cálculo. Nesta função, o comprimento de ligação para a n -ésima ligação (b_n) entre os átomos i e j nas posições r_i e r_j é dado por $b_n = r_{ij} = \sqrt{r_{ij} \cdot r_{ij}}$, onde $r_{ij} = r_i - r_j$. Os parâmetros K_b e b_0 foram obtidos através de dados de espectroscopia [133] e difração de raios-X [134] para moléculas pequenas, respectivamente. Os valores desses parâmetros para os diversos tipos de ligação do GROMOS podem ser conferidos na referência [66].

2.2.3. Ângulos de Ligação

A energia potencial devido às flexões é calculada também como a soma sobre todos os ângulos N_a e dependente dos parâmetros K_θ e θ_0 :

$$V^{\text{ângulo}}(r; s) = V^{\text{ângulo}}(r; K_\theta, \theta_0) = \sum_{n=1}^{N_a} \frac{1}{2} K_{\theta_n} [\cos \theta_n - \cos \theta_{0_n}]^2 \quad \text{Eq. 2.6}$$

Sendo θ_n o valor do n -ésimo ângulo definido pelos átomos i , j e k . Os parâmetros K_θ e θ_0 foram obtidos através de análises de espectroscopia e difração de raios-X, respectivamente. Os valores desses parâmetros para cada um dos tipos de átomos do GROMOS podem ser encontrados na referência [66].

Uma particularidade da formulação do GROMOS em relação a outros campos de força é que somente o valor e a derivada do $\cos \theta_n$ são utilizados, economizando uma operação arco-cosseno para o cálculo do potencial. Essa formulação permite uma estabilidade numérica à medida que θ_n se aproxima de 180° (interação se torna harmônica). A constante de força

K_{θ_n} pode ser relacionada à constante de força harmônica $K_{\theta_n}^{harm}$ (> 0) com a condição de que as energias de ambas as formas sejam iguais a $k_B T$ para mesmos desvios do ângulo ideal θ_0 :

$$K_{\theta_n} = \frac{2k_B T}{[\cos(\theta_{0_n} + \sqrt{k_B T / K_{\theta_n}^{harm}}) - \cos \theta_{0_n}]^2 + [\cos(\theta_{0_n} - \sqrt{k_B T / K_{\theta_n}^{harm}}) - \cos \theta_{0_n}]^2} \quad \text{Eq. 2.7}$$

Na equação acima (Eq. 2.7), k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura do sistema.

2.2.4. Ângulos Diédricos de Torção

Os ângulos diédricos de torção (também conhecidos como diedros próprios, diedros trigonométricos ou simplesmente diedros) são descritos por uma função trigonométrica. A energia potencial correspondente às interações desses diedros é calculada de forma similar aos ângulos de ligação. Ou seja, é a soma sobre os N_φ ângulos diédricos utilizando os parâmetros K_φ , δ_0 e m de acordo com a Equação 2.8,

$$V^{tor}(r; s) = V^{tor}(r; K_\varphi, \delta, m) = \sum_{n=1}^{N_\varphi} \frac{1}{2} K_{\varphi_n} [1 + \cos(\delta_n) \cos(m_n \varphi_n)] \quad \text{Eq. 2.8}$$

Em que δ_n é o ângulo de fase (restrita aos valores de 0 ou π), m_n é a multiplicidade do diedro e φ_n é o valor real para o ângulo diédrico definido pelos átomos i, j, k e l . Por ser uma função trigonométrica, cálculos de arco-cossenos podem ser evitados como para os ângulos de ligação, tornando o procedimento computacional mais rápido.

Os parâmetros do campo de força GROMOS 53A6 para ângulos diédricos torsionais K_φ , δ_0 e m (ver referência [66]) foram obtidos a partir da reprodução de perfis energéticos de rotação via cálculos de química quântica no vácuo e ajuste destes perfis para o comportamento do mesmo em presença de solvente explícito e da interação de terceiros-vizinhos ou termos não-ligados.

A função que descreve o potencial energético para os ângulos diédricos φ e ψ da cadeia principal de peptídeos no GROMOS é (em **Anexos 8.2.3**, estão as operações para obtenção dessa equação):

$$V^{tor}(\varphi, \psi) = \sum_{n=1}^{N_\varphi} K_n [1 + \cos(m_n \varphi - \delta_n)] + \sum_{n=1}^{N_\psi} K_n [1 + \cos(m_n \psi - \delta_n)] \quad \text{Eq. 2.9}$$

Na qual, N_φ e N_ψ correspondem aos números de termos de um ângulo diédrico. Na correção adotada no GROMOS 54A7, um termo cruzado que depende da soma dos diedros φ e ψ é adicionado a esse potencial [127]:

$$V^{cruz}(\varphi, \psi) = \sum_{n=1}^{N_{\varphi,\psi}} K_n [1 + \cos(m_n(\varphi + \psi) - \delta_n)] \quad \text{Eq. 2.10}$$

Um termo cruzado em campo de força refere-se a um acoplamento entre coordenadas internas e são importantes na medida que descrevem como algumas interações afetam as outras. Na versão 54A7 do GROMOS, o termo que descreve a energia potencial diédrica é corrigido para que o termo repulsivo (C12) do potencial de Lennard-Jones se torne menos repulsivo (descrição na seção 2.2.6). Os parâmetros para o campo de força 54A7 podem ser encontrados na referência [126].

2.2.5. Ângulos Diédricos Impróprios

Os ângulos diédricos impróprios (também chamados de ângulos diédricos harmônicos) são utilizados para especificar a configuração de um grupo de quatro átomos constituindo centros quirais (como o formato tetraédrico de um carbono com hibridização sp^3) ou com geometria plana (como o formato plano da vizinhança de carbonos sp^2). No campo de força do GROMOS 53A6, o potencial resultante desse tipo de interação é obtido através da soma sobre os N_ξ diedros impróprios com parâmetros K_ξ e ξ_0 :

$$V^{imp}(r; s) = V^{imp}(r; K_\xi, \xi_0) = \sum_{n=1}^{N_\xi} \frac{1}{2} K_{\xi_n} [\xi_n - \xi_{0_n}]^2 \quad \text{Eq. 2.11}$$

Em que o ângulo diédrico ξ_n é formado pelos átomos i , j , k e l e pode ser calculado através das posições desses átomos:

$$\xi_n = \text{sign}(\xi_n) \arccos \left(\frac{\vec{r}_{mj} \cdot \vec{r}_{qk}}{\vec{r}_{mj} \vec{r}_{qk}} \right) \quad \text{Eq. 2.12}$$

No qual, $\vec{r}_{mj} = \vec{r}_{ij} \times \vec{r}_{kj}$ e $\vec{r}_{qk} = \vec{r}_{kj} \times \vec{r}_{kl}$ com os índices m e q definidos através dos produtos cruzados. O sinal do ângulo ξ_n é obtido pela função sinal: $\text{sign}(\xi_n) = \text{sign}(\vec{r}_{ij} \cdot \vec{r}_{qk})$.

Na versão 53A6, três tipos de ângulos diédricos impróprios foram definidos (um tetraédrico e dois tipos planos com constantes de forças diferentes). Na referência [66] podem ser encontrados os valores dos parâmetros K_ξ e ξ_0 . Para a versão 54A7 do GROMOS, dois outros ângulos diédricos impróprios (-35° e 180°) foram definidos como mínimos de energia, de modo a facilitar o cálculo de energia livre envolvendo mudanças de quiralidade [126].

No campo de força GROMOS, as interações não-ligadas são calculadas para os pares de átomos não-ligados, porém com algumas restrições. Num primeiro momento, os primeiros e segundos átomos vizinhos são excluídos da soma do potencial, uma vez que já estão sendo computados na energia potencial de ligação. Também são excluídos os terceiros vizinhos ou átomos 1-4 que sejam membros de anéis aromáticos. Por fim, a soma sobre todos os pares é restrita apenas aos pares que tenham uma interação a uma distância menor do que um específico raio-de-corte (*cutoff*). Dois tipos de interações não-ligadas são utilizadas no GROMOS: interação de van der Waals e interações eletrostáticas.

2.2.6. Interações de van der Waals

O termo do potencial relacionado às interações de van der Waals é a soma de todos os pares de átomos não-ligados (seguindo as restrições definidas), usando uma função potencial de Lennard-Jones com parâmetros C12 e C6:

$$V^{LJ}(r; s) = V^{LJ}(r; C12, C6) = \sum_{\text{pares } i,j} \left(\frac{C12_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C6_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \quad \text{Eq. 2.13}$$

No qual os parâmetros C12 e C6 dependem do tipo de átomo envolvido e do caráter da interação (atrativa ou repulsiva). A versão 53A6 contém 53 diferentes tipos de átomos e para cada um desses tipos são definidos parâmetros $C12_{ii}$, $C12_{jj}$, $C6_{ii}$ e $C6_{jj}$ que são utilizados para o cálculo do C12 e C6 da interação entre pares, na forma:

$$C12_{ij} = \sqrt{C12_{ii} \cdot C12_{jj}} \quad C6_{ij} = \sqrt{C6_{ii} \cdot C6_{jj}} \quad \text{Eq. 2.14}$$

A escolha dos parâmetros a serem utilizados nas regras de combinação geométricas (Eq. 2.22) [135] depende do tipo de interação entre os átomos i e j . São definidos três parâmetros C12 diferentes, dentre os quais o C12(I) é utilizado como padrão. O C12(II), um pouco maior, é utilizado quando os átomos i e j formam um par doador e receptor de ligação de hidrogênio de modo a obter o comprimento adequado de ligação de hidrogênio. Já o parâmetro C12(III) é usado em grupos carregados (como íons) para mantê-los a uma distância apropriada. Outros valores para os parâmetros C6 e C12 são utilizados em interações especiais, como no caso onde os átomos i e j estão ligados via três ligações covalentes (chamadas interações 1-4) e casos onde a regra de combinação não é aplicável. Todos esses parâmetros podem ser encontrados na referência [66].

Para a versão 54A7, algumas mudanças foram realizadas nesse tipo de interação. Seguindo a atualização realizada no ângulo diedro de torção para polipeptídeos (seção 2.2.4), foi feita uma mudança do tipo C12(II) para C12(I) do par de átomos O(IAC=1)-N(IAC=6). Os parâmetros C12 e C6 para os íons Na^+ e Cl^- foram substituídos pelos novos valores calculados por Reif e Hünenberger [128] e os terceiros-vizinhos foram alterados. Essa substituição foi feita para que as propriedades termodinâmicas dos íons sódio e cloro se tornem mais adequadas aos dados experimentais. Além dessas mudanças, um novo tipo de átomo foi incluído para descrever o grupo $-\text{CH}_3$ positivamente carregado (IAC=54). O objetivo dessa adição foi para aumentar a repulsão entre os grupos CH_3 da região colina e os oxigênios $-\text{OM}$ negativamente carregados do grupamento fosfato no lipídio DPPC [125]. A Figura 2.2.2 mostra as cargas atômicas parciais e a definição dos grupos de carga para o GROMOS 53A6 (a) e as utilizadas para o 54A7 baseadas no modelo de Chiu et. al. (b) [136].

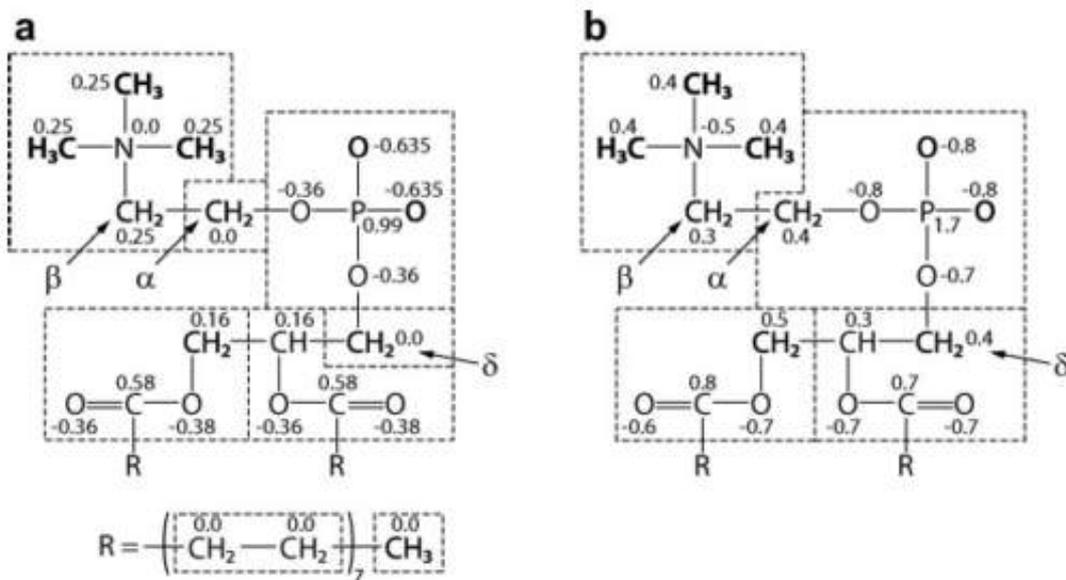


Figura 2.2.2 Cargas atômicas parciais (em e) e grupos de cargas no DPPC do: **a)** GROMOS 53A6; **b)** Chiu et. al. [136]. Em negrito, os grupos metil colina e os oxigênios não-ésteres do grupo fosfato. Também estão indicadas as posições dos metilenos no grupo colina em α e β e em δ no grupo glicerol. Retirada da Ref. [125].

Todos os parâmetros podem ser encontrados no artigo de definição do GROMOS 54A7 [126]. Entretanto, para utilizar este conjunto de parâmetros do GROMOS, foi necessário calcular os termos de interação de van der Waals entre pares do grupo $-\text{CH}_3\text{p}$ e os outros 53 tipos de átomos listados no GROMOS 53A6, bem como as interações dos íons Na^+ e Cl^- com esses mesmos átomos usando as equações Eq. 2.22 no programa *Microsoft Excel 2011*. Em **Anexos**, as figuras 8.2.1 e 8.2.2 mostram alguns dos potenciais calculados e inseridos no arquivo de termos não-ligados do campo de força. Os potenciais foram calculados de acordo com as regras de combinação descritas no artigo [137].

2.2.7. Interações Eletrostáticas

As interações eletrostáticas entre pares são governadas por três contribuições. A primeira contribuição é a soma sobre todas as interações entre pares dentro de um raio de corte R_{rf} utilizando um potencial de Coulomb (V^C):

$$V^C(r; s) = V^C(r; q) = \sum_{\text{pares } i,j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad \text{Eq. 2.15}$$

Em que o parâmetro q é definido como a carga parcial dos átomos, r_{ij} é a distância entre i e j , ε_0 é a constante dielétrica do meio no qual os átomos estão inseridos [106, 132].

A segunda contribuição é relacionada ao tratamento do campo de reação (V^{RF} , do inglês *reaction-field*), que contabiliza interações eletrostáticas de longo alcance entre pares de átomos. Esta contribuição representa a interação do átomo i com o campo induzido em um meio dielétrico contínuo, além de um raio de corte (R_{rf}), devido à presença do átomo j [132]:

$$V^{RF}(r; s) = V^{RF}(r; q) = \sum_{\text{pares } i,j} \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_1} \frac{-\frac{1}{2}C_{rf}r_{ij}^2}{R_{rf}^3} \quad \text{Eq. 2.16}$$

Em que,

$$C_{rf} = \frac{(2\varepsilon_1 - 2\varepsilon_2)(1 + \kappa R_{rf}) - \varepsilon_2(\kappa R_{rf})^2}{(\varepsilon_1 + 2\varepsilon_2)(1 + \kappa R_{rf}) + \varepsilon_2(\kappa R_{rf})^2} \quad \text{Eq. 2.17}$$

Na qual, ε_2 é a permissividade relativa (na Seção 2.3.7 abordaremos como foi feito o tratamento eletrostático e utilização da constante dielétrica) e κ é o inverso do comprimento de Debye do meio, fora da região esférica definida pelo raio de corte R_{rf} .

A contribuição final (termo independente da distância no campo de reação) é uma constante que atua em cada par, segundo a equação:

$$V^{RFe}(q) = \sum_{\text{pares } i,j} \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_1} \frac{-(1-\frac{1}{2}C_{rf})}{R_{rf}} \quad \text{Eq. 2.18}$$

Este termo, por ser independente da distância interatômica (r_{ij}), não contribui para as forças. Porém, ele garante que a energia eletrostática será zero para todos os átomos que estão na região definida pelo raio de corte R_{rf} . As cargas atômicas utilizadas no GROMOS 53A6 (não houve modificação para o 54A7) podem ser encontradas no artigo de definição e divulgação desses parâmetros [66].

Uma vez definidos os parâmetros atômicos (campo de força) a serem utilizados, pode-se definir o protocolo metodológico a ser aplicado durante as simulações computacionais e análises de dos sistemas biomoleculares estudados. Na próxima seção, será abordada a

fundamentação teórica que serviu de base para a escolha do protocolo metodológico utilizado neste trabalho. Subsequentemente, os sistemas químicos e as propriedades físico-químicas estudadas serão descritos.

2.3. Simulação Computacional

Como discutido anteriormente, em dinâmica molecular, configurações sucessivas do sistema são geradas através da integração das equações clássicas de movimento das partículas (sistema conservativo), que tem a forma:

$$\vec{F}_{x_i} = m_i \frac{d^2 \vec{x}_i}{dt^2} = - \frac{\partial V}{\partial \vec{x}_i}(\vec{x}_i, \dots) \quad \text{Eq. 2.19}$$

O resultado dessas configurações é uma trajetória que mostra como as partículas se movem e em que posição elas estão no sistema em determinado tempo [71].

A Equação 2.19 descreve o movimento de uma partícula de massa m_i sob ação da força \vec{F}_{x_i} na direção dessa coordenada, ou seja, conhecendo a posição e as velocidades das partículas em um dado instante t_0 e calculando as forças sobre cada partícula devido à interação com as outras, é possível determinar as posições e velocidades num instante $t_0 + \delta t$. Para um sistema com milhares de átomos, faz-se necessário o uso de um protocolo de simulação de dinâmica molecular para aplicar, calcular e estudar o comportamento de todas as partículas e, conseqüentemente, todo o sistema.

Logo, para simular um sistema de partículas através de dinâmica molecular é preciso seguir algumas etapas:

- Gerar a configuração inicial das partículas;
- Calcular as forças exercidas sobre cada partícula, resultantes das interações intermoleculares;
- Movimentar as partículas;
- Gerar trajetórias (*ensembles*);
- Analisar os dados das trajetórias geradas.

Em cada uma dessas etapas, o processo de descrição das posições e velocidades das partículas deve ser feito de modo estudado e planejado. A Figura 2.3.1 apresenta um fluxograma resumindo os passos envolvidos durante o processo de simulação computacional.

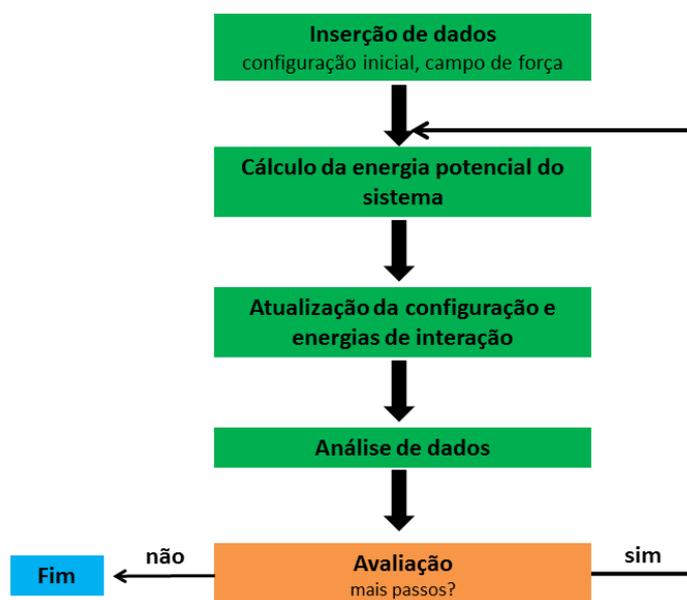


Figura 2.3.1 Fluxograma mostrando os principais passos de um procedimento de simulação computacional.

Neste trabalho, foi utilizado o programa computacional GROMACS (*Groningen Machine for Chemical Simulations*) versão 4.5.4 [138] para realizar todas as simulações e análises, exceto análise do ângulo de inclinação (código desenvolvido no grupo) [139].

Todos os sistemas tiveram suas configurações iniciais submetidas a uma minimização de energia antes de serem submetidas ao processo de simulação propriamente dito. Para isso, foi utilizado o algoritmo de busca de descida íngreme (*Steepest Descent*), conhecido por ser simples e robusto. Em todos os casos, a cada adição de nova molécula, foram executados 5000 passos (com $dt = 1\text{fs}$) para minimização da energia do sistema e uma minimização final quando a configuração completa estava pronta. Uma vez minimizado, o sistema era submetido para simulação usando o conjunto de integradores e algoritmos listados na Figura 2.3.2:

```

|disre           = simple
integrator       = md
dt              = 0.001
nsteps          = 10000000
nstxout         = 500
nstvout         = 500
nstlog          = 250
nstenergy       = 500
nstxtcout       = 500
comm-mode       = Linear
nstcomm         = 5
comm-grps       = Protein DPOPG Water_and_ions
xtc_grps        = Protein DPOPG
energygrps      = Protein DPOPG Water_and_ions
nstlist         = 5
rlist           = 1.4
coulombtype     = generalized-reaction-field
epsilon_rf      = 66.0
ns_type        = grid
rcoulomb        = 1.4
rvdw            = 1.4
pbc             = xyz
tcoupl         = berendsen
tc-grps         = Protein DPOPG Water_and_ions
tau_t           = 0.2 0.2 0.2
ref_t           = 305 305 305
Pcoupl         = berendsen
Pcoupltype     = semi-isotropic
tau_p           = 0.1 0.1
ref_p           = 1.0 1.0
compressibility = 4.5e-5 4.5e-5
gen_vel         = yes
gen_temp        = 5
gen_seed        = 178296
constraints     = h-bonds

```

Figura 2.3.2 Exemplo de arquivo de entrada para as simulações computacionais dos sistemas completos (peptídeos, lipídios, água e íons) com as variáveis e algoritmos listados.

Cada uma das simulações foi realizada preparando o arquivo de topologia com as variáveis e algoritmos representados acima. Nas próximas subseções, serão descritos esses algoritmos, as variáveis utilizadas e sua fundamentação teórica.

2.3.1. Condições Periódicas

Um dos problemas que emerge de simulações biomoleculares, em especial de membranas, é a limitação imposta pelo tamanho do sistema. Devido ao custo computacional, simular a membrana de uma vesícula inteira, por exemplo, torna-se inviável e temos que utilizar um modelo representando apenas uma parte/região da mesma. Entretanto, esse tipo de representação implica na necessidade de um tratamento adequado dos limites da caixa (cela) do sistema e dos efeitos de fronteira. Num sistema de biomoléculas, as fronteiras devem ser descritas utilizando condições periódicas, as quais permitem que uma simulação possa ser realizada com um número relativamente menor de partículas. Nessa abordagem, os átomos do sistema são colocados numa determinada caixa, que é cercada por unidades transladadas dessa

mesma caixa. A Figura 2.3.3 apresenta um exemplo de uma caixa bidimensional. Nas caixas bidimensionais, cada unidade é cercada por oito vizinhos, enquanto que caixas tridimensionais (caso das simulações deste trabalho), 26 caixas são dispostas ao redor de cada caixa.

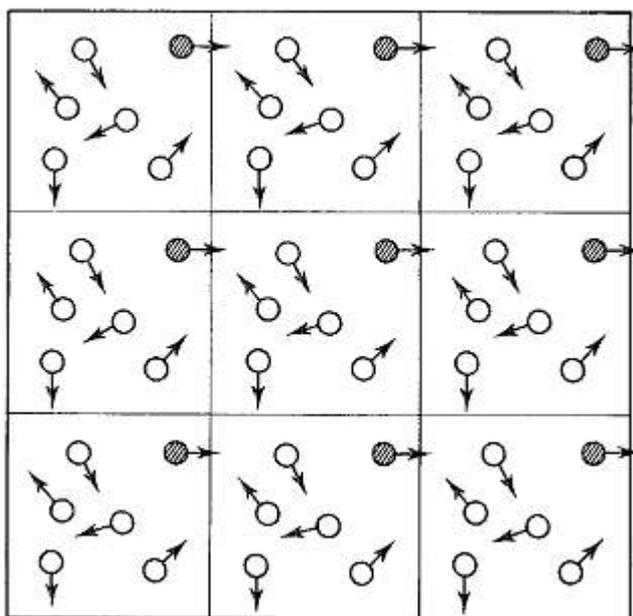


Figura 2.3.3 Exemplo de caixa bidimensional no qual são aplicadas as condições periódicas de contorno. Figura obtida da referência [140].

No programa GROMACS, as condições periódicas são baseadas em células unitárias triclinicas [141] ($abc = xyz$). Elas são utilizadas em conjunto com a convenção de imagem mínima (*minimum image convention*): apenas uma imagem (a mais próxima) de cada partícula é utilizada no cálculo do potencial de interação não-ligado para curto alcance. As interações eletrostáticas de longo alcance são tratadas por outras metodologias (subseção 2.3.7).

2.3.2. Ensembles

Durante a simulação, alguns parâmetros macroscópicos podem ser mantidos constantes em *ensembles* como NPT , NVT , NVE ou grã-canônico (μVT), em que N é o número de partículas do sistema, p é a pressão, V o volume, T a temperatura e μ é o potencial químico. Um *ensemble* é um conjunto de réplicas de um sistema macroscópico que diferem entre si nas coordenadas e momentos das partículas, isto é, diferentes estados microscópicos. Logo, cada

réplica corresponde a um ponto no espaço de fases. Se, depois de um tempo suficientemente grande, cada réplica tiver passado por todas as regiões do espaço de fases, onde a densidade de probabilidade não é nula (sistema ergódico), as funções termodinâmicas podem ser determinadas como médias do *ensemble*.

O método de dinâmica molecular, em geral, consiste em simular um sistema conservativo (E) com N partículas interagentes, ocupando um volume V (*ensemble NVE*) através da integração das equações de movimento destas partículas. No entanto, sistemas biológicos existem em condições de temperatura e pressão constantes. Por esta razão, as propriedades investigadas neste trabalho foram obtidas de simulações em condições de *ensemble NPT*. Neste ensemble, um banho térmico é utilizado para regular a temperatura (termostato) e a pressão é regulada (imposta) por um barostato através do uso de uma pressão externa sobre o sistema (virial) [142]. Neste trabalho, foram utilizados o termostato e barostato de Berendsen [143, 144] para manutenção da temperatura e pressão constantes.

2.3.3. Algoritmo de Integração

Em dinâmica molecular, o algoritmo de integração é o responsável por determinar as posições e velocidades das partículas nas etapas da simulação. Trata-se de um programa computacional que faz a resolução das equações de movimento. Em geral, essa resolução é obtida através de metodologias de diferenças finitas, dentre as quais se destacam o algoritmo de Verlet [145] e o algoritmo integrador *leap-frog* [146].

Neste trabalho, o algoritmo de *leap-frog* (padrão do GROMACS) foi utilizado em todas as simulações. Apesar de o algoritmo de Verlet oferecer grande estabilidade, o integrador de *leap-frog* é uma reformulação do Verlet com maior precisão numérica, pois a velocidade das partículas é calculada de forma explícita [146, 147]. Ele utiliza as posições r em um determinado tempo t e velocidades v na metade do intervalo de tempo ($t - \frac{1}{2}\Delta t$), atualizando as posições e as velocidades através da força $F(t)$ usando as relações:

$$v\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = v\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \frac{\Delta t}{m}F(t) \quad \text{Eq. 2.20}$$

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t v\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) \quad \text{Eq. 2.21}$$

No tempo t , a velocidade das partículas na trajetória produzida é descrita por:

$$v(t) = \frac{1}{2} \left[v \left(t - \frac{1}{2} \Delta t \right) + v \left(t + \frac{1}{2} \Delta t \right) \right] \quad \text{Eq. 2.30}$$

As equações de movimento são modificadas de acordo com o acoplamento da temperatura e da pressão que serão descritos a seguir.

2.3.4. Termostato

O controle da temperatura pode ser feito através da aplicação de um banho térmico regulado através de diferentes algoritmos como: o termostato de Berendsen [148], o *ensemble* estendido Nosé-Hoover [149, 150] ou o esquema de reescalonamento de velocidade (*canonical sampling through velocity-rescaling*) [151]. Neste trabalho, todas as simulações tiveram sua temperatura regulada em $T_0 = 305$ K (32 °C) através do uso do termostato de Berendsen (Figura 2.3.2: *tcoup = Berendsen*). Esse algoritmo simula um acoplamento fraco com cinética de primeira ordem para o banho térmico. Os grupos acoplados separadamente durante as simulações foram três: peptídeos (*Protein*), bicamada lipídica (*POPG e/ou POPC*) e água com íons (*Water_and_ions*). O algoritmo do termostato aplica uma correção para os desvios da temperatura definida (T_0) segundo a equação abaixo:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{\tau} \quad \text{Eq. 2.22}$$

Logo, o desvio da temperatura decai com uma exponencial da constante de tempo τ (nas simulações, $\tau = 0.2$ ps).

Uma das vantagens dessa abordagem, em comparação com o método de Nosé-Hoover, é que a força do acoplamento pode variar e é adaptável de acordo com a necessidade: para a fase de equilíbrio, a constante de tempo pode ser muito pequena. Porém, uma vez o sistema equilibrado, ela pode ser aumentada cerca de cem vezes sem influenciar na produção da dinâmica [144]. Na literatura [152, 153], resultados mostram que para sistemas de bicamada de fosfolípidios, esse termostato pode ser utilizado com resultados satisfatórios.

2.3.5. Barostato

No *ensemble NPT*, a pressão e a temperatura do sistema é mantida constante enquanto o volume pode flutuar. Para o controle da pressão realizada sobre o sistema, é necessária a utilização de um barostato. Na literatura, os barostatos de Berendsen [148], de Andersen [154], a aproximação de Parrinello-Rahman [155, 156] e o controle de pressão de Martyna-Tuckerman-Tobias-Klein (MTTK) estão entre os mais utilizados em simulações biomoleculares [157].

Para combinar o acoplamento da temperatura e da pressão, foi utilizado o barostato de Berendsen (*pcoupl = berendsen*) em todas as simulações deste trabalho. O algoritmo desse barostato rescala as coordenadas e os vetores da caixa a cada passo (ou n_{PC} passos) com a matriz μ , na qual tem o efeito de primeira ordem na cinética de relaxação da pressão dada uma pressão P_0 , de acordo com a equação:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{P_0 - P}{\tau_P} \quad \text{Eq. 2.23}$$

A matriz μ é descrita por:

$$\mu = \delta_{ij} - \frac{n_{PC}\Delta t}{3\tau_P} \beta_{ij} \{P_{0ij} - P_{ij}(t)\} \quad \text{Eq. 2.24}$$

Em que β é a compressibilidade isotérmica do sistema (*compressibility* = $4,5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$).

A pressão de 1 bar foi aplicada de forma semi-isotrópica (*pcoupltype = semi-isotropic*), ou seja, nas direções x e y do sistema a pressão é feita de modo diferente do que na direção z e com constante temporal (τ_P) de 1 ps (*tau_p = 1 ps*).

2.3.6. LINCS: Algoritmo de Restrição

O tempo de integração da equação de movimento em métodos de dinâmica molecular é limitado pelas vibrações das ligações químicas. Estas oscilações possuem uma frequência relativamente alta e uma baixa amplitude. O uso de algoritmos para manter o comprimento de ligações constante (*constraints*) durante simulações de mecânica clássica permite um aumento em até quatro vezes do passo de integração das equações de movimento, possibilitando

simulações significativamente mais longas. Os algoritmos mais usados em simulações moleculares são o SHAKE [158], LINCS (*Linear Constraint Solver*) [159] e RATTLE [160] para pequenas moléculas. No presente trabalho, o algoritmo LINCS foi aplicado para controlar o comprimento de ligações envolvendo átomos de hidrogênio.

O algoritmo LINCS é baseado no restabelecimento dos comprimentos das ligações após uma atualização sem restrições do comprimento de ligação em consideração. Trata-se de um método não-iterativo, geralmente realizado em duas etapas: na primeira, as projeções das novas ligações sobre as antigas ligações são levadas a zero. Em seguida, na segunda etapa, a correção é aplicada para os estiramentos das ligações devido à rotação.

$$g_i(r) = |r^{i_1} - r^{i_2}| - d_i = 0 \quad i = 1, 2, \dots, K \quad \text{Eq. 2.25}$$

Em que d_i é o comprimento da ligação entre os átomos i_1 e i_2 e r^i é a posição desses átomos.

Essa correção evita que erros numéricos se acumulem, evitando a multiplicação de matrizes e tornando, portanto, os cálculos mais precisos e mais rápidos que o método SHAKE. Entretanto, isso só é válido para restrições de ligações e ângulos de ligação isolados, como os utilizados nas restrições via LINCS nas simulações realizadas (*constraints = h-bonds*). Para maiores detalhes da fundamentação teórica e implementação do algoritmo LINCS, ver referência [159].

2.3.7. Longo Alcance: Campo de Reação Generalizado

O potencial de interação entre um par de átomos ou moléculas é calculado através da soma de um termo devido às interações de curto alcance e um termo responsável pelas interações Coulômbicas de longo alcance. Como visto na seção 2.2.7, o campo de força define os parâmetros para essas interações de longo alcance. Com a utilização das condições periódicas, emerge um número infinito de interações. Logo, é necessário definir uma metodologia que permita definir o número adequado de interações a serem computadas através de uma região definida (raio de corte). É possível calcular essas interações através de metodologias como Campo de Reação [161–163], Campo de Reação Generalizado [132], somatório de Ewald [72, 164], PME (*Particle Mesh Ewald*) [165], entre outros.

No presente trabalho, foi utilizado o Campo de Reação Generalizado (*coulomb-type = generalized-reaction-field*) em todas as simulações, uma vez que essa metodologia apresenta

resultados consistentes com um custo computacional melhor em comparação com PME, por exemplo [166]. No Campo de Reação Generalizado, cada carga (pontual) é considerada como a origem de um sistema de coordenadas esféricas, e é rodeada por uma esfera de raio de corte (RC, $r_{coulomb} = 1,4 \text{ nm}$) e imersa num dielétrico contínuo ϵ_{rf} ($\epsilon_{rf} = 66,0$) [106, 132]. O potencial do campo de reação é escrito como:

$$V_{crf} = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \left[\frac{1}{r_{ij}} + k_{rf} r_{ij}^2 - c_{rf} \right] \quad \text{Eq. 2.26}$$

Como o campo de reação generalizado leva em consideração a força iônica do dielétrico (I), as constantes k_{rf} e c_{rf} se tornam:

$$\kappa = \frac{2I F^2}{\epsilon_0\epsilon_{rf}RT} = \frac{F^2}{\epsilon_0\epsilon_{rf}RT} \sum_{i=1}^K c_i z_i^2 \quad \text{Eq. 2.27}$$

$$k_{rf} = \frac{1}{r_c^3} \frac{(\epsilon_{rf} - \epsilon_r)(1 + \kappa r_c) + \frac{1}{2} \epsilon_{rf} (\kappa r_c)^2}{(2\epsilon_{rf} + \epsilon_r)(1 + \kappa r_c) + \epsilon_{rf} (\kappa r_c)^2} \quad \text{Eq. 2.28}$$

$$c_{rf} = \frac{1}{r_c} \frac{3\epsilon_{rf} \left(1 + \kappa r_c + \frac{1}{2} \epsilon_{rf} (\kappa r_c)^2\right)}{(2\epsilon_{rf} + \epsilon_r)(1 + \kappa r_c) + \epsilon_{rf} (\kappa r_c)^2} \quad \text{Eq. 2.29}$$

Em que F é a constante de Faraday, R é a constante de gás ideal, T é a temperatura absoluta, c_i é a concentração molar para a espécie i e z_i é a carga da espécie i onde temos K espécies diferentes. No limite da força iônica zero ($\kappa = 0$), as constantes das equações 2.28 e 2.29 se tornam as constantes para o potencial Coulômbico do campo de reação.

