UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE FÍSICA

Estudo Teórico da Interação entre Líquido Iônico e Bicamadas Fosfolipídicas

MATHEUS JEAN LAZAROTTO

ORIENTADORA

PROFA.DRA. KALINE RABELO COUTINHO

Dissertação de mestrado apresentada
ao Instituto de Física para a obtenção
do título de Mestre em Física.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Kaline Rabelo Coutinho (IF/USP)

Profa. Dra. Iolanda Midea Cuccovia (IQ/USP)

Profa. Dra. Thereza Amélia Soares da Silva (DQF/UFPE)

SÃO PAULO

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação
do Instituto de Física da Universidade de São Paulo

Lazarotto, Matheus Jean

Estudo teórico da interação de líquido iônico com bicamadas fosfolipídicas. São Paulo, 2019.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Física. Depto. de Física Geral.

Orientador: Profa. Dra. Kaline Rabelo Coutinho
Área de Concentração: Física Atômica e Molecular

Unitermos: 1. Biofísica; 2. Física da matéria condensada; 3. Fluídos complexos; 4. Física computacional.

USP/IF/SBI-024/2019

UNIVERSITY OF SÃO PAULO

PHYSICS INSTITUTE

Theoretical Study of the Interaction Between Ionic Liquid and Phospholipid Bilayers

MATHEUS JEAN LAZAROTTO

ORIENTED BY

PROFA.DRA. KALINE RABELO COUTINHO

Master thesis presented to the
Physics Institute for the obtainment
of the Master degree in Physics.

SÃO PAULO
2019

Agradecimentos

Este trabalho, conduzido ao longo de 2 anos, contou com financiamento da CAPES ao programa Biocomputacional sob o processo 88882.160171/2017-01.

Agradeço à Kaline, pela oportunidade, assistência e tratamento amigável, permitindo tranquilidade a um longo trabalho. Foi um privilégio contar com sua experiência.

Aos colegas com quem dividi espaço, Leandro e Henrique, pelas incontáveis ajudas e sugestões, desde minhas primeiras simulações até as menores dúvidas, minha sincera gratidão. À Pamela, pela fortuita felicidade de ter partilhado de sua companhia. Ao Julian, pelo apreço e amizade que dispôs, e em particular pela ajuda na construção das topologias, executada com eficiência germânica.

Ao Fabio e ao Valdir, pela atenção, prontidão e esforço contra as diversas e ferrenhas pendências técnicas com computadores e servidores.

À Fátima, Bianca e Edineusa, pela organização das atividades do departamento e tratamento cordial, em especial pela ajuda na impressão deste trabalho. À todos os demais funcionários do IFUSP pelo diligente trabalho.

À todos os colegas que tive o prazer de conhecer por circunstância deste trabalho, em congressos, cursos ou reuniões. Aos amigos mais antigos pelo apoio e por compartilharem das vicissitudes do meio científico.

À Vanessa e ao Bruno, pelo acolhimento e divertimento que me proporcionaram desde meu primeiro dia em São Paulo. Obrigado por zelarem por mim.

À Larissa, por ter me estimulado desde as primeiras lições de física e por ter sido meu refúgio. Obrigado por ter se mantido tão perto.

Aos meus pais, meus mais sinceros agradecimentos, os quais preencheriam mais páginas do que disponho. Impensável me olhar hoje sem ver o reflexo de vocês.

*Well, that's Philosophy I've read,
And Law and Medicine, and I fear
Theology too, from A to Z;
Hard studies all, that have cost me dear.
And so I sit, poor silly man,
No wiser now than when I began.*

Johann Wolfgang von Goethe, *Faust* (1808)

Resumo

Experimentalmente, a transição entre as fases gel e gel-líquida de bicamadas fosfolipídicas pode ser mensurada por técnicas de anisotropia de fluorescência. A partir de uma sonda interna à membrana, a diferença entre as radiações absorvida e emitida, causada pela rotação da sonda no intervalo de fluorescência, relaciona-se com a fluidez da membrana. Com esta técnica aplicada às sondas DPH, foi encontrada influência do líquido iônico (LI) C14MImCl na temperatura de transição de fase de fosfolipídios carregados (DPPG), mas não nos casos neutros (DPPC e DMPC). A temperatura de transição para DPPG apresenta queda de 45°C , em estado puro, para 26°C com concentração de 30%mol de LI. Neste estudo, simulações de dinâmica molecular foram conduzidas de forma a descrever as interações de LI com os fosfolipídios de bicamadas em dois casos, DPPC e DPPG, e de analisar o comportamento dinâmico da sonda. Diferentes condições iniciais de mistura entre lipídios e LI foram consideradas nas simulações. Os resultados indicam que, quando misturadas aleatoriamente, ambos os lipídios apresentam agregação espontânea, evoluindo para forma lamelar com LI distribuído uniformemente. Quando uniformemente distribuído, o LI diminui a interação entre lipídios e outras moléculas do sistema nos dois casos, porém com maior intensidade em DPPG devido à repulsão dos contra íons catiônicos (Na^+) do lipídio, enquanto que em DPPC os contra íons aniônicos provenientes do LI (Cl^-) mantém-se perto da interface. O comportamento da sonda foi qualitativamente reproduzido e visto ser altamente correlacionado com a fluidez das caudas, medida por meio do parâmetro de ordem deutérica. Por conta da equivalência das caudas entre DPPC e DPPG, encontrou-se comportamento similar nos dois sistemas.

Palavras-chave: Bicamadas, Anisotropia de Fluorescência, Líquido Iônico, Dinâmica Molecular

Abstract

The gel-liquid phase transition of phospholipid bilayers can be experimentally measured via fluorescence anisotropy techniques. Using a fluorescent probe in the membrane, the difference between absorbed and emitted radiation due to rotational movement can be related to the bilayer fluidity. The use of the fluorescent probe DPH shows the influence of the ionic liquid (IL) C14MImCl on the phase transition temperature of charged lipids (DPPG) but not neutral ones (DPPC and DMPC). The phase transition temperature for DPPG bilayers dropped from 45°C , in pure state, to 26°C , with 30%mol concentration of IL. In this study, molecular dynamics (MD) simulations were performed in order to describe the IL interactions with the phospholipids in the membranes for two cases, DPPG and DPPC, and to analyze the dynamical behavior of the probe. Different initial conditions of the mixture between IL and lipids were considered in the simulations. The results indicate that in random initial conditions, both lipids spontaneously aggregates with the IL into a bilayer shape with IL uniformly distributed across it. The uniform distribution of IL in the membranes decreased the total interaction of the lipids and the other molecules in the system for both cases, but with higher influence in DPPG due to repulsion of cationic counter ions from the lipids (Na^+), whereas in DPPC the anionic counter ions from IL (Cl^-) remained closer to the bilayer interface. The probe behavior was qualitatively verified and found to be highly correlated with the lipid tails fluidity, through the calculated Deuter order parameter. Because of tails equivalence between the DPPG and DPPC, it was found a similar behavior of the probe in both systems.