Na parametrização do campo de força GROMOS 54A7 utilizado neste trabalho, foi aplicado um esquema com raio de corte triplo para o tratamento das interações não-ligadas [126]:

- i. até 0,8 nm, todas as interações são calculadas em cada passo a partir de uma lista de pares atualizada a cada 5 passos;
- ii. entre 0,8 – 1,4 nm, as interações entre cargas também são calculadas e mantidas constantes entre as atualizações (também a cada 5 passos);
- iii. após 1,4 nm, campo de reação com ($r_{rf} = 1,4 \text{ nm}$) com constante dielétrica $\epsilon = 66$.

Uma vez conhecidos os algoritmos que farão uso dos parâmetros do campo de força escolhido, é hora de configurar os sistemas (preparar as caixas de simulação) e realizar a simulação computacional propriamente dita. O próximo capítulo trata do procedimento computacional adotado para criação e simulação dos sistemas de interesse, bem como as análises que foram feitas.

3. Procedimento Computacional

3.1. *Sistemas Simulados*

3.1.1 *Simulações de Sistemas Contendo uma Unidade do Peptídeo*

Para realizar as simulações, foi criado um modelo do peptídeo híbrido (KYYGNGVTCGKHSCSVDWGATAIKQVKKLFKKKGG) baseado nas informações experimentais [3] descritas no Capítulo 1 deste trabalho. Medidas de dicroísmo circular indicam que esta sequência possui conteúdo em hélice. Foi também mostrado que, à medida em que a concentração de POPG aumenta em relação à POPC na composição da membrana, o percentual de hélice do peptídeo também aumenta, sugerindo uma transição conformacional induzida pela membrana. Entretanto, a espectroscopia CD não permite identificar qual a trecho da sequência adota uma estrutura helicoidal, fornecendo informação apenas sobre o percentual de conformação em uma dada estrutura da mesma [167]. Partindo destas medidas experimentais, a sequência correspondendo ao peptídeo híbrido foi construída em uma conformação de hélice-alfa, considerando-se que o custo computacional envolvido no processo de desenovelamento da estrutura secundária de um peptídeo é menor que o processo reverso de enovelamento. Nas simulações do peptídeo em presença da bicamada fosfolipídica foi aplicada uma restrição à distância (*distance restraints*) da ligação de hidrogênio entre átomos NH e CO do esqueleto do peptídeo durante os 5 ns iniciais da equilibrção. Restrições deste tipo são implementadas via a aplicação de uma função de penalidade energética para desvios da distância de um dado valor. Neste trabalho, foi adotado um potencial quadrático para as restrições nas ligações de hidrogênio, cujo valor inferior de distância foi 0,28 nm e dois valores superiores de 0,29 nm e 0,30 nm. O uso de restrições de distância entre átomos tem por objetivo preservar a conformação inicial do peptídeo durante o período de equilibrção da membrana e solvente. A Figura 3.1.1 representa a configuração inicial do peptídeo utilizada nas simulações com uma única unidade do mesmo. Na Tabela 3.1.1, apresentamos uma compilação dos sistemas estudados neste trabalho.

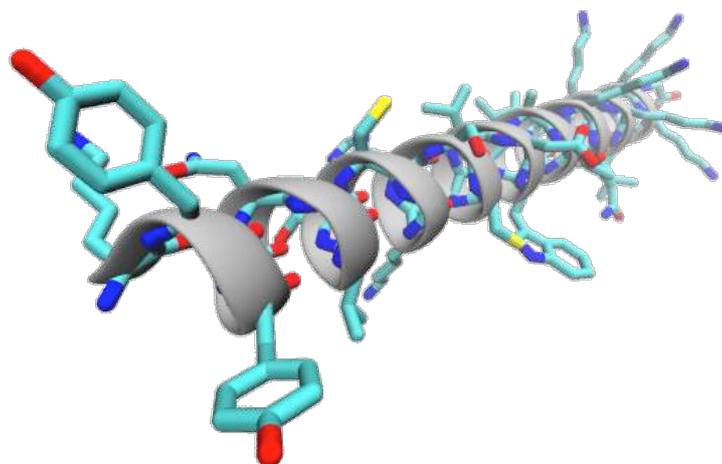


Figura 3.1.1 Configuração inicial do peptídeo híbrido com toda sua estrutura em formato de hélice- α (em cinza).

Para construção das membranas fosfolípídicas de POPC e POPG utilizou-se parâmetros atômicos para lipídios [65] baseados no conjunto de parâmetros GROMOS 53A6. As membranas compostas por um único tipo de lipídio foram construídas replicando uma caixa inicial com oito unidades lipídicas (quatro com as cadeias apontando para cima, quatro com as cadeias apontando para baixo), totalizando 512 unidades de lipídio. Em seguida, as membranas foram colapsadas aplicando pressão de 100 bar até adquirir formato de bicamada. De modo similar, as membranas mistas foram construídas. A diferença consistiu na substituição de duas unidades lipídicas pelo outro tipo de lipídio: para construção da membrana 75% POPC, por exemplo, duas unidades POPC da caixa inicial de oito unidades foram substituídas por 2 unidades POPG. A escolha das unidades substituídas foi feita de forma aleatória, porém sendo sempre uma da camada superior e outra da camada inferior. Assim, ao replicar a caixa, obtemos um sistema com 384 unidades POPC e 128 unidades POPG. Para as simulações com os peptídeos parcial ou totalmente imersos, foram removidos lipídios suficientes (de acordo com cada membrana) e, em seguida, o peptídeo foi imerso. A Tabela 8.2.1 em **Anexos** detalha a composição de cada sistema.

O modelo de água SPC (do inglês *Single Point Charge*) [135] foi adicionado a uma caixa de dimensão 9,49 nm \times 10,11 nm \times 12,00 nm contendo o sistemas peptídeo-membrana. Nas representações gráficas apresentadas neste trabalho as moléculas de água são frequentemente omitidas para facilitar a visualização do soluto (membrana e peptídeos). Entretanto, em todas as simulações as moléculas de água estão presentes, inclusive entre a membrana e o peptídeo no início das simulações. O modelo de água SPC, como os modelos SPC/E [168] e TIP3P [169], é um modelo de 3-pontos ou 3-sítios, os quais representam a

molécula de água por três centros de cargas concentradas. Os átomos de hidrogênio possuem cargas positivas e o excesso de carga negativa é localizado no átomo de oxigênio. O modelo SPC tem como particularidade um valor de $109,47^\circ$ (ângulo tetraédrico) para o ângulo H-O-H, que deve ser comparado com o valor de $104,52^\circ$ observado experimentalmente e usado nos demais modelos. Essa mudança é feita para corrigir o momento dipolar do modelo de 3-pontos. Os modelos de 3-pontos são amplamente utilizados em simulações de biomoléculas devido à simplicidade e à eficiência computacional dos mesmos.

Os conjuntos de parâmetros GROMOS53A6 e GROMOS 54A7 foram utilizados para simular duas conformações do sistema A) peptídeo na superfície da membrana; B) peptídeo imerso na membrana (Figura 3.1.2). Essas conformações foram simuladas em presença de bicamadas com diferentes composições de POPC:POPG (100:0; 75:25; 25:75; 0:100) durante 30 ns (GROMOS 53A6) e 150-250 ns (GROMOS 54A7) (Tabela 3.1.1). Além da comparação de diferentes conjuntos de parâmetros do campo de força GROMOS, foi investigado também o efeito de mudanças no valor da concentração iônica do ambiente sobre a estrutura secundária do peptídeo (detalhes nas subseções deste capítulo). O efeito da concentração foi emulado através da adição de íons sódios (Na^+) e íons cloretos (Cl^-) em quantidades correspondentes à concentração de $0,150 \text{ mol L}^{-1}$ utilizada nos procedimentos experimentais. Além disso, foram também realizadas simulações controle para o peptídeo em solução sob as mesmas condições de concentração iônica que em presença de bicamadas e partindo de uma conformação inicial em hélice-alfa. Estas simulações foram realizadas ao longo de 50ns sob concentração iônica equivalente a 0 e 0.150 mol L^{-1} (Tabela 8.2.1) em **Anexos**.

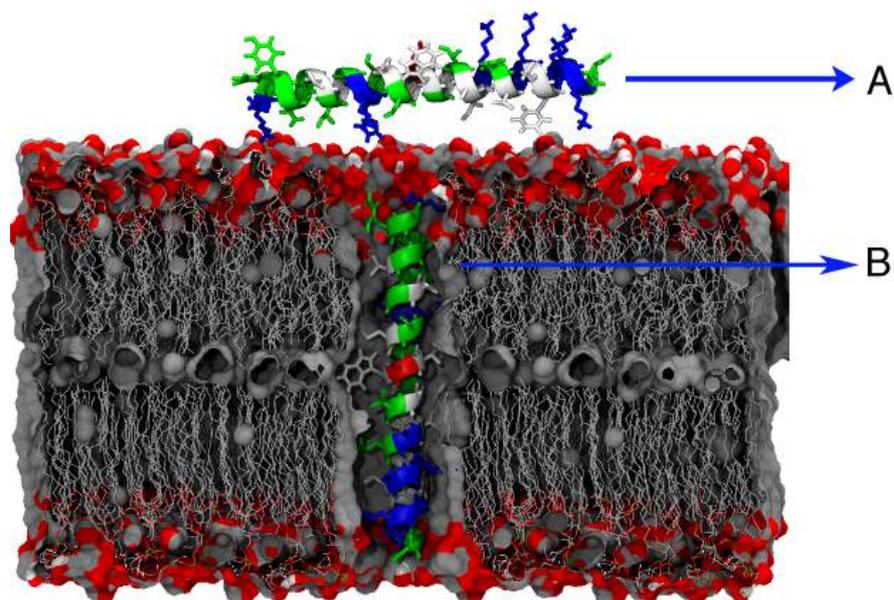


Figura 3.1.2 Conformações iniciais do peptídeo na presença da membrana fosfolipídica: A) peptídeo na superfície da membrana; B) peptídeo imerso na membrana. Os lipídios são representados por uma superfície sólida em cinza com os grupamentos fosfatos em vermelho. O peptídeo é representado de acordo com o caráter hidrofílico (**verde**), carga positiva (**azul**), carga negativa (**vermelho**) hidrofóbico (**branco**) dos aminoácidos constituintes do mesmo.

3.1.2 Simulações de Sistemas Contendo Múltiplas Unidades do Peptídeo

O procedimento metodológico descrito para as simulações contendo uma unidade do peptídeo em bicamadas simples ou binárias de POPC e/ou POPG também foi utilizado para a preparação dos sistemas contendo múltiplas unidades do peptídeo (Tabela 3.1.1). As únicas modificações do procedimento descrito referem-se ao: i. uso exclusivo do conjunto de parâmetros GROMOS 54A7, e ii. no caso dos sistemas contendo cinco ou dez unidades do peptídeo, foram utilizadas como conformações iniciais do sistema estruturas em hélice-alfa, assim como unidades da conformação final (após 150 ns) do peptídeo obtidas via simulações dos sistemas com uma única unidade na superfície da membrana. Para investigar a orientação preferencial do peptídeo quando imerso em membranas simples (100% POPC e 100% POPG), foram realizadas simulações onde uma unidade do peptídeo foi inserida via região N-terminal em um dos lados da bicamada, e uma segunda unidade via região C-terminal no lado oposto ao qual foi inserido a primeira unidade (Figura 3.1.3).

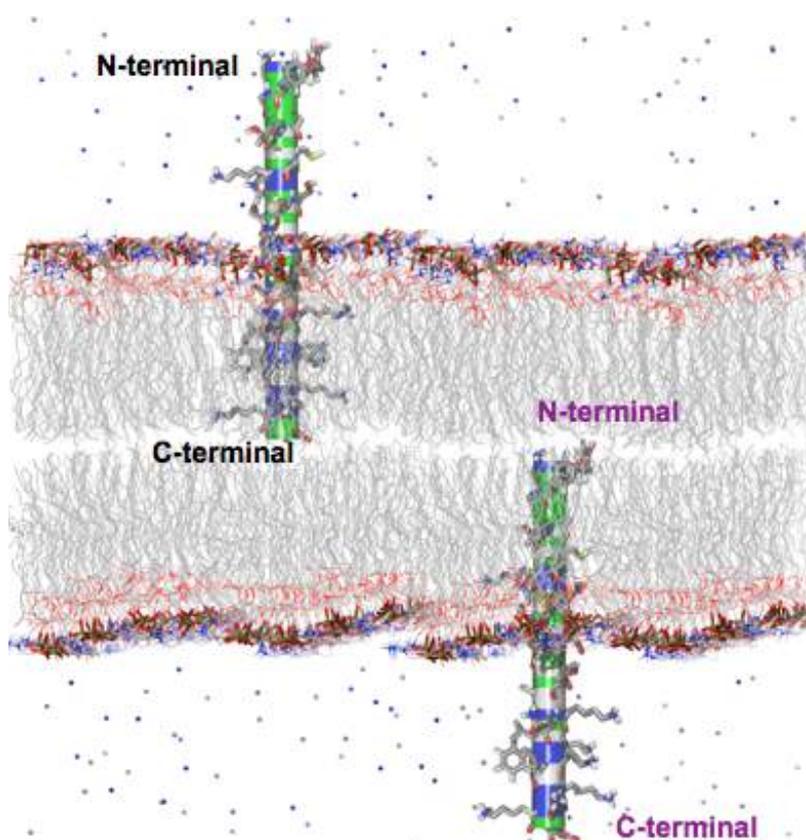
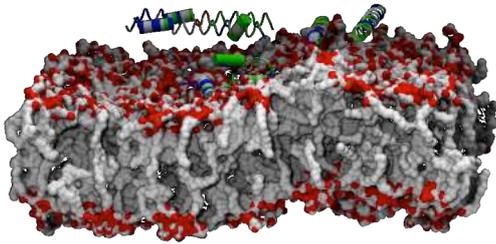


Figura 3.1.3 Configuração inicial dos sistemas contendo duas unidades do peptídeo imerso em uma bicamada de POPG (100%) ou POPC (100%). As moléculas de água foram excluídas da representação para facilitar a visualização.

Foram também simulados sistemas contendo cinco, dez e vinte unidades do peptídeo em presença de bicamadas simples de POPG (100%) ou POPC (100%), com o objetivo de investigar o efeito da concentração do peptídeo sobre o processo de ruptura da membrana (Figura 3.1.4). O sistema contendo dez unidades do peptídeo foi construído a partir da conformação final (após 100 ns) da simulação da bicamada contendo cinco unidades do peptídeo. Simulações adicionais para o sistema contendo dez unidades do peptídeo foram efetuadas utilizando uma bicamada quatro vezes maior que aquela utilizada anteriormente visando prevenir artefatos metodológicos devido ao tamanho do bicamada [170, 171]. Desta forma, espera-se garantir que o fenômeno observado durante as simulações seja decorrente do aumento da concentração do peptídeo. Adicionalmente, quatro simulações da bicamada composta por POPG e/ou POPC na ausência de peptídeos foram realizadas ao longo de 100 ns para servirem como controle. Na Tabela 8.2.1 em **Anexos** estão enumerados as quantidades dos integrantes das simulações.

a)



b)

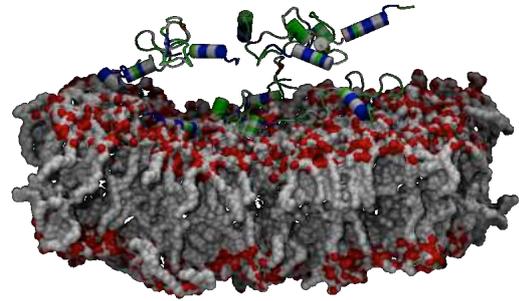


Figura 3.1.4 Configurações iniciais dos sistemas contendo: a) cinco unidades de peptídeo híbrido; b) dez unidades do peptídeo interagindo com membrana 100% POPG. Moléculas de água e íons foram omitidas para facilitar a visualização.

Tabela 3.1.1: Sistemas simulados e tempo de simulação (em ns).

Composição	Posição do(s) Peptídeo(s) na Membrana e Tempo de Simulação (ns)										
	Uma unidade do peptídeo								Múltiplas unidades do peptídeo		
	Superfície da Membrana				Imerso na Membrana						
	Sim1s	Sim2s	Sim3s	Sim4s	Sim1i	Sim2i	Sim3i	Sim4i	Sim2u	Sim5c	Sim10c ^{a)}
100% POPC	5	30	30	150	5	30	30	100	150	-	(100)
75% POPC	5	30	30	150	-	-	-	100	-	-	-
75% POPG	5	30	30	150	5	-	-	100	-	-	-
100% POPG	5	30	30	250	5	30	30	100	150	500	500 (100)

Sim1 - GROMOS 53a6, 0 mM, sem restrições nas ligações de hidrogênio do peptídeo.

Sim2 - GROMOS 53a6, 0 mM, restrições nas ligações de hidrogênio do peptídeo durante os 5 ns iniciais.

Sim3 - GROMOS 54a7, 0 mM, restrições nas ligações de hidrogênio do peptídeo durante os 5 ns iniciais.

Sim4 - GROMOS 54a7, 150 mM, restrições nas ligações de hidrogênio do peptídeo durante os 5 ns iniciais.

Sim2u - GROMOS 54a7, 150 mM, duas unidades do peptídeo, imersos via parte C- ou N-terminal.

Sim5c - GROMOS 54a7, 150 mM, cinco unidades do peptídeo na superfície da membrana.

Sim10c - GROMOS 54a7, 150 mM, dez unidades do peptídeo na superfície da membrana.

^{a)} Em parênteses, simulações com dez unidades do peptídeo na superfície da membrana gigante.

3.2. Análises

Neste trabalho, foram analisadas diversas propriedades para os sistemas estudados através da média sobre *ensemble*: área por cabeça de lipídio, mapas de estrutura secundária para os peptídeos, análise de densidade para o sistema, parâmetros de ordem para as cadeias lipídicas, distância entre centros de massa de sítios e regiões específicas do peptídeo e ângulo de inclinação das cadeias lipídicas em relação ao eixo z da caixa de simulação. As metodologias usadas, que possibilitam as análises destas propriedades, são descritas a seguir.

3.2.1 Área por Cabeça de Lipídio

A medida de área por cabeça de lipídio é muito utilizada em simulações de dinâmica molecular e de Monte Carlo para avaliar a metodologia utilizada de acordo com comparações com as medidas experimentais. Logo, se a medida encontrada nas simulações computacionais estiver próximo do(s) valor(es) experimental(is) observado(s) para o lipídio, este é um indicativo de que a simulação convergiu e de que a metodologia está reproduzindo dados experimentais de forma adequada.

Neste trabalho, para calcular a área por cabeça, as dimensões x e y da caixa (o tamanho lateral da caixa é limitado pela camada de lipídios) ao longo da simulação forem multiplicadas entre si e o resultado dividido pelo número de lipídios presentes em uma camada (N_l).

$$\text{Área} = \frac{x \cdot y}{N_l} \quad \text{Eq. 3.1}$$

3.2.2 Mapas de Estrutura Secundária

Como o nome sugere, estruturas secundárias de peptídeos e proteínas representam o segundo nível da estrutura proteica e a forma tridimensional geral da sequência de aminoácidos. A estruturação da sequência de aminoácidos num peptídeo depende de interações do tipo ligações de hidrogênio e dos ângulos diédricos formados devido à essas interações. Portanto, a análise de evolução da estrutura de um peptídeo durante a simulação permite observar quais interações estão sendo mais ou menos relevantes.

Como um dos objetivos do trabalho é identificar as regiões do peptídeo híbrido com maior conteúdo em hélice, além de entender como essa estrutura é influenciada pela interação com os diferentes componentes do sistema, foram realizadas análises de elementos de estrutura secundária (mapeamento) ao longo das simulações. Os mapas de estrutura secundária foram feitos utilizando o programa *do_dssp* do pacote do GROMACS 4.5.4 que é uma interface para o programa comercial DSSP [10, 172].

O programa DSSP lê o arquivo de trajetória e computa a estrutura secundária para cada quadro (*frame*) do tempo simulado e analisado. O algoritmo começa identificando as ligações de hidrogênio na cadeia principal do peptídeo usando um modelo eletrostático. Ele então calcula a energia de interação eletrostática entre dois grupos de ligações de hidrogênio, atribuindo cargas no átomos C, O ($+q_1, -q_1$) e N, H ($+q_2, -q_2$):

$$E = q_1 q_2 \left\{ \frac{1}{r_{ON}} + \frac{1}{r_{CH}} - \frac{1}{r_{OH}} - \frac{1}{r_{CN}} \right\} f \quad \text{Eq. 3.2}$$

Em que $q_1 = 0,42e$, $q_2 = 0,20e$, r é a distância interatômica (em Å) e $f = 332 \text{ kcal. mol}^{-1}$ é o fator dimensional.

Baseado no resultado, o programa define a estrutura de acordo com um dos oito tipos: hélice 3_{10} , hélice α , hélice π (sequência de ligações de hidrogênios em 3, 4 e 5 resíduos, respectivamente), folha beta-ponte, barril beta, volta (do inglês *turn*, volta ligada a hidrogênio), dobra (*bend*), desestruturado (*coil*) e curvaturas (*loops*).

Uma vez criada a matriz com os assinalamentos para cada resíduo, faz-se uma conversão para um arquivo *postscript* usando o *xpm2ps* e o mapa de estrutura secundária ao longo do tempo é obtido.

3.2.3 Densidade em Número

Analisar a densidade em número é interessante para identificar as regiões onde os componentes dos sistemas estão distribuídos, caracterizando-os. Os perfis de densidade podem servir, juntamente com parâmetros de ordem, para indicar uma possível transição de fase. Além disso, pode ser utilizada para estudar as perturbações causadas por mudanças de concentração como foi realizada neste trabalho.

Foi utilizada a ferramenta *g_density* do GROMACS para o cálculo do número de densidade parcial de cada componente através da caixa. O número de densidade indica a composição de determinado componente ao longo do plano normal da membrana em direção ao eixo z . Os grupos selecionados foram: água; PO₄, CH₃, CH₂, CH₁ (cadeias lipídicas); GLYC (grupo glicerol do POPG) e CHOL (grupo colina do POPC).

3.2.4 Parâmetros de Ordem

Como o nome indica, parâmetros de ordem são medidas do grau de ordem de um sistema. Em geral, o valor desse parâmetro varia de 0 (mais desordenado) a 1 (mais estável) [173, 174]. No caso específico de membranas, há uma diferença: os parâmetros de ordem são calculados por carbono nas cadeias acilas dos lipídios, representando mudanças em suas orientações (*g_order*).

$$S_z = \frac{3}{2} \langle \cos^2 \theta_z \rangle - \frac{1}{2} \quad \text{Eq. 3.3}$$

Em que θ_z é o ângulo entre o eixo z da caixa de simulação e o eixo molecular em consideração definido do C_n ao C_{n+1} da cadeia. Essa média sobre o tempo e sobre as moléculas pode variar entre 1 (vetor totalmente alinhado à normal) a $-1/2$ (vetor totalmente perpendicular à normal). O mesmo é válido para os parâmetros S_x e S_y .

3.2.5 Potencial Eletrostático

Outra forma de identificar as regiões onde os componentes de sistemas com bicamada lipídica estão distribuídos é através da análise do potencial eletrostático. Ele permite verificar as regiões com características hidrofóbicas (cadeia carbônica dos lipídios) ou hidrofílicas (íons e cabeças polares dos lipídios), por exemplo. O potencial eletrostático (ψ) ao longo da interface pode ser obtido da trajetória pelo cálculo da integral dupla da densidade de carga ($\rho(z)$), segundo a equação:

$$\psi(z) - \psi(-\infty) = - \int_{-\infty}^z dz' \int_{-\infty}^{z'} \rho(z'') dz'' / \epsilon_0 \quad \text{Eq. 3.4}$$

Em que a posição $z = -\infty$ é distante o suficiente no espaço de fase que o campo é zero. Através desse método, então, é possível “dividir” o potencial total em diferentes contribuições desde o lipídio até as moléculas de água [138]. Utilizando o programa *g_potential*, a caixa de simulação é dividida em pequenas fatias e é feita a soma de todas as cargas para cada uma dessas fatias. Utilizando a equação 3.4, integra-se a densidade de carga a um dado campo elétrico, obtendo-se assim o potencial eletrostático.

3.2.6 Distância entre Centros de Massa

Foi realizada a medição da distância entre centros de massa no caso das simulações com dois peptídeos para verificar a direção de interação de cada região do peptídeo com a membrana. Em cada uma das simulações, foram medidas as distâncias do centro de massa da região N-terminal (resíduo 1, lisina, 15 átomos) para o centro de massa da membrana, e também do centro de massa da região C-terminal (resíduo 35, glicina, 6 átomos) para o centro de massa da membrana. Essas medidas foram feitas para acompanhar o movimento de aproximação ou afastamento das regiões dos peptídeos em relação ao interior da membrana ao longo do tempo de simulação (150 ns).

3.2.7 Ângulo de Inclinação

O ângulo de inclinação (*tilt angle*) foi calculado para os lipídios em relação ao eixo z da caixa, como forma de expressar quantitativamente a desordem das cadeias lipídicas causada pelo efeito da interação de peptídeos. É uma medida do ângulo definido pelo vetor formado pela direção das cadeias acilas projetado em relação ao vetor do eixo z . A Figura 3.2.1a) mostra a definição do vetor baseado nas cadeias do fosfolipídio.

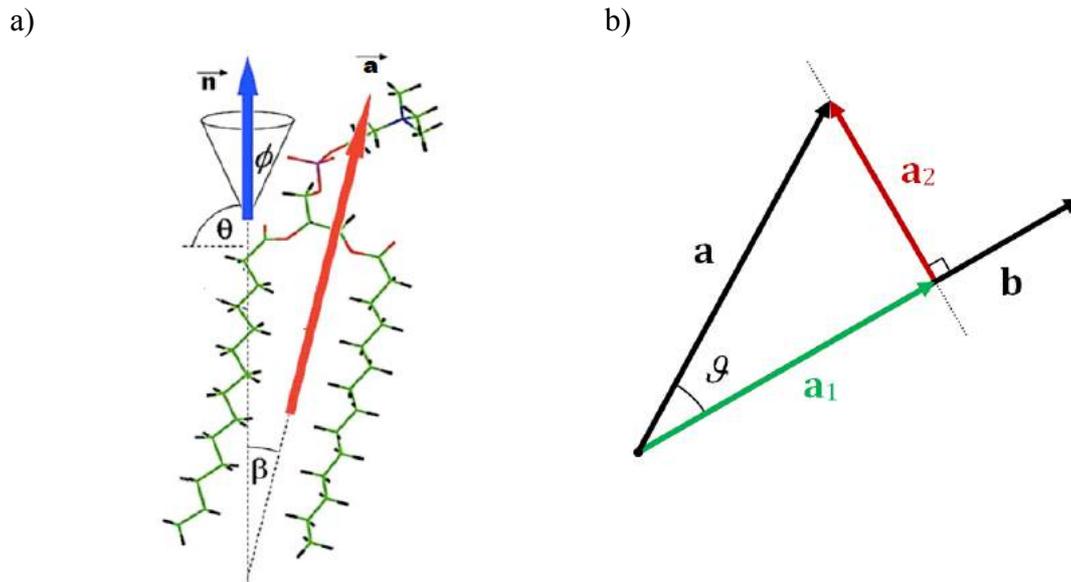


Figura 3.2.1 a) Representação do vetor de inclinação \hat{a} indicando a direção e posicionamento das cadeias lipídicas (adaptado da Ref. [175]); b) projeção do vetor de inclinação \hat{a} na direção do vetor \hat{b} .

A Figura 3.2.1b) mostra como é feita a projeção desse ângulo (\hat{a}) no vetor (\hat{b}) do eixo z da caixa sobre uma linha paralela a esse vetor. Esse ângulo (a projeção ortogonal de \hat{a}) é definido por:

$$\hat{a}_1 = a_1 \hat{b} \quad \text{Eq. 3.5}$$

$$a_1 = |\hat{a}| \cos \vartheta = \hat{a} \cdot \hat{b} \quad \text{Eq. 3.6}$$

Em que a_1 é um escalar denominado projeção escalar de \hat{a} sobre \hat{b} (vetor unitário na direção de \hat{b}). A Equação 3.5 é o produto escalar que é igual ao comprimento do vetor projeção, com um sinal negativo se o sentido da projeção é oposto ao sentido de \hat{b} .

3.2.8 Arrefecimento simulado (Simulated Annealing)

O arrefecimento é o processo no qual a temperatura de uma substância fundida é reduzida lentamente até que o material se cristalice em um único cristal. Em metalurgia, ele é utilizado para obtenção de estados de baixa energia de um sólido como a produção de cristais de silicone para *chips* de computador. O cristal obtido corresponde ao mínimo global de energia livre [176]. De modo análogo, a metodologia computacional de arrefecimento simulado busca a melhor solução (mínimo global) para um sistema com grande número de

possíveis soluções [177, 178]. A altas temperaturas, o sistema pode ocupar regiões de alta energia no espaço conformacional e, assim, superar barreiras de energia mais altas. Com a redução gradativa da temperatura, estados de energia mais baixas se tornam mais prováveis em acordo com a distribuição de Boltzmann.

No programa GROMACS, o arrefecimento é implementado alterando a temperatura de referência para o acoplamento de cada grupo (dependente do termostato escolhido). O procedimento é especificado como uma série de tempos (*annealing-time*) e temperaturas (*annealing-temp*) de referência para cada grupo, como mostrado na Figura 8.3.1 em **Anexos 8.3**. Neste trabalho, o arrefecimento foi aplicado no peptídeo em solução de forma periódica. Os tempos adotados para cada período foram: 0, 50, 250, 300 e 500 ps; e as temperaturas: 300, 600, 600, 300 e 300 K.

Uma vez definida a metodologia e sua fundamentação teórica, o capítulo seguinte aborda e propõe discussões sobre os resultados obtidos durante as simulações e sobre as análises feitas com as trajetórias produzidas. Por fim, propomos uma explicação para o mecanismo de rompimento da membrana baseado nas observações feitas.

4. Resultados e Discussão

4.1. *Simulações Exploratórias: Validação do Protocolo Computacional*

Medidas experimentais de dicroísmo circular (CD) indicam que o peptídeo híbrido sofre uma reorganização estrutural ao interagir com bicamadas ricas em POPG [3]. Portanto, várias simulações exploratórias foram realizadas para estabelecer o procedimento apropriado para reproduzir as tendências experimentais. Em uma primeira fase, utilizou-se o conjunto de parâmetros GROMOS 53A6 para simular uma unidade do peptídeo híbrido em presença de bicamadas fosfolipídicas compostas por diferentes percentagens de POPC:POPG (Tabela 3.1.1). Neste primeiro conjunto de simulações exploratórias (Sim1), uma unidade do peptídeo foi colocada próximo à superfície das respectivas bicamadas, ou imersa paralelamente ao eixo normal da membrana (Sim1i), sem que fosse aplicada qualquer restrição do comprimento das ligações de hidrogênio do esqueleto da proteína durante o período de equilíbrio dos sistemas. A evolução temporal (eixo x) da estrutura secundária do peptídeo na superfície ou imerso nas diferentes bicamadas é apresentada nas Figuras 4.1.1.-4.1.2 por resíduo (eixo y):

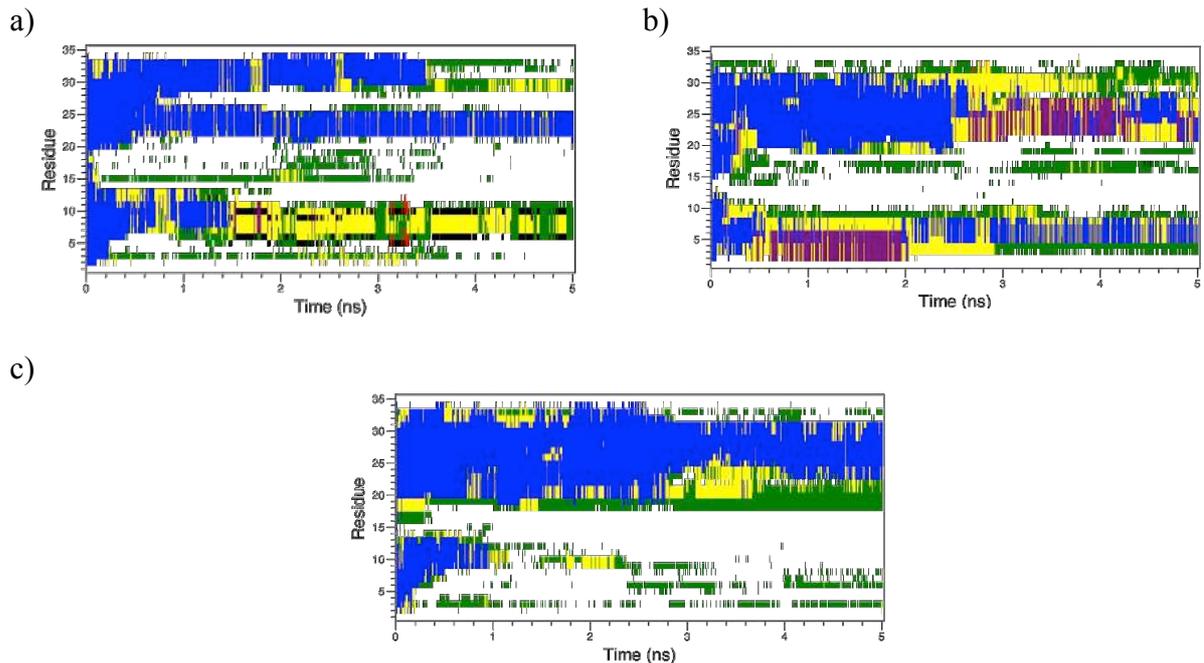


Figura 4.1.1 Mapas de estrutura secundária para grupo de simulações de peptídeo na superfície da membrana durante 5 ns. Foi utilizado o GROMOS 53a6, 0 mM, sem restrições nas ligações de hidrogênio do peptídeo para membrana composta por: a) 100% POPC; b) 75% POPG; c) 100% POPG. Legenda: hélice 3_{10} (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco).

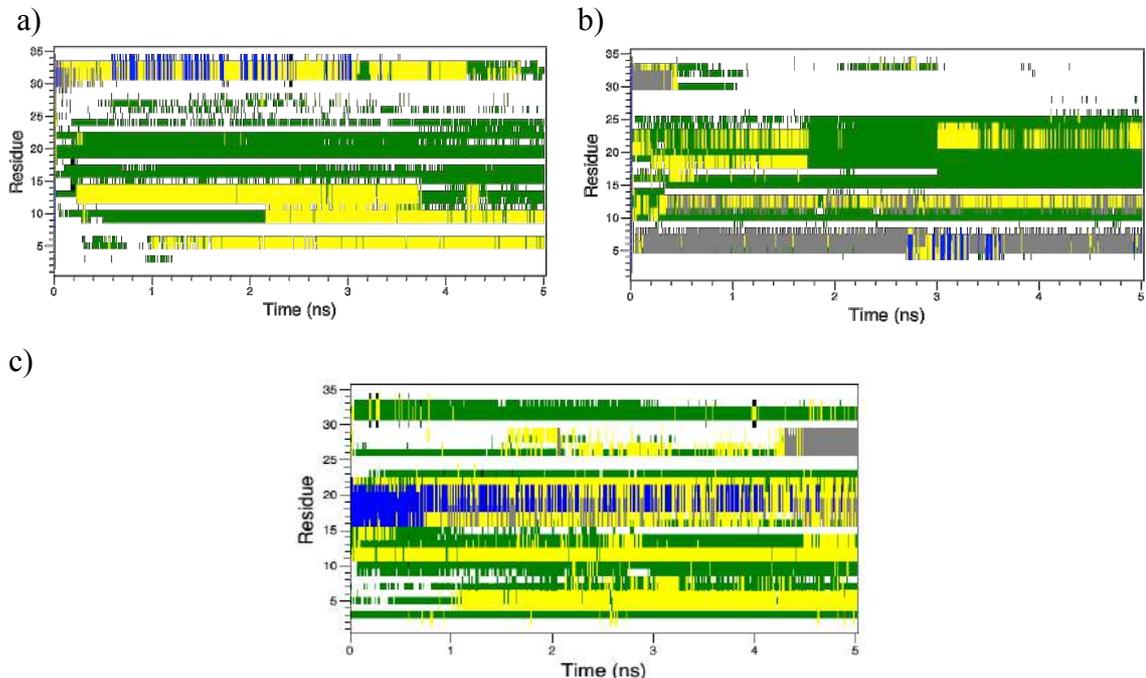


Figura 4.1.2 Mapas de estrutura secundária para grupo de simulações com peptídeo imerso membrana durante 5 ns. Foi utilizado o GROMOS 53a6, 0 mM, sem restrições nas ligações de hidrogênio do peptídeo para membrana composta por: a) 100% POPC; b) 75% POPG; c) 100% POPG. Legenda: hélice 3_{10} (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco).

Este primeiro conjunto de simulações mostra uma perda significativa da estrutura helicoidal, em particular nas simulações onde o peptídeo está imerso nas respectivas bicamadas. A fim de verificar se esse fenômeno seria um efeito induzido pela configuração inicial adotada, foram realizadas novas simulações um pouco mais longas (30 ns) onde as ligações de hidrogênio entre grupos CO-NH no esqueleto da proteína foram mantidas dentro de uma distância $0,285 \pm 0,005$ e $0,290 \pm 0,010$ nm. Essas restrições foram aplicadas exclusivamente durante o período de equilíbrio (5 ns), para evitar distorções artificiais da estrutura do peptídeo ao entrar em contato com os grupos carregados na superfície da membrana. Após o período de 5 ns, as restrições de comprimento de ligações de hidrogênio são removidas. A evolução temporal da estrutura secundária do peptídeo híbrido na superfície das respectivas membranas sob este novo protocolo é mostrada nas Figuras 4.1.3-4.1.4.

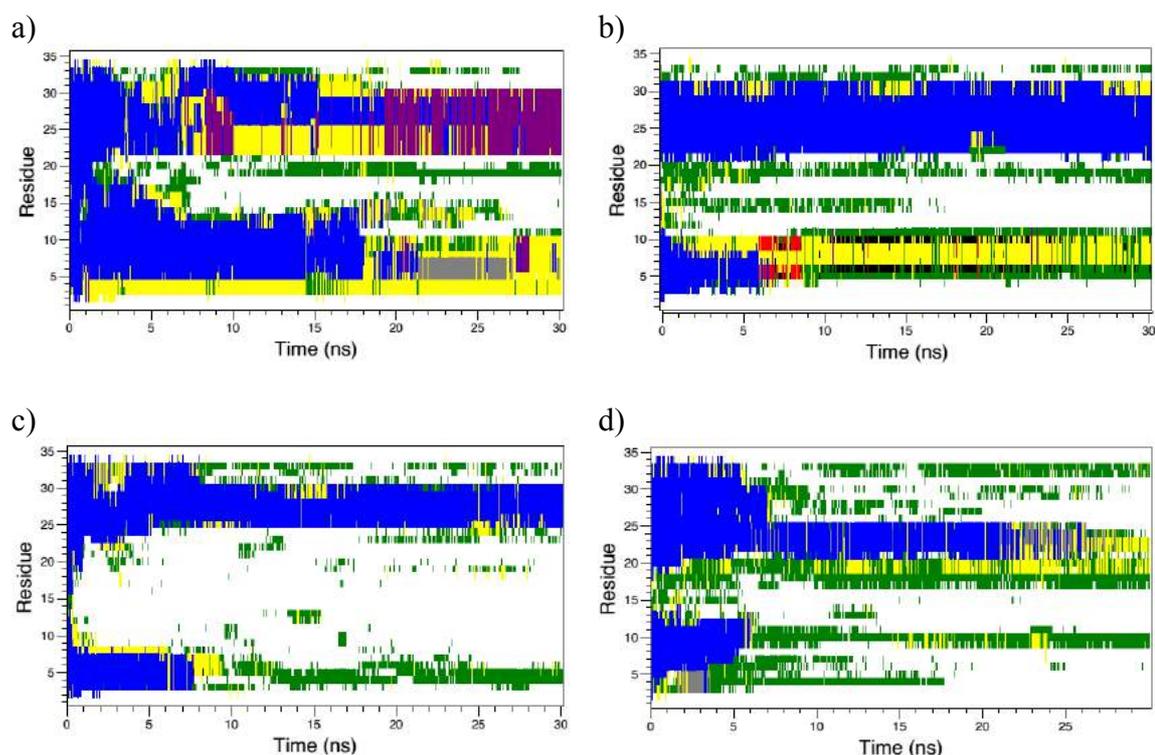


Figura 4.1.3 Mapas de estrutura secundária para grupo de simulações de peptídeo na superfície da membrana durante 30 ns. Foi utilizado o GROMOS 53a6, 0 mM, com restrições nas ligações de hidrogênio do peptídeo (restritas a 0,28-0,30 nm nos 5 ns iniciais) para membrana composta por: a) 100% POPC; b) 75% POPC; c) 75% POPG; d) 100% POPG. Legenda: hélice 3_{10} (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco).

Para o segundo conjunto de simulações exploratórias é observado que a estrutura helicoidal do peptídeo é mais persistente, quando comparado com o primeiro conjunto de

simulações, seja para as simulações do peptídeo na superfície (Sim2) ou imersos (Sim2i) na bicamada. Contudo, contrariamente às observações experimentais, o conteúdo de hélice é maior para o peptídeo em presença de bicamadas ricas em POPC que POPG para o caso das simulações do peptídeo na superfície da bicamada. Já as simulações do peptídeo imerso na bicamada são consistentes com as medidas experimentais, exibindo um maior conteúdo de hélice na presença de POPG e um decréscimo deste conteúdo na presença de POPC. No entanto, sistemas compostos por peptídeos imersos em membranas fosfolipídicas requerem longos períodos de simulações comparativamente aos sistemas constituídos por peptídeos localizados na interface água-membrana. Por esta razão é plausível assumir que o aumento do tempo de simulação para os sistemas Sim2i provavelmente resultaria no decréscimo do conteúdo de hélice também para o peptídeo em presença de POPG.

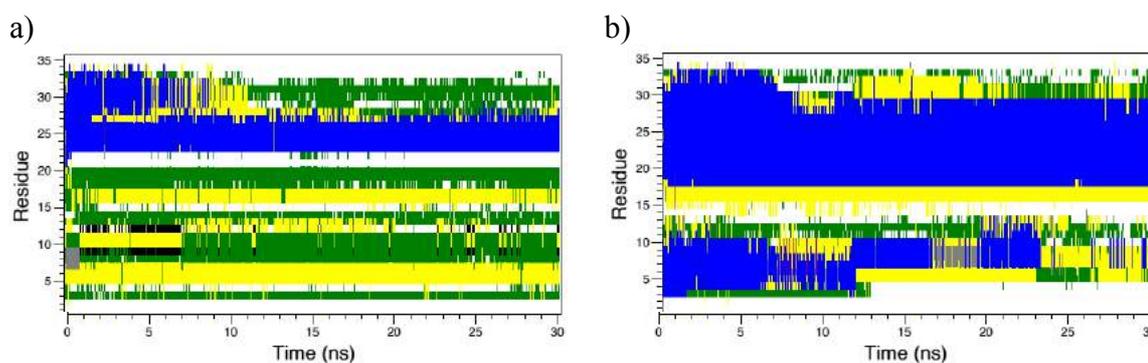


Figura 4.1.4 Mapas de estrutura secundária para grupo de simulações de peptídeo imerso na membrana durante 30 ns. Foi utilizado o GROMOS 53a6, 0 mM, com restrições nas ligações de hidrogênio do peptídeo (5 ns iniciais) para membrana composta por: a) 100% POPC; b) 100% POPG. Legenda: hélice 3_{10} (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco).

Durante o período em que estes resultados foram obtidos, uma re-parametrização do conjunto de parâmetros GROMOS53A6 foi publicada [179]. Conforme descrito na Metodologia (Capítulo 2), as modificações relevantes para os sistemas aqui estudados consistiram de novos valores para os ângulos diédricos ϕ e ψ e novos termos de repulsão para os grupos CO-NH do esqueleto da proteína. Embora o GROMOS 53A6 tenha sido desenvolvido para reproduzir as energias de hidratação de aminoácidos, este conjunto de parâmetros resultou na perda da estabilidade de hélices curtas, em especial em peptídeos. Portanto, novas simulações do peptídeo híbrido em solução assim como em presença de bicamadas compostas por diferentes concentrações de POPC e POPG foram realizadas usando

o novo conjunto de parâmetros GROMOS 54A7. Nas seções a seguir os resultados obtidos para este conjunto de simulações usando o GROMOS 54A7 serão apresentados e discutidos.

4.2. Simulações Contendo Uma Única Unidade do Peptídeo: Conformação do Peptídeo após Interação com a Bicamada

As simulações com o conjunto de parâmetros GROMOS54A7 foram realizadas tanto para o peptídeo na superfície (Sim3s) quanto imerso (Sim3i) em membranas contendo diferentes composições (100%POPC, 75%POPC:25%POPG; 25%POPC:75%POPG; 100%POPG), força iônica 0 M e uso de restrições do comprimento de ligações de hidrogênio entre grupos NH-CO do esqueleto da proteína durante o período de equilíbrio (5 ns) dos sistemas. A evolução temporal da estrutura secundária do peptídeo para estes sistemas mostra a presença de hélices mais estáveis na região C-terminal da sequência (Figuras 4.2.2-4.2.3). Os dois conjuntos de simulações Sim3s e Sim3i apresentam um conteúdo de hélice equivalente, com uma maior flexibilidade estrutural na região N-terminal. Esta região sofre variações conformacionais que levam a uma estrutura helicoidal desordenada. Todavia, mesmo com uma melhor reprodução das medidas experimentais de CD com relação ao conteúdo de hélice, o percentual de hélice em relação ao aumento da concentração de POPG na membrana não é alterado de forma significativa.

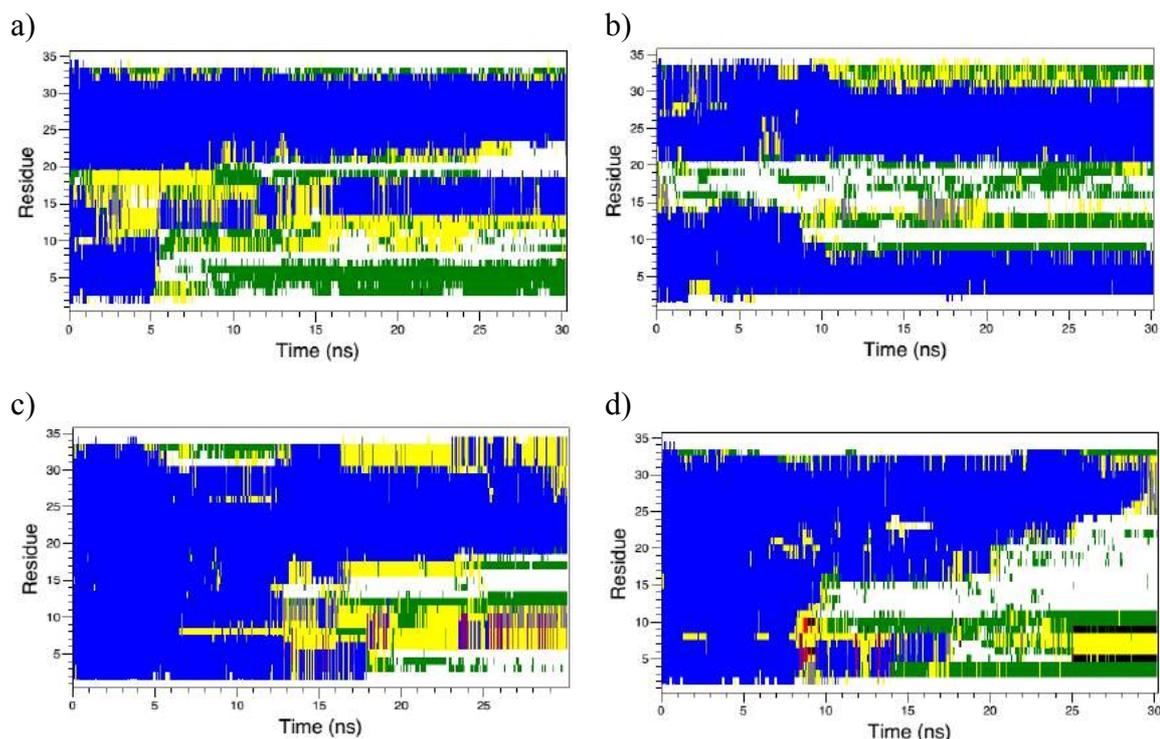


Figura 4.2.1 Mapas de estrutura secundária para grupo de simulações de peptídeo na superfície da membrana durante 30 ns. Foi utilizado o GROMOS 54a7, 0 mM, com restrições nas ligações de hidrogênio do peptídeo (5 ns iniciais) para membrana composta por: a) 100% POPC; b) 75% POPC; c) 75% POPG; d) 100% POPG. Legenda: hélice 3_{10} (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco).

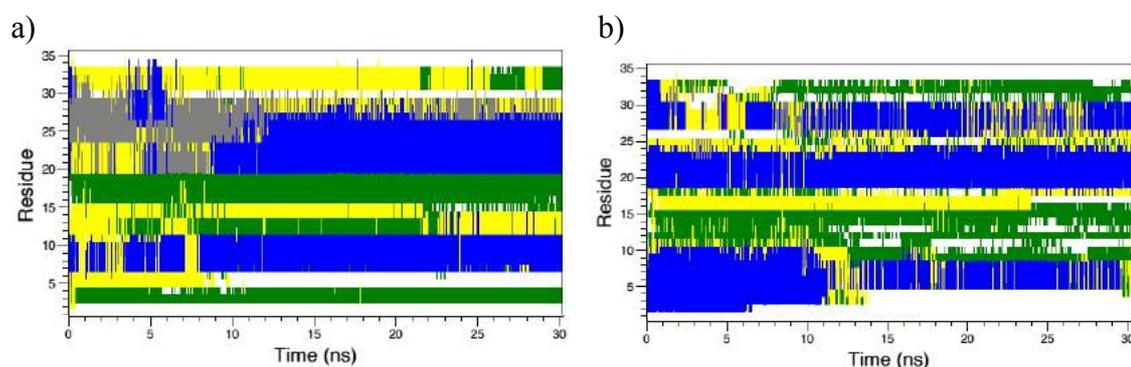


Figura 4.2.2 Mapas de estrutura secundária para grupo de simulações de peptídeo imerso na membrana durante 30 ns. Foi utilizado o GROMOS 54a7, 0 mM, com restrições nas ligações de hidrogênio do peptídeo (5 ns iniciais) para membrana composta por: a) 100% POPC; b) 100% POPG. Legenda: hélice 3_{10} (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco).

Um fator que não foi levado em consideração nas simulações apresentadas até aqui foi o efeito da força iônica. Os sistemas previamente descritos foram simulados em força iônica 0 M, com o número de íons adicionado ao sistema foi suficiente apenas para neutralizar a carga

total do soluto. O peptídeo híbrido possui um caráter catiônico com uma carga +7. Assim, foram realizadas novas simulações (Sim4s e Sim4i) sob condições idênticas aos sistemas Sim3s e Sim3i, exceto pelo valor da força iônica que foi ajustada para condições fisiológicas de 0,150 M. Íons Na^+ e Cl^- foram adicionados aos respectivos sistemas, de modo a estabelecer uma concentração de 0,150 M, como aquela utilizada nas medidas experimentais de CD realizadas para o peptídeo híbrido [3].

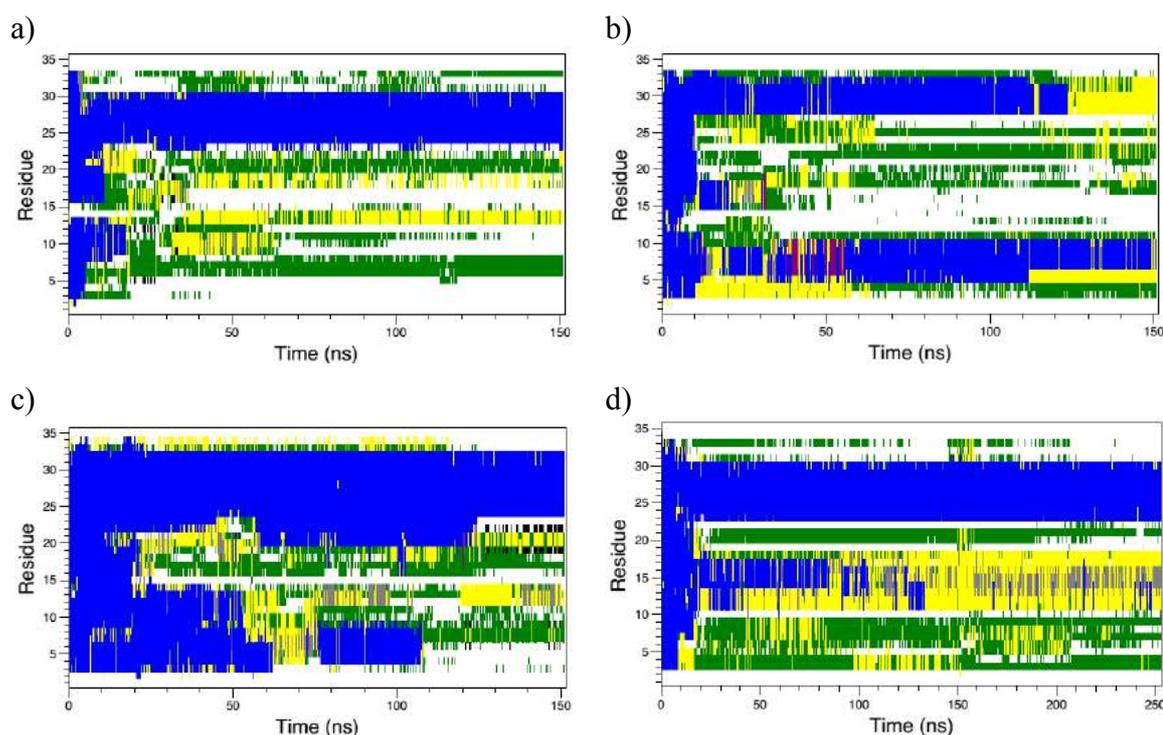


Figura 4.2.3 Mapas de estrutura secundária para grupo de simulações de peptídeo na superfície da membrana durante 150 ns (250 ns para caso 100% POPG). Foi utilizado o GROMOS 54a7, 150 mM, com restrições nas ligações de hidrogênio do peptídeo (5ns iniciais) para membrana composta por: a) 100% POPC; b) 75% POPC; c) 75% POPG; d) 100% POPG. Legenda: hélice 3_{10} (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco).

Os sistemas Sim4s e Sim4i (Figura 4.2.3 e Figura 4.2.4, respectivamente) exibem um comportamento mais consistente com as medidas experimentais de Archilla e Itri [3]. É possível observar um aumento do conteúdo de hélice em resposta ao aumento da concentração de POPG com relação à de POPC na bicamada. A região C-terminal adota uma conformação em hélice enquanto que a região N-terminal adota uma estrutura helicoidal desordenada. Mais à frente, as razões para esse comportamento serão apresentadas e discutidas. A evolução temporal da estrutura secundária do peptídeo imerso nas respectivas membranas é consistente a tendência de maior caráter de hélice para as simulações com maior número de lipídios

POPG. A grande quantidade de hélice- α para a simulação 100% POPG em comparação com o mesmo caso com o peptídeo na superfície é atribuída ao maior confinamento da cadeia peptídica. Isso diminuiu os graus de liberdade do peptídeo, fazendo com que as ligações de hidrogênio não se desestabilizem e mantenham boa parte da estrutura em hélice ao longo do tempo de simulação.

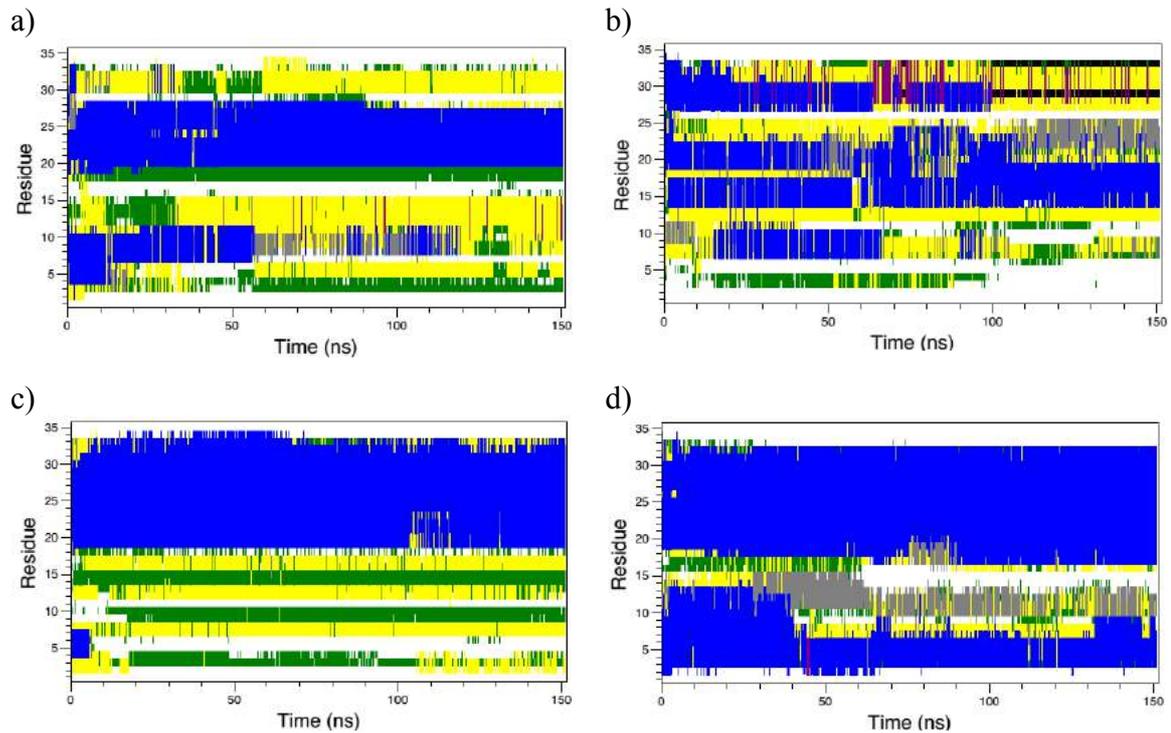


Figura 4.2.4 Mapas de estrutura secundária para grupo de simulações de peptídeo imerso na membrana durante 150 ns. Foi utilizado o GROMOS 54a7, 150 mM, com restrições nas ligações de hidrogênio do peptídeo (5 ns iniciais) para membrana composta por: a) 100% POPC; b) 75% POPC; c) 75% POPG; d) 100% POPG. Legenda: hélice 3_{10} (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco).

Com o peptídeo imerso na membrana, seus graus de liberdade diminuem favorecendo a presença da estrutura em hélice (mais estrutura em hélice em todas as membranas). Em particular, aliado à essa restrição de movimento, podemos observar a interação dos aminoácidos iniciais/terminais com a superfície da membrana POPG, induzindo o posicionamento e estrutura dos demais aminoácidos da cadeia. A estrutura em hélice estável em peptídeos antimicrobianos imersos na membrana é uma das características do mecanismo de formação de barril ou poro toroidal.

As análises da evolução temporal da estrutura secundária do peptídeo híbrido em presença de bicamadas de POPG:POPC puras e mistas permitiram definir um protocolo de

simulação capaz de reproduzir medidas experimentais disponíveis para os sistemas em consideração. Este protocolo (condições de simulação e conjunto de parâmetros GROMO54A7) foi utilizado para todas as simulações discutidas daqui em diante.

4.2.1 Caracterização das Bicamadas Fosfolipídicas Puras e Binárias

Como parte do processo de validação do protocolo de simulação proposto, foram também realizadas simulações de bicamadas (100%POPC, 75%POPC:25%POPG; 25%POPC:75%POPG; 100POPG) na ausência do peptídeo híbrido. Estas simulações fornecem uma estimativa da convergência de propriedades estruturais a partir da comparação entre valores calculados e medidos experimentalmente para bicamadas puras. Esta é uma etapa importante para garantir que cada bicamada tenha sido adequadamente equilibrada previamente a adição do peptídeo híbrido. Para isso, foram realizadas análises de área por cabeça de lipídio, potencial eletrostático da membrana, parâmetros de ordem e número de densidade. Posteriormente, estas análises foram realizadas para os sistemas contendo o peptídeo híbrido visando investigar o efeito do peptídeo sobre estrutura, dinâmica e potencial eletrostático das bicamadas puras e mistas. As Figuras 4.2.5 e 4.2.7 mostram a evolução da área por cabeça para os 15 ns finais das simulações sem e com peptídeo na superfície, respectivamente, para solução 150 mM NaCl.

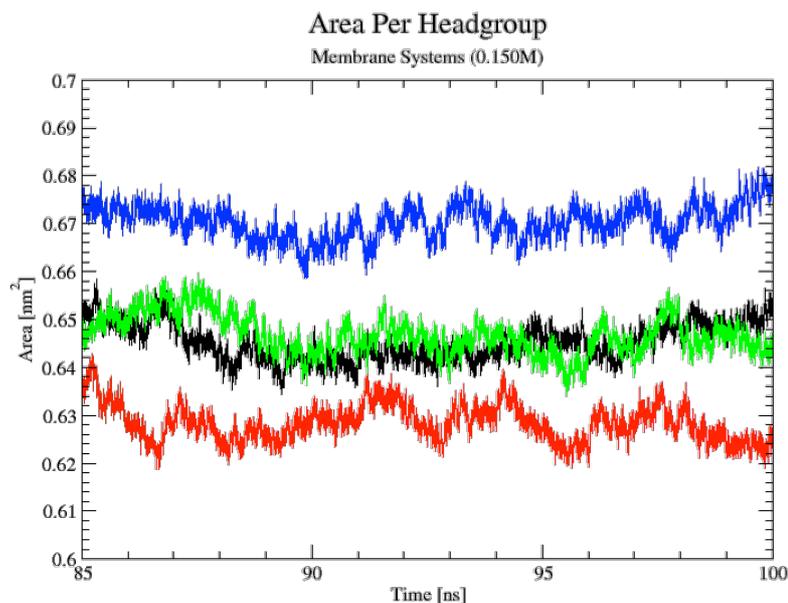


Figura 4.2.5 Evolução da área por cabeça de lipídio nos 15 ns finais para as simulações das membranas isoladas. Legenda: 100% POPC (azul), 75% POPC (verde), 75% POPG (vermelho) e 100% POPG (preto). Valores de referência: 0,54-0,68 nm² (POPC) e 0,55-0,67 nm² (POPG) [180–183].

Os valores calculados da área por cabeça exibem uma maior flutuação para os sistemas binários, sem convergir completamente ao final de 100 ns (Figura 4.2.5). No entanto, a variação dos valores calculados é pequena, e está dentro da variação dos valores experimentais obtidos por diferentes grupos [180–183]. Esse comportamento indica uma termalização satisfatória das bicamadas para que possam ser usadas em simulações contendo o peptídeo híbrido. É possível notar, também, um comportamento de diminuição da área por cabeça, à medida que aumentamos gradativamente a quantidade de POPG da membrana: o caso em que a membrana é formada apenas por POPC apresenta área em torno de $67,8 \pm 0,1 \text{ \AA}^2$; na membrana composta por 75% de POPC e 25% de POPG, esse valor cai para $65,6 \pm 0,1 \text{ \AA}^2$; e na membrana com apenas 25% de POPC, esse valor cai ainda mais ($63,6 \pm 0,1 \text{ \AA}^2$). A exceção ocorre quando a membrana não apresenta lipídios POPC (100% POPG). Nesse caso, a área aumenta para em torno de $65,6 \pm 0,1 \text{ \AA}^2$, valor ainda abaixo da medida para 100% de POPC [180–183]. A explicação para essa mudança na “tendência” está nas interações lipídio-lipídio da membrana, mais precisamente nas ligações eletrostáticas que as cabeças dos lipídios podem formar. No caso dos lipídios POPG, os hidrogênios do grupo glicerol e os oxigênios grupo fosfato da cabeça do peptídeo se atraem eletrostaticamente. Isso torna esse tipo de interação mais forte e permite com que as cabeças dos lipídios fiquem mais próximas umas das outras já que estão “dobradas” em comparação ao caso 100% POPC. Por outro lado, nas interações POPC-POPG, há a formação de interações intermoleculares: hidrogênio da região

glicerol do POPG é atraído pelos oxigênios do grupo fosfato do POPC. Esse tipo de interação aproxima ainda mais as cabeças lipídicas, diminuindo de forma significativa a área por cabeça de lipídio, como pode ser observado no gráfico da Figura 4.2.5. A Figura 4.2.6 representa essas interações intramoleculares (POPG-POPG) e intermoleculares (POPC-POPG).

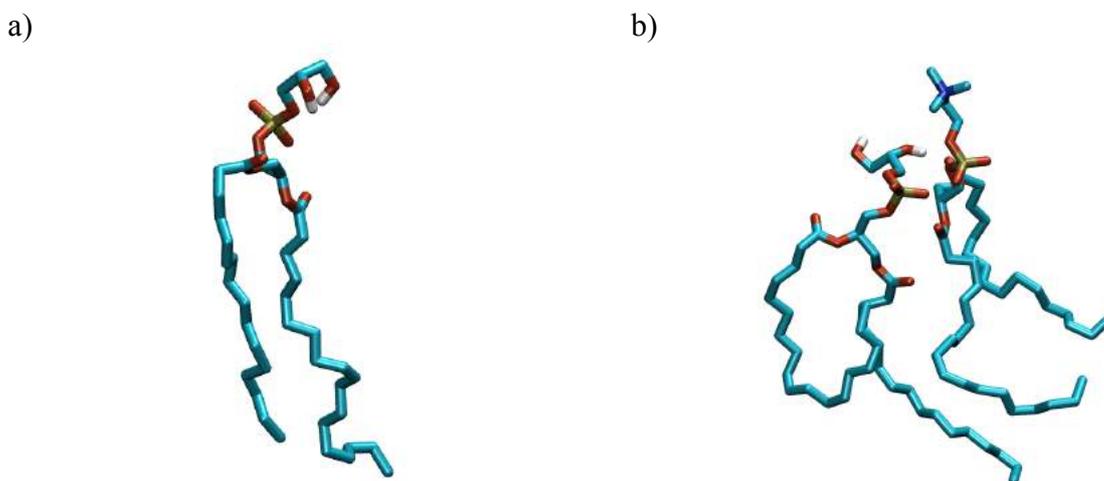


Figura 4.2.6 Representação das interações intramoleculares no POPG (a) e intermoleculares POPC:POPG (b). O hidrogênio do grupo glicerol do POPG sofre atração eletrostática com os oxigênios do grupo fosfato dos lipídios.

Observações análogas foram previamente descritas na literatura interações lipídio-lipídio [182, 184, 185]. Janosi e Gorfe também realizaram simulações de bicamadas POPC:POPG utilizando o CHARMM para comparar com os resultados experimentais da literatura [186]. Eles encontraram que as propriedades estruturais médias das misturas binárias (área por cabeça, espessura da membrana) permaneceram praticamente as mesmas que a bicamada de POPC puro. O mesmo comportamento foi observado para os parâmetros de ordem. Entretanto, diferenças foram encontradas no comportamento das cabeças dos lipídios, devido ao potencial de formação de ligações de hidrogênio (intramolecular e interlipídios) das moléculas de POPG [185].

Esses dados são importantes à medida que mostram que lipídios negativamente carregados integrantes de membranas com lipídios não-carregados contribuem para preservar a estrutura da bicamada. Porém, eles também alteram o potencial de reatividade da superfície, permitindo formação de sítios de interações eletrostáticas mais fortes com compostos positivamente carregados, por exemplo. Essas condições tornam-se particularmente interessantes para interações com peptídeos catiônicos. A Figura 4.2.7 a seguir mostra o efeito na área por cabeça de lipídio causado pela proximidade e interação com o peptídeo híbrido catiônico.

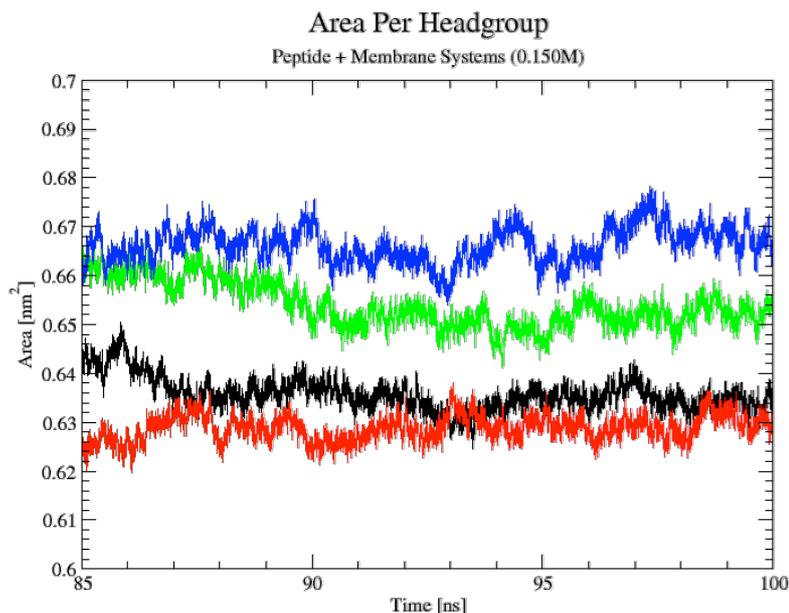


Figura 4.2.7 Evolução da área por cabeça de lipídio nos 15 ns finais para as simulações das membranas interagindo com peptídeo na superfície. Legenda: 100% POPC (**azul**), 75% POPC (**verde**), 75% POPG (**vermelho**) e 100% POPG (**preto**). Valores de referência: 0,54-0,68 nm² (POPC) e 0,55-0,66 nm² (POPG) [180–183].

Na membrana composta apenas por POPC, não houve mudanças significativas na área por cabeça ($66,661 \pm 0,003 \text{ \AA}^2$). O caráter positivo do grupo colina das cabeças dos lipídios faz com que a interação com o peptídeo catiônico seja mais fraca, afetando pouco a estrutura da membrana em si. No caso oposto, 100% POPG, houve uma razoável diminuição da área ($63,573 \pm 0,003 \text{ \AA}^2$) causada pela aproximação entre os lipídios devido às interações (discutidas na subseção 4.2.2) com peptídeo na superfície. As demais simulações mostraram mudanças sutis na área por cabeça, porém nenhuma alteração significativa. Foi analisado, também, o efeito da presença do peptídeo catiônico sobre o potencial eletrostático transmembrana (Figura 4.2.8) em relação ao eixo z da caixa. O potencial eletrostático muda de maneira significativa na presença do peptídeo quando o percentual de POPG é maior na bicamada lipídica. Trata-se de um fenômeno esperado, pois o lipídio é carregado negativamente. Na membrana de POPC, o efeito eletrostático é minimizado devido à carga neutra (zwitteriônica) desse tipo de lipídio.

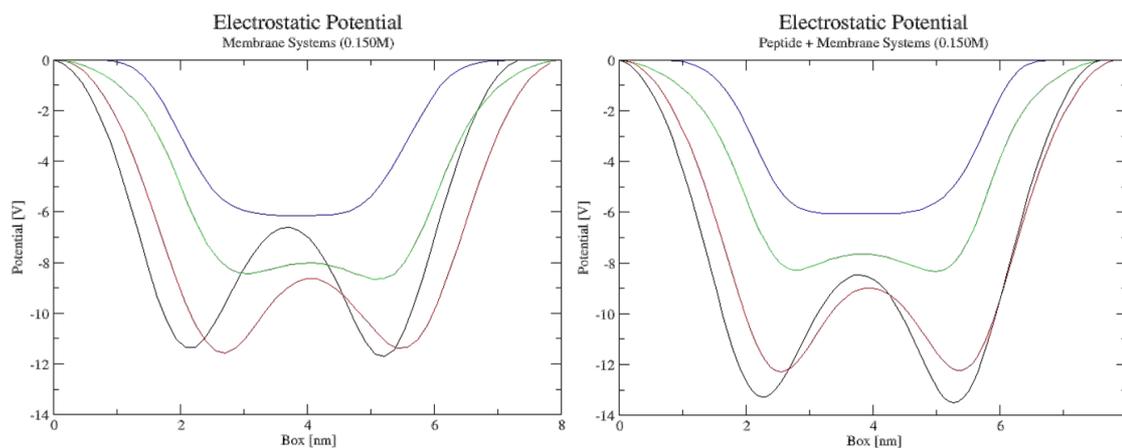


Figura 4.2.8 Potencial eletrostático em relação ao eixo z dos sistemas com membranas isoladas (à esquerda) e membranas com peptídeo interagindo na superfície (à direita). As cabeças dos lipídios da membrana superior e da inferior ocupam a região por volta de 2-3 nm e 5-6, respectivamente. As cadeias alifáticas estão posicionadas entre 3 e 5 nm. As moléculas de água se distribuem fora dessa região. Legenda: 100% POPC (azul), 75% POPC (verde), 75% POPG (vermelho) e 100% POPG (preto).