Key-words: Bilayers, Fluorescent Anisotropy, Ionic Liquid, Molecular Dynamics

Lista de Figuras

1	Estruturas formadas por moléculas fosfolipídicas.	16
2	Principais moléculas componentes dos sistemas estudados.	17
3	Destaque da cabeça polar de uma molécula fosfolipídica.	18
4	Organização das caudas dos fosfolipídios nas fases gel e gel-líquida.	19
5	Escaneamento diferencial calorimétrico dos lipídios DMPG e DMPC, utilizado para determinação da temperatura de transição de fase.	19
6	Representação da anisotropia de fluorescência devido à rotação da sonda DPH inserida em bicamada.	20
7	Temperatura de transição de fase T_M para bicamadas neutras (DPPC e DMPC) e carregadas (DPPG) em função da concentração molar de líquido iônico C14MImCL.	21
8	Esquematização do fluxograma do algoritmo geral de DM	25
9	Ilustração do algoritmo de evolução das variáveis $\mathbf{r}_i$, $\mathbf{v}_i$ e $\mathbf{a}_i$ pelo integrador de Euler.	26
10	Ilustração do algoritmo de evolução das variáveis $\mathbf{r}_i$, $\mathbf{v}_i$ e $\mathbf{a}_i$ pelo integrador <i>LeapFrog</i>	26
11	Esquematização do fluxograma do algoritmo de integração de LeapFrog	28
12	Gráfico da função potencial de Coulomb U_{Coul} para o caso de cargas unitárias de mesmo sinal (repulsivo).	30
13	Gráfico da função potencial de Lennard-Jones U_{LJ}	31
14	Esquematização do potencial V_{bond}	33
15	Gráfico da função potencial de ligação U_{bond} para o caso harmônico V_h e quártico V_b	33
16	Esquematização do potencial V_{angle}	33
17	Gráfico da função potencial de ângulo U_{angle} para diferentes valores de equilíbrio θ_0	34
18	Esquematização do potencial $V_{dihedral}$	34
19	Gráfico da função potencial de diedro $U_{dihedral}$ para diferentes modos m	35
20	Esquematização do potencial $V_{improper}$	35
21	Gráfico da função potencial de diedro impróprio U_{improp} para diferentes valores de equilíbrio ξ_0	36
22	Método das imagens exemplificado com a réplica da caixa de simulação em duas dimensões.	37
23	As três etapas de movimento realizadas no LINCS em cada passo de tempo exemplificado para uma ligação e um eixo cartesiano.	40
24	Esquematização do fenômeno de anisotropia pelo movimento rotacional da sonda fluorescente no tempo τ	45
25	Superfícies ajustadas às interfaces da membrana em azul, no meio em branco, a superfície média entre elas. Produzidas a partir do software SuAVE.	47
26	Perfil de densidade atômica exemplificado para uma bicamada de DPPC.	48
27	Superfícies de Gibbs indicadas para as curvas de densidade da água e hidrocarbonetos	49
28	Esquematização da definição dos eixos para o cálculo dos parâmetros de ordem S_{CD}	50

29	Estruturação local ao redor de uma molécula contada a partir de cascas esféricas concêntricas para o cálculo de $g(r)$	51
30	Etapas de construção da bicamada a partir da estrutura de um lipídio. . .	53
31	Célula unitária da monocamada com líquido iônico à esquerda e sua replicação em rede 6×6	55
32	Corte em perfil da bicamada de DPPC termalizada com a alocação da sonda DPH.	56
33	Diferentes configurações iniciais de mistura de LI e lipídios simuladas. . .	60
34	Evolução temporal (300ns) da mistura de DPPC e LI a 293K a partir de condição inicial aleatória.	62
35	Evolução temporal (300ns) da mistura de DPPC e LI a 343K a partir de condição inicial aleatória.	62
36	Evolução temporal (300ns) da mistura de DPPG e LI a 293K a partir de condição inicial aleatória.	63
37	Evolução temporal (300ns) da mistura de DPPG e LI a 343K a partir de condição inicial aleatória.	63
38	Evolução temporal (300ns) da mistura de DPPC e LI a partir da condição inicial com subdomínio de LI.	64
39	Visão em perfil lateral da evolução temporal da mistura de DPPC e LI a partir da condição inicial com subdomínio de LI (fig 38).	65
40	Evolução temporal (300ns) da mistura de DPPG e LI a partir da condição inicial com subdomínio de LI.	65
41	Visão em perfil lateral da evolução temporal da mistura de DPPG e LI a partir da condição inicial com subdomínio de LI (fig 40).	66
42	Reprodução de 1ns de evolução de DPPG com LI em 343K (fig 40) em ângulo ressaltando o descolamento das monocamadas.	66
43	Evolução temporal (300ns) da mistura de DPPC e LI a partir da condição inicial com agregado de LI.	67
44	Visão superior da evolução temporal da mistura de DPPC e LI a partir da condição inicial com agregado de LI a 343K (fig 43).	67
45	Evolução temporal (300ns) da mistura de DPPG e LI a partir da condição inicial com agregado de LI.	68
46	Visão superior da evolução temporal da mistura de DPPG e LI a partir da condição inicial com agregado de LI (fig 45).	68
47	APL em função do tempo para bicamada de DPPC pura e com LI nas fases gel e gel-líquida, sem DPH, calculada a partir da seção plana da caixa. . .	70
48	APL em função do tempo para bicamada de DPPG pura e com LI nas fases gel e gel-líquida, sem DPH, calculada a partir da seção plana da caixa. . .	70
49	APL em função do tempo no intervalo de produção (fig 47) com correção de curvatura para a bicamada de DPPC pura e com LI nas fases gel e gel-líquida, sem DPH.	71
50	APL em função do tempo no intervalo de produção (fig 48) com correção de curvatura para a bicamada de DPPG pura e com LI nas fases gel e gel-líquida, sem DPH.	71
51	Parâmetro de ordem angular $P_2(\cos(\phi))$ para as superfícies das bicamadas de DPPC puras e com LI.	75
52	Parâmetro de ordem angular $P_2(\cos(\phi))$ para as superfícies das bicamadas de DPPG puras e com LI.	75

53	Mapa topográfico da altura z da superfície média ajustada entre as monocamadas dos sistemas de bicamadas simulados.	76
54	Mapa topográfico da espessura entre as superfícies ajustadas pelos átomos mais externos das bicamadas.	77
55	Espessura T_z (média sobre superfície) em função do tempo para bicamadas de DPPC puras e com LI nas fases gel e fluida.	78
56	Espessura T_z (média sobre superfície) em função do tempo para bicamadas de DPPG puras e com LI nas fases gel e fluida.	78
57	Parâmetro de ordem deutérica S_{CD} para os carbonos C_i das caudas de DPPC, à esquerda, e DPPG, à direita.	79
58	Parâmetro de ordem deutérica S_{CD} para os carbonos C_i da cauda de líquido iônico nas temperaturas (293 e 343K) e fosfolípidios (DPPC e DPPG) simulados.	81
59	Perfis de densidade numérica DP para os diversos grupos da bicamada de DPPC pura nas fases gel (293K) e fluida (343K).	82
60	Perfis de densidade numérica DP para os diversos grupos da bicamada de DPPG pura nas fases gel (293K) e fluida (343K).	83
61	Exemplificação do efeito da interdigitação parcial sobre o perfil de densidade.	84
62	Regiões interdigitadas na bicamada de DPPG pura em fase gel.	84
63	Perfis de densidade numérica DP para os diversos grupos da bicamada de DPPC com LI (30%mol) nas fases gel (293K) e fluida (343K).	85
64	Perfis de densidade numérica DP para os diversos grupos da bicamada de DPPG com LI (30%mol) nas fases gel (293K) e fluida (343K).	86
65	Perfis de densidade numérica comparados entre DPPC e DPPG com LI nas fases gel (293K) e fluida (343K).	87
66	Função de distribuição radial $g(r)$ entre colinas (chol) de bicamadas de DPPC puro e com LI (IoL) a 293 e 343K.	91
67	Função de distribuição radial $g(r)$ entre gliceróis (gly) de bicamadas de DPPG puro e com LI (IoL) a 293 e 343K.	91
68	Função de distribuição radial $g(r)$ entre o contra íon Na^+ e gliceróis (gly) em bicamadas pura e com LI (IoL) a 293 e 343K.	92
69	Função de distribuição radial $g(r)$ entre os grupos colina (Chol) e glicerol (Gly) com as cabeças de LI (H) nas temperaturas 293K e 343K.	93
70	Função de distribuição radial $g(r)$ entre a cabeças de LI (H) nas bicamadas de DPPC e DPPG em duas temperaturas: 293K e 343K.	93
71	Função de distribuição radial $g(r)$ entre cabeças de LI (H) e água nas bicamadas de DPPC e DPPG em duas temperaturas: 293K e 343K.	94
72	Função de distribuição radial $g(r)$ entre cabeças de LI (H) e contra íons Cl^- nas bicamadas de DPPC e DPPG em duas temperaturas: 293K e 343K.	94
73	Função de distribuição radial $g(r)$ entre o contra íon Cl^- e os grupos colina (Chol), glicerol (Gly) e fosfato (Phosp) nas bicamadas de DPPC e DPPG em duas temperaturas: 293K e 343K.	95
74	Corte em perfil da interface membrana-água (perpendicular à z) da vizinhança até $r = 0.5nm$ com posicionamentos ilustrando os resultados obtidos pelas funções $g(r)$ e números de vizinhos $N(r)$	97
75	Profundidade z da sonda DPH em função do tempo nas bicamada de DPPC puro e com LI (30%mol), medida a partir do centro da sonda entre $CL3$ e $CL4$	99