Análises da densidade dos grupos funcionais, ao longo do eixo normal à membrana, foram realizadas para as bicamadas tanto na ausência quanto na presença do peptídeo (Figuras 4.2.9-4.2.10). Todos os sistemas exibem uma estrutura lamelar com um padrão estrutural muito similar. As moléculas de água estão confinadas na região hidrofílica formada pelos grupamentos glicerol e pelos grupos PO_4 , os quais constituem a cabeça dos lipídios. A região hidrofóbica também é bem definida em todos os casos: as cadeias de CH_3 , CH_2 e CH_1 ao longo da região central da caixa, onde estão afastadas das moléculas de água. Em todos os casos, na ausência de peptídeo, a caixa possui uma distribuição aproximadamente simétrica de seus constituintes. Uma comparação dos perfis de densidade de grupos no início (0 a 50 ns) e final (200 a 250 ns) da simulação foi realizada para identificar possíveis eventos e/ou migrações de componentes do sistema. Esta comparação é apresentada na simulação do peptídeo em contato com a superfície da bicamada contendo apenas POPG (Figura 4.2.10). Observa-se que não houve mudanças significativas na estrutura da bicamada lipídica. A única região que apresenta alguma variação corresponde aos grupos glicerol e PO_4 , possivelmente devido à atração eletrostática. Já aproximação do peptídeo é indicada pelo deslocamento da região que o representa (curva cinza) em direção aos grupos PO_4 da membrana (Figura 4.2.10).

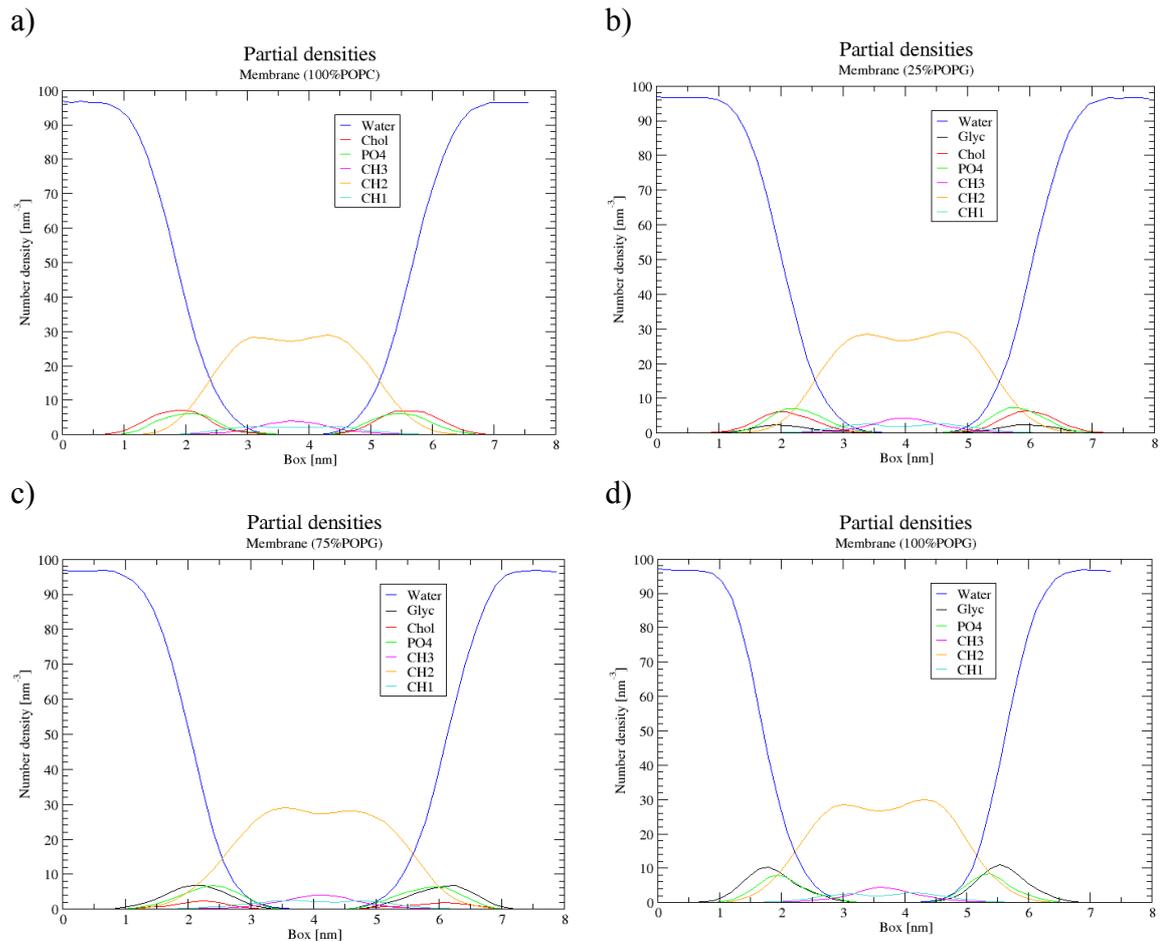


Figura 4.2.9 Densidade em número para as simulações das membranas sem interação com peptídeos. a) 100% POPC; b) 75% POPC; 75% POPG; d) 100% POPG. Legenda: água (azul); grupo glicerol (preto); PO₄ (verde); CH₃ (rosa); CH₂ (laranja) e CH₁ (azul claro).

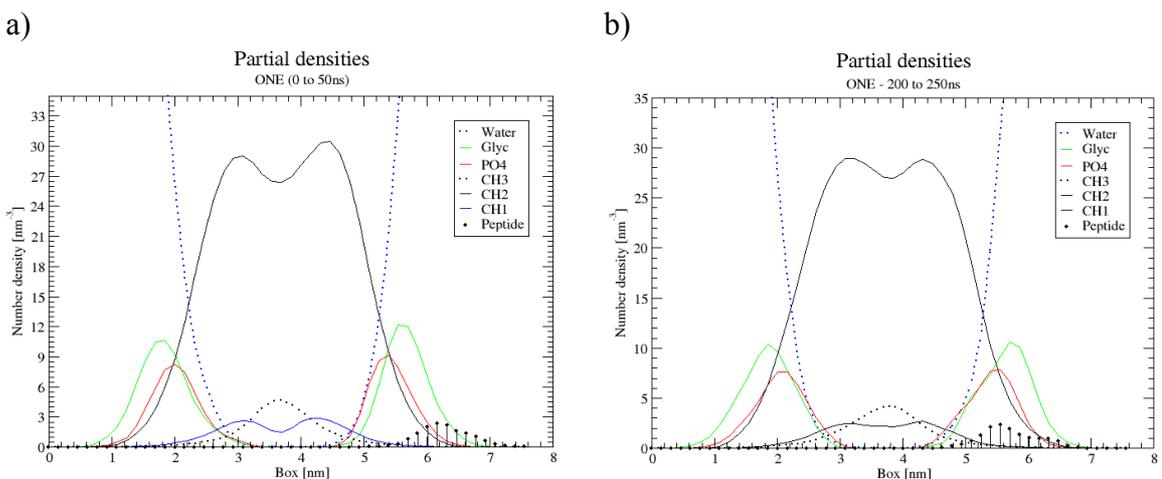


Figura 4.2.10 Densidade em número para o sistema de um peptídeo interagindo com a membrana de 100% POPG durante: a) 0 a 50 ns; b) 200 a 250 ns de simulação.

Os parâmetros de ordem para as cadeias acila dos lipídios foram calculados para estimar o grau de desordem e fluidez das bicamadas, em especial em presença do peptídeo.

Foram analisadas as simulações contendo bicamadas compostas por apenas um tipo de fosfolípido (100% POPC vs. 100% POPG) para observar o grau de ordenamento dos carbonos das cadeias palmitoil (sn1) e oleila (sn2) em cada uma destes sistemas. As análises foram realizadas ao longo dos 10 ns iniciais e finais (Figuras 4.2.11-4.2.12).

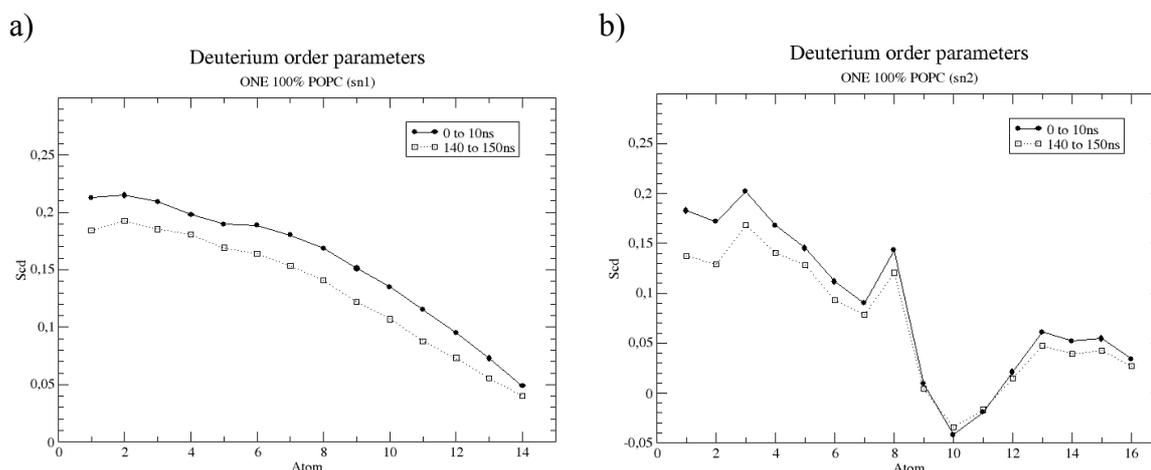


Figura 4.2.11 Gráficos de parâmetros de ordem para as cadeias palmitoil (a) e oleila (b) dos lipídios nas simulações de um peptídeo com membrana 100% POPC.

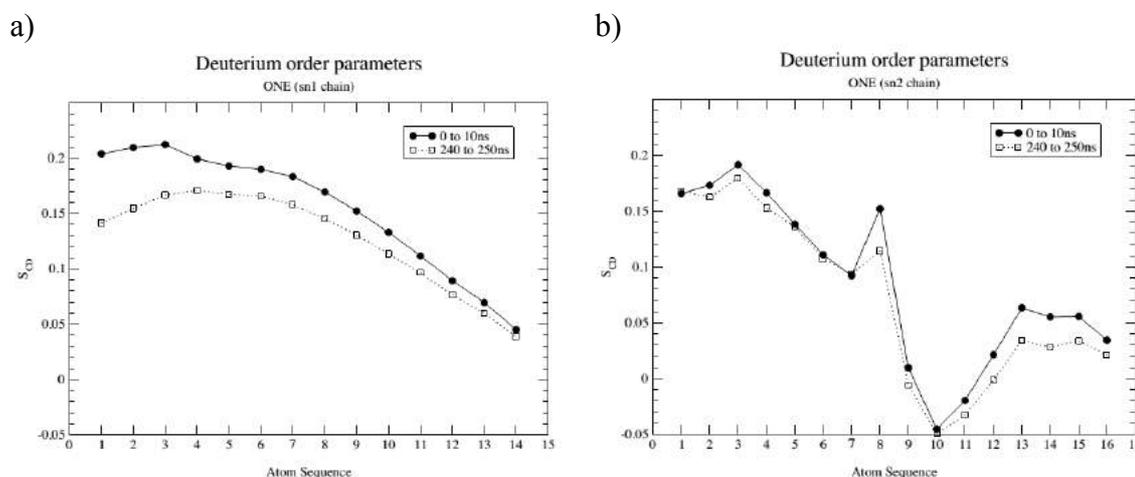


Figura 4.2.12 Gráficos de parâmetros de ordem para as cadeias palmitoil (a) e oleila (b) dos lipídios nas simulações de um peptídeo com membrana 100% POPG.

Todos os gráficos das Figuras 4.2.11 e 4.2.12 refletem basicamente a mesma essência: ao fim da simulação as cadeias estão um pouco mais desordenadas. Esse comportamento é esperado, pois ao longo da simulação, a membrana vai se equilibrando e as cadeias (antes bem próximas e colapsadas) relaxam e adquirem maior grau de liberdade. Outro fato também esperado é o maior grau de desordem das extremidades das cadeias, uma vez que os últimos átomos possuem maior liberdade. Nas cadeias oleila, o aumento da ordem no átomo 8 da

cadeia é devido à ligação dupla (cadeia insaturada) que esse átomo realiza, o que diminui seus movimentos, aumentando o ordenamento dessa região específica. Esses fenômenos são essencialmente associados à equilibração da membrana lipídica, pois o efeito causado pela interação de apenas uma unidade do peptídeo é muito fraco.

4.2.2 Simulações de Uma Unidade do Peptídeo em Solução

Simulações do peptídeo em solução contendo NaCl 0 M e 0,150 M foram realizadas para verificar as possíveis diferenças em relação às simulações com interação com membrana. O peptídeo híbrido adota uma conformação estável que se mantém ao longo de 50 ns em condições de NaCl 0 M e 0,150 M. Nesta conformação, a região C-terminal adota uma estrutura em hélice enquanto a região N-terminal do peptídeo é desordenada. Esta conformação é similar àquela adotada pelo peptídeo na presença da bicamada. A priori, o peptídeo exibe um maior percentual de hélice em força iônica de 0 M do que para 0,150 M (Figure 4.2.13).

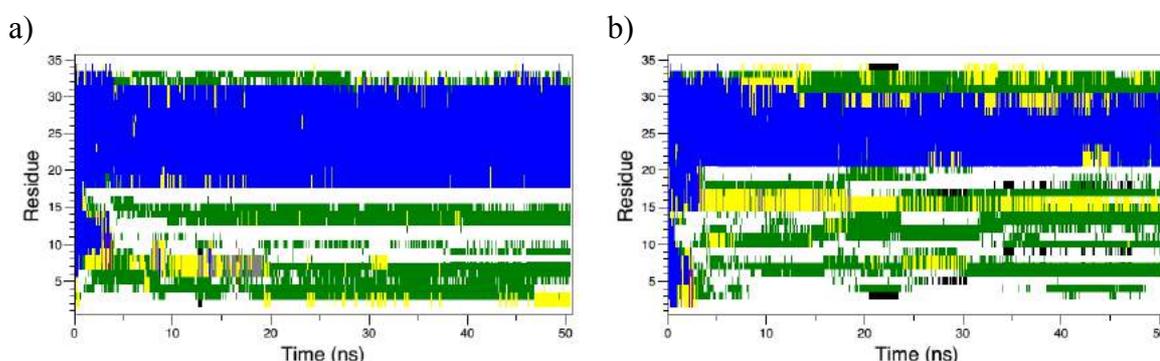


Figura 4.2.13 Mapas de estrutura secundária para grupo de simulações de peptídeo isolado durante 50ns. Foi utilizado o GROMOS 54a7 sem restrições nas ligações de hidrogênio do peptídeo para meio com concentração adicional de NaCl de: a) 0 M; b) 0,150 M. Legenda: hélice 3_{10} (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco).

Entretanto, os resultados experimentais indicavam o resultado oposto. Então, com objetivo de verificar se o peptídeo em solução 0 M NaCl estava no mínimo global, foi feita a análise de arrefecimento simulado. O resultado mostrou que a estrutura obtida inicialmente não era a de menor energia e uma nova estrutura foi observada, como mostrado no mapa de estrutura secundária da Figura 4.2.14 (onde é também comparado com a estrutura do peptídeo em solução de 150 mM NaCl):

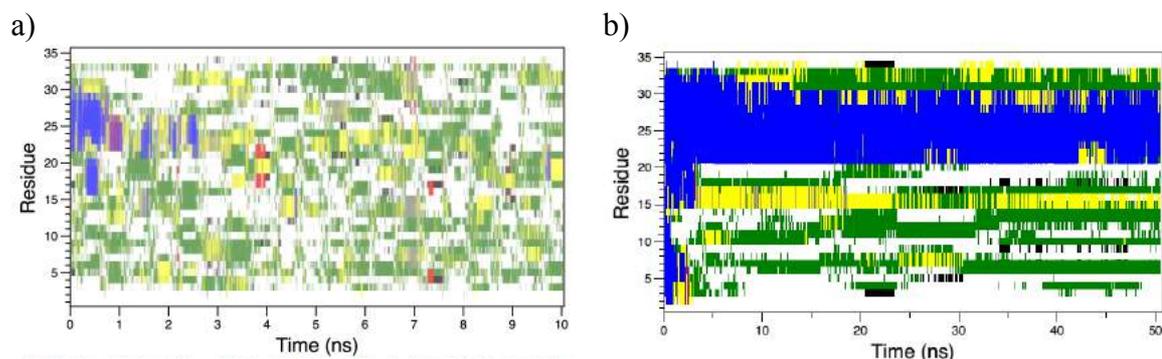


Figura 4.2.14 Mapas de estrutura secundária para grupo de simulações de peptídeo isolado. Foi utilizado o GROMOS 54a7 sem restrições nas ligações de hidrogênio do peptídeo para meio com concentração adicional de NaCl de: a) 0 M com arrefecimento simulado – 10 ns finais; b) 0,150 M – 50 ns. Legenda: hélice 3_{10} (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco).

Logo, como evidenciado pelo aumento da estrutura em hélice ao adicionar NaCl ao peptídeo em solução (Figura 4.2.14), com o procedimento computacional adotado foi possível reproduzir as observações experimentais para esse tipo de solução.

As medidas experimentais de CD indicam que o peptídeo adota uma conformação mais ordenada ao interagir com as bicamadas comparativamente à solução. Este ordenamento é mais pronunciado para bicamadas compostas por POPG. Nossas simulações reproduzem esta tendência com o peptídeo em solução exibindo um maior número de resíduos em regiões desordenadas (Figura 4.2.14), quando comparados ao peptídeo em presença das bicamadas contendo POPG (Figures 4.2.3d-4.24d) mais ordenado. A composição da bicamada lipídica influencia a estrutura secundária do peptídeo híbrido, em especial nos casos com maior quantidade de POPG. A explicação para esse efeito é devida ao maior número de interações sequenciais entre lisinas com os grupamentos da cabeça do lipídio POPG, o que favorece a conformação em hélice na região C-terminal do peptídeo. Além disso, nessa configuração o triptofano (W18) fica preso à superfície da membrana (menor polaridade) desde o início da simulação.

Enquanto isso, na interação do peptídeo com a membrana contendo apenas lipídios POPC, essas interações sequenciais entre lisinas não ocorrem. Neste caso, formam-se pares de interações entre aminoácidos (N6-T9, S14-K33), levando o peptídeo a uma configuração mais estável. Durante parte da simulação, o triptofano fica exposto a moléculas de água (maior polaridade). Essa observação está de acordo com os resultados observados experimentalmente (ou seja, a ocorrência de *blue shift*) [3].

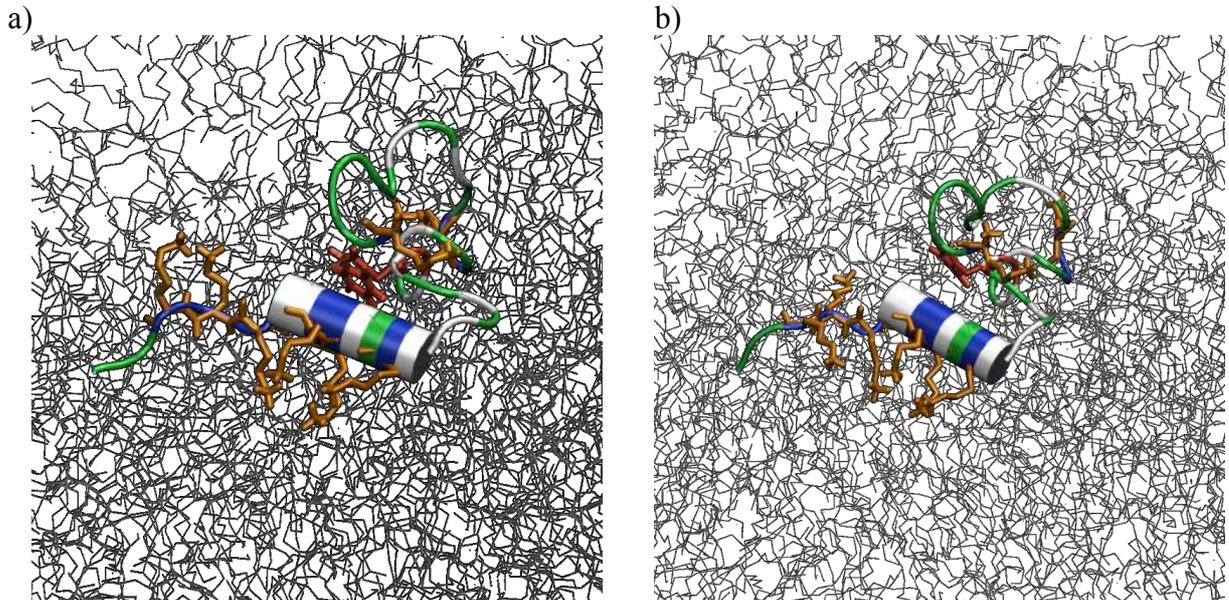


Figura 4.2.15 Representação da interação do peptídeo com a superfície da membrana 100% POPG no: a) início da simulação; b) fim da simulação. Lisinas são mostradas em laranja, triptofano em vermelho e membrana em cinza. Moléculas de água e íons foram omitidos para melhor visualização.

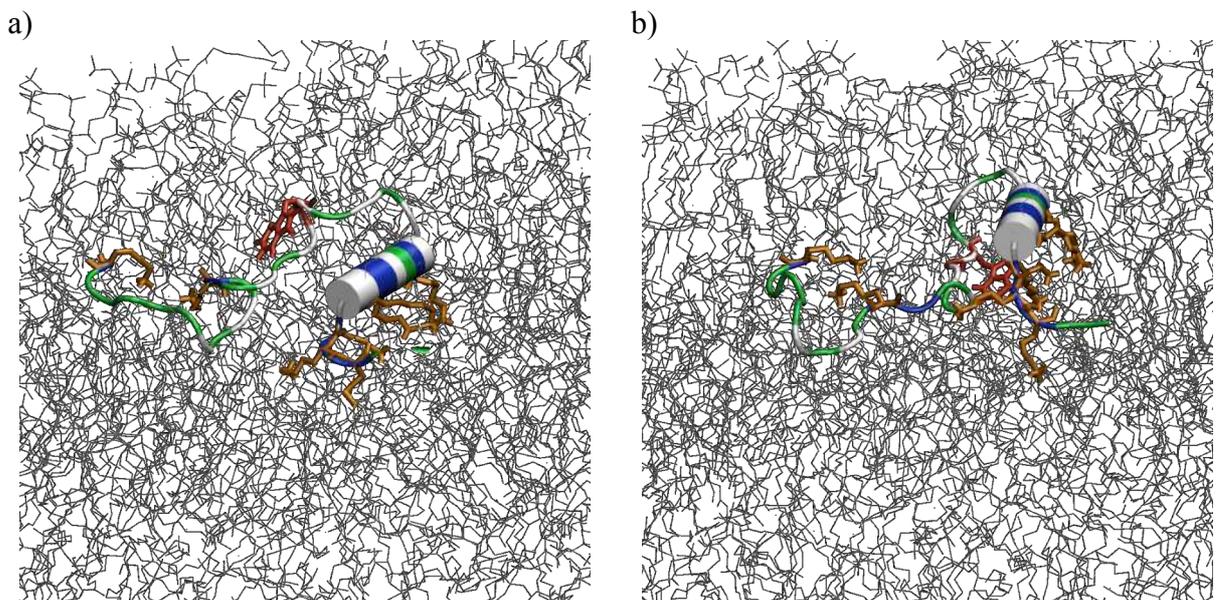


Figura 4.2.16 Representação da interação do peptídeo com a superfície da membrana 100% POPC no: a) início da simulação; b) fim da simulação. Lisinas são mostradas em laranja, triptofano em vermelho e membrana em cinza. Moléculas de água e íons foram omitidos para melhor visualização.

As interações eletrostáticas entre o peptídeo e as diferentes membranas influenciam na estrutura secundária do peptídeo, fazendo-o apresentar maior caráter helicoidal ao interagir com membranas contendo maior percentual de POPG em sua estrutura. Uma vez conhecido e discutido esse fenômeno, procurou-se estudar outras propriedades desses sistemas em busca de informações que permitissem a elucidação do mecanismo de ação desse peptídeo. Uma

dessas propriedades estudadas foi a direção de inserção do peptídeo no interior das membranas.

4.3. Simulações Contendo Duas Unidades do Peptídeo: Preferência de Inserção do Peptídeo na Bicamada

Simulações contendo duas unidades do peptídeo híbrido imersas na membrana (Sim2u) foram realizadas para investigar a preferência de inserção (se através da região C-terminal ou N-terminal) em bicamadas constituídas por um único tipo de fosfolípido (100% POPC e 100% POPG) (Figura 3.1.3.). Cada simulação consistiu de duas unidades do peptídeo inseridas em lados opostos da bicamada de POPC ou POPG via região N-terminal (DOWN) ou C-terminal (UP). Foram realizadas análises de distância de centro de massa entre o centro de massa de cada região e o centro de massa da bicamada, com o objetivo de quantificar esse fenômeno de afastamento. Os gráficos a seguir mostram a evolução deste deslocamento para a simulação com a membrana de POPC.

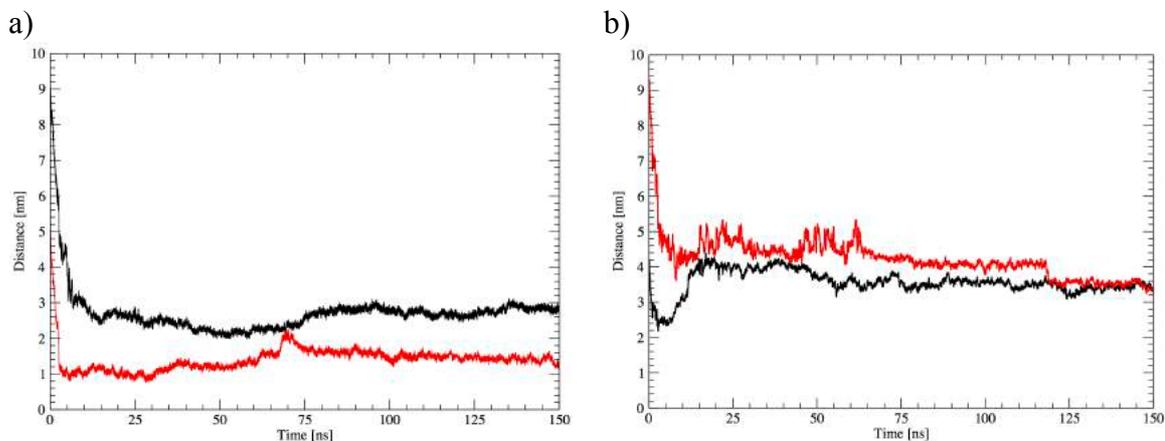


Figura 4.3.1 Evolução da distância entre centro de massa da membrana de 100% POPC e o centro de massa da região: a) N-terminal; b) C-terminal de cada peptídeo. A região N-terminal corresponde a uma lisina (K1) e a região C-terminal, uma glicina (G35). A curva em **preto** corresponde ao peptídeo *UP*; em **vermelho**, o peptídeo *DOWN*.

A evolução temporal da distância entre os centros de massa dos aminoácidos N-terminal e C-terminal com relação ao centro de massa da bicamada de POPC mostra a aproximação da extremidade N-terminal do peptídeo *UP* da superfície da membrana (painel a) e o deslocamento da região C-terminal do interior da membrana (painel b). O procedimento acontece de modo análogo com o peptídeo *DOWN*: a região N-terminal inicialmente imersa

na membrana é levemente expelida do interior da camada lipídica, afastando-se do centro de massa da membrana (painel a). A região C-terminal aproxima-se do interior membrana e, ali, fica presa devido às interações já observadas com a simulação de um peptídeo. A Figura 4.3.2 ilustra esse deslocamento comparando a configuração inicial com a configuração final da caixa.

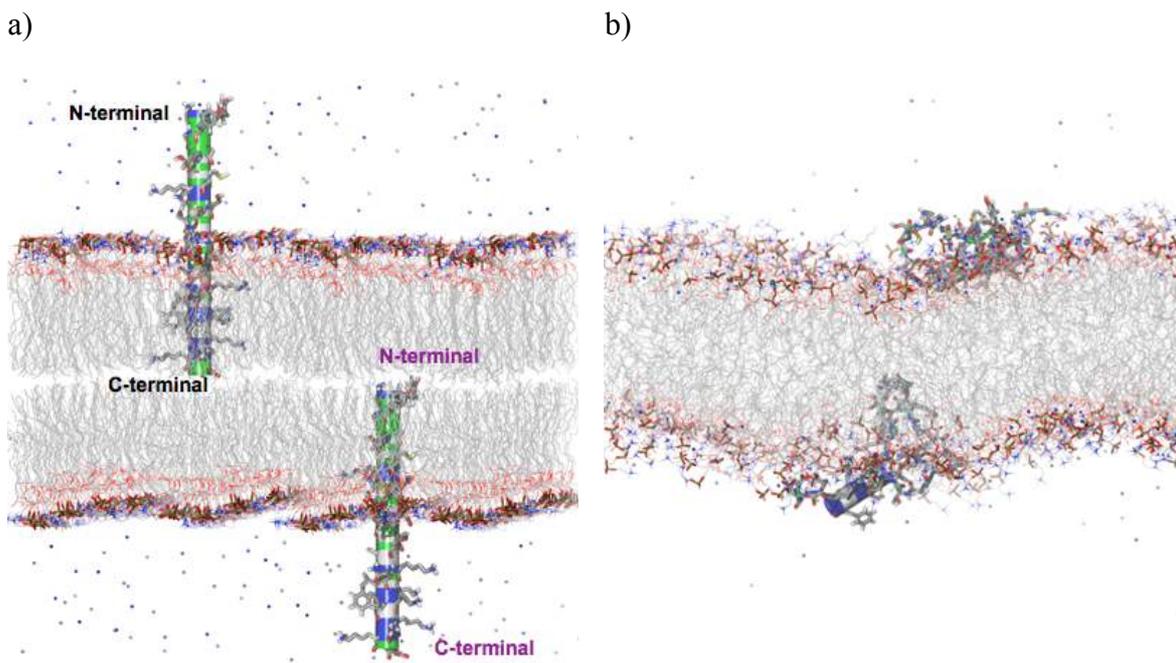


Figura 4.3.2 Representação gráfica do início (a) e do final (b) da simulação com duas unidades do peptídeo na membrana 100% POPC. Os dois peptídeos foram expulsos do interior da membrana. Moléculas de água e íons foram omitidos para melhor visualização.

Foram também analisadas a evolução da estrutura secundária de ambos os peptídeos (Figura 4.3.3.). Os padrões observados se assemelham ao da simulação com um peptídeo, em especial para a unidade com a região N-terminal inicialmente imersa. Neste caso, por ter sido expelido de forma mais rápida, o peptídeo passou a interagir apenas com a superfície exatamente como o caso do peptídeo isolado em 100% POPC.

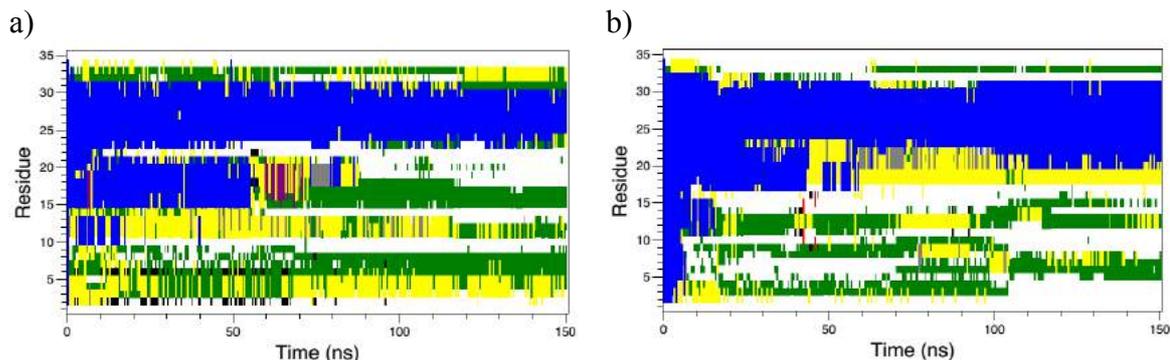


Figura 4.3.3 Mapas de estrutura secundária para simulação de dois peptídeos parcialmente imersos na membrana de 100% POPC. Região imersa: a) N-terminal; b) C-terminal. Legenda: hélice 3_{10} (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco).

Da mesma maneira, foi realizada a simulação com os peptídeos parcialmente imersos, agora, na membrana contendo apenas lipídios POPG. A ideia consiste em analisar se o mesmo padrão de expulsão dos peptídeos é observado ou não, buscando as possíveis explicações. Os gráficos da Figura 4.3.4 já indicam um padrão de comportamento diferente para, pelo menos, um dos peptídeos.

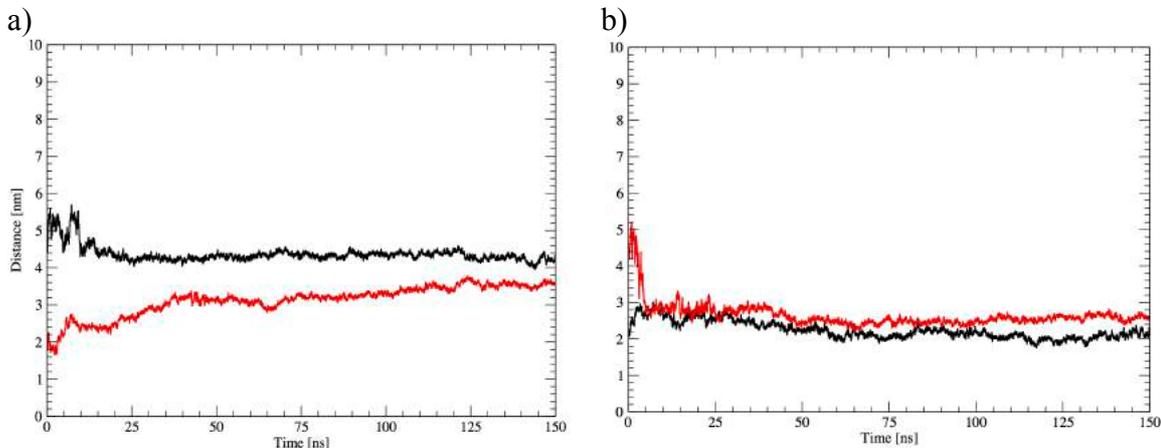


Figura 4.3.4 Evolução da distância entre centro de massa da membrana de 100% POPG e o centro de massa da região: a) N-terminal; b) C-terminal de cada peptídeo. A região N-terminal corresponde a uma lisina (K1) e a região C-terminal, uma glicina (G35). A curva em preto corresponde ao peptídeo *UP*; em vermelho, o peptídeo *DOWN*.

O peptídeo *DOWN* (região N-terminal imersa no começo da simulação) é deslocado de forma mais rápida para o exterior da membrana como pode ser visualizado no gráfico (a) da Figura 4.3.4. Esse movimento de saída do centro hidrofóbico é acompanhado por um deslocamento da porção C-terminal em direção à superfície de POPG (b). Esse deslocamento é governado pela atração eletrostática do peptídeo com os grupamentos carregados

negativamente da superfície. Na configuração final, o peptídeo forma uma configuração em ‘V’, com duas hélices separadas pelos resíduos que definiam a parte imersa e a parte externa à membrana. O outro peptídeo, entretanto, permanece com sua região C-terminal dentro da membrana e, como o gráfico (a) indica, penetra mais um pouco, se aproximando ainda mais do centro de massa da membrana. Esse movimento é acompanhado pela região N-terminal que se aproxima mais, passando a interagir com os grupamentos carregados da superfície. A Figura 4.3.5 mostra a disposição dos peptídeos no início e no fim da simulação.

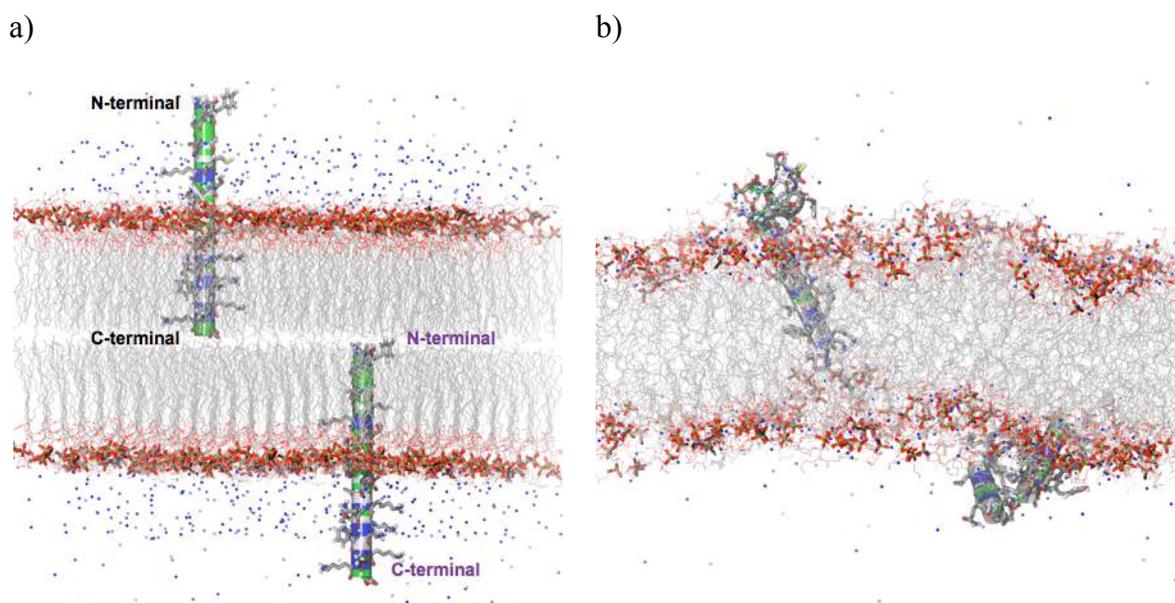


Figura 4.3.5 Representação gráfica do início (a) e do final (b) da simulação com duas unidades do peptídeo na membrana 100% POPG. Apenas o peptídeo *DOWN* foi expulso do interior da membrana. O peptídeo *UP* permanece com sua região C-terminal no interior da membrana. Moléculas de água e íons foram omitidos para melhor visualização.

Visualmente, nota-se que um dos peptídeos saiu da região interna da membrana. Trata-se da unidade cuja região N-terminal estava imersa no início da simulação. Já o outro peptídeo permaneceu com sua parte C-terminal imersa ao longo de toda a simulação. De modo similar ao caso com membrana 100% POPC, foram calculadas as distâncias entre os centros de massa das regiões terminais para o centro de massa da membrana.

A evolução da estrutura secundária dos peptídeos foi feita para auxiliar no entendimento desse comportamento. A Figura 4.3.6 mostra os mapas dessa evolução e indicam que as composições em hélice das estruturas para os dois peptídeos são maiores que nas simulações com a bicamada lipídica 100% POPC. Mais uma vez, há concordância com as

observações realizadas para as simulações com apenas uma unidade do peptídeo e com os dados experimentais.

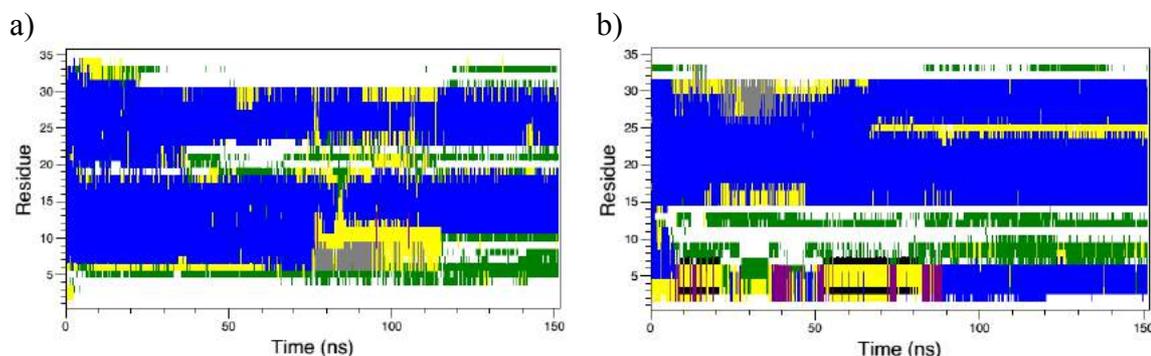


Figura 4.3.6 Mapas de estrutura secundária para simulação de dois peptídeos parcialmente imersos na membrana de 100% POPG. Região imersa: a) N-terminal; b) C-terminal. Legenda: hélice 3_{10} (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco).

Na configuração *UP* (porção C-terminal imersa no início da simulação), a região helicoidal composta pelos aminoácidos K33, G34 e G35 sofre desenovelamento para interagir com os grupos carregados das cabeças dos lipídios ao longo da superfície, formando uma espécie de âncora, enquanto a região C-terminal permanece perpendicular ao plano da membrana. A ligação das regiões C e N-terminal do peptídeo à superfície da membrana é governada por interações eletrostáticas entre aminoácidos positivamente carregados e os grupos carregados negativamente nas cabeças dos lipídios. A porção N-terminal do peptídeo possui um maior caráter hidrofílico e é composta por resíduos aceptores e doadores de ligação de hidrogênio (tirosina, cisteína e serina, por exemplo), favorecendo interações com as cabeças lipídicas. Devido a estas características, a região N-terminal é deslocada da região hidrofóbica da membrana (centro) em direção à superfície carregada. A conformação em hélice otimiza a distribuição de carga das lisinas na região C-terminal. Além disso, a grande flexibilidade dos resíduos lisina permite otimizar o número de interações entre estes resíduos e a superfície da membrana. Este comportamento não é observado para a região N-terminal do peptídeo devido ao pequeno número de resíduos positivamente carregados nesta região.

O conjunto de simulações contendo duas unidades do peptídeo híbrido imersos em bicamadas de POPG ou POPC mostrou que a região C-terminal possui uma maior tendência de penetração na membrana do que a porção N-terminal. Após a inserção da região C-terminal, ocorre um desenovelamento parcial da estrutura em hélice permitindo a interação de aminoácidos positivamente carregados (lisinas) com a superfície da camada oposta. Estes

resultados sugerem um possível mecanismo para penetração da bicamada no qual os peptídeos atravessam a membrana. Entretanto, devido ao tempo de simulação e/ou a baixa concentração de peptídeos, tal processo não foi observado durante as simulações descritas aqui. Nas próximas subseções será discutido o efeito da concentração de peptídeos sobre o mecanismo de ruptura das respectivas bicamadas. Com esta finalidade, simulações adicionais foram realizadas contendo múltiplas unidades do peptídeo (cinco e dez moléculas) na superfície de bicamadas compostas por POPC ou POPG.

4.4. Simulações Contendo Múltiplas Unidades do Peptídeo: Efeito da Concentração de Peptídeos

Para aumentar a concentração de peptídeos, foi utilizada como base uma simulação prévia contendo uma unidade do peptídeo na superfície da membrana de POPG. À configuração da caixa dessa simulação, aos 100 ns de trajetória, foram adicionadas quatro unidades do peptídeo dispostas de forma paralela (regiões terminais paralelas) e antiparalela (regiões terminais antiparalelas) como descrito na subseção 4.4.1. Em seguida, foi estudado um sistema contendo dez unidades do peptídeo, replicando-se a configuração dos peptídeos da simulação com cinco unidades e posicionando-os proximamente aos originais. Os resultados desta simulação são abordados na subseção 4.4.2.

4.4.1 Cinco Unidades do Peptídeo

A Figura 4.4.1 a) mostra a disposição inicial dos peptídeos acima da membrana de lipídios POPG com quatro dos cinco peptídeos em conformação totalmente em hélice. Já a Figura 4.4.1 b) mostra a disposição desses peptídeos ao final da simulação (Sim5c).

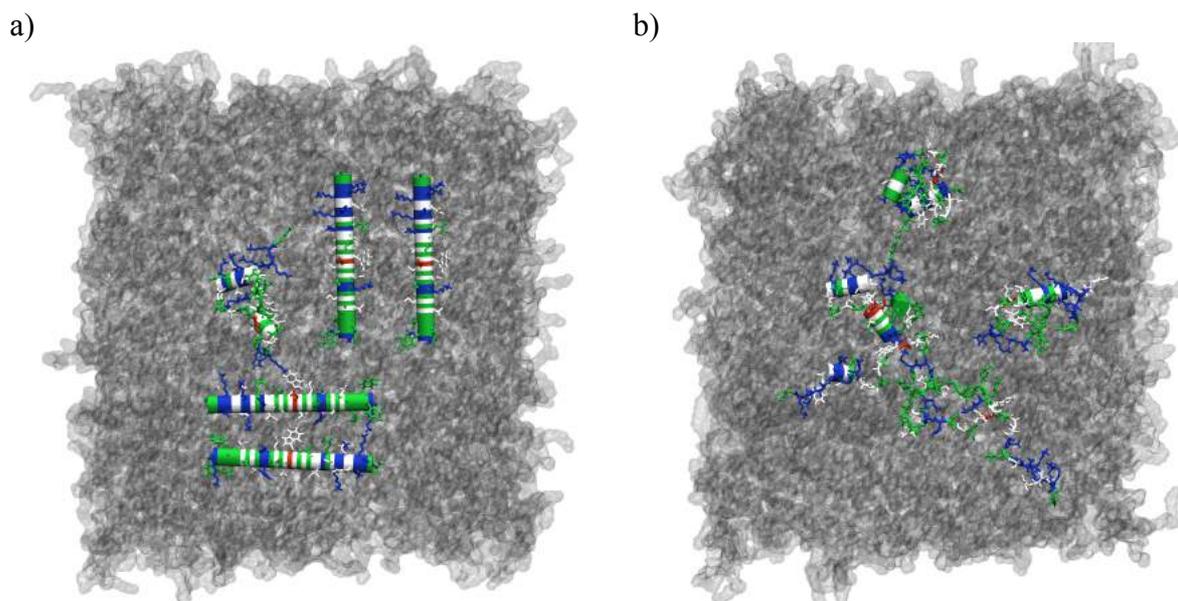


Figura 4.4.1 Representação gráfica da simulação com cinco unidades do peptídeo na membrana 100% POPG (em cinza). a) Início da simulação; b) Final da simulação. Moléculas de água e íons foram omitidos para melhor visualização.

A ideia de colocar os peptídeos em hélice, mais uma vez, foi para tornar o processo de equilíbrio estrutural mais rápido e para analisar se as interações entre as unidades provocaria diferença na estrutura geral dos mesmos. E, também, para analisar a possibilidade de organização em forma de barril de hélices (estruturação mais alta). A imagem (b) da Figura 4.4.1 mostra que a maioria dos peptídeos se agregou e que também houve perda de estrutura helicoidal na estrutura secundária. A evolução do comportamento da estrutura secundária desses peptídeos pode ser visualizada na Figura 4.4.2.

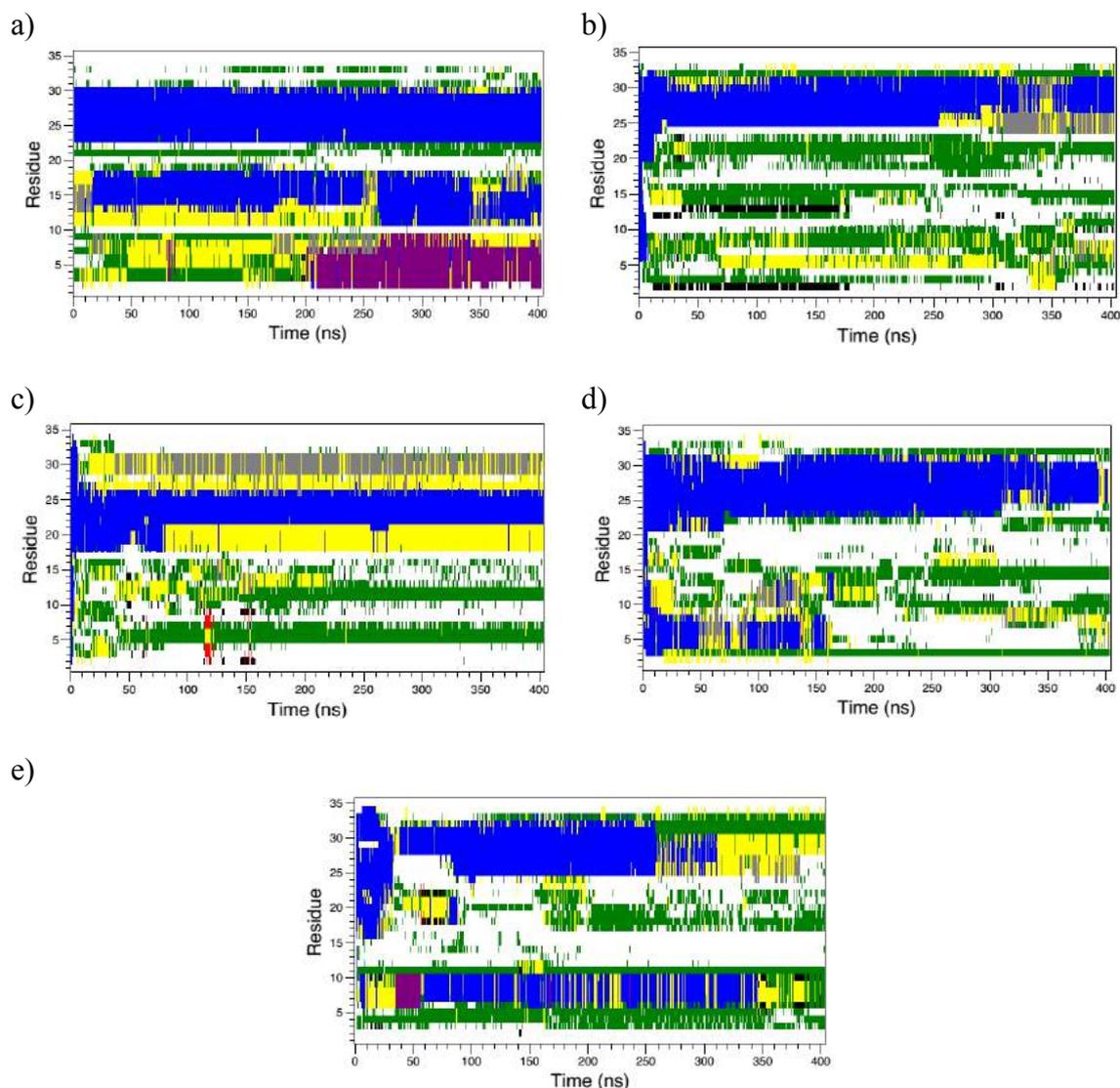


Figura 4.4.2 Mapas de estrutura secundária para as cinco unidades de peptídeo interagindo na superfície da membrana de POPG durante os últimos 400 ns de simulação. Legenda: hélice 3_{10} (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco).

Os mapas da Figura 4.4.2 mostram que há uma perda do ordenamento da estrutura secundária ao longo da simulação, especialmente em um dos peptídeos (e). Entretanto, parte do peptídeo ainda possui estruturação do tipo em volta (cor amarela). Esse comportamento sugere que a perda de estrutura está associada às interações que a região C-terminal desse peptídeo com a região N-terminal do que estava próximo a ele (antiparalelo). Isso faz com que as interações das lisinas da região C-terminal desse peptídeo com as cabeças dos lipídios da membrana de POPG sejam mais fracas, o que provoca a desestabilização da estrutura em hélice.

Além disso, foi observado ao longo da trajetória que os peptídeos realizam uma pressão sobre a membrana, perturbando-a de forma mais acentuada que sob o efeito de um único peptídeo (Figura 4.4.3).

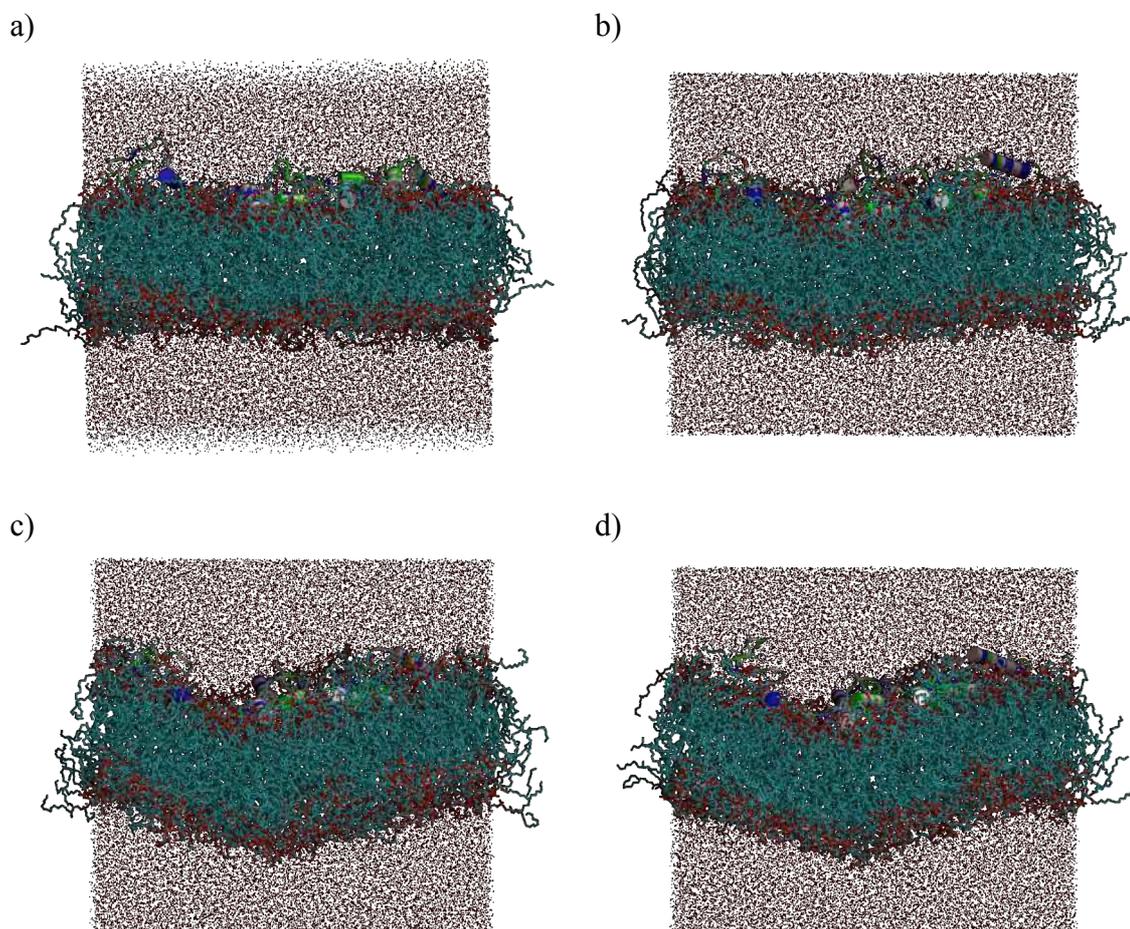


Figura 4.4.3 Mudanças na estrutura da membrana de 100% POPG causadas pela interação com as cinco unidades do peptídeo ao longo da trajetória. As imagens referem-se ao tempo de trajetória de: a) 100 ns; b) 200 ns; c) 300 ns; d) 400 ns. Membrana em verde, com oxigênios dos grupos fosfato em vermelho. Moléculas de água representadas por pontos em vermelho.

À medida que a simulação progride, os peptídeos induzem uma curvatura negativa da membrana. Esse fenômeno parece resultar da concentração de peptídeos que, numa espécie de efeito cooperativo devido à interação entre os peptídeos (Figura 4.4.1-b), causa a curvatura da superfície da membrana. Isso sugere um possível caminho para rompimento da bicamada, através da formação de um poro ou de um mecanismo *carpet-like*, permitindo a passagem de moléculas de água e/ou dos peptídeos. Para medir o grau de penetração dos peptídeos na membrana, foram feitas análises do perfil de densidade de grupos funcionais na bicamada para os 50 ns iniciais e finais da simulação.

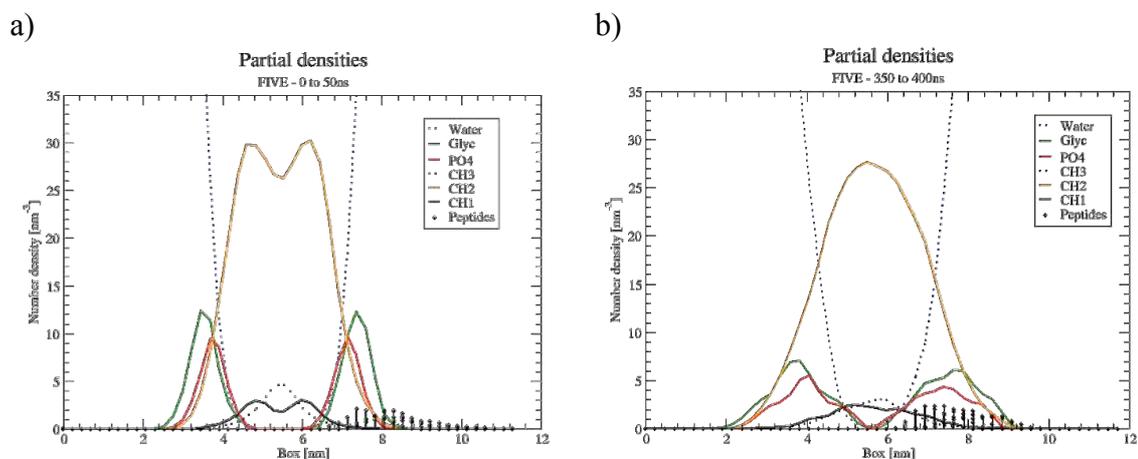


Figura 4.4.4 Densidade em número para o sistema de cinco peptídeos interagindo com a membrana de 100% POPG durante: a) 0-50 ns; b) 350-400 ns de simulação.

Dos gráficos da Figura 4.4.4, pode-se observar a aproximação dos peptídeos e a penetração na região dos grupamentos fosfatos dos lipídios. Em termos de proximidade do centro da caixa, se compararmos a região que os peptídeos alcançam com o caso com apenas um peptídeo (Figura 4.2.10), vemos que esse efeito é mais pronunciado devido à maior quantidade de unidades. Além disso, a perturbação provocada na membrana é identificada através da distribuição dos picos dos grupos característicos de bicamadas lipídicas. As regiões do glicerol e PO_4 tornam-se menos uniformes e pronunciadas, especialmente na camada que interage com os peptídeos. As cadeias acilas (CH_2 e CH_1) deixam o alinhamento usual, gerando uma única distribuição (único pico cada). Entretanto, não há sinal de água nas regiões hidrofóbicas. Logo, não há rompimento efetivo da membrana.

Foi realizada também medidas dos parâmetros de ordem e do ângulo de inclinação das cadeias lipídicas ao longo da simulação. O objetivo consistia em quantificar a perturbação provocada pelos peptídeos nas cadeias dos lipídios ao longo da trajetória. A seguir, são mostrados os parâmetros de ordem para as cadeias palmitoil (sn1) oleila (sn2) para os primeiros 10 ns e os 10 ns finais de simulação.

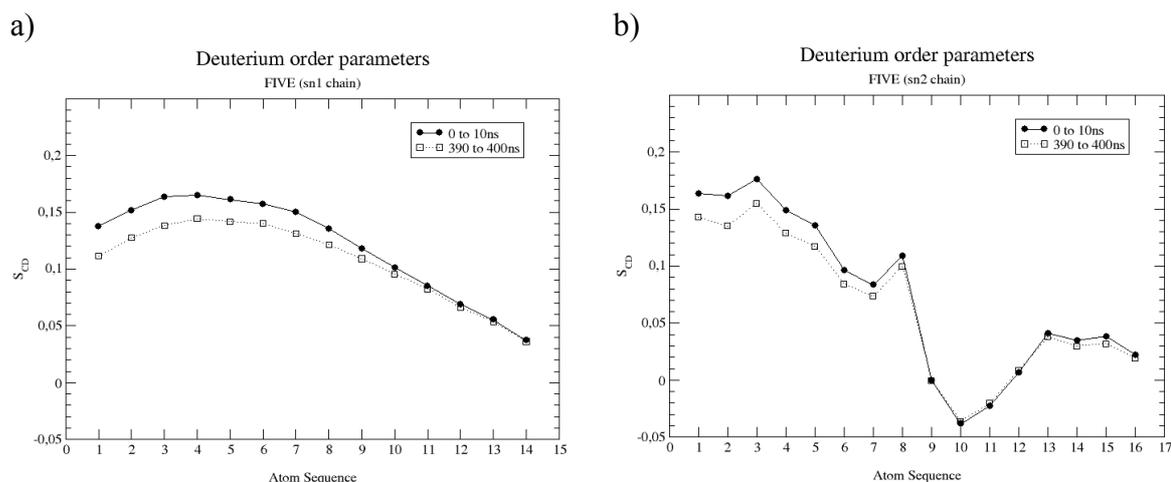


Figura 4.4.5 Gráficos de parâmetros de ordem para as cadeias palmitoil (a) e oleila (b) dos lipídios nas simulações de cinco unidades do peptídeo com membrana formada por lipídios POPG apenas.

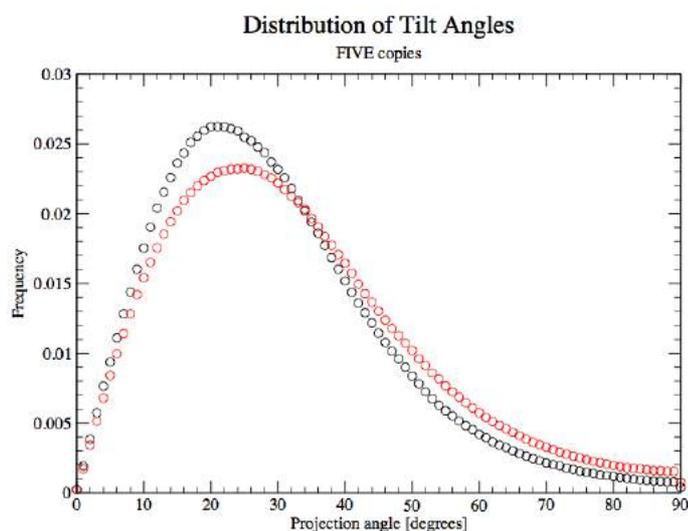


Figura 4.4.6 Histograma mostrando a distribuição dos ângulos de inclinação dos lipídios para a simulação com cinco unidades do peptídeo na superfície da membrana de 100% POPG. Em **preto**, 10ns iniciais e em **vermelho**, os 10ns finais.

Os parâmetros de ordem mostram que não há grandes mudanças no ordenamento de um átomo de carbono para o outro nas cadeias alifáticas. Um sutil aumento do desordenamento é observado nos últimos 10 ns da simulação em comparação com o início. Essa pequena mudança indica que não houve grande perturbação dos carbonos do fim da cadeia (centro da caixa), pois como abordado, o parâmetro de ordem expressa a variação de um átomo de carbono em relação ao anterior. Já o perfil de distribuição de ângulos de inclinação mostra que a quantidade de peptídeos agindo sobre a superfície da membrana provoca um aumento na quantidade de lipídios com maior grau de inclinação em relação ao eixo z . Ou seja, há um número maior de lipídios se movendo além da posição de relaxamento

(paralela ao eixo z , ângulo de projeção menor). Esse fenômeno é explicado devido à forte interação do maior número de peptídeos com a membrana, inclinando os lipídios e, conseqüentemente, formando a curvatura observada na bicamada.

Apesar de não haver um rompimento da membrana, a presença de maior número de peptídeos (concentração) indica um aumento da perturbação da bicamada lipídica de POPG. Investigou-se, então, o efeito ao dobrar essa concentração de peptídeos através da simulação da membrana de 100% POPG com dez unidades do peptídeo.

4.4.2 Dez Unidades do Peptídeo

A simulação com dez unidades do peptídeo foi realizada a partir da configuração do sistema com cinco unidades aos 100 ns de simulação. Dessa vez, foram utilizados os peptídeos da simulação com 5 unidades (com estrutura já equilibrada) para dobrar a concentração. Esses peptídeos foram distribuídos pouco acima das cinco unidades originais e foram realizados mais 300 ns de trajetórias, totalizando 500 ns de simulação. As imagens da Figura 4.4.7 mostram a distribuição inicial e final dos peptídeos na superfície da membrana.

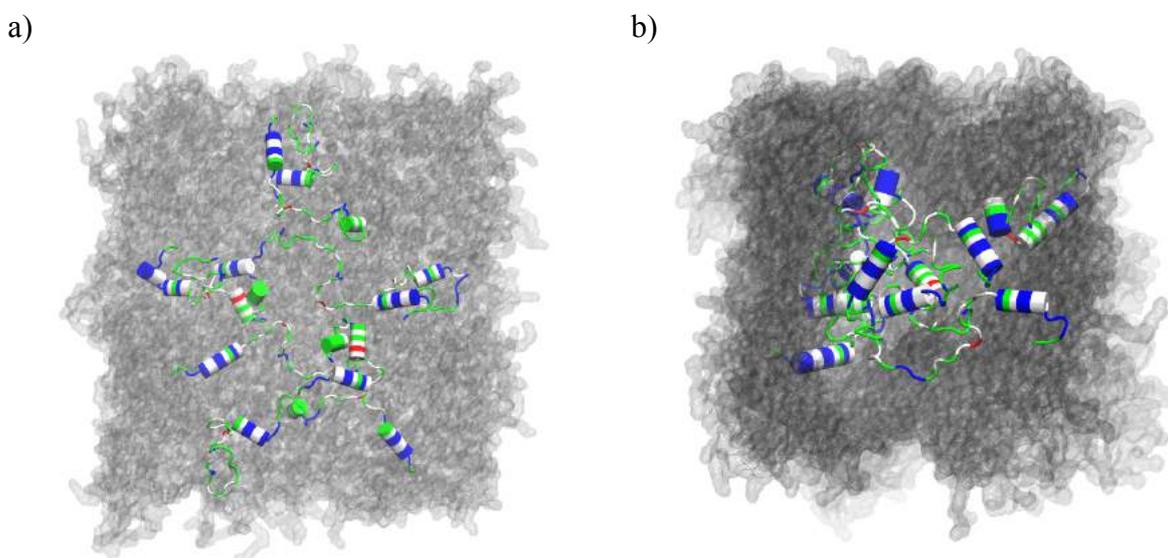


Figura 4.4.7 Representação gráfica da simulação com dez unidades do peptídeo na superfície da membrana 100% POPG (em cinza). a) Início da simulação; b) Final da simulação. Moléculas de água e íons foram omitidos para melhor visualização.

Os peptídeos, antes dispersos, formam um agregado único que pressiona a membrana. As estruturas secundárias exibem poucas alterações ao longo da simulação. Entretanto, para analisar mais detalhadamente os efeitos do aumento da concentração dos dez peptídeos sobre

eles mesmos, análises de mudanças na estrutura secundária ao longo da simulação foram realizadas e podem ser visualizadas na Figura 4.4.8.

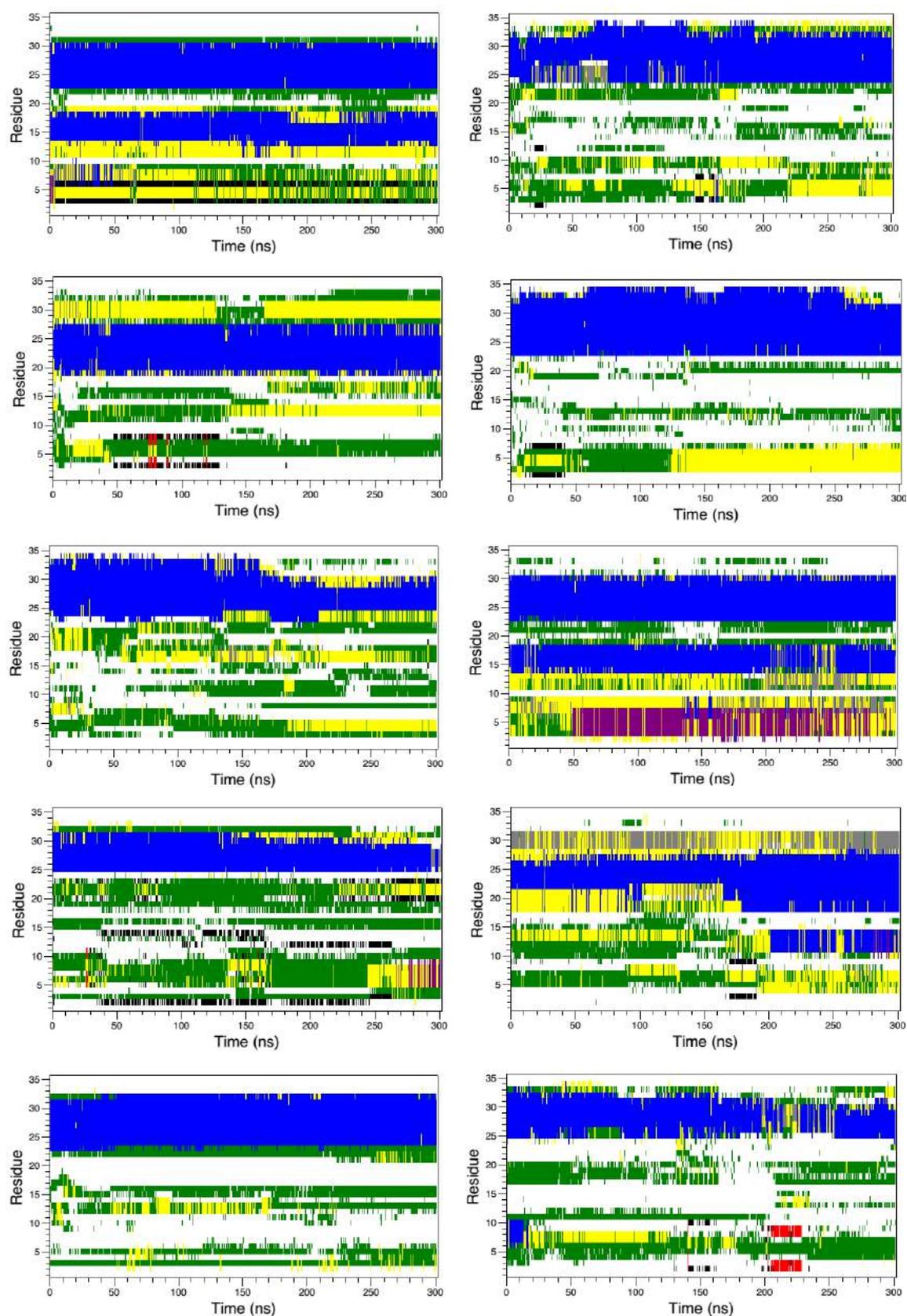


Figura 4.4.8 Mapas de estrutura secundária para as dez unidades de peptídeo interagindo na superfície da membrana de POPG para os 300 ns finais de simulação. Legenda: hélice 3_{10} (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco).

Em média, todos os peptídeos apresentam conservação de estrutura em hélice na porção final da cadeia (C-terminal). Em alguns casos, a perda de hélice é associada às interações entre os próprios peptídeos, como observado na simulação com cinco unidades do mesmo. Observou-se novamente o comportamento de forte interação realizado pelos peptídeos sobre a membrana, provocando distorções até mais profundas em comparação ao caso com os cinco peptídeos.