76	Profundidade z da sonda DPH em função do tempo nas bicamada de DPPG puro e com LI (30%mol), medida a partir do centro da sonda entre $CL3$ e $CL4$	99
77	Perfil de densidade eletrônica (EDP) dos grupos da cauda, cabeça e sonda DPH.	100
78	Histograma da distribuição angular do eixo maior (CB6–CB9) da sonda DPH em bicamadas de DPPC puro e com LI.	101
79	Histograma da distribuição angular do eixo maior (CB6–CB9) da sonda DPH em bicamadas de DPPG puro e com LI.	101
80	Sobreposição das configurações da trajetória de DPH nos sistemas simulados.	102
81	Cálculo da função de anisotropia $r(t)$ ajustado com 20% do intervalo total de correlação, de 0 a 10ns.	103
82	Correlação estatística (eq 3.4) entre o parâmetro de ordem médio $\langle S_{CD} \rangle_{Lip}$ e a anisotropia limite r_{∞}	105
83	Representação do resíduo da cauda dos fosfolipídios (DPT) com os <i>labels</i> utilizados.	117
84	Representação do resíduo da cabeça do fosfolipídio DPPC (PCH) com os <i>labels</i> utilizados.	120
85	Representação do resíduo da cabeça de DPPG (PGH) com os <i>labels</i> utilizados.	122
86	Representação do resíduo da molécula da sonda fluorescente [DPH] com os <i>labels</i> utilizados.	124
87	Representação do resíduo da molécula de líquido iônico [IOL] com os <i>labels</i> utilizados.	127
88	APL em função do tempo, calculada a partir da seção plana da caixa, de membranas de DPPC com uma sonda DPH inserida.	133
89	APL em função do tempo, calculada a partir da seção plana da caixa, de membranas de DPPG com uma sonda DPH inserida.	134
90	Função de distribuição radial $g(r)$ entre o íon Na^+ e os oxigênios $O11$ e $O12$ do primeiro éster para a bicamada de DPPG pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, $293K$ e $343K$	135
91	Função de distribuição radial $g(r)$ entre o íon Na^+ e os oxigênios $O11$ e $O12$ do segundo éster para a bicamada de DPPG pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, $293K$ e $343K$	136
92	Função de distribuição radial $g(r)$ entre o íon Na^+ e os oxigênios $OC2$ e $OC3$, ligados aos carbonos $C32$ e $C33$ do glicerol respectivamente, para a bicamada de DPPG pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, $293K$ e $343K$	136
93	Função de distribuição radial $g(r)$ entre o íon Na^+ e os oxigênios $O31$ e $O32$ do fosfato para a bicamada de DPPG pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, $293K$ e $343K$	137
94	Função de distribuição radial $g(r)$ entre o íon Na^+ e os oxigênios $O33$ e $O34$ do fosfato para a bicamada de DPPG pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, $293K$ e $343K$	137
95	Função de distribuição radial $g(r)$ entre os grupos colina (Chol) e fosfato (Phosp) para a bicamada de DPPC pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, $293K$ e $343K$	138

96	Função de distribuição radial $g(r)$ entre os grupos fosfato (Phosp) para a bicamada de DPPC pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, 293K e 343K.	139
97	Função de distribuição radial $g(r)$ entre os grupos colina (Chol) e água para a bicamada de DPPC pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, 293K e 343K.	139
98	Função de distribuição radial $g(r)$ entre os grupos fosfato (Phosp) e água para a bicamada de DPPC pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, 293K e 343K.	140
99	Função de distribuição radial $g(r)$ entre os grupos glicerol (Gly) e fosfato (Phosp) para a bicamada de DPPG pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, 293K e 343K.	140
100	Função de distribuição radial $g(r)$ entre os grupos fosfato (Phosp) para a bicamada de DPPG pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, 293K e 343K.	141
101	Função de distribuição radial $g(r)$ entre os grupos colina (Chol) e água para a bicamada de DPPG pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, 293K e 343K.	141
102	Função de distribuição radial $g(r)$ entre os grupos fosfato (Phosp) e água para a bicamada de DPPG pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, 293K e 343K.	142
103	Função de distribuição radial $g(r)$ entre as cabeças de IL e os grupos éster das bicamadas de DPPG e DPPC em duas temperaturas, 293K e 343K.	142
104	Função de distribuição radial $g(r)$ entre as cabeças de IL e os grupos fosfato (phosp) das bicamadas de DPPG e DPPC em duas temperaturas, 293K e 343K.	143

Lista de Tabelas

1	Compilação dos sistemas simulados com números de lipídios, LI, águas e tempo simulado.	58
2	Parâmetros médios de APL sobre os trechos termalizados de 50ns para bicamadas puras e com líquido iônico (30% mol) – figs 47, 48, 49 e 50. . . .	72
3	Valores de referência da literatura de APL para membranas de DPPC e DPPG.	73
4	Intervalos de valores de referência de parâmetros de ordem deutérica S_{CD} encontrados na literatura para membranas de DPPC e DPPG.	80
5	Espessuras características calculadas para as bicamadas de DPPC e DPPG nas fases gel e fluida, em estado puro ou com líquido iônico (30%mol). . . .	88
6	Compilação de medidas de espessuras características de membranas de DPPC da literatura.	89
7	Compilação de medidas de espessuras características de membranas de DPPG da literatura.	89
8	Número de vizinhos $N(r)$ para diferentes raios de integração das curvas entre Colinas de DPPC – fig 66.	91
9	Número de vizinhos $N(r)$ para diferentes raios de integração das curvas entre Gliceróis de DPPG – fig 67.	91
10	Número de vizinhos $N(r)$ para diferentes raios de integração das curvas entre Gliceróis e contra íon Na^+ de DPPG – fig 68.	92
11	Número de vizinhos $N(r)$ para diferentes raios de integração das curvas entre cabeças de LI e Glicerol/Colina – fig 69.	93
12	Número de vizinhos $N(r)$ para diferentes raios de integração das curvas entre cabeças de LI em DPPC(G) – fig 70.	93
13	Número de vizinhos $N(r)$ para diferentes raios de integração das curvas entre cabeças de LI e água – fig 71.	94
14	Número de vizinhos $N(r)$ para diferentes raios de integração das curvas entre cabeças de LI e Cl^- – fig 72.	94
15	Número de vizinhos $N(r)$ para diferentes raios de integração das curvas entre contra íon Cl^- e grupos Colina, Glicerol e Fosfato – fig 73.	95
16	Resumo dos resultados de número de vizinhos $N(r)$ para um raio de 0.5nm. . . .	96
17	Profundidade média do centro de massa da sonda DPH em relação ao centro da membrana.	100
18	Parâmetros ajustados da função $r(t)$ com r_0 fixado em 0.4.	104
19	Diferenças das energias de interação média ($Coul + LJ$) dos grupos componentes do sistema entre os estados puro e com LI (30% mol).	106
20	Comparação das energias de interação média ($Coul + LJ$) dos grupos componentes do sistema entre as temperaturas 293 e 343K.	108
21	Parâmetros <i>atoms</i> para o resíduo DPT.	117
22	Parâmetros <i>bonds</i> para o resíduo DPT.	118
23	Parâmetros <i>angles</i> para o resíduo DPT.	118
24	Parâmetros <i>dihedrals</i> para o resíduo DPT.	119
25	Parâmetros <i>impropers</i> para o resíduo DPT.	119
26	Parâmetros <i>atoms</i> para o resíduo PCH.	120
27	Parâmetros <i>bonds</i> para o resíduo PCH.	120
28	Parâmetros <i>angles</i> para o resíduo PCH.	121