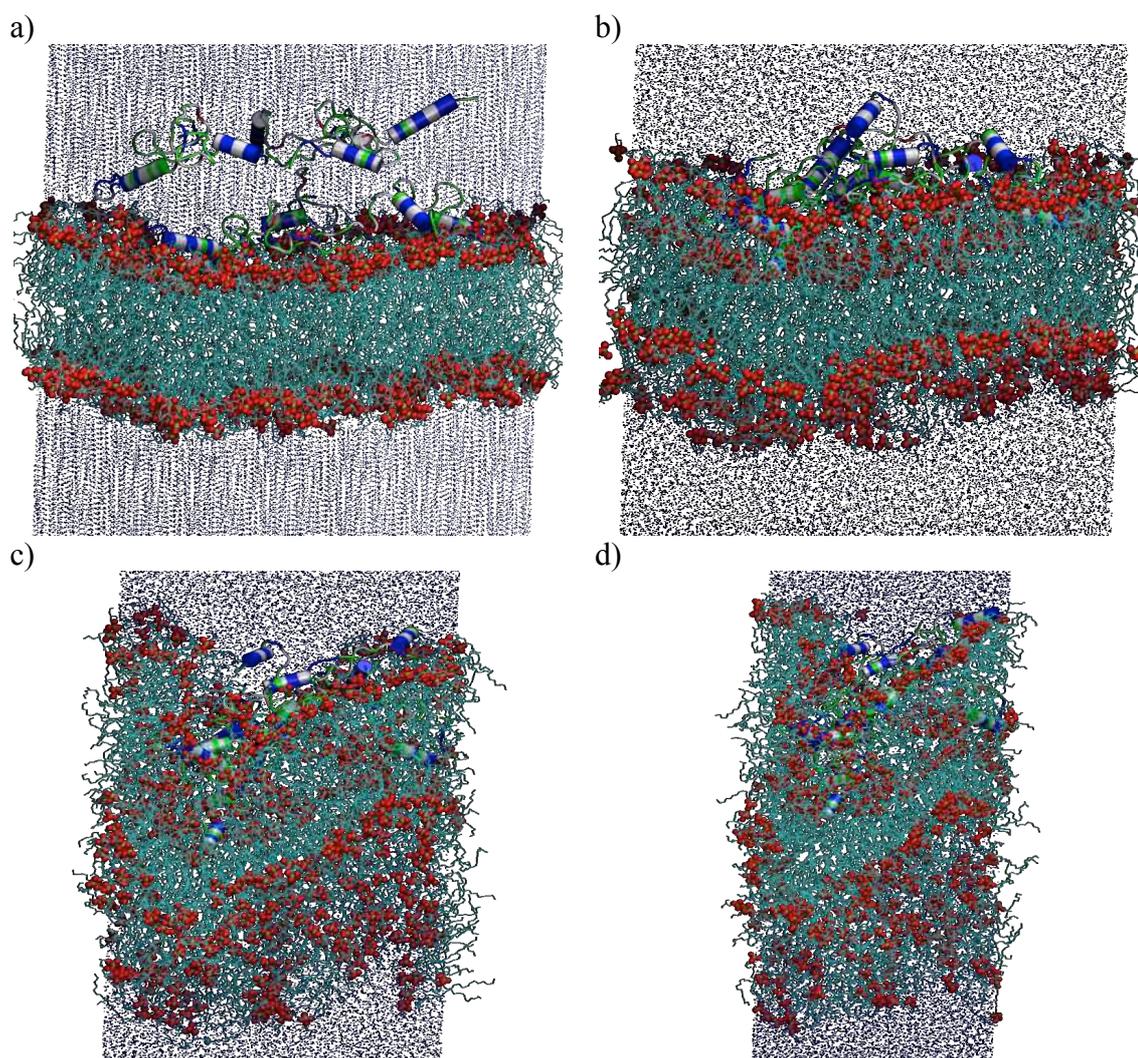


Figura 4.4.9 Mudanças na estrutura da membrana de 100% POPG causadas pela interação com as dez unidades do peptídeo ao longo da trajetória. As imagens referem-se ao tempo de trajetória de: a) 0 ns ; b) 100 ns; c) 200 ns; d) 300 ns. Membrana em verde, com oxigênios dos grupos fosfato em vermelho. Moléculas de água representadas por pontos em azul.

O processo de perturbação da membrana associado ao aumento da concentração de peptídeos é acelerado. Enquanto no caso com cinco unidades peptídicas, foram necessários

praticamente 400 ns (Figura 4.4.3) para formação de uma curvatura visível, no sistema com dez peptídeos uma perturbação muito maior já acontece aos 200ns de simulação, numa relação de proporcionalidade direta. Além disso, ao avançar a simulação (300 e 400ns da Figura 4.4.9), percebe-se a descaracterização da bicamada lipídica afetada pelos peptídeos, que se comportam seguindo um comportamento similar ao mecanismo do tipo carpete (do inglês, *carpet-like*). Para mensurar essa perda de característica de bicamada lipídica, foram feitos gráficos da densidade em número no início e no fim da simulação.

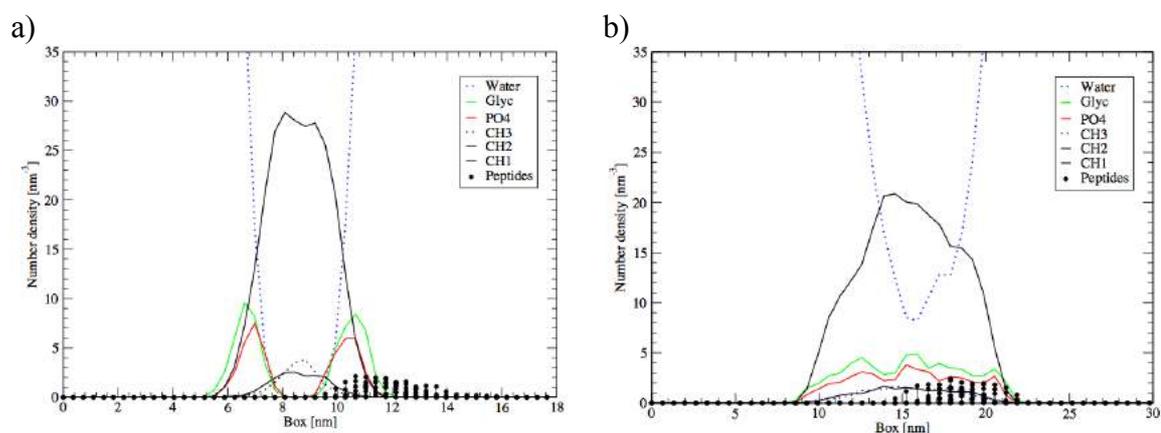


Figura 4.4.10 Densidade em número para o sistema de dez peptídeos interagindo com a membrana de 100% POPG durante: a) 0-50 ns; b) 350-400 ns de simulação.

A Figura 4.4.10 mostra que no início da simulação, a membrana possuía regiões específicas e características bem definidas. Os grupamentos glicerol e fosfato definindo as cabeças dos lipídios e região acessível à água (hidrofílica). Nessa região também são encontrados os primeiros peptídeos que interagem com a superfície da membrana. As regiões hidrofóbicas estão internas, afastadas dos peptídeos e das moléculas de água. Todavia, ao final da simulação, não é mais possível distinguir as regiões específicas de cada camada lipídicas. O sistema membranoso foi afetado pela maior concentração de peptídeos, tornando-se deformado e descaracterizado. Como a membrana possui curvaturas pronunciadas, o gráfico sugere que moléculas de água teriam penetrado na região hidrofóbica devido à formação de interações dos peptídeos com essa região (o que seria uma evidência de possível formação de poro). Entretanto, na visualização da trajetória, não é verificado esse processo. Há apenas a formação de uma região onde a membrana provavelmente pode se romper devido ação de interação do conjunto de peptídeos (como um carpete). A Figura 4.4.11 mostra a possível região de rompimento da membrana.

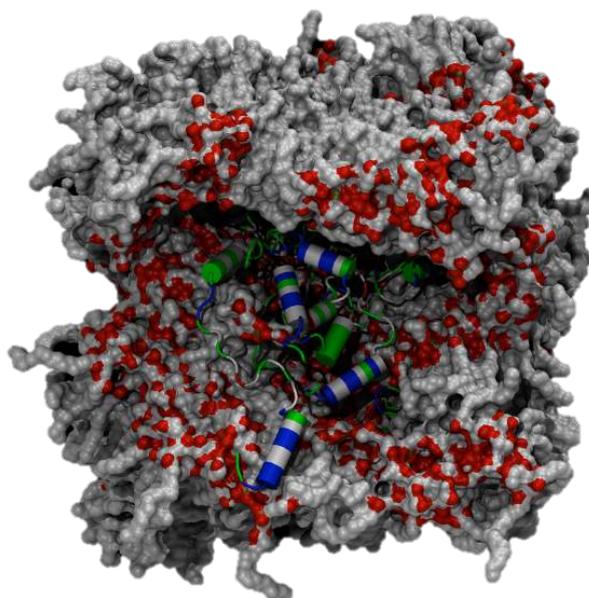


Figura 4.4.11 Cavidade causada pela ação dos dez peptídeos sobre a membrana de POPG, indicando possível mecanismo *carpet-like* de rompimento. Membrana em branco, com grupos fosfatos destacados em vermelho indicando as cabeças lipídicas.

De modo análogo à simulação com cinco peptídeos, foram realizadas análises de parâmetros de ordem e ângulo de inclinação dos lipídios para verificar o grau de perturbação nas cadeias acila. As mudanças nas ordens dos átomos de carbonos das cadeias palmitoil (sn1) e oleila (sn2) podem ser visualizadas na Figura 4.4.12.

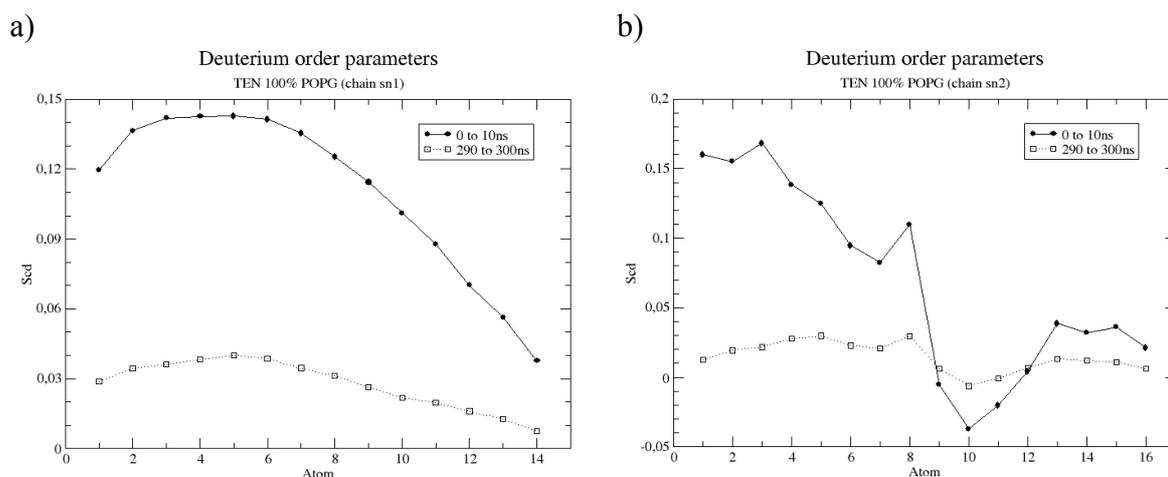


Figura 4.4.12 Gráficos de parâmetros de ordem para as cadeias palmitoil (a) e oleila (b) dos lipídios nas simulações de dez unidades do peptídeo com membrana formada por 100% POPG.

Ao contrário da simulação com cinco unidades peptídeos, quando não houve mudanças significativas na ordem entre os átomos de carbono das cadeias, a perturbação causada pelos cinco peptídeos na membrana reflete-se nas cadeias lipídicas. O grau de ordem diminui de maneira significativa, mesmo sem haver interações diretas entre os peptídeos e esses átomos. Esse fenômeno sugere que os átomos integrantes das cadeias acila estão com graus de liberdades maiores, realizando deslocamentos mais intensos, indicando um enfraquecimento de suas ligações. Esse enfraquecimento pode levar à desestabilização total e, conseqüentemente, ao rompimento da membrana.

A análise do ângulo de inclinação, que mostra quão afastados estão os lipídios da sua formação original paralela ao eixo z , é encontrada na Figura 4.4.13.

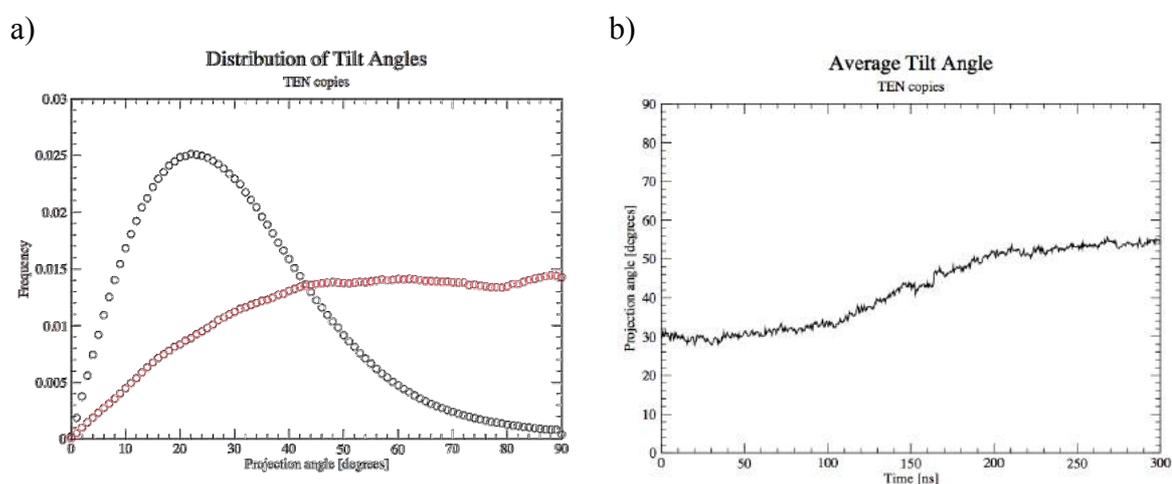


Figura 4.4.13 Gráficos da simulação com dez unidades do peptídeo na superfície da membrana de 100% POPG: a) Histograma mostrando a distribuição dos ângulos de inclinação dos lipídios. Em **preto**, 10 ns iniciais e em **vermelho**, os 10 ns finais; b) Evolução temporal da média dos ângulos de inclinação.

O primeiro gráfico mostra que grande quantidade de lipídios cuja inclinação em relação ao eixo z aumentou. Esse fenômeno é associado às curvaturas provocadas na membrana devido à interação que os peptídeos exercem na mesma. Isso faz com que os lipídios deixem sua conformação relaxada e acabem se inclinando. O segundo gráfico mostra a evolução ao longo do tempo do ângulo médio de inclinação da projeção do vetor definido pelos lipídios no eixo z . No início da simulação, esse ângulo possuía média em torno de 30° , valor associado à própria definição do vetor (devido às duas cadeias alifáticas que compõe os lipídios). Ao fim da simulação, esse valor médio passou a cerca de 50° , ou seja, ocorre um afastamento médio de 20° da posição inicial indicando um alto grau de perturbação da membrana.

As medidas da desordem associadas aos fenômenos de contínua interação dos peptídeos com as cabeças dos lipídios, durante o processo de perturbação, sugerem que o mecanismo de rompimento ocorre sem penetração efetiva dos peptídeos na membrana. Ou seja, o rompimento da membrana aconteceria devido à interação do aglomerado de peptídeos num procedimento conhecido como mecanismo *carpete* (*carpet-like*). Todavia, para certificar que o tamanho da caixa estava adequado e que o fenômeno observado não ser associado a um efeito de fronteira, foram simulados sistemas com dez unidades dos peptídeos interagindo com membrana lipídica com tamanho nove vezes maior.

4.4.3 Membranas Gigantes com Dez Unidades do Peptídeo

Para realizar essas simulações, foram criadas caixas com membrana fosfolipídica com dimensões iniciais 19,8 nm x 21,2 nm x 18,0 nm (POPC) e 23,7 nm x 24,7 nm x 17,5 nm (POPG). Dez unidades do peptídeo foram colocadas na superfície de cada membrana como pode ser visualizado na Figura 4.4.13 para a membrana de 100% POPC.

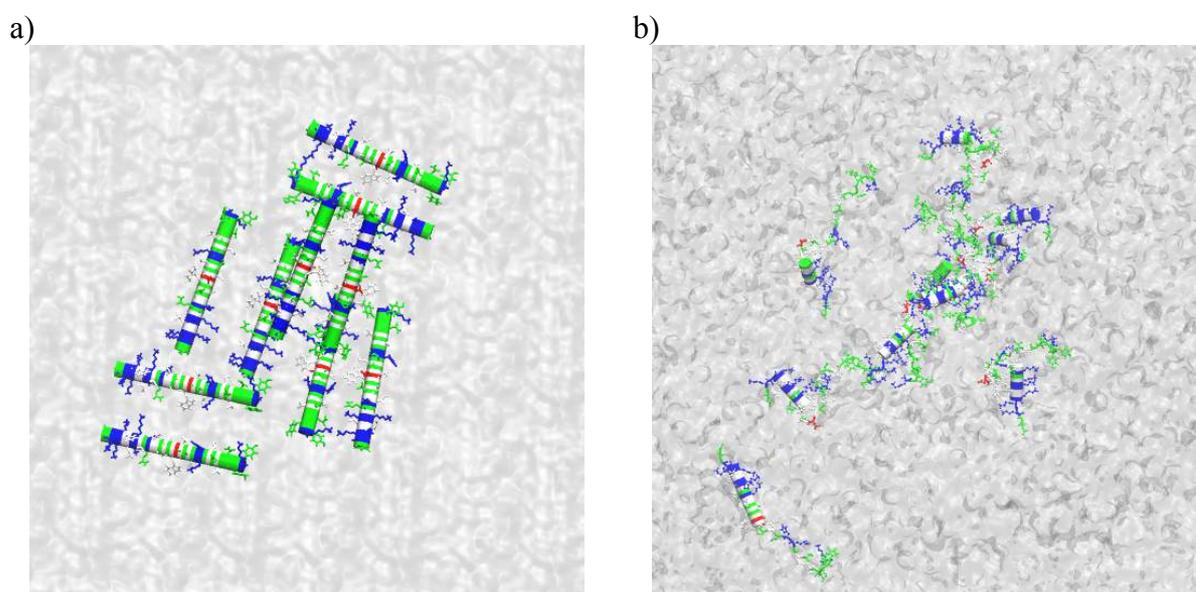


Figura 4.4.14 Representação gráfica da simulação com dez unidades do peptídeo na superfície da membrana gigante de 100% POPC (em cinza). a) Início da simulação; b) Final da simulação (100 ns). Moléculas de água e íons foram omitidos para melhor visualização.

A imagem mostra que, ao final da simulação, não há a formação de um único aglomerado com todos os peptídeos, ao contrário do que é observado na simulação de dez unidades na membrana de POPG. Alguns dos peptídeos se dispersam e se isolam na

superfície da membrana. Fez-se, então, análise das estruturas secundárias dos peptídeos para ver se também apresentam conteúdo em hélice, como mostrado nos mapas a seguir:

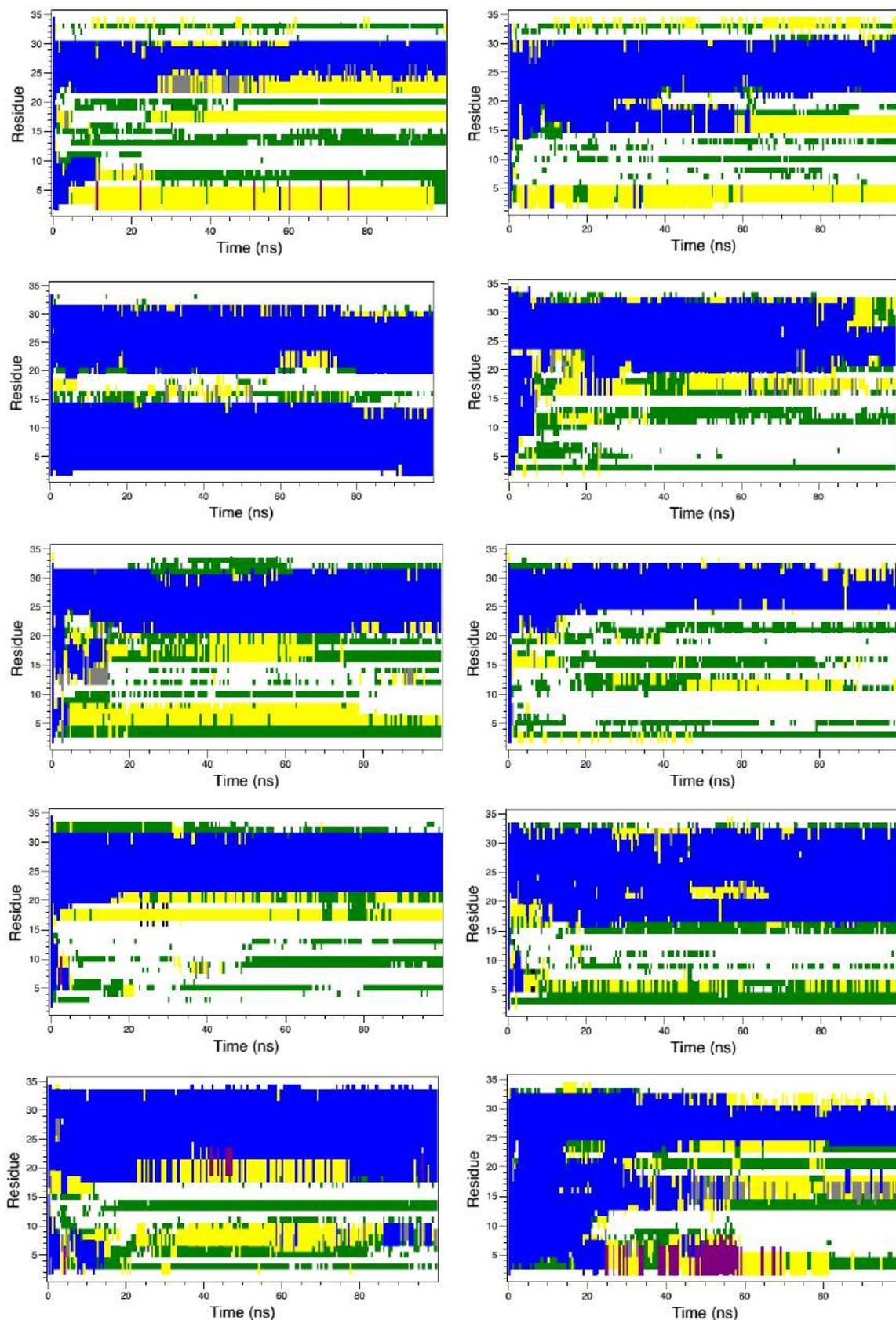


Figura 4.4.15 Mapas de estrutura secundária para as dez unidades de peptídeo interagindo com a membrana de POPC para os 100 ns de simulação. Legenda: hélice 3_{10} (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco).

A Figura 4.4.15 mostra que o trecho N-terminal da cadeia peptídica preserva pouca estrutura em hélice, há muita dinâmica de mudança estrutural. Esse fenômeno auxilia a refutar a hipótese de mecanismo via formação de poro, pois este requer a preservação da estrutura em hélice do peptídeo. Em seguida, foi observado o efeito que os peptídeos causavam na membrana ao longo da simulação.

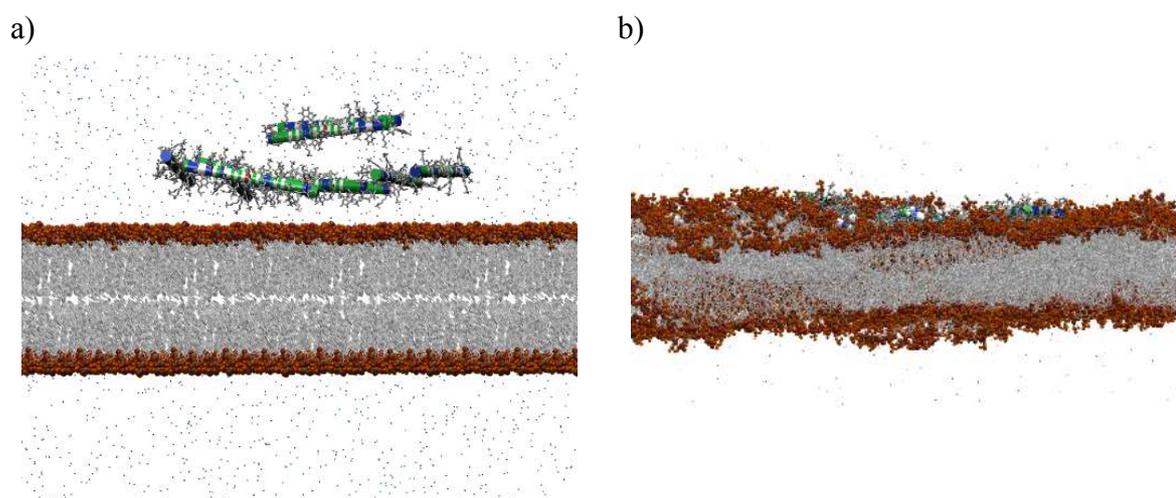


Figura 4.4.16 Evolução da estrutura da membrana de 100% POPC através da interação com as dez unidades do peptídeo ao longo da trajetória. As imagens referem-se ao tempo de trajetória de: a) 0 ns; b) 100 ns. Cadeias alifáticas estão em cinza, grupo colina em laranja e os oxigênios dos grupos fosfato em vermelho. Moléculas de água foram omitidas para melhor visualização.

A bicamada lipídica sofre pequenas ondulações em sua estrutura, porém permanece claramente observável a separação entre as duas camadas (ao contrário do que foi observado para a membrana menor composta por POPG). Apesar de a interferência dos peptídeos ser considerada pequena, na região onde a maior parte deles interage com a membrana, há a formação de uma pequena curvatura. Mais uma vez, esse fenômeno sugere o mecanismo carpete para rompimento da membrana, porém mais lento do que acontece nas membranas de POPG. Em seguida, dois perfis de densidade foram feitos para caracterizar a caixa: no início e no fim da simulação (10 ns cada).

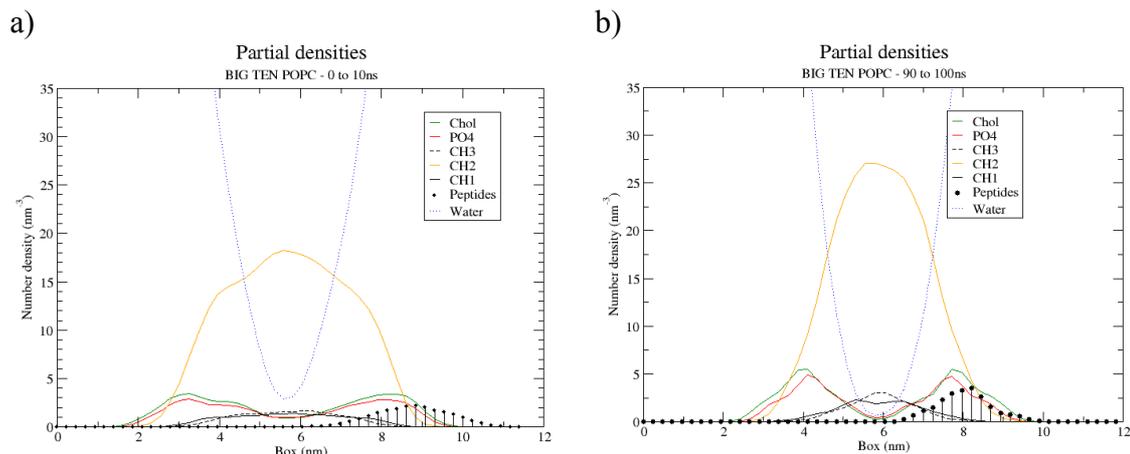


Figura 4.4.17 Densidade em número para o sistema de dez peptídeos interagindo com a membrana gigante de 100% POPC durante: a) 0-10 ns; b) 90-100 ns de simulação.

Os perfis de número de densidade confirmam que não houve grandes perturbações e a bicamada lipídica preserva suas regiões características. No início da simulação, há uma movimentação intensa para termalizar o sistema. Por isso o perfil parece mais suave no início que no fim da simulação. A penetração dos peptídeos é visualizada pela aproximação de seus pontos das curvas dos grupamentos colina e fosfato da camada fosfolipídica superior. Além disso, foram realizadas análises de parâmetros de ordem dos carbonos das cadeias alifáticas e ângulos de inclinação dos lipídios para mensurar a pequena perturbação causada pelos peptídeos. As figuras 4.4.18 e 4.4.19 mostram os gráficos obtidos dessas análises.

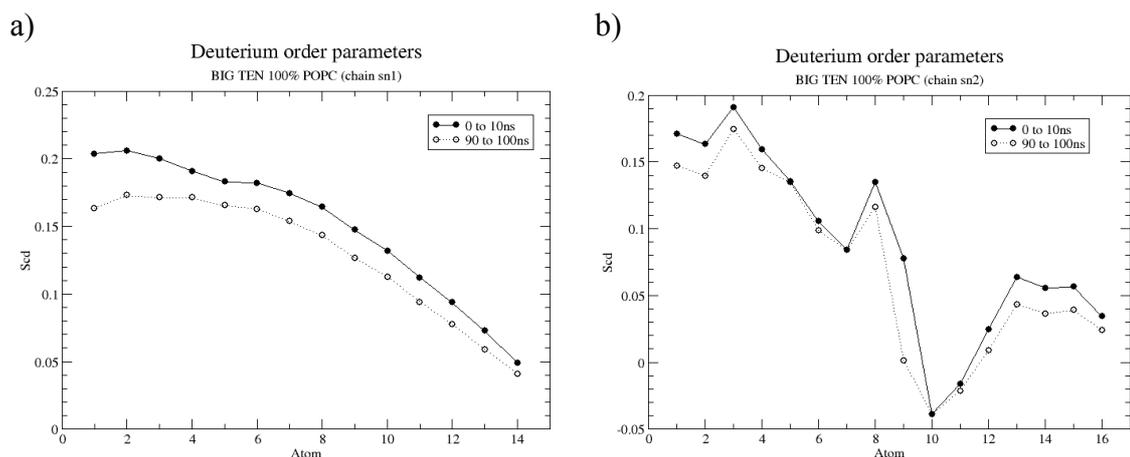


Figura 4.4.18 Gráficos de parâmetros de ordem para as cadeias palmitoil (a) e oleila (b) dos lipídios nas simulações de dez unidades do peptídeo com membrana gigante formada por 100% POPC.

Observando a variação dos valores dos parâmetros de ordem, obtém-se mais um indicativo que a perturbação causada pelos peptídeos é menor do que comparado ao caso da membrana composta por lipídios POPG. A diminuição observada nos gráficos da Figura

4.4.17 está mais correlacionada à relaxação do sistema do que a pressão realizada pelos peptídeos.

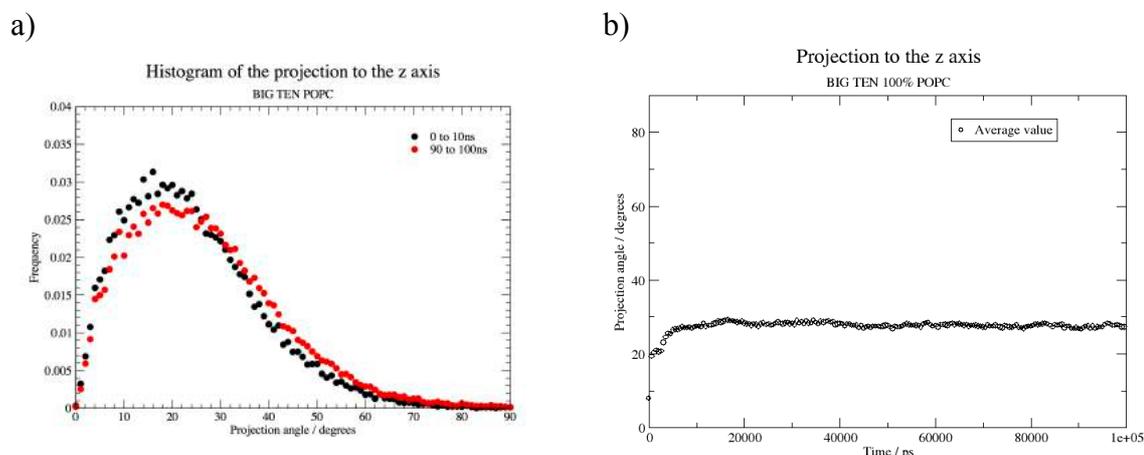


Figura 4.4.19 Gráficos da simulação com dez unidades do peptídeo na superfície da membrana de 100% POPC gigante: a) Histograma mostrando a distribuição dos ângulos de inclinação dos lipídios. Em **preto**, 10 ns iniciais e em **vermelho**, os 10 ns finais; b) Evolução temporal da média dos ângulos de inclinação.

O histograma e a evolução média da projeção do ângulo de inclinação mostram que o sistema foi pouco perturbado. As mudanças nas cadeias e orientações dos lipídios estão associadas à relaxação do sistema e a região no qual os peptídeos pressionam a membrana. A formação da curvatura, mesmo que menor em comparação ao caso 100% POPG, também contribui na medida em que os lipídios sofrem inclinações na região pressionada pelos peptídeos.

O mesmo protocolo de simulação foi então realizado para a simulação membrana de lipídios POPG gigante interagindo com dez peptídeos na superfície. Os peptídeos foram distribuídos de forma similar ao caso com a membrana 100% POPC, apenas a bicamada foi trocada. A Figura 4.4.19 ilustra a distribuição da caixa ao início e no final da simulação de 100 ns.

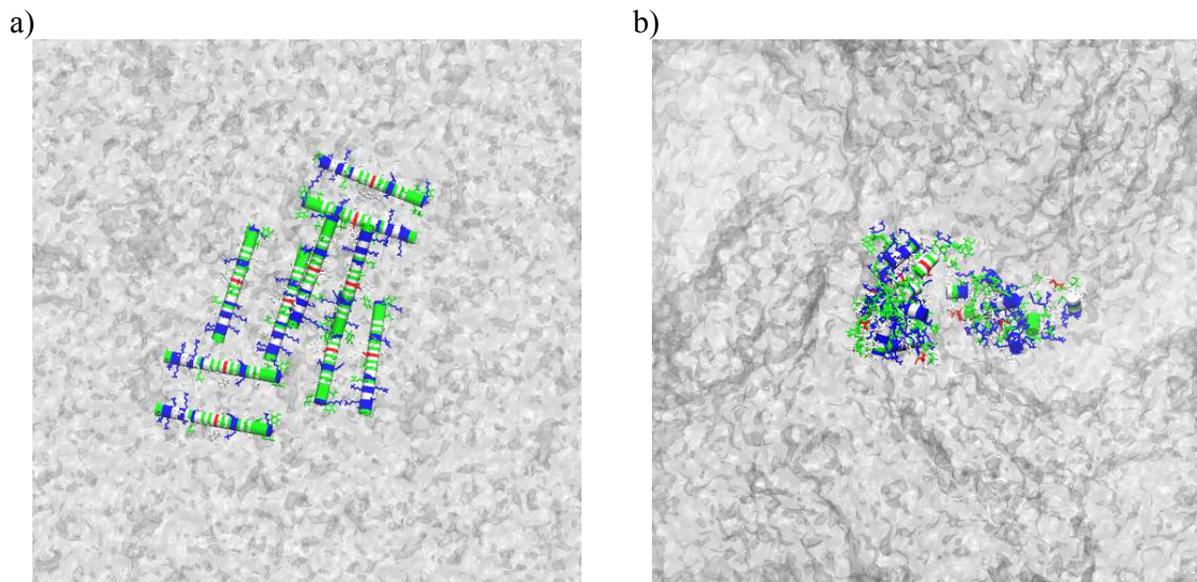


Figura 4.4.20 Representação gráfica da simulação com dez unidades do peptídeo na membrana gigante de 100% POPG (em cinza). a) Início da simulação; b) Final da simulação. Moléculas de água e íons foram omitidos para melhor visualização.