29	Parâmetros <i>dihedrals</i> para o resíduo PCH.	121
30	Parâmetros <i>atoms</i> para o resíduo PGH.	122
31	Parâmetros <i>bonds</i> para o resíduo PGH.	122
32	Parâmetros <i>angles</i> para o resíduo PGH.	123
33	Parâmetros <i>impropers</i> para o resíduo PGH.	123
34	Parâmetros <i>dihedrals</i> para o resíduo PGH.	123
35	Parâmetros <i>atoms</i> para o resíduo DPH.	124
36	Parâmetros <i>bonds</i> para o resíduo DPH.	125
37	Parâmetros <i>angles</i> para o resíduo DPH.	125
38	Parâmetros <i>dihedrals</i> para o resíduo DPH.	126
39	Parâmetros <i>impropers</i> para o resíduo DPH.	126
40	Parâmetros <i>exclusions</i> para o resíduo DPH.	126
41	Parâmetros <i>atoms</i> para o resíduo IOL.	127
42	Parâmetros <i>bonds</i> para o resíduo IOL.	128
43	Parâmetros <i>angles</i> para o resíduo IOL.	128
44	Parâmetros <i>dihedrals</i> para o resíduo IOL.	129
45	Parâmetros <i>impropers</i> para o resíduo IOL.	129
46	Parâmetros <i>exclusions</i> para o resíduo IOL.	129
47	Cargas atômicas calculadas (CHELPG, base HF/6-31g*) para o LI no caso carregado (+1).	130
48	Cargas atômicas calculadas (CHELPG, base HF/6-31g*) e parametrizadas para a sonda DPH.	131
49	Parâmetros médios de APL sobre os trechos termalizados para bicamadas de DPPC com uma sonda DPH em fase gel (293K) e gel-líquida (343K), puras e com líquido iônico (30% mol) – fig 88.	134
50	Parâmetros médios de APL sobre os trechos termalizados para bicamadas de DPPG com uma sonda DPH em fase gel (293K) e gel-líquida (343K), puras e com líquido iônico (30% mol) – fig 89.	134
51	Parâmetros ajustados da função $r(t)$ sobre intervalo de 10% do tempo de correlação.	143
52	Parâmetros ajustados da função $r(t)$ sobre intervalo de 30% do tempo de correlação.	143
53	Energias de interação média ($Coul + LJ$) com $r_c = 1.4nm$	144
54	Comparação das energias de interação ($Coul + LJ$) entre sistemas puros e com LI.	145
55	Comparação das energias de interação ($Coul + LJ$) entre as temperaturas simuladas.	145
56	Energias de interação média ($Coul + LJ$) com $r_c = 2.0nm$	145
57	Comparação entre energias de interação promediadas sobre trajetória única, $\langle E \rangle_{50ns}$, e em intervalos de 1ns $\langle E \rangle_{\Delta 1ns}$	146

Lista de Abreviações

APL — Área por Lipídio

C14MImCl — 1-Tetradecil-3-Metillimidazolium Chloride

Chol — Choline (grupo colina)

Coul — Interação de Coulomb

DPPC — Dipalmitoyl Phosphatidyl Choline

DPPG — Dipalmitoyl Phosphatidyl Glycerol

DPH — 1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatriene

EDP — Electron Density Profile (Perfil de Densidade Eletrônica)

DP — Density Profile (Densidade Eletrônica)

Gly — Glycerol (grupo glicerol)

LJ — Interação de Lennard-Jones

LI — Líquido Iônico

MD — Molecular Dynamics (Dinâmica Molecular)

Phosp — Phosphat (grupo Fosfato)

S_{CD} — Parâmetro de ordem deutérica

Índice

Lista de Abreviações	XII
1 Introdução	16
2 Métodos	24
2.1 Dinâmica Molecular	24
2.1.1 Integradores - LeapFrog	26
2.1.2 Interações atômicas & Campo de Força GROMOS	29
2.1.3 Condições de contorno periódicas & Método das imagens	37
2.1.4 Constraints	38
2.1.5 Termostato & Barostato	41
2.2 Propriedades de Análise	45
2.2.1 Anisotropia de Fluorescência	45
2.2.2 Área por Lipídio	47
2.2.3 Perfil de Densidade	48
2.2.4 Parâmetro de Ordem Deutérica S_{CD}	49
2.2.5 Funções de Distribuição Radial $g(r)$	50
2.3 Metodologia	52
2.3.1 Construção das Bicamadas	52
2.3.2 Parâmetros de Simulação	57
3 Resultados	60
3.1 Análise de condições iniciais	60
3.1.1 Condição inicial aleatória	61
3.1.2 Condição inicial com subdomínio de LI	64
3.1.3 Condição inicial com agregado de LI	66
3.2 Análise estrutural	69
3.2.1 Área por Lipídio	69
3.2.2 Análise de Curvatura e Espessura	74
3.2.3 Parâmetro de Ordem Deutérica S_{CD}	79
3.2.4 Perfil de Densidade	81
3.2.5 Funções de distribuição radial	90
3.3 Dinâmica da sonda DPH	98
3.3.1 Translação	98
3.3.2 Rotação	101
3.3.3 Anisotropia	102
3.4 Energias de Interação	105
4 Conclusão	109
Referências	112
Apêndice	116
A Topologias	116
A.1 Topologia Lipídios (PCH, PGH e DPT)	117
A.2 Topologia DPH	124
A.3 Topologia IOL	127

B	Seleção de Cargas	130
C	Arquivo <i>.mdp</i>	132
D	Extra - Áreas por lipídio	133
E	Extra - Funções de distribuição radiais	135
	E.1 Íons Na^+	135
	E.2 Grupos dos Lipídios	138
	E.3 Líquido Iônico	142
F	Extra - Anisotropia	143
G	Energia de Interação	144

1

Introdução

Neste capítulo apresenta-se o sistema estudado com seus principais elementos, juntamente da motivação experimental para o estudo da interação entre líquido iônico e bicamadas fosfolipídicas.

"Molecular biology is essentially the practice of biochemistry without a license."

Edwin Chargaff

ENTRE os componentes e sistemas biológicos conhecidos, células, bactérias e suas organelas compõem os mais fundamentais e básicos para compreensão da vida. O invólucro que dá forma a estes organismos é composto por membranas de apenas alguns nanômetros de espessura, porém ainda assim garantindo seu isolamento do meio externo. Entretanto, devido à sua permeabilidade, estas membranas são essenciais na interação do organismo com seu exterior regulando a troca de substâncias químicas como íons, proteína, colesterol, e até mesmo outros organismos inteiros [1], [2].

Por sua relevância em meios biológicos, estudos teóricos e experimentais de membranas vem sendo conduzidos há décadas. Sua formação se faz possível pelo tipo específico de moléculas das quais são compostas. Comumente em células humanas, de plantas ou bactérias, suas membranas são formadas por moléculas anfifílicas de fosfolípidios, isto é, compostas por uma extremidade hidrofílica (cabeça polar), e longas caudas hidrofóbicas, de caráter apolar. Desta forma, quando imersas em água, os grupos polares ficam voltados para o solvente isolando as caudas, minimizando sua área de contato e organizando-se espontaneamente em diferentes estruturas (figura 1) [3].

Figura 1: Estruturas formadas por moléculas fosfolípídicas com cabeças hidrofílicas destacadas em branco e caudas hidrofóbicas (avaliadas a pH neutro) em amarelo – retirado de [4].

A classe dos fosfolípidios apresenta grande variedade referente a forma química da cabeça polar e do tipo e quantidade de caudas apolares conectadas a elas. Em muitos deles, as cabeças são constituídas de grupos fosfato (PO_4^-), ligados a grupos como colina e etanolamina, formando assim conjuntos neutros, ou glicerol e serina, resultando em cabeças carregadas. As caudas alifáticas por sua vez variam em comprimento (carbonos encadeados), saturação das ligações entre eles e quantidade de caudas ligadas à cabeça (usualmente duas).

Em membranas reais, geralmente formadas pela mistura de diferentes tipos lipídicos, são presentes ainda outros tipos de biomoléculas, como colesterol, proteínas, carboidratos etc. Por conta disso, membranas são representadas por sistemas modelos de bicamada compostas por um único tipo de lipídio ou misturas binárias e terciárias [3].

Figura 2: Principais moléculas componentes dos sistemas estudados: **(A)** Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC); **(B)** Dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG); **(C)** 1,6-Difenil-1,3,5-Hexatrieno (DPH); **(D)** Líquido Iônico (LI) cloreto de 1-tetradecil-3-metilimidazol [C14MIm] $^+$ [Cl $^-$].

Neste trabalho, analisou-se sistemas de bicamadas modelo compostos pelos tipos lipídicos DPPC (fig 2-A) e DPPG (fig 2-B). O primeiro, de caráter neutro, pode ser encontrado comumente em células animais, especialmente mamíferos, enquanto o segundo, carregado negativamente pela dissociação de contra íons de sódio (Na^+), é presente em membranas de bactérias genéricas e cloroplasto (tilacoides) de plantas e cianobactérias [5]. A concentração de DPPG nestes casos serve como regulador de permeabilidade, podendo variar entre 20-25%mol até 60%mol [6]. Ambos os lipídios possuem caudas alifáticas idênticas, compostas por 16 carbonos saturados, seguidos de esteres e fosfato. O grupo mais externo da cabeça conectado ao fosfato os diferencia, sendo colina para DPPC e glicerol para DPPG (fig 3).

Figura 3: Destaque da cabeça polar de uma molécula fosfolipídica. Os ligantes na extremidade diferenciam o lipídio neutro, com colina (DPPC) e carregado, com glicerol (DPPG).

O estudo sobre bicamadas é feito para análise de sua estrutura sob efeito de alterações do meio externo como temperatura e concentração iônica ([7], [8], [9], [10], [11], [12], [6], [13], [14]); enquanto aplicações em ministração de medicamentos [15], interação com peptídeos de ação anti microbiana ([16], [17], [18]), proteínas ([19], [20]), [21]), colesterol ([22], [23],[24]) e sacarídeos ([25]) endossam suas aplicações a biosistemas.

Com o avanço do poder computacional, estes sistemas passam a ser amplamente estudados de forma teórica por meio de simulações computacionais, especialmente por dinâmica molecular (DM) ([26], [27]). Particularmente sobre os lipídios utilizados, trabalhos foram realizados sobre DPPC ([3], [28], [29], [11], [30], [31]) e DPPG ([5], [32]).

Muitos dos estudos acima descrevem a organização específica dos lipídios em bicamadas, micelas ou lipossomas, indicando sua orientação, espessura e área superficial. Quando agregados, as moléculas podem apresentar diferentes graus de organização relativos a sua fluidez. Em temperaturas mais baixas, próximas a $20^{\circ}C$, o movimento reduzido das caudas permite seu alinhamento e organização mais rígida, aumentando o empacotamento na membrana, enquanto que o aumento da temperatura promove sua desorganização, porém mantendo sua estrutura lamelar. Estas duas fases de organização são denominadas respectivamente por gel e gel-líquida (ou fluida), sendo bem demarcadas por uma temperatura de transição de fase, T_M (figura 4).

Figura 4: Organização das caudas dos fosfolípidios nas fases gel e gel-líquida, abaixo e acima da temperatura de transição T_M , respectivamente.

A compreensão da mudança de fase se faz relevante pela relação com sua permeabilidade e rigidez, podendo implicar ruptura da membrana. De acordo com Lentz [33], o estado de fluidez pode ser considerado de diferentes formas: termodinamicamente, pela desorganização das caudas devido ao aumento de energia cinética; biologicamente, pela maior dispersão de proteínas e colesterolis; ou espectroscopicamente, analisadas por técnicas de espectroscopia.

As medidas experimentais da estrutura e sua transição são variadas, sendo diversas frequências de espectroscopia vibracional; FRAP (fluorescence recovery after photobleaching); ressonância nuclear (NMR) e eletrônica de spin (ESR), espalhamento Raman [2], espalhamento de raios X em baixos ângulos (SAXS) entre outras. Em particular, a transição de fase pode ser bem determinada por picos nas curvas de calor específico (à pressão constante), medida por escaneamento diferencial calorimétrico (DSC) [34] (vide fig 5). Nos perfis expostos, nota-se o pico de transição bem definido em DMPC (lípidio neutro), enquanto que em DMPG (lípidio carregado) observam-se outras estruturas, porém ainda com um pico principal bem demarcado.

Figura 5: Escaneamento diferencial calorimétrico dos lipídios DMPG e DMPC, utilizado para determinação da temperatura de transição de fase a partir da posição dos picos mais pronunciados – retirado de [34].

Dentro das técnicas de espectroscopia, utiliza-se a de fluorescência por vantagens par-

ticulares. Dado que muitos lipídios não são fluorescentes, utilizam-se moléculas extrínsecas que se posicionam no interior ou superfície da membrana, como a sonda DPH (fig 2–C)), nas quais são realizadas as medidas do espectro luminoso. Desta forma, pode-se analisar propriedades da membrana com baixa perturbação; ainda mais, com intervalos de fluorescência de nanosegundos, a sensibilidade permite análise sobre movimentos moleculares.

A medida é feita a partir da anisotropia de fluorescência, comparando-se as intensidades da radiação incidente e emitida da amostra. Devido à rotação da sonda no intervalo entre absorção e emissão, a radiação emitida possui polarização alterada, com novas componentes perpendicular $I_{\perp}$ e paralela $I_{\parallel}$ à direção inicial I (fig 6). Em fase gel, com o maior alinhamento das caudas, o movimento restrito implica menor diferença entre as componentes emitidas (menor anisotropia), crescente de acordo com a fluidez das caudas e maior rotação da sonda. Pela baixa perturbação, a técnica vem sendo utilizada experimentalmente [35] e teoricamente ([36], [37], [38], [39], [40], [41]).

Dentre as diversas sondas fluoróforas, são comumente utilizadas moléculas derivadas de DPH. Neste trabalho estuda-se sua aplicação na forma mais simples, como indicado na figura 2, porém variações com substituintes nas extremidades são encontradas na literatura: TMA-DPH, CE-DPH, DPHpPC [33]. Os grupos químicos adicionais permitem o posicionamento da sonda em diferentes regiões da membrana. Sem substituintes, sua alta hidrofobicidade a mantém na região das caudas, enquanto substituintes polares permitem seu ancoramento mais próximo à superfície de interface com a água.

Figura 6: Representação da anisotropia de fluorescência devido à rotação da sonda DPH inserida em bicamada. As cabeças são ressaltadas em verde, as caudas em linhas azuis e moléculas de água em alvi-rubro. A radiação polarizada incidente I é emitida com mudança de direção, nas componentes perpendiculares $I_{\perp}$ e paralela $I_{\parallel}$.

Com a anisotropia relacionada à fluidez, e consequentemente à temperatura, utiliza-se desta técnica para avaliação da transição de fase em membranas. Desta forma, foram realizados por estudantes do Prof. Leandro Barbosa, Oliveira [42] e Luma [43], no laboratório experimental de biofísica do DFGE/IFUSP, estudos das membranas de DPPC, DMPC e DPPG na presença do líquido iônico (LI) tensoativo [C14MIm][CL] (fig 2–D). Encontrou-se influência na temperatura de transição de fase T_M para o lipídio DPPG, com diminuição de 42.5°C em membrana pura para 25.3°C com concentração 30%mol de LI. Enquanto que nenhum efeito foi observado no caso do lipídio DPPC, mantendo-se em

torno de 38°C (fig 7).

Figura 7: Temperatura de transição de fase T_M para bicamadas neutras (DPPC e DMPC) e carregadas (DPPG) em função da concentração molar de líquido iônico C14MImCl; obtidas a partir de medidas de anisotropia de fluorescência por Oliveira e Barbosa – retirado de [42].

Líquidos iônicos constituem a classe de moléculas de sais líquidos a baixas temperaturas, especificamente abaixo de 100°C , apresentando baixa pressão de vapor. Esta particularidade se dá por conta da interação iônica dipolar com seu contra íon, mais fraca que a interação iônica usual entre sais como o cloreto de sódio. Tornaram-se populares por sua aplicação como possíveis solventes não tóxicos e ecológicos, sendo amplamente estudados em polimerização química; remoção de contaminantes em água; eletrólitos em baterias; biocatálise; espectrometria ([44],[45]); ação antimicrobiana [46] etc. Em sistemas de membrana, estudos foram conduzidos com LIs do tipo imidazol juntamente com antibióticos [47] e açúcares [48]; toxicidade celular [49]; análise estrutural por reflectometria de nêutrons [50] e agregação com lipídios [51].

Neste trabalho, realizou-se estudos teóricos, através de simulações computacionais de dinâmica molecular (DM), do comportamento experimental do líquido iônico C14MImCl sobre membranas de DPPC e DPPG encontrados por Oliveira e Barbosa [42], descrevendo o comportamento atômico para compreensão da diferença observada. Em detalhe, foi estudado como o LI afeta estruturalmente e energeticamente os lipídios. Ainda mais, a análise do movimento dinâmico da sonda DPH nas membranas possibilita o cálculo de sua anisotropia ao longo do tempo, comparada posteriormente ao obtido no experimento.