Ao contrário da simulação com a membrana de POPC, neste caso, os peptídeos formam um aglomerado único na superfície. Esse comportamento é similar ao que já havia sido observado na membrana menor de 100% POPG com as dez unidades. Ou seja, a aglomeração dos peptídeos quando interagindo com fosfolipídios POPG não é um fenômeno de efeito de borda, mas sim produto da interação dos peptídeos com a membrana e entre si.

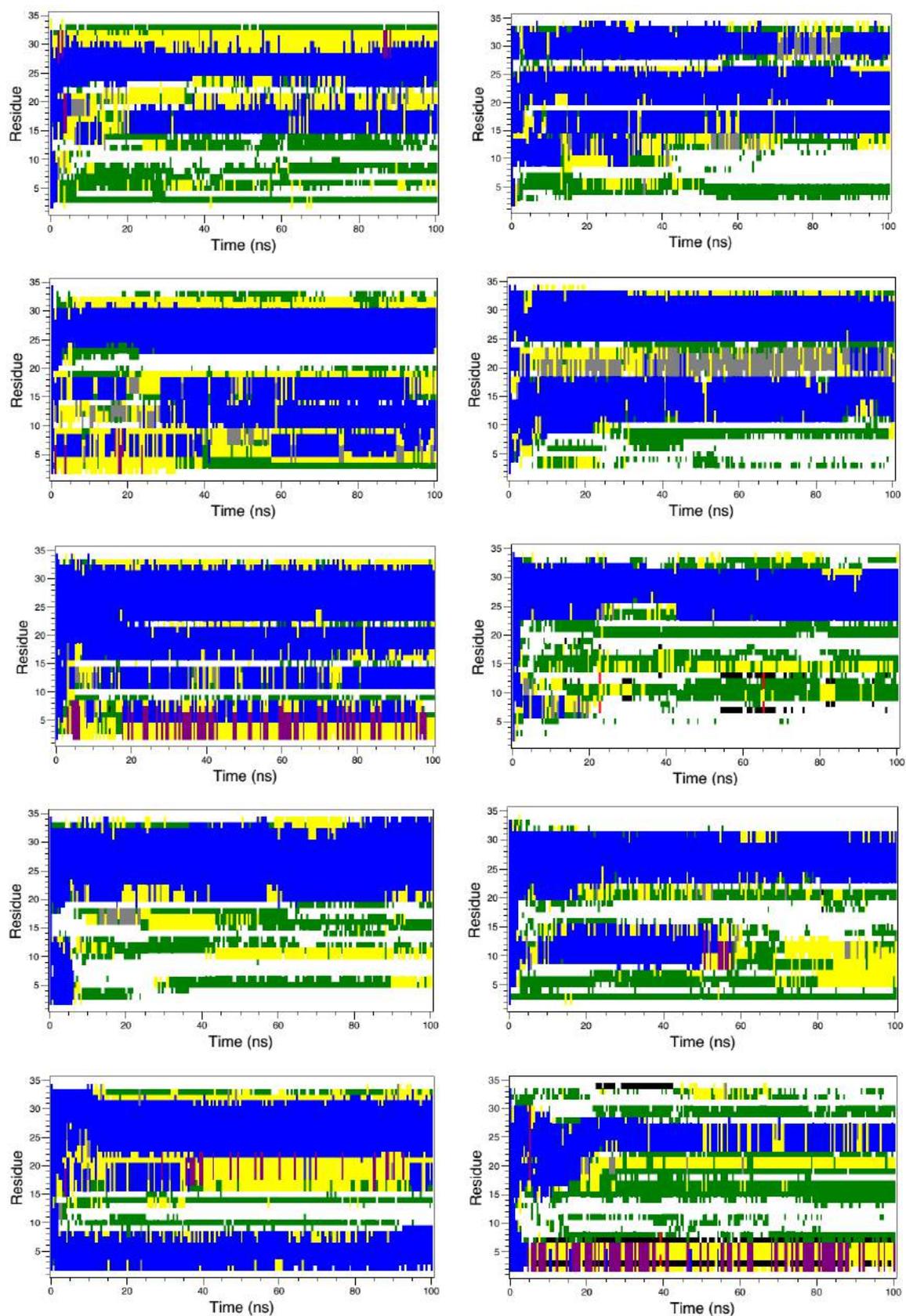


Figura 4.4.21 Mapas de estrutura secundária para as dez unidades de peptídeo interagindo com a membrana gigante de POPG para os 100 ns de simulação. Legenda: hélice 3_{10} (cinza), hélice α (azul), hélice π (roxo), folha beta-ponte (preto), barril beta (vermelho), volta (amarelo), dobra (verde) e desestruturado (branco).

Apesar de, em geral, o percentual de hélice ser maior, quando comparado com a simulação com membrana de POPC, não há uma uniformidade na estrutura secundária geral de cada peptídeo. A dinâmica de evolução das estruturas secundárias dos peptídeos torna a possibilidade de mecanismo de rompimento da membrana via formação de poro mais remota. A quebra via mecanismo carpete parece ser a explicação mais viável, principalmente quando se observa o efeito do aglomerado de peptídeos na bicamada lipídica (Figura 4.4.21).

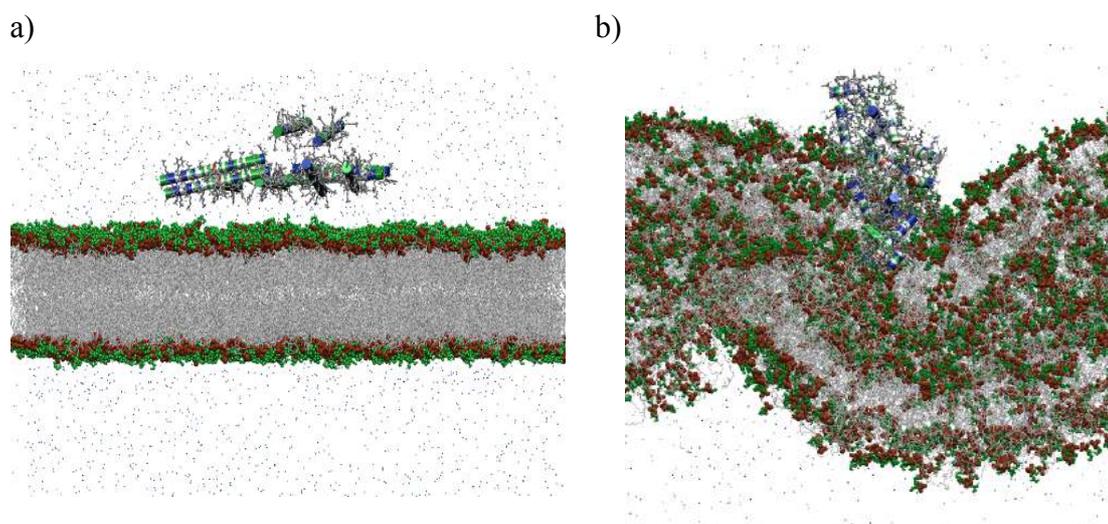


Figura 4.4.22 Evolução da estrutura da membrana gigante de 100% POPG através da interação com as dez unidades do peptídeo ao longo da trajetória. As imagens referem-se ao tempo de trajetória de: a) 0 ns; b) 100 ns. Na membrana, os grupos glicerol estão em verde, as cadeias alifáticas em cinza e os oxigênios dos grupos fosfato em vermelho. Moléculas foram omitidas para melhor visualização.

No início da simulação, os peptídeos estão dispostos afastados da membrana. É possível observar as duas camadas na membrana através dos grupamentos fosfatos em destaque. À medida que a trajetória avança, os peptídeos são atraídos pela membrana por forças eletrostáticas e formam um aglomerado entre si, que age sobre a superfície da membrana de forma mais intensa. Essa pressão é associada ao maior número de interações que os peptídeos fazem com as cabeças dos lipídios POPG. Por causa dessa maior interação, a desestabilização da bicamada é mais intensa e, ao fim, dos 100 ns de simulação, não é mais tão simples identificar as camadas individuais que a compõem. Como a simulação foi realizada numa membrana nove vezes maior, foi descartada a possibilidade de que a distorção resultasse de um efeito de fronteira. Ou seja, é a ação dos peptídeos que provoca a perturbação e é, conseqüentemente, a possível causa da ruptura na membrana lipídica.

De modo análogo ao procedimento realizado para outras simulações com múltiplas unidades do peptídeo, através do perfil de número de densidade foi feita a caracterização do sistema no início e ao fim da simulação.

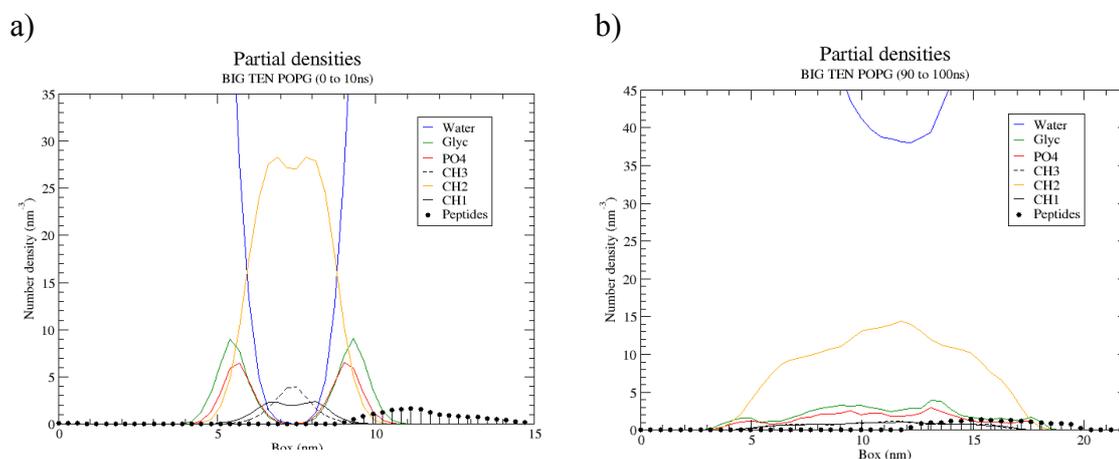


Figura 4.4.23 Densidade em número para o sistema de dez peptídeos interagindo com a membrana gigante de 100% POPG durante: a) 0-10 ns; b) 90-100 ns de simulação.

Observa-se que, no início da simulação, o sistema de peptídeos-membrana possui suas regiões características bem definidas. As cadeias acilas dos lipídios mais próximas das regiões centrais da caixa, os grupamentos fosfato e glicerol (regiões hidrofílicas) estão em contato com as moléculas de água e mais próximas dos peptídeos. Estes últimos atraídos pela superfície de carga negativa formada pela cabeça dos lipídios. Ao final da simulação, essas regiões sofreram distorções profundas, alterando significativamente o perfil da bicamada à medida que o aglomerado de peptídeos interage com a membrana. Na Figura 4.4.22 b), a membrana está totalmente descaracterizada. Não há mais separação visível das camadas individuais. As mudanças são tão drásticas que a curva de água passa a ocupar regiões que antes seriam inacessíveis (centro da caixa = região hidrofóbica). Entretanto, não houve ruptura propriamente dita da membrana durante a trajetória, mas um indicativo do processo de rompimento através dessa perturbação.

A região hidrofóbica da bicamada também sofreu perturbações, dada à interação dos peptídeos com a membrana fosfolipídica. É possível observar, através dos gráficos de parâmetros de ordem (Figura 4.4.23), que os carbonos das cadeias lipídicas adquirem um grau de liberdade maior, o que permite maior movimentação. Esse aumento da movimentação dos carbonos tende tornar as cadeias alifáticas mais instáveis. Essa mobilidade, ou o próprio afastamento médio dos lipídios entre si devido à desestabilização causada na membrana, é o possível meio para a ruptura da mesma (mecanismo *carpet-like*).

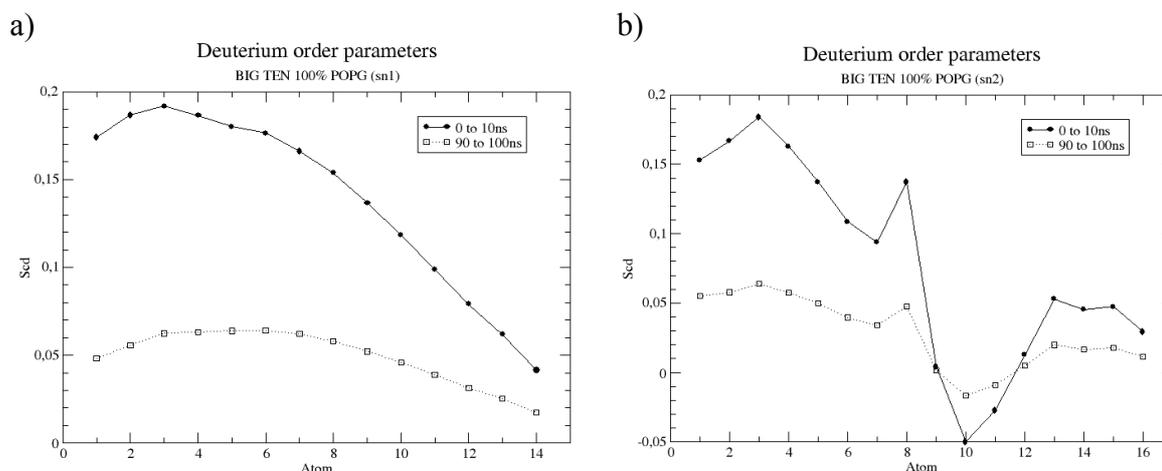


Figura 4.4.24 Gráficos de parâmetros de ordem para as cadeias palmitoil (a) e oleila (b) dos lipídios nas simulações de cinco unidades do peptídeo com membrana gigante formada por lipídios POPG apenas.

A análise da inclinação da projeção dos ângulos definidos pelos lipídios sobre o eixo z também foi realizada e pode ser visualizada na Figura 4.4.24.

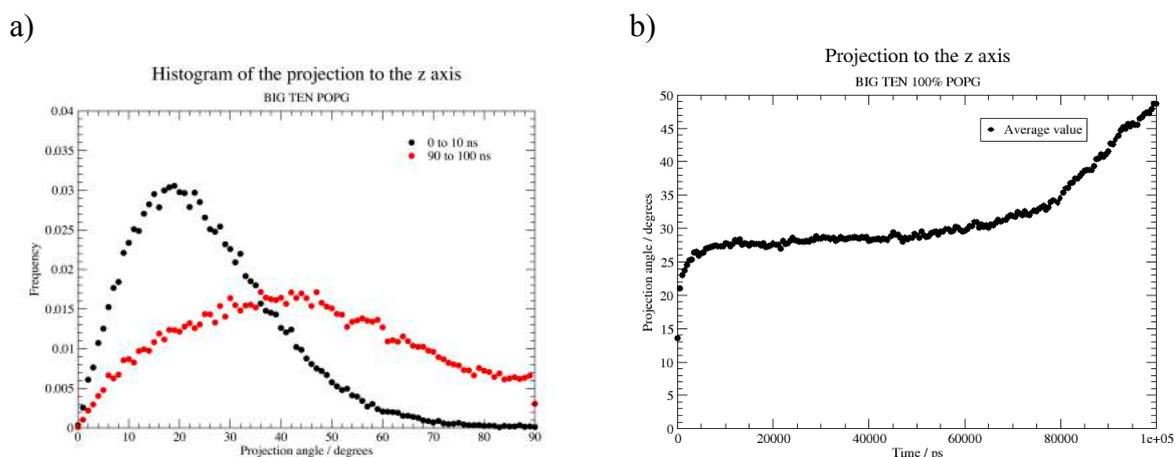


Figura 4.4.25 Gráficos da simulação com dez unidades do peptídeo na superfície da membrana de 100% POPC gigante: a) Histograma mostrando a distribuição dos ângulos de inclinação dos lipídios. Em **preto**, 10 ns iniciais e em **vermelho**, os 10 ns finais; b) Evolução temporal da média dos ângulos de inclinação.

Como pode ser observado, o perfil é bastante similar ao observado para a simulação com os dez peptídeos com a membrana menor de POPG. Nos 10 ns iniciais de simulação, a maior parte dos lipídios possuía projeção com inclinação em torno de 20° do eixo z. Na parte final da simulação, vê-se que muitos lipídios se inclinaram, com alguns chegando a 90° em relação ao eixo z. Ou seja, fosfolipídio perpendicular ao plano do eixo z e longe do posicionamento usual de lipídios em bicamadas. Observa-se, também, que o valor médio da inclinação dobra em apenas 100ns de simulação. Esses fenômenos de inclinação de lipídios

estão associados às perturbações (curvaturas) provocadas na membrana, devido ação dos peptídeos.

Ressalta-se, mais uma vez, que as medidas experimentais mostram o rompimento da membrana e rápido encolhimento das GUVs [3], o que não é característico de processo de ruptura através de formação de poro. A formação de poro na membrana requer grande estabilidade da estrutura dos peptídeos em hélice e que exista a quebra das interações desses peptídeos com a superfície da membrana para interação com região hidrofóbica. Esse mecanismo foi descartado, pois não é observado nas simulações (em especial, caso 100% POPC). Tanto para a membrana de POPC quanto para a membrana composta apenas por POPG, o processo de desestabilização membranoso ocorreu devido ao aumento significativo da concentração de peptídeos agindo sobre as mesmas, com destaque para a membrana de lipídios POPG. A desestabilização e rompimento da membrana são governados por um mecanismo carpete, no qual os peptídeos pressionam e empurram a superfície da membrana.

5. Conclusões

Este trabalho teve como objeto de estudo um peptídeo híbrido de plantaricina 149 e pediocina A e os efeitos nele causados e os que foram provocadas pela sua presença em membranas fosfolipídicas puras e misturas de POPC e POPG. Investigou-se, também, a forma de interação preferencial e o efeito da concentração de peptídeos nas membranas para sugestão de possível mecanismo de ação. Para realizar esse estudo através de dinâmica molecular, foi antes necessário escolher a metodologia computacional adequada. Baseando-se em medidas experimentais de dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescência e microscopia ótica [3], utilizamos o conjunto de parâmetros do campo de força do GROMOS 53A6 para tentar reproduzir a observação experimental que indicava um aumento do conteúdo de hélice do peptídeo ao interagir com membranas carregadas (POPG) em relação às não-carregadas (POPC). No entanto, estas simulações exploratórias não reproduziram adequadamente as tendências experimentais. Ocorre que um novo conjunto de parâmetros do campo de força GROMOS, recém publicado à época, trazia correções para a instabilidade de hélices em sequências peptídicas curtas [126]. O conjunto de parâmetros GROMOS 54A7 resultou em simulações consistentes com as observações experimentais, isto é, os mapas de estrutura secundária reproduziram o aumento do conteúdo de hélice do peptídeo ao interagir com membranas de POPG comparativamente às membranas de POPC. Esse fenômeno é válido tanto para a interação da única unidade do peptídeo com a superfície da membrana, quanto para o peptídeo imerso na membrana. A simulação na membrana de 100% POPG também mostrou que o triptofano permanece confinado e interagindo com a membrana durante a simulação, em acordo com o deslocamento para o azul (*blue shift*) observado experimentalmente por espectroscopia de fluorescência (seção 1.1.4). Na simulação com POPC, o triptofano possui uma maior flexibilidade conformacional, interagindo ora com água, ora com a membrana e, assim, exibindo um menor deslocamento para o azul.

Nas simulações com duas unidades do peptídeo, observamos que as duas partes (regiões C-terminal e N-terminal) dos peptídeos são expelidos do interior da membrana de POPC. De modo similar, o fenômeno se repete para a porção N-terminal do peptídeo na membrana de POPG, mas não com a região C-terminal que permanece estável no interior da membrana durante a simulação (150 ns). Isso sugere que a interação preferencialmente acontece na superfície da membrana, enquanto a região C-terminal (parte derivada da

plantaricina 149) é a responsável pela penetração e/ou pressão realizada pelo peptídeo sobre a membrana.

Em seguida, investigamos o efeito do aumento da concentração de peptídeos sobre a membrana de POPG. Foram colocadas cinco unidades do peptídeo sobre a superfície da membrana e observou-se que os peptídeos agem induzindo uma curvatura negativa da mesma, desestabilizando-a. Todavia, não foi observado o rompimento efetivo da membrana, nem a penetração de água ou peptídeo nas regiões hidrofóbicas. Ao dobrar a concentração de peptídeo (dez unidades), o aumento da curvatura tornou-se mais pronunciado e a membrana sofreu distorções mais acentuadas e de forma mais rápida. Os peptídeos perturbam a membrana atuando como um aglomerado, via um mecanismo similar ao mecanismo carpete. Durante as simulações, a região N-terminal dos peptídeos permanece desestruturada e a região helicoidal apresenta grande dinâmica de comportamento. Estas observações tornam um mecanismo de formação de poro pelo peptídeo menos provável, pois tal mecanismo requer um maior ordenamento da estrutura dos peptídeos. Para verificar se a ruptura da membrana sofreu o efeito de fronteira/vizinhança devido ao tamanho da bicamada, foram feitas simulações com membranas POPC e POPG nove vezes maior, chamadas de membranas gigantes. A simulação das dez unidades do peptídeo híbrido com a membrana gigante de POPC mostrou que a membrana sofreu pouca perturbação. Os peptídeos pressionam a membrana, porém como a interação não é tão forte (devido ao caráter zwitteriônico do fosfolípido), essa pressão é significativamente menor do que a observada para a simulação com POPG. No caso da membrana gigante carregada negativamente (POPG), os peptídeos formam um grande aglomerado que atua da mesma maneira que a versão com membrana menor: pressionam a membrana e provocam perturbações profundas que indicam o caminho viável para rompimento da membrana. A alta barreira para separar o agregado e provocar a estruturação em hélice de todos os peptídeos somada à energia necessária para entrar na bicamada, indicam que mecanismo em barril é inviável. Esse comportamento, aliado às demais informações experimentais e computacionais obtidas, sugere que o possível mecanismo de ação desse peptídeo híbrido é através do mecanismo carpete.

6. Perspectivas

Uma das perspectivas do trabalho é utilizar cálculos de função de distribuição radial e potencial eletrostático ao redor do triptofano do peptídeo para verificar a vizinhança do aminoácido. Através desses cálculos, será possível determinar o número de coordenação do TRP (e de sua cadeia lateral), obtendo o número médio de moléculas de água que estão coordenadas a ele. Esse é um possível resultado quantitativo para comparação com os dados experimentais obtidos através do espectro de emissão de fluorescência e do deslocamento para o azul (causado pela mudança de polaridade do meio interagente).

Outra perspectiva é criar representações dos sistemas com múltiplas unidades do peptídeo utilizando o modelo *coarse-grained* MARTINI [187–189]. O conceito de modelo *coarse-grained* consiste em reduzir os graus de liberdades (em comparação com modelos *all-atoms*) através do tratamento implícito dos átomos. Ou seja, moléculas ou trechos delas são transformados em sítios únicos de interação e isso provoca, conseqüentemente, a diminuição dos sítios de interação. Devido à diminuição dos graus de liberdade e dos detalhes das interações, uma simulação *coarse-grained* requer menos tempo computacional e obtêm-se trajetórias de forma mais rápida do que para o mesmo sistema tratando todos os átomos explicitamente. Logo, aumentos da escala de tempo e tamanho das caixas das simulações podem ser obtidos. Essa redução permite a visualização de efeitos que escalas de tempo mais reduzidas não são capazes, como o processo de desestabilização e possível rompimento da membrana de POPG.

7. Referências bibliográficas

1. Da Silva, T. H. A. Molecular Modeling with the Aid of a Computer. In *Practical Studies for Medicinal Chemistry*; Monge, A.; Ganellin, C. R., Eds.; International Union of Pure and Applied Chemistry: IUPAC, 2006; pp. 1–46.
2. da Hora, G. C. A.; Archilha, N. L.; Lopes, J. L. S.; Coutinho, K.; Itri, R.; Soares, T. A. Design, Characterization and Mechanism of Action of a Hybrid Peptide from Pediocin PA-1 and Plantaricin 149. *Manuscr. Prep. (Soft Matter)* **2016**.
3. Archilha, N. L. Interação entre um peptídeo antimicrobiano e vesículas de fosfolípidos, Universidade de São Paulo, 2009.
4. Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemistry*; 4^a ed.; John Wiley & Sons: New Jersey, 2011.
5. Marzzoco, A.; Torres, B. B. *Bioquímica Básica*; 2^a ed.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1999.
6. Scherer, G.; Kramer, M. L.; Schutkowski, M.; Reimer, U.; Fischer, G. Barriers to Rotation of Secondary Amide Peptide Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5568–5574.
7. Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Biochemistry*; 5^a ed.; W. H. Freeman: New York, 2002.
8. Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*; Lehninger, A. L., Ed.; 3^a ed.; W. H. Freeman: New York, 2005.
9. Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* **1963**, *7*, 95–99.
10. Kabsch, W.; Sander, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **1983**, *22*, 2577–637.
11. Wang, Z.; Wang, G. APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, D590–2.
12. Martin, E.; Ganz, T.; Lehrer, R. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *J. Leukoc. Biol.* **1995**, *58*, 128–136.
13. Jenssen, H.; Hamill, P.; Hancock, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 491–511.
14. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **2002**, *415*, 389–95.
15. Wang, G.; Li, X.; Wang, Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D933–7.
16. Reddy, K. V. R.; Yedery, R. D.; Aranha, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2004**, *24*, 536–547.
17. Bals, R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir. Res.* **2000**, *1*, 141–50.
18. Ge, Y.; MacDonald, D. L.; Holroyd, K. J.; Thornsberry, C.; Wexler, H.; Zasloff, M. In Vitro Antibacterial Properties of Pexiganan, an Analog of Magainin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 782–788.

19. Zasloff, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 5449–53.
20. Kruszewska, D.; Sahl, H.-G.; Bierbaum, G.; Pag, U.; Hynes, S. O.; Ljungh, A. Mersacidin eradicates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse rhinitis model. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *54*, 648–53.
21. Poole, R. K.; Hancock, R. E. W.; Falla, T.; Brown, M. Cationic Bactericidal Peptides. *Adv. Microb. Physiol.* **1995**, *37*, 135–175.
22. Tytler, E. M.; Anantharamaiah, G. M.; Walker, D. E.; Mishra, V. K.; Palgunachari, M. N.; Segrest, J. P. Molecular basis for prokaryotic specificity of magainin-induced lysis. *Biochemistry* **1995**, *34*, 4393–401.
23. Oren, Z.; Shai, Y. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **1998**, *47*, 451–63.
24. Cudic, M.; Otvos, L. Intracellular targets of antibacterial peptides. *Curr. Drug Targets* **2002**, *3*, 101–6.
25. Hale, J. D. F.; Hancock, R. E. W. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2007**, *5*, 951–9.
26. Wu, M.; Maier, E.; Benz, R.; Hancock, R. E. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **1999**, *38*, 7235–42.
27. Matsuzaki, K.; Murase, O.; Fujii, N.; Miyajima, K. An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry* **1996**, *35*, 11361–8.
28. Matsuzaki, K.; Yoneyama, S.; Fujii, N.; Miyajima, K.; Yamada, K.; Kirino, Y.; Anzai, K. Membrane permeabilization mechanisms of a cyclic antimicrobial peptide, tachyplesin I, and its linear analog. *Biochemistry* **1997**, *36*, 9799–806.
29. Pouny, Y.; Rapaport, D.; Mor, A.; Nicolas, P.; Shai, Y. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogs with phospholipid membranes. *Biochemistry* **1992**, *31*, 12416–12423.
30. Gazit, E.; Boman, A.; Boman, H. G.; Shai, Y. Interaction of the Mammalian Antibacterial Peptide Cecropin P1 with Phospholipid Vesicles. *Biochemistry* **1995**, *34*, 11479–11488.
31. Hancock, R.; Patrzykat, A. Clinical Development of Cationic Antimicrobial Peptides: From Natural to Novel Antibiotics. *Curr. Drug Target -Infectious Disord.* **2002**, *2*, 79–83.
32. Gaussier, H.; Lavoie, M.; Subirade, M. Conformational changes of pediocin in an aqueous medium monitored by Fourier transform infrared spectroscopy: a biological implication. *Int. J. Biol. Macromol.* **2003**, *32*, 1–9.
33. Klaenhammer, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **1993**, *12*, 39–85.
34. Montville, T. J.; Chen, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *50*, 511–9.
35. Katla, A.-K.; Kruse, H.; Johnsen, G.; Herikstad, H. *Antimicrobial susceptibility of*

- starter culture bacteria used in Norwegian dairy products*; 2001; Vol. 67.
36. Katla, T.; Moretro, T.; Sveen, I.; Aasen, I. M.; Axelsson, L.; Rorvik, L. M.; Naterstad, K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in chicken cold cuts by addition of sakacin P and sakacin P-producing *Lactobacillus sakei*. *J. Appl. Microbiol.* **2002**, *93*, 191–196.
 37. Cintas, L. .; Casaus, P.; Fernández, M. .; Hernández, P. . Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* **1998**, *15*, 289–298.
 38. Watson, R. M.; Woody, R. W.; Lewis, R. V.; Bohle, D. S.; Andreotti, a H.; Ray, B.; Miller, K. W. Conformational changes in pediocin AcH upon vesicle binding and approximation of the membrane-bound structure in detergent micelles. *Biochemistry* **2001**, *40*, 14037–46.
 39. Jack, R. W.; Tagg, J. R.; Ray, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **1995**, *59*, 171–200.
 40. Ennahar, S.; Sashihara, T.; Sonomoto, K.; Ishizaki, A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* **2000**, *24*, 85–106.
 41. Gaussier, H.; Lefèvre, T.; Subirade, M. Binding of pediocin PA-1 with anionic lipid induces model membrane destabilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 6777–6784.
 42. Chikindas, M. L.; Garcia-Garcera, M. J.; Driessen, A. J.; Ledebøer, A. M.; Nissen-Meyer, J.; Nes, I. F.; Abee, T.; Konings, W. N.; Venema, G. Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Appl. Envir. Microbiol.* **1993**, *59*, 3577–3584.
 43. Fimland, G.; Blingsmo, O. R.; Sletten, K.; Jung, G.; Nes, I. F.; Nissen-Meyer, J. New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: the C-terminal region is important for determining specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 3313–8.
 44. El-Jastimi, R.; Lafleur, M. Structural characterization of free and membrane-bound nisin by infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1997**, *1324*, 151–158.
 45. El Jastimi, R.; Edwards, K.; Lafleur, M. Characterization of Permeability and Morphological Perturbations Induced by Nisin on Phosphatidylcholine Membranes. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 842–852.
 46. Strahilevitz, J.; Mor, A.; Nicolas, P.; Shai, Y. Spectrum of Antimicrobial Activity and Assembly of Dermaseptin-b and Its Precursor Form in Phospholipid Membranes. *Biochemistry* **1994**, *33*, 10951–10960.
 47. Ladokhin, A. S.; Selsted, M. E.; White, S. H. Sizing membrane pores in lipid vesicles by leakage of co-encapsulated markers: pore formation by melittin. *Biophys. J.* **1997**, *72*, 1762–6.
 48. Ladokhin, A. S.; White, S. H. “Detergent-like” permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2001**, *1514*, 253–260.
 49. Matsuzaki, K.; Murase, O.; Tokuda, H.; Funakoshi, S.; Fujii, N.; Miyajima, K. Orientational and Aggregational States of Magainin 2 in Phospholipid Bilayers. *Biochemistry* **1994**, *33*, 3342–3349.

50. Matsuzaki, K.; Harada, M.; Funakoshi, S.; Fujii, N.; Miyajima, K. Physicochemical determinants for the interactions of magainins 1 and 2 with acidic lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1991**, *1063*, 162–170.
51. Oren, Z.; Shai, Y. Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin: structure-function study. *Biochemistry* **1997**, *36*, 1826–35.
52. Kato, T.; Matsuda, T.; Ogawa, E.; Ogawa, H.; Kato, H.; Doi, U.; Nakamura, R. Plantaricin-149, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NRIC 149. *J. Ferment. Bioeng.* **1994**, *77*, 277–282.
53. Haines, T.; Lopes, J. L. S.; Nobre, T. M.; Siano, Á.; Humpola, V.; Bossolan, N. R. S.; Zaniquelli, M. E. D.; Tonarelli, G.; Beltramini, L. M. Disruption of *Saccharomyces cerevisiae* by Plantaricin 149 and investigation of its mechanism of action with biomembrane model systems. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2009**, *1788*, 2252–2258.
54. Müller, D. M.; Carrasco, M. S.; Simonetta, A. C.; Beltramini, L. M.; Tonarelli, G. G. A synthetic analog of plantaricin 149 inhibiting food-borne pathogenic bacteria: evidence for alpha-helical conformation involved in bacteria-membrane interaction. *J. Pept. Sci.* **2007**, *13*, 171–8.
55. Atlas, R. M. *Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition*; CRC Press, 2010.
56. Zhou, H.; Zhou, Y. Fold recognition by combining sequence profiles derived from evolution and from depth-dependent structural alignment of fragments. *Proteins* **2005**, *58*, 321–8.
57. Shai, Y. From Innate Immunity to de-Novo Designed Antimicrobial Peptides. *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 715–725.
58. Zhao, H.; Sood, R.; Jutila, A.; Bose, S.; Fimland, G.; Nissen-Meyer, J.; Kinnunen, P. K. J. Interaction of the antimicrobial peptide pheromone Plantaricin A with model membranes: implications for a novel mechanism of action. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 1461–74.
59. Wallace, B. a Protein characterisation by synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy. *Q. Rev. Biophys.* **2009**, *42*, 317–370.
60. Lopes, J. L. S.; Miles, A. J.; Whitmore, L.; Wallace, B. A. Distinct circular dichroism spectroscopic signatures of polyproline II and unordered secondary structures: Applications in secondary structure analyses. *Protein Sci.* **2014**, *23*, 1765–1772.
61. Lees, J. G.; Smith, B. R.; Wien, F.; Miles, A. J.; Wallace, B. A. CDtool—an integrated software package for circular dichroism spectroscopic data processing, analysis, and archiving. *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 285–289.
62. Andrushchenko, V. V.; Aarabi, M. H.; Nguyen, L. T.; Prenner, E. J.; Vogel, H. J. Thermodynamics of the interactions of tryptophan-rich cathelicidin antimicrobial peptides with model and natural membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2008**, *1778*, 1004–1014.
63. Hadjicharalambous, C.; Sheynis, T.; Jelinek, R.; Shanahan, M. T.; Ouellette, A. J.; Gizeli, E. Mechanisms of alpha-defensin bactericidal action: comparative membrane disruption by Cryptdin-4 and its disulfide-null analogue. *Biochemistry* **2008**, *47*, 12626–34.
64. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer, 2010.

65. Kukol, A. Lipid Models for United-Atom Molecular Dynamics Simulations of Proteins. *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5*, 615–626.
66. Oostenbrink, C.; Villa, A.; Mark, A. E.; van Gunsteren, W. F. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1656–76.
67. Newman, M. H. A. Alan Mathison Turing. 1912-1954. *Biogr. Mem. Fellows R. Soc.* **1955**, *1*, 253–263.
68. Hodges, A. *Alan Turing: The Enigma*; Princeton University Press, 2012.
69. Wood, W. W. Early history of computer simulations in statistical mechanics. **1985**, *67*.
70. Ciccotti, G.; Frenkel, D.; McDonald, I. R. *Simulation of liquids and solids: molecular dynamics and Monte Carlo methods in statistical mechanics*; North-Holland, Amsterdam, 1987.
71. Leach, A. R. Molecular dynamics simulation methods. In *Molecular modelling: principles and applications*; Pearson Education Limited: Harlow, 2001; Vol. 1, pp. 303–409.
72. Martinez, L.; Borin, I. A.; Skaf, M. S. Fundamentos de Simulação por Dinâmica Molecular. In *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*; Morgon, N. H.; Coutinho, K., Eds.; Editora Livraria da Física: São Paulo, 2007; pp. 413–452.
73. Frenkel, D.; Smit, B. Molecular Dynamics Simulation. In *Understanding molecular simulation: from algorithms to applications*; Academic Press: San Diego, 1996; pp. 63–108.
74. van Gunsteren, W. F.; Bakowies, D.; Baron, R.; Chandrasekhar, I.; Christen, M.; Daura, X.; Gee, P.; Geerke, D. P.; Glättli, A.; Hünenberger, P. H.; Kastenholtz, M. A.; Oostenbrink, C.; Schenk, M.; Trzesniak, D.; van der Vegt, N. F. A.; Yu, H. B. Biomolecular modeling: Goals, problems, perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 4064–92.
75. Hansson, T.; Oostenbrink, C.; van Gunsteren, W. Molecular dynamics simulations. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 190–196.
76. Smith, L. J.; Mark, A. E.; Dobson, C. M.; van Gunsteren, W. F. Comparison of MD Simulations and NMR Experiments for Hen Lysozyme. Analysis of Local Fluctuations, Cooperative Motions, and Global Changes. *Biochemistry* **1995**, *34*, 10918–10931.
77. van Gunsteren, W. F.; Mark, A. E. Validation of molecular dynamics simulation. *J. Chem. Phys.* **1998**, *108*, 6109.
78. Tieleman, D. .; Marrink, S. .; Berendsen, H. J. . A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **1997**, *1331*, 235–270.
79. Nagle, J. F.; Tristram-Nagle, S. Structure of lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **2000**, *1469*, 159–195.
80. Leslie, C. V. and J. F. R. / E. E. and A.; van Gunsteren, W. F.; Dolenc, J.; Mark, A. E. Molecular simulation as an aid to experimentalists. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18*, 149–153.
81. Leach, A. R. Empirical Force Field Models: Molecular Mechanics. In *Molecular Modelling: Principles and Applications*; Pearson Education Limited: Harlow, 2001; pp.