Para comparação do efeito do LI, foram conduzidas simulações das bicamadas de DPPC e DPPG puras e com concentração de 30%mol de LI, em duas temperaturas, 20 e 70°C , abaixo e acima das temperaturas de transição de fase dos dois fosfolipídios. Todos os casos são simulados duplicadamente com presença da sonda DPH, buscando analisar sua dinâmica e comparar as medidas de anisotropia. Precedendo as análises acima, foram realizadas também simulações com diferentes condições iniciais de agrupamentos de LI e lipídios, visando verificar a forma de distribuição assumida pelo LI.

A seguir, constam os capítulos de desenvolvimento do trabalho. No capítulo 2, são expostos os modelos e métodos teóricos de simulações de dinâmica molecular (DM), as propriedades analisadas a partir delas e a metodologia utilizada na construção dos sistemas de bicamada. No terceiro capítulo, constam os resultados calculados, separados em quatro seções principais: análise sobre diferentes condições iniciais de LI e lipídios;

análise estrutural das bicamadas sob influência do LI; dinâmica da sonda DPH e análise de energias de interação entre LI e lipídios. Por fim, o resumo das principais conclusões é apresentado.

2

Métodos

Neste capítulo são apresentados os conceitos teóricos necessários à simulação de dinâmica molecular a partir da noção genérica de dinâmica, especificando o algoritmo de integração, cálculo das interações atômicas e aproximações exigidas. São descritas as propriedades analisadas a partir das trajetórias, juntamente da metodologia para construção dos sistema e especificações técnicas das simulações realizadas.

"We are perhaps not far from the time when we shall be able to submit the bulk of chemical phenomena to calculation."

Joseph Louis Gay-Lussac, 1808

ENTRE os métodos de simulação de sistemas moleculares, os mais disseminados são: dinâmica molecular (DM); dinâmica de Langevin; dinâmica *ab-initio* e Monte Carlo (MC) [52]. Enquanto os três primeiros baseiam-se no cálculo discretizado da evolução temporal a partir das leis de Newton, o último gera configurações de forma aleatória, sendo aceitas ou não de acordo com o critério de Metropolis. Em todos os casos, a discretização gera configurações com as quais são calculadas propriedades macroscópicas do sistema a partir de variáveis microscópicas, determinando quantidades acessíveis experimentalmente e passíveis de comparação.

As dinâmicas *ab-initio* e de Langevin diferem da dinâmica molecular pela forma de implementação das forças. A primeira as calcula a partir da mecânica quântica, enquanto que a segunda aplica as forças newtonianas de maneira aleatória, simulando o comportamento caótico de tipo Browniano [53],[54]. A aleatoriedade das forças implica em uma dinâmica com propriedades físicas diferentes das usuais, como a perda da trajetória com sequência temporal. Nos algoritmos de MC [55], as configurações são geradas com mudanças aleatórias de posição das partículas, de acordo com o critério de aceitação de Metropolis, perdendo também a correlação temporal.

O princípio que garante a equivalência dos resultados obtidos com diferentes métodos baseia-se na hipótese de ergodicidade. Para as configurações geradas, independente da correlação temporal, ao se amostrar todo o espaço de configurações (de fase), as médias tomadas sobre estas configurações, no limite de amostragem infinita, devem ser iguais.

Os sistemas simulados são controlados através de parâmetros macroscópicos constantes, como número de partículas (N), energia (E), volume (V), pressão (P) e temperatura (T). O conjunto de parâmetros escolhidos, por exemplo, NVE, NVT ou NPT são denominados *ensembles* e serão referidos ao longo do texto (na literatura é comum serem apontados respectivamente por micro-canônico, canônico e isobárico-isotérmico [56]). Seu propósito é o de descrever, de forma controlada, condições experimentais de equilíbrio termodinâmico (estatístico). Dentre os *ensembles*, é possível encontrar também o potencial químico μ constante (μVT), porém de uso mais esporádico.

No que segue, o algoritmo de dinâmica molecular é apresentado juntamente com os métodos de aproximação necessários. Por fim, são descritas as propriedades passíveis de análise e de interesse para sistemas de membrana a partir das configurações geradas nas simulações. Adicionalmente, a metodologia de construção das bicamadas é detalhada, assim como as especificações técnicas utilizadas.

2.1 Dinâmica Molecular

A dinâmica molecular consiste no cálculo de posições e velocidades de cada átomo a intervalos de tempo discretos Δt , tratados como partículas pontuais de massa constante m_i . A evolução destas posições ($\vec{r}_i$) e velocidades ($\vec{v}_i$) entre os instantes é regida pelas equações de movimento da dinâmica newtoniana:

$$\vec{F}_i = m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} \quad (2.1)$$

com cada partícula (i) submetida às forças ($\vec{F}_{ij}$) de interação com as demais:

$$\vec{F}_i = \sum_{j \neq i} \vec{F}_{ij} = \sum_{j \neq i} -\vec{\nabla} U_{ij}(\vec{r}_{ij}) \quad (2.2)$$

A cada passo Δt , além de posições e velocidades, extraem-se do sistema: energias, temperaturas, volume, densidade e demais propriedades que descrevam seu estado. Uma vez provido de informações microscópicas do sistema ao longo da evolução temporal em muitos instantes, é possível tomar médias das quantidades macroscópicas termodinâmicas.

Dentro dos algoritmos usados na dinâmica molecular, todos seguem por definição um roteiro similar, de solução das equações de Newton a passos discretos de tempo, esquematizado no fluxograma da figura 8.

Os métodos expostos a seguir nesta seção dizem respeito às técnicas de cálculo da atualização da configuração (Integradores), às funções potenciais que descrevem as forças $\vec{F}_{ij}$, às correções aplicadas no cálculo e demais aproximações que recriam as condições termodinâmicas de interesse (Termostato, Barostato, condições periódicas de contorno etc).

Figura 8: Esquematização do fluxograma do algoritmo geral de DM – adaptado a partir do manual do software GROMACS [57].

2.1.1 Integradores - LeapFrog

Primordialmente, a dinâmica molecular baseia-se na resolução das equações de movimento 2.1, obtendo em função do tempo as posições $\vec{r}(t) = (x(t), y(t), z(t))$ e velocidades $\vec{v}(t) = (v_x(t), v_y(t), v_z(t))$. A partir das forças $\vec{F}_i = (F_{ix}, F_{iy}, F_{iz})$ que atuam em cada partícula i e do conjunto de condições iniciais, as equações diferenciais são solucionadas por integração, pelos então nomeados algoritmos integradores. Embora expressas em termos de variável de tempo contínua t , a simulação computacional limita-se a calculá-las em intervalos de tempo discreto Δt [58].

$$\frac{d\vec{r}}{dt}(t) = \vec{v}(t) \longrightarrow \Delta\vec{r} = \Delta t \vec{v} \longrightarrow \vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \Delta t \vec{v}(t) \quad (2.3)$$

$$\frac{d\vec{v}}{dt}(t) = \vec{a}(t) \longrightarrow \Delta\vec{v} = \Delta t \vec{a} \longrightarrow \vec{v}(t + \Delta t) = \vec{v}(t) + \Delta t \vec{a}(t) \quad (2.4)$$

O resultado então é a trajetória avaliada em diversos pontos, tão precisos quanto menor o intervalo de integração Δt . Esta forma de discretização e cálculo sequencial foi primeiro apresentado por Euler (figura 9) e serve de base para algoritmos modernos. Apesar de eficiente, a discretização produz acúmulo de erro a cada passo (tanto menor quanto Δt , e tanto maior quanto o número de passos – tempo total), sendo parcialmente corrigido com o uso da velocidade em instante diferente de t .

Figura 9: Ilustração do algoritmo de evolução das variáveis $\mathbf{r}_i$, $\mathbf{v}_i$ e $\mathbf{a}_i$ pelo integrador de Euler.

Ao se calcular a posição no instante posterior $t + \Delta t$, considera-se a velocidade no instante inicial t do intervalo; porém, a mesma modifica-se neste espaço de tempo, sendo possível aprimorar o cálculo da posição com o uso da velocidade no ponto intermediário $v(t + \frac{1}{2}\Delta t)$. Este artifício compõe o integrador denominado *LeapFrog* ou *LeapFrog-Verlet*, baseado em mudanças sobre o algoritmo original de Verlet propostas por Hockney [59].

Em detalhe, o método consiste em calcular a posição seguinte $\vec{r}(t + \Delta t)$ a partir da posição atual $\vec{r}(t)$ e a velocidade intermediária $\vec{v}(t + \Delta t/2)$ – eq 2.5 e figura 10.