- 165–252.
82. Allinger, N. L. Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8127–8134.
 83. Allinger, N. L.; Yuh, Y. H.; Lii, J. H. Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 1. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8551–8566.
 84. Lii, J. H.; Allinger, N. L. Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 2. Vibrational frequencies and thermodynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8566–8575.
 85. Lii, J. H.; Allinger, N. L. Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 3. The van der Waals' potentials and crystal data for aliphatic and aromatic hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8576–8582.
 86. Nevins, N.; Chen, K.; Allinger, N. L. Molecular mechanics (MM4) calculations on alkenes. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 669–694.
 87. Nevins, N.; Lii, J.-H.; Allinger, N. L. Molecular mechanics (MM4) calculations on conjugated hydrocarbons. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 695–729.
 88. Weiner, S. J.; Kollman, P. A.; Case, D. A.; Singh, U. C.; Ghio, C.; Alagona, G.; Profeta, S.; Weiner, P. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 765–784.
 89. 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. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5179–5197.
 90. Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W.; Kollman, P. A. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10269–10280.
 91. Jorgensen, W. L.; Tirado-Rives, J. The OPLS Potential Functions for Proteins. Energy Minimizations for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1658–1666.
 92. Jorgensen, W. L.; Briggs, J. M. Monte Carlo simulations of liquid acetonitrile with a three-site model. *Mol. Phys.* **1988**, *63*, 547–558.
 93. Jorgensen, W. L.; Briggs, J. M.; Contreras, M. L. Relative partition coefficients for organic solutes from fluid simulations. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 1683–1686.
 94. Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tirado-rives, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11225–11236.
 95. Kaminski, G. A.; Friesner, R. A.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 6474–6487.
 96. Brooks, B. R.; Brucoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* **1983**, *4*, 187–217.
 97. Blondel, A.; Karplus, M. New formulation for derivatives of torsion angles and

- improper torsion angles in molecular mechanics: Elimination of singularities. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 1132–1141.
98. Nobelprize.org The Nobel Prize in Chemistry 2013. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2013/.
 99. Reiher III, W. E. *Theoretical Studies of Hydrogen Bonding*, Harvard University, 1985.
 100. Nilsson, L.; Karplus, M. Empirical energy functions for energy minimization and dynamics of nucleic acids. *J. Comput. Chem.* **1986**, *7*, 591–616.
 101. MacKerell, A. D.; Bashford, D.; Bellott, Dunbrack, R. L.; Evanseck, J. D.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T. K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D. T.; Prodhom, B.; Reiher, W. E.; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J. C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiórkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins†. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 3586–3616.
 102. Foloppe, N.; MacKerell Jr., A. D. All-atom empirical force field for nucleic acids: I. Parameter optimization based on small molecule and condensed phase macromolecular target data. *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 86–104.
 103. MacKerell, A. D.; Banavali, N.; Foloppe, N. Development and current status of the CHARMM force field for nucleic acids. *Biopolymers* **2001**, *56*, 257–265.
 104. Kirschner, K. N.; Yongye, A. B.; Tschampel, S. M.; González-Outeiriño, J.; Daniels, C. R.; Foley, B. L.; Woods, R. J. GLYCAM06: A generalizable biomolecular force field. *Carbohydrates. J. Comput. Chem.* **2008**, *29*, 622–655.
 105. Woods, R. J.; Dwek, R. A.; Edge, C. J.; Fraser-Reid, B. Molecular Mechanical and Molecular Dynamic Simulations of Glycoproteins and Oligosaccharides. 1. GLYCAM_93 Parameter Development. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 3832–3846.
 106. Kirschner, K. N.; Lins, R. D.; Maass, A.; Soares, T. A. A Glycam-Based Force Field for Simulations of Lipopolysaccharide Membranes: Parametrization and Validation. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8*, 4719–4731.
 107. Mayo, S. L.; Olafson, B. D.; Goddard, W. A. DREIDING: a generic force field for molecular simulations. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 8897–8909.
 108. Rappe, A. K.; Casewit, C. J.; Colwell, K. S.; Goddard, W. A.; Skiff, W. M. UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10024–10035.
 109. Rappe, A. K.; Colwell, K. S.; Casewit, C. J. Application of a universal force field to metal complexes. *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 3438–3450.
 110. Gundertofte, K.; Liljefors, T.; Norrby, P.; Pettersson, I. A comparison of conformational energies calculated by several molecular mechanics methods. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 429–449.
 111. Young, D. C. *Computational chemistry: a practical guide for applying techniques to real world problems*; 1^a ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2004.
 112. Cornell, W. D.; Ha, M. P.; Sun, Y.; Kollman, P. A. Application of a simple diagonal force field to the simulation of cyclopentane conformational dynamics. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 1541–1548.

113. Halgren, T. A. Merck molecular force field. V. Extension of MMFF94 using experimental data, additional computational data, and empirical rules. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 616–641.
114. Veenstra, D. L.; Ferguson, D. M.; Kollman, P. A. How transferable are hydrogen parameters in molecular mechanics calculations? *J. Comput. Chem.* **1992**, *13*, 971–978.
115. Ferguson, D. M.; Gould, I. R.; Glauser, W. A.; Schroeder, S.; Kollman, P. A. Comparison of ab initio, semiempirical, and molecular mechanics calculations for the conformational analysis of ring systems. *J. Comput. Chem.* **1992**, *13*, 525–532.
116. Jalaie, M.; Lipkowitz, K. B. Appendix: Published Force Field Parameters for Molecular Mechanics, Molecular Dynamics, and Monte Carlo Simulations. In *Reviews in Computational Chemistry*; John Wiley & Sons, Inc., 2007; pp. 441–486.
117. Guvench, O.; MacKerell Jr., A. Comparison of Protein Force Fields for Molecular Dynamics Simulations. In *Molecular Modeling of Proteins SE - 4*; Kukol, A., Ed.; Methods Molecular BiologyTM; Humana Press, 2008; Vol. 443, pp. 63–88.
118. Cino, E. a; Choy, W.-Y.; Karttunen, M. Comparison of Secondary Structure Formation Using 10 Different Force Fields in Microsecond Molecular Dynamics Simulations. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8*, 2725–2740.
119. van Gunsteren, W. F.; Berendsen, H. J. C. Groningen Molecular Simulation (GROMOS) Library Manual **1987**, 1–221.
120. van Gunsteren, W. F.; Billeter, S. R.; Eising, A. A.; Hünenberger, P. H.; Krüger, P.; Mark, A. E.; Scott, W. R. P.; Tironi, I. G. *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 manual and userguide*; Hochschulverlag AG an der ETH Zürich: Zuriqye, Suiça, 1996.
121. van Gunsteren, W. F.; Berendsen, H. J. C. Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1990**, *29*, 992–1023.
122. Weiner, P. K.; Kollman, P. A. AMBER: Assisted model building with energy refinement. A general program for modeling molecules and their interactions. *J. Comput. Chem.* **1981**, *2*, 287–303.
123. Lins, R. D.; Hünenberger, P. H. A new GROMOS force field for hexopyranose-based carbohydrates. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1400–12.
124. Chandrasekhar, I.; Kastholz, M.; Lins, R. D.; Oostenbrink, C.; Schuler, L. D.; Tieleman, D. P.; van Gunsteren, W. F. A consistent potential energy parameter set for lipids: dipalmitoylphosphatidylcholine as a benchmark of the GROMOS96 45A3 force field. *Eur. Biophys. J.* **2003**, *32*, 67–77.
125. Poger, D.; van Gunsteren, W. F.; Mark, A. E. A new force field for simulating phosphatidylcholine bilayers. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 1117–1125.
126. Schmid, N.; Eichenberger, A. P.; Choutko, A.; Riniker, S.; Winger, M.; Mark, A. E.; van Gunsteren, W. F. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *Eur. Biophys. J.* **2011**, *40*, 843–56.
127. Cao, Z.; Lin, Z.; Wang, J.; Liu, H. Refining the description of peptide backbone conformations improves protein simulations using the GROMOS 53A6 force field. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 645–60.

128. Reif, M. M.; Hünenberger, P. H. Computation of methodology-independent single-ion solvation properties from molecular simulations. IV. Optimized Lennard-Jones interaction parameter sets for the alkali and halide ions in water. *J. Chem. Phys.* **2011**, *134*, 144104.
129. Daura, X.; Mark, A. E.; Van Gunsteren, W. F. Parametrization of aliphatic CH_n united atoms of GROMOS96 force field. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 535–547.
130. Schuler, L. D.; Daura, X.; van Gunsteren, W. F. An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase. *J. Comput. Chem.* **2001**, *22*, 1205–1218.
131. Oostenbrink, C.; van Gunsteren, W. F. Free energies of binding of polychlorinated biphenyls to the estrogen receptor from a single simulation. *Proteins* **2004**, *54*, 237–46.
132. Tironi, I. G.; Sperb, R.; Smith, P. E.; van Gunsteren, W. F. A generalized reaction field method for molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.* **1995**, *102*, 5451.
133. Van Gunsteren, W. F.; Karplus, M. Protein dynamics in solution and in a crystalline environment: a molecular dynamics study. *Biochemistry* **1982**, *21*, 2259–2274.
134. Gurskaya, G. V. *Molecular Structure of Amino Acids-Determination by X-Ray Diffraction Analysis*; Bureau, C., Ed.; New York, 1968.
135. Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; Van Gunsteren, W. F.; Hermans, J. Interaction models for water in relation to protein hydration. In *Intermolecular Forces*; Pullman, B., Ed.; Intermolecular Forces.; Reidel: Dordrecht: The Netherlands, 1981; Vol. 11, pp. 331–338.
136. Chiu, S. W.; Clark, M. M.; Jakobsson, E.; Subramaniam, S.; Scott, H. L. Optimization of Hydrocarbon Chain Interaction Parameters: Application to the Simulation of Fluid Phase Lipid Bilayers. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 6323–6327.
137. Schmid, N.; Eichenberger, A. P.; Choutko, A.; Riniker, S.; Winger, M.; Mark, A. E.; van Gunsteren, W. F. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *Eur. Biophys. J.* **2011**, *40*, 843–856.
138. Hess, B.; Kutzner, C.; van der Spoel, D.; Lindahl, E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 435–447.
139. Rusu, V. H.; Baron, R.; Lins, R. D. PITOMBA: Parameter Interface for Oligosaccharide Molecules Based on Atoms. *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, *10*, 5068–5080.
140. Leach, A. R. Computer Simulation Methods. In *Molecular Modelling: Principles and Applications*; Pearson Education Limited: Harlow, 2001; pp. 303–352.
141. Bekker, H.; Dijkstra, E. J.; Renardus, M. K. R.; Berendsen, H. J. C. An Efficient, Box Shape Independent Non-Bonded Force and Virial Algorithm for Molecular Dynamics. *Mol. Simul.* **1995**, *14*, 137–151.
142. Martyna, G. J.; Tobias, D. J.; Klein, M. L. Constant pressure molecular dynamics algorithms. *J. Chem. Phys.* **1994**, *101*, 4177.
143. Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684.
144. Berendsen, H. J. C. Transport Properties Computed by Linear Response through Weak

- Coupling to a Bath. In *Computer Simulation in Materials Science SE - 7*; Meyer, M.; Pontikis, V., Eds.; NATO ASI Series; Springer Netherlands, 1991; Vol. 205, pp. 139–155.
145. Verlet, L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Phys. Rev.* **1967**, *159*, 98–103.
 146. Hockney, R. .; Goel, S. .; Eastwood, J. . Quiet high-resolution computer models of a plasma. *J. Comput. Phys.* **1974**, *14*, 148–158.
 147. Berendsen, H. J. C.; van Gunsteren, W. F. Practical algorithms for dynamic simulations. In *Molecular Dynamics Simulation of Statistical Mechanical Systems*; Ciccotti, G.; Hoover, W., Eds.; Soc. Italiana di Fisica: Bologna, 1986; pp. 43–65.
 148. Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, a.; Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684.
 149. Nosé, S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Mol. Phys.* **1984**, *52*, 255–268.
 150. Hoover, W. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Phys. Rev. A* **1985**, *31*, 1695–1697.
 151. Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 014101.
 152. Oostenbrink, C.; Villa, A.; Mark, A. E.; Van Gunsteren, W. F. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1656–1676.
 153. Van Der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A. E.; Berendsen, H. J. C. GROMACS: fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1701–18.
 154. Andersen, H. C. Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature. *J. Chem. Phys.* **1980**, *72*, 2384.
 155. Parrinello, M.; Rahman, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* **1981**, *52*, 7182.
 156. Nosé, S.; Klein, M. L. Constant pressure molecular dynamics for molecular systems. *Mol. Phys.* **1983**, *50*, 1055–1076.
 157. Martyna, G. J.; Tuckerman, M. E.; Tobias, D. J.; Klein, M. L. Explicit reversible integrators for extended systems dynamics. *Mol. Phys.* **1996**, *87*, 1117–1157.
 158. Ryckaert, J.-P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. . Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23*, 327–341.
 159. Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 1463–1472.
 160. Andersen, H. C. Rattle: A “velocity” version of the shake algorithm for molecular dynamics calculations. *J. Comput. Phys.* **1983**, *52*, 24–34.
 161. Onsager, L. Electric Moments of Molecules in Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, *58*, 1486–1493.
 162. Barker, J. A.; Watts, R. O. Monte Carlo studies of the dielectric properties of water-like models. *Mol. Phys.* **1973**, *26*, 789–792.

163. Watts, R. O. Monte Carlo studies of liquid water. *Mol. Phys.* **1974**, *28*, 1069–1083.
164. Allen, M. P.; Tildesley, D. J. *Computer Simulation of Liquids*; Oxford University Press, USA, 1989.
165. Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An $N \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089.
166. Walser, R.; Hünenberger, P. H.; van Gunsteren, W. F. Comparison of different schemes to treat long-range electrostatic interactions in molecular dynamics simulations of a protein crystal. *Proteins* **2001**, *43*, 509–19.
167. Glättli, A.; Daura, X.; Seebach, D.; van Gunsteren, W. F. Can One Derive the Conformational Preference of a β -Peptide from Its CD Spectrum? *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12972–12978.
168. Berendsen, H. J. C.; Grigera, J. R.; Straatsma, T. P. The missing term in effective pair potentials. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 6269–6271.
169. Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926.
170. Patra, M.; Karttunen, M.; Hyvönen, M. T.; Falck, E.; Lindqvist, P.; Vattulainen, I. Molecular dynamics simulations of lipid bilayers: major artifacts due to truncating electrostatic interactions. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 3636–45.
171. Anézo, C.; de Vries, A. H.; Höltje, H.-D.; Tieleman, D. P.; Marrink, S.-J. Methodological Issues in Lipid Bilayer Simulations. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 9424–9433.
172. Joosten, R. P.; te Beek, T. a H.; Krieger, E.; Hekkelman, M. L.; Hooft, R. W. W.; Schneider, R.; Sander, C.; Vriend, G. A series of PDB related databases for everyday needs. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, D411–9.
173. Clarke, J. B.; Hastie, J. W.; Kihlberg, L. H. E.; Metselaar, R.; Thackeray, M. M. Definitions of terms relating to phase transitions of the solid state (IUPAC Recommendations 1994). *Pure Appl. Chem.* **1994**, *66*, 577–594.
174. Wilkinson, C. by A. D. M. and A. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology (the “Gold Book”)*; Nič, M.; Jirát, J.; Košata, B.; Jenkins, A.; McNaught, A., Eds.; 2^a ed.; Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1997.
175. Vermeer, L. S.; de Groot, B. L.; Réat, V.; Milon, A.; Czaplicki, J. Acyl chain order parameter profiles in phospholipid bilayers: computation from molecular dynamics simulations and comparison with ²H NMR experiments. *Eur. Biophys. J.* **2007**, *36*, 919–31.
176. Leach, A. R. Conformational Analysis. In *Molecular Modelling: Principles and Applications*; Pearson Education Limited: Harlow, 2001; pp. 457–508.
177. Kirkpatrick, S.; Gelatt, C. D.; Vecchi, M. P. Optimization by simulated annealing. *Science* **1983**, *220*, 671–80.
178. Kirkpatrick, S. Optimization by simulated annealing: Quantitative studies. *J. Stat. Phys.* **1984**, *34*, 975–986.
179. Oostenbrink, C.; Soares, T. a; van der Vegt, N. F. a; van Gunsteren, W. F. Validation of the 53A6 GROMOS force field. *Eur. Biophys. J.* **2005**, *34*, 273–84.

180. Pabst, G.; Rappolt, M.; Amenitsch, H.; Laggner, P. Structural information from multilamellar liposomes at full hydration: full q-range fitting with high quality x-ray data. *Phys. Rev. E. Stat. Phys. Plasmas. Fluids. Relat. Interdiscip. Topics* **2000**, *62*, 4000–9.
181. Kucerka, N.; Tristram-Nagle, S.; Nagle, J. F. Structure of fully hydrated fluid phase lipid bilayers with monounsaturated chains. *J. Membr. Biol.* **2005**, *208*, 193–202.
182. Elmore, D. E. Molecular dynamics simulation of a phosphatidylglycerol membrane. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 144–8.
183. Pan, J.; Heberle, F. A.; Tristram-Nagle, S.; Szymanski, M.; Koepfinger, M.; Katsaras, J.; Kučerka, N. Molecular structures of fluid phase phosphatidylglycerol bilayers as determined by small angle neutron and X-ray scattering. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1818*, 2135–48.
184. Zhao, W.; Róg, T.; Gurtovenko, A. A.; Vattulainen, I.; Karttunen, M. Atomic-scale structure and electrostatics of anionic palmitoyloleoylphosphatidylglycerol lipid bilayers with Na⁺ counterions. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 1114–24.
185. Janosi, L.; Gorfe, A. a. Simulating POPC and POPC/POPG Bilayers: Conserved Packing and Altered Surface Reactivity. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 3267–3273.
186. Janosi, L.; Gorfe, A. A. Simulating POPC and POPC/POPG Bilayers: Conserved Packing and Altered Surface Reactivity. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 3267–3273.
187. Marrink, S. J.; Risselada, H. J.; Yefimov, S.; Tieleman, D. P.; de Vries, A. H. The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 7812–7824.
188. Monticelli, L.; Kandasamy, S. K.; Periole, X.; Larson, R. G.; Tieleman, D. P.; Marrink, S.-J. The MARTINI Coarse-Grained Force Field: Extension to Proteins. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 819–834.
189. Lee, H.; de Vries, A. H.; Marrink, S.-J.; Pastor, R. W. A coarse-grained model for polyethylene oxide and polyethylene glycol: conformation and hydrodynamics. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 13186–13194.

8. Anexos

8.1. Lista de Aminoácidos

<i>Nome</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Abreviação</i>	<i>Nomenclatura</i>
Glicina ou Glicocola	Gly, Gli	G	Ácido 2-aminoacético ou Ácido 2-amino-etanóico
Alanina	Ala	A	Ácido 2-aminopropiônico ou Ácido 2-amino-propanóico
Leucina	Leu	L	Ácido 2-aminoisocapróico ou Ácido 2-amino-4-metil-pentanóico
Valina	Val	V	Ácido 2-aminovalérico ou Ácido 2-amino-3-metil-butanóico
Isoleucina	Ile	I	Ácido 2-amino-3-metil-n-valérico ou ácido 2-amino-3-metil-pentanóico
Prolina	Pro	P	Ácido pirrolidino-2-carboxílico
Fenilalanina	Phe, Fen	F	Ácido 2-amino-3-fenil-propilônico ou Ácido 2-amino-3-fenil-propanóico
Serina	Ser	S	Ácido 2-amino-3-hidroxi-propilônico ou Ácido 2-amino-3-hidroxi-propanóico
Treonina	Thr, The	T	Ácido 2-amino-3-hidroxi-n-butírico
Cisteína	Cys, Cis	C	Ácido 2-bis-(2-amino-propilônico)-3-dissulfeto ou Ácido 3-tiol-2-amino-propanóico
Tirosina	Tyr, Tir	Y	Ácido 2-amino-3-(p-hidroxifenil)propilônico ou paraidroxifenilalanina
Asparagina	Asn	N	Ácido 2-aminossuccinâmico
Glutamina	Gln	Q	Ácido 2-aminoglutarâmico
Aspartato ou Ácido aspártico	Asp	D	Ácido 2-aminossuccínico ou Ácido 2-amino-butanodióico
Glutamato ou Ácido glutâmico	Glu	E	Ácido 2-aminoglutárico
Arginina	Arg	R	Ácido 2-amino-4-guanidina-n-valérico
Lisina	Lys, Lis	K	Ácido 2,6-diaminocapróico ou Ácido 2, 6-diaminoexanóico
Histidina	His	H	Ácido 2-amino-3-imidazolpropilônico
Triptofano	Trp, Tri	W	Ácido 2-amino-3-indolpropilônico
Metionina	Met	M	Ácido 2-amino-3-metil-tio-n-butírico

8.2. Metodologia

8.2.1. Atualização para GROMOS 54A7

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	atom		c6		c12				
2	O		2,26195360E-03		1,00000000E-06		0,004663258		5,16200000E-06
3	OM		2,26195360E-03		9,41262400E-06		0,004663258		1,58370160E-05
4	OA		2,26195360E-03		1,50552900E-06		0,004663258		6,33377400E-06
5	OE		2,26195360E-03		1,21000000E-06		0,004663258		5,67820000E-06
6	OW		2,61734560E-03		2,63412900E-06		0,005016238		8,37792600E-06
7	N		2,43640960E-03		2,31952900E-06		0,004839748		7,86172600E-06
8	NT		2,43640960E-03		5,06250000E-06		0,004839748		1,16145000E-05
9	NL		2,43640960E-03		2,31952900E-06		0,004839748		7,86172600E-06
10	NR		2,43640960E-03		3,38928100E-06		0,004839748		9,50324200E-06
11	NZ		2,43640960E-03		2,31952900E-06		0,004839748		7,86172600E-06
12	NE		2,43640960E-03		2,31952900E-06		0,004839748		7,86172600E-06
13	C		2,34062440E-03		4,93728400E-06		0,004743659		1,14699640E-05
14	CH0		2,39708160E-03		2,05348900E-04		0,004800528		7,39714600E-05
15	CH1		6,06841000E-03		9,70225000E-05		0,007638095		5,08457000E-05
16	CH2		7,46841640E-03		3,39655840E-05		0,008473481		3,00841360E-05
17	CH3		9,61380250E-03		2,66462440E-05		0,009613803		2,66462440E-05
18	CH4		1,31790400E-02		3,43630440E-05		0,01125614		3,02596440E-05
19	CH2r		7,33420960E-03		2,80582090E-05		0,008397002		2,73431140E-05
20	CR1		5,51306250E-03		1,51165440E-05		0,007280213		2,00698560E-05
21	HC		8,46400000E-05		1,51290000E-08		0,00090206		6,34926000E-07
22	H		0,00000000E+00		0,00000000E+00		0		0,00000000E+00
23	DUM		0,00000000E+00		0,00000000E+00		0		0,00000000E+00
24	S		9,98400640E-03		1,30754560E-05		0,009797156		1,86657920E-05
25	CU1+		4,18202500E-04		5,12512810E-09		0,002005123		3,69547580E-07
26	CU2+		4,18202500E-04		5,12512810E-09		0,002005123		3,69547580E-07
27	FE		0,00000000E+00		0,00000000E+00		0		0,00000000E+00
28	ZN2+		4,18202500E-04		9,44006560E-09		0,002005123		5,01539920E-07
29	MG2+		6,52864000E-05		3,40822440E-09		0,000792244		3,01357560E-07
30	CA2+		1,00489000E-03		4,98012490E-07		0,003108185		3,64282340E-06
31	P		1,47379600E-02		2,21935210E-05		0,01190327		2,43181820E-05
32	AR		6,26472250E-03		9,84704400E-06		0,007760658		1,61983560E-05
33	F		1,17786240E-03		7,60732840E-07		0,003365076		4,50229640E-06
34	CL		8,76470440E-03		1,52959210E-05		0,009179441		2,01885820E-05
35	BR		2,78556900E-02		6,54804640E-05		0,016305715		4,17709040E-05
36	CMet		8,87552410E-03		1,93600000E-05		0,009237291		2,27128000E-05
37	OMet		2,26195360E-03		2,32562500E-06		0,004663258		7,87205000E-06
38	NA+		7,20631210E+00		7,29000000E-08		0,263211058		1,39374000E-06
39	CL-		1,38062500E-02		6,04661760E-05		0,011520875		4,01397120E-05
40	CChI		2,63086930E-03		4,06425600E-06		0,005029181		1,04065920E-05
41	CLChI		8,30668190E-03		1,37648420E-05		0,008936375		1,9151362E-05
42	HChI		3,76996000E-05		4,29994950E-09		0,000602027		3,38492989E-07
43	SDmso		1,05616730E-02		2,14980600E-05		0,010076599		2,39341294E-05
44	CDmso		9,61380250E-03		2,66462440E-05		0,009613803		2,66462440E-05
45	ODmso		2,27071310E-03		7,51446260E-07		0,004672279		4,47473132E-06
46	CCl4		2,63086930E-03		7,59994620E-06		0,005029181		1,42306016E-05
47	CLCl4		7,60401440E-03		1,27677580E-05		0,008550058		1,84448582E-05
48	FTFE		1,17786240E-03		1,00000000E-06		0,003365076		5,16200000E-06
49	CTFE		2,34062440E-03		3,37456900E-06		0,004743659		9,48259400E-06
50	CHTFE		7,10480410E-03		2,57759290E-05		0,008264635		2,62074740E-05
51	OTFE		2,26195360E-03		1,50552900E-06		0,004663258		6,33377400E-06
52	CUrea		4,88684880E-03		1,35895450E-05		0,006854283		1,90291968E-05
53	OUrea		2,36390440E-03		1,58986880E-06		0,004767191		6,50876578E-06
54	NUrea		3,35275740E-03		3,95095130E-06		0,005677389		1,02605074E-05
55	SI		1,47379600E-02		2,21935210E-05		0,01190327		2,43181820E-05
56	MNH3		0,00000000E+00		0,00000000E+00		0		0,00000000E+00
57	MW		0,00000000E+00		0,00000000E+00		0		0,00000000E+00
58	CH3p		9,61380250E-03		2,66462440E-05		0,009613803		2,66462440E-05
59									
60									
61	CASD N-D								
62									
63	O		2,26195360E-03		1,00000000E-06		2,34756160E-03		1,94300000E-06
64	N		2,43640960E-03		3,77524900E-06		0,00000000E+00		0,00000000E+00

Figura 8.2.1 Exemplo de cálculo dos parâmetros C6 e C12 de Lennard-Jones com base na atualização do campo de força GROMOS 54A7.

```

ffnonbonded.itp X
[ atomtypes ]
;name  at.num  mass      charge  ptype   c6          c12
O       8       0.000     0.000   A       0.0022619536  1e-06
OM      8       0.000     0.000   A       0.0022619536  7.4149321e-07
OA      8       0.000     0.000   A       0.0022619536  1.505529e-06
OE      8       0.000     0.000   A       0.0022619536  1.21e-06
OW      8       0.000     0.000   A       0.0026173456  2.634129e-06
N       7       0.000     0.000   A       0.0024364096  2.319529e-06
CC14   6       0.000     0.000   A       0.0026308693  7.5999462e-06
CLC14  17      0.000     0.000   A       0.0076040144  1.2767758e-05
TFE     9       0.000     0.000   A       0.0011778624  1e-06
CTFE    6       0.000     0.000   A       0.0023406244  3.374569e-06
CHTFE   6       0.000     0.000   A       0.0071048041  2.5775929e-05
OTFE    8       0.000     0.000   A       0.0022619536  1.505529e-06
CUrea   6       0.000     0.000   A       0.0048868488  1.3589545e-05
OUrea   8       0.000     0.000   A       0.0023639044  1.5898688e-06
NUrea   7       0.000     0.000   A       0.0033527574  3.9509513e-06
SI      14      0.000     0.000   A       0.01473796   2.2193521e-05
MNH3    0       0.000     0.000   A       0.0           0.0
MW      0       0.000     0.000   A       0.0           0.0
CH3p    6       0.000     0.000   A       0.0096138025  2.6646244e-05;added by GCH 27/12/11 based on SCHMID et al. EurBiophysJ (201

[ nonbond_params ]
; i      j      func      c6          c12
OM       O      1      0.0022619536  8.611e-07
OA       O      1      0.0022619536  1.38651e-06
OA       OM     1      0.0022619536  2.258907e-06
OE       O      1      0.0022619536  1.1e-06
OE       OM     1      0.0022619536  9.4721e-07
OE       OA     1      0.0022619536  1.505529e-06
OW       O      1      0.0024331696  1.83399e-06
OW       OM     1      0.0024331696  2.987943e-06
OW       OA     1      0.0024331696  1.991421e-06
OW       OE     1      0.0024331696  1.991421e-06
N        O      1      0.0023475616  1.943000e-06; changed by GCH 27/12/11 based on SCHMID et al. EurBiophysJ (2011) 40:843
N        OM     1      0.0023475616  3.577063e-06
N        OA     1      0.0023475616  2.384061e-06
N        OE     1      0.0023475616  2.384061e-06
N        OW     1      0.0025252576  3.153489e-06
NT       O      1      0.0023475616  2.5425e-06

```

Figura 8.2.2 Exemplo de adição dos parâmetros C6 e C12 de Lennard-Jones no arquivo de interação não-ligada (*ffnon-bonded.itp*) para as modificações do campo de força GROMOS 54A7.

8.2.2. Descrição dos sistemas simulados

Tabela 8.2.1: Descrição e tempo (em ns) de simulação para os sistemas estudados com campo de força GROMOS 54A7 e concentração NaCl 150 mM.

<i>Sistema</i>	<i>Peptídeos</i>	<i>Lipídios</i>	<i>Número de átomos</i>			<i>Tempo (ns)</i>
			<i>Soluto</i>	<i>Íons</i>	<i>Total</i>	
Sol1	1	0	361	7	368	50
Sol2	1	0	361	139	500	60
Memb1	0	512	0	720	27856	100
Memb2	0	512	0	594	27602	100
Memb3	0	512	0	348	27100	100
Memb4	0	512	0	220	26844	100
100PGs1	1	512	27497	713	28210	250
75PGs1	1	512	27369	587	27956	150
75PCs1	1	512	27113	341	27454	150
100PCs1	1	512	26985	227	27212	150
100PGe1	1	507	27232	698	27930	150
75PGe1	1	499	26682	644	27326	150
75PCe1	1	495	26226	338	26564	150
100PCe1	1	511	26933	229	27162	150
100PGe2	2	492	26798	756	27554	150
100PCe2	2	494	26410	308	26718	150
100PGs5	5					
100PGs10a	10	512	30746	1259	32005	500
100PGs10b	10	2048	112154	1926	114080	100
100PCs10	10	2048	110106	1058	111164	100

Sol1 e Sol2 – peptídeo em solução 0 mM e 150 mM, respectivamente.

Memb1, Memb2, Memb3 e Memb4 – membranas sem peptídeos: 100% POPC, 75% POPC, 75% POPG e 100% POPG, respectivamente.

100PGs1 – uma unidade do peptídeo na superfície da membrana de 100% POPG.

75PGs1 – uma unidade do peptídeo na superfície da membrana de 75% POPG + 25% POPC.

75PCs1 – uma unidade do peptídeo na superfície da membrana de 25% POPG + 75% POPC.

100PCs1 – uma unidade do peptídeo na superfície da membrana de 100% POPC.

100PGe1 – uma unidade do peptídeo imersa na membrana de 100% POPG.

75PGe1 – uma unidade do peptídeo imersa na membrana de 75% POPG + 25% POPC.

75PCe1 – uma unidade do peptídeo imersa na membrana de 25% POPG + 75% POPC.

100PCe1 – uma unidade do peptídeo imersa na membrana de 100% POPC.

100PGe2 – duas unidades do peptídeo parcialmente imersas na membrana de 100% POPG.

100PCe2 – duas unidades do peptídeo parcialmente imersas na membrana de 100% POPC.

100PGs5 – cinco unidades do peptídeo na superfície da membrana de 100% POPG.

100PGs10a – dez unidades do peptídeo na superfície da membrana de 100% POPG.

100PGs10b – dez unidades do peptídeo na superfície da membrana gigante de 100% POPG.

100PCs10b – dez unidades do peptídeo na superfície da membrana gigante de 100% POPC.

8.2.3. Campo de Força

- Ângulo Diédrico de Torção

Sendo:

$$(\cos x) (\cos y) = \cos(x + y) \pm (\sin x) (\sin y)$$

E:

$$(\sin x)(\sin y) = \frac{1}{2} [\cos(x - y) - \cos(x + y)]$$

Temos que:

$$\begin{aligned} (\cos x) (\cos y) &= \cos(x + y) \pm \frac{1}{2} [\cos(x - y) - \cos(x + y)] \\ &\quad (-) \\ (\cos x) (\cos y) &= \cos(x - y) - \frac{1}{2} \cos(x - y) + \frac{1}{2} \cos(x + y) \\ &= \frac{1}{2} [\cos(x - y) + \cos(x + y)] \end{aligned}$$

Então (da Eq. 2.17):

$$\cos(m_n \varphi_n) = \frac{1}{2} [\cos(m_n \varphi_n - \delta_n) + \cos(m_n \varphi_n + \delta_n)]$$

8.3. Procedimento Computacional

8.3.1. Arrefecimento simulado – arquivo de entrada

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

Figura 8.3.1 Trecho de arquivo de entrada do tipo .mdp do programa GROMACS para utilização da metodologia de arrefecimento simulado (*simulated annealing*) mostrando o tipo (*periodic*), o tempo (*annealing-time*, em ps) e as temperaturas de referência (*annealing-temp*, em K) para os grupos Proteína e Água com Íons.

9. Apêndice

9.1. *Artigos em Preparação*

- **A Thermodynamic Perspective on the Oxygen Sensitivity of [NiFe]- and [NiFeSe]-Hydrogenases – Gabriel C. da Hora, Aline M. C. Assumpção, Thereza A. Soares e Maurício D. Coutinho-Neto.**
- **Design, Characterization and Mechanism of Action of a Hybrid Peptide from Pediocin PA-1 and Plantaricin 149 – G. C. A. da Hora, N. L. Archilha, J. L. S. Lopes, K. Coutinho, R. Itri, e T. A. Soares.**

9.2. *Artigos Publicados*

- Dias, R. P.; Da Hora, G.C.A.; Ramstedt, M.; Soares, T.A.; Outer Membrane Remodeling: The Structural Dynamics and Electrostatics of Rough Lipopolysaccharide Chemotypes. *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, *10* (6), 2488–2497. (doi:10.1021/ct500075h)
- Lorezón, E. N.; Riske, K. A.; Troiano, G. F.; Da Hora, G.C.A.; Soares, T.A.; Cilli, E.M.; Effect of dimerization on the mechanism of action of aurein 1.2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* **2016**. (doi:10.1016/j.bbamem.2016.02.010)