Figura 10: Ilustração do algoritmo de evolução das variáveis $\mathbf{r}_i$, $\mathbf{v}_i$ e $\mathbf{a}_i$ pelo integrador *LeapFrog*.

A velocidade por sua vez é evoluída a partir da aceleração atual $\vec{a}(t) = \frac{1}{m_i} \vec{F}_i(\vec{r}(t))$ – eq 2.6.

$$\vec{\mathbf{r}}(t + \Delta t) = \vec{\mathbf{r}}(t) + \vec{\mathbf{v}}(t + \Delta t/2)\Delta t \quad (2.5)$$

$$\vec{\mathbf{v}}(t + \Delta t/2) = \vec{\mathbf{v}}(t - \Delta t/2) + \vec{\mathbf{a}}(t)\Delta t \quad (2.6)$$

Caso seja necessário no cálculo da energia cinética, a velocidade atual $\vec{\mathbf{v}}(t)$ pode ser recuperada pela média das velocidades intermediárias anterior e posterior, porém para a trajetória em si se faz dispensável.

$$\vec{\mathbf{v}}_i(t) = (\vec{\mathbf{v}}_i(t + \Delta t/2) - \vec{\mathbf{v}}_i(t - \Delta t/2))/2 \quad (2.7)$$

O problema de associação da velocidade inicial, conhecida em $t = 0$ ao invés de $t = -\Delta t/2$, é contornado com uma evolução diferente apenas neste caso:

$$\vec{\mathbf{v}}(\Delta t/2) = \vec{\mathbf{v}}(0) + \frac{\Delta t}{2}\vec{\mathbf{a}}(0) \quad (2.8)$$

A figura 11 apresenta o fluxograma exato do algoritmo implementado para um único passo, com a ordem precisa das evoluções de velocidade e posição. Cada ciclo (*loop*) realiza o passo de integração sobre uma única partícula, sendo executado portanto sobre todos os N átomos do sistema a cada passo, indicado no fluxograma pelo índice i .

```

Num instante  $t$ , são conhecidos:  $\vec{r}_i(t)$ ,  $\vec{v}_i(t - \Delta t/2)$ 

1. Cálculo das forças  $\vec{F}_i(\vec{r}_i(t))$  sobre a partícula  $i$  a partir das posições.

2. Passo de LeapFrog entre os instante  $t \rightarrow t + \Delta t$ :

loop  $i \in [1, N]$ :
    2.1 Cálculo da aceleração:
         $\vec{F}_i(t)/m_i \rightarrow \vec{a}_i(t)$ 
    2.2 Evolução da velocidade intermediária:
         $\vec{v}_i(t + \Delta t) = \vec{v}_i(t - \Delta t/2) + \vec{a}_i(t)\Delta t$ 
    2.3 Evolução das novas posições:
         $\vec{r}_i(t + \Delta t) = \vec{r}_i(t) + \vec{v}_i(t + \Delta t/2)\Delta t$ 
    2.4 Cálculo da velocidade no tempo  $t$ :
         $\vec{v}_i(t) = (\vec{v}_i(t + \Delta t/2) - \vec{v}_i(t - \Delta t/2))/2$ 
    2.5 Atualiza as velocidades intermediárias:
         $\vec{v}_i(t - \Delta t/2) \leftarrow \vec{v}_i(t + \Delta t/2)$ 
    2.6 Atualiza as novas coordenadas:
         $\vec{r}_i(t) \leftarrow \vec{r}_i(t + \Delta t)$ 
end  $i$  loop

```

Figura 11: Esquematisação do fluxograma do algoritmo de integração de LeapFrog – adaptado de Sadus [59].

O cálculo intercalado da posição e da velocidade, que nomeia o integrador (Leap-Frog), apresenta segunda ordem de precisão em Δt , uma a mais que o método de Euler. O tamanho do intervalo de integração usado leva em conta a rapidez dos movimentos executados pelos átomos, por exemplo, no caso de oscilação de átomos leves, como hidrogênios, a frequência de cálculo dos pontos da trajetória deve ser alta, a fim de obter pontos suficientes de preenchimento da curva do movimento. Portanto, é recorrente em simulações de DM que se ignore o movimento de hidrogênios a fim de aumentar Δt e consequentemente o tempo total simulado, com o mesmo número de passos. Alternativamente, o intervalo de integração pode ser modificado e adaptado durante a simulação, com custo computacional adicional.

Além de precisão, é desejável a um integrador que mantenha e reproduza as seguintes propriedades físicas:

- Reversibilidade Temporal: por conta da simetria das equações de Newton, o integrador deve retornar a trajetória inversa no caso de inversão temporal ($\Delta t \rightarrow -\Delta t$).
- Conservação de Energia: caso o sistema seja fechado, a energia total permanece constante no tempo. Em geral, é admitido que o integrador apresente pequenas, mas limitadas, flutuações no valor da energia, sendo então considerada conservada.

- Simplético: um integrador é dito simplético quando não altera a forma das equações de movimento, ou, tecnicamente, equivale-se a uma transformação canônica, mantendo áreas do espaço de fase inalteradas.

Espera-se ainda que os momentos lineares e angulares sejam conservados (o segundo para o caso de potenciais radiais $U = U(r)$). Porém, acúmulos de erro podem transferir momento entre componentes do sistema desigualmente, mantendo a quantidade total mas violando a equipartição de energia, problema referido na seção 2.1.5 de termostato e barostato.

O integrador LeapFrog assemelha-se à versão sem velocidade do algoritmo de Verlet (*Velocity-Verlet*), diferindo apenas no uso da velocidade, evoluindo as posições apenas com seu valor anterior e aceleração. Porém, ambos ainda apresentam mesma ordem de precisão e eficiência. Outras modificações do integrador de Verlet foram propostas, além de LeapFrog e Velocity-Verlet, Beeman em 1976 propôs um método de maior precisão (Beeman-Verlet). Todos estes algoritmos pertencem à classe de integradores preditores, diferenciada da classe de preditores-corretores; neste último, o passo de integração prediz as posições, atualiza a aceleração recalculando as novas posições em seguida. Destes, o primeiro e mais disseminado é o de Gear.

Outros métodos, menos comuns, são *steepest descent* e Runge-Kutta, menos aplicados à dinâmica pelo maior custo computacional. O primeiro pelo cálculo de gradiente de energia e o segundo pelo de forças múltiplas vezes, etapas mais laboriosas que a simples evolução temporal direta das variáveis. Adições ao integrador são feitas também para o caso de moléculas, devido a vínculos de movimento entre átomos, problema abordado na seção de *constraints* 2.1.4.

2.1.2 Interações atômicas & Campo de Força GROMOS

Ao elaborar sobre a evolução dinâmica do sistema molecular, pouco detalhe foi dado em relação a natureza e método de cálculo das forças. Dentro do mesmo contexto de dinâmica newtoniana, as forças que agem sobre cada partícula são obtidas a partir do gradiente da função de energia potencial $U(r)$ – eq 2.2.

A dependência exclusiva do potencial com a posição é consequência do caráter conservativo das forças interatômicas, excluindo a presença da velocidade. O potencial U_{ij} resulta da contribuição de diversas interações separadas em dois grupos: Intermoleculares (*non-bonded*), correspondentes às interações de Lennard-Jones (LJ) e Coulomb para átomos não ligados covalentemente; e Intramoleculares (*bonded*), com potenciais relacionados à geometria molecular.

As funções utilizadas e os parâmetros que descrevem cada átomo, ligação e ângulo compõe o que se denomina por campo de força. Por compatibilidade com o software usado (GROMACS [57]) e melhor desempenho computacional, foi utilizado o campo de força GROMOS [60]. No que segue, tanto potenciais quanto parametrizações são expostos de acordo com o definido pelo manual referenciado.

Potenciais não ligados - *non-bonded*

Dentre as interações entre os átomos que compõe o sistema, aqueles que não se encontram ligados covalentemente ainda interagem entre si de duas maneiras. A primeira, devido às cargas de cada átomo, é de natureza eletrostática e modelada pelo potencial de Coulomb U_{Coul} (figura 12).

Figura 12: Gráfico da função potencial de Coulomb U_{Coul} para o caso de cargas unitárias de mesmo sinal (repulsivo). A distância entre as partículas i e j é dada pelo módulo do vetor $\vec{r}_{ij} = \vec{r}_i - \vec{r}_j$.

As constantes de carga q_i são fornecidas nos arquivos de entrada para cada átomo individualmente, sendo obtidas através de cálculos quânticos ou valores previamente tabelados de acordo com o campo de força; nos apêndices [A](#) e [B](#), detalhes de implementação e seleção das cargas são expostos, respectivamente.

Pela dependência de r^{-1} com a distância, o potencial eletrostático domina interações de longo alcance, característica importante no caso de átomos de carga pronunciada. O segundo potencial em questão (U_{LJ}), proposto por Lennard-Jones, modela a interação de caráter neutro entre átomos (figura [13](#)).

Figura 13: Gráfico da função potencial de Lennard-Jones U_{LJ} . Unidades adaptadas de acordo com a energia mínima do poço ϵ e a distância de equilíbrio $r^* = \sqrt[6]{2}\sigma$ tal que $\partial_r U_{LJ}(r^*) = 0$ e $U_{LJ}(r^*) = \epsilon$.

O potencial U_{LJ} foi proposto como combinação da repulsão de curto alcance de Pauli, resultante da sobreposição de orbitais eletrônicos mais externos $(\frac{\sigma}{r})^{12}$, e a interação de longo alcance de Van der Waals $(\frac{\sigma}{r})^6$. Os parâmetros ϵ e σ definem a intensidade e distância da interação, respectivamente.

A modelagem dos dois potenciais não ligados para dois átomos i e j é feita pelos parâmetros: q_i , q_j , σ_{ij} e ϵ_{ij} . Para os dois primeiros, os valores são dados individualmente, enquanto que os demais são produto da combinação de sub-parâmetros individuais. Como utilizado pelo programa, o potencial de LJ é escrito na forma:

$$V_{LJ}(r_{ij}, C_6(i, j), C_{12}(i, j)) = \left[\frac{C_{12}(i, j)}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_6(i, j)}{r_{ij}^6} \right] \quad (2.9)$$

com

$$C_6(i, j) = \sqrt{C_i^6 C_j^6} = 4\epsilon_{ij}\sigma_{ij}^6 \quad \text{e} \quad C_{12}(i, j) = \sqrt{C_i^{12} C_j^{12}} = 4\epsilon_{ij}\sigma_{ij}^{12} \quad (2.10)$$

onde

$$\epsilon_{ij} = \sqrt{\epsilon_i \epsilon_j} \quad \text{e} \quad \sigma_{ij} = \frac{\sigma_i + \sigma_j}{2} \quad (2.11)$$

Por ser intermolecular, o cálculo de interação é feito sobre todas as partículas do sistema, que pela ordem elevada (tipicamente $\approx 10^5$), aumenta o tempo de cálculo enormemente, dado que o mesmo escala com ordem $\mathcal{O}(N^2)$.

Para a redução do número de cálculos, delimita-se uma esfera de raio r_c em torno de cada partícula na qual os átomos externos são excluídos do cálculo de interação. Como exemplo, para um sistema cúbico de 10^5 partículas e densidade próxima da água, usual em sistemas biológicos, e um raio de corte $r_c = 1.4nm$, o número de partículas consideradas na interação cai para ordem 1000. Como o tempo de cálculo é majoritariamente gasto neste processo, é de interesse a seleção de um raio de corte de equilíbrio entre a precisão da interação e rapidez.

O termo extra de energia, exterior à esfera de corte, é parcialmente recuperado com o método de correção eletrostática. Os átomos que então possuem interação mais longínqua (eletrostática) tem as forças calculadas pelo algoritmo *Particle-Mesh-Ewald* (PME). Replicando a caixa de simulação em torno da original e discretizando-as em uma rede (*mesh*), cada pedaço de volume discretizado e substituído por uma carga pontual.

Com as cargas distribuídas na rede, o campo potencial é obtido através da solução da equação de Poisson no espaço de Fourier. Neste ponto, a soma das densidades é feita pelo procedimento de Ewald, considerando uma distribuição gaussiana local para as densidades pontuais, agilizando o processo de soma no espaço de Fourier. Uma vez determinado o potencial, a derivação retorna a força aplicada sobre o átomo. Nesta procedimento de correção, o tempo de cálculo é escalado em ordem $\mathcal{O}(N)$, uma ordem abaixo do cálculo exato.

Em adição ao potencial de Coulomb, é possível a adição de termos de interação de dipolo e interação com campo de reação (*Reaction-Field*), levando em conta ambientes de diferentes constantes dielétricas, simulando o efeito solvente. Ainda, moléculas podem ser separadas em grupos de carga nula, anulando a interação entre grupos, interagindo apenas de forma dipolar $\propto r^{-3}$, de decaimento maior.

Para a interação em curto alcance, cada átomo tem seus pares covalentes próximos explicitamente excluídos da interação de LJ pois passam a interagir quanticamente. Uma lista de vizinhos é feita para cada um e o cálculo de interação não é realizado; porém, para átomos intermediariamente distantes, como terceiros e quartos vizinhos (ligados consecutivamente), é calculada a interação a parte, modificada. Esta interação, referida como 1-4, é especificada para cada par de átomos como exclusões (apêndice A).

Além do cálculo de forças, a medida direta das energias intermoleculares é de interesse ao se analisar a interação entre os componentes do sistema, responsável pela mudança de fase. Para isso, usou-se a função *gmx energy* para o cálculo das energias a partir da trajetória, porém sem a adição de correção por PME.

Potenciais ligados - *bonded*

A dinâmica dos demais pares de átomos, ligados covalentemente, é calculada por um conjunto de quatro tipos de potenciais: ligação (*bond*), ângulo (*angle*), diedro (*dihedral*) e diedro impróprio (*improper dihedral*).

Bonds - Usualmente descrito como potencial harmônico ($V(r) \propto r^2$), o campo de força GROMOS implementa o potencial de ligação com quarta ordem em r (fig 15), visando economia de cálculo ao evitar a resolução de raízes no módulo – eq 2.12. A rigidez e frequência de vibração da ligação são proporcionais ao parâmetro k_b .

Figura 14: Esquemática do potencial V_{bond} [60].

$$V_b(r_{ij}; r_0, k_b) = \frac{k_b}{4}(r_{ij}^2 - r_0^2)^2 \quad \text{com} \quad r_{ij} = \sqrt{\vec{r}_{ij} \cdot \vec{r}_{ij}} \quad (2.12)$$

Figura 15: Gráfico da função potencial de ligação U_{bond} para o caso harmônico V_h e quártico V_b . Unidades adaptadas para as constantes k_b, k_h e r_0 . Neste exemplo: $r_0 = 0.5$; $k_b, k_h = 1.0$.

Angles - Análogo ao potencial de ligação, a descrição usual se da em termos harmônicos (neste caso $V_{angle} \propto \theta^2$), porém, por conta do cálculo de arcocossenos para determinação de θ , implementa-se o potencial com $\cos^2 \theta$ – eq 2.13. Cada três átomos encadeados exigem o apontamento de um valor de parâmetro de ângulo, definido no intervalo $[0, \pi]$.

Figura 16: Esquemática do potencial V_{angle} [60].

$$V_a(\theta_{ijk}; \theta_0, k_\theta) = \frac{k_\theta}{2} (\cos(\theta_{ijk}) - \cos(\theta_0))^2 \quad \text{com} \quad \theta_{ijk} = \arccos\left(\frac{\vec{r}_{ij} \cdot \vec{r}_{kj}}{r_{ij}r_{kj}}\right) \quad (2.13)$$

Figura 17: Gráfico da função potencial de ângulo U_{angle} para diferentes valores de equilíbrio θ_0 . Unidades adaptadas de acordo com as constantes k_θ e θ_0 . Neste exemplo: $k_\theta = 1.0$

Dihedral - O diedral próprio, ou apenas diedral, corresponde ao ângulo φ_{ijkl} entre os planos formados pelos três átomos iniciais (i, j, k) e finais (j, k, l) do encadeamento ($i-j-k-l$). Explicitamente, o ângulo corresponde à rotação da ligação central (vide fig 18) no intervalo $[0, 2\pi)$.

Figura 18: Esquematização do potencial $V_{dihedral}$ [60].

$$V_d(\varphi_{ijkl}; \varphi_0, k_\varphi) = k_\varphi (1 + \cos(\varphi_0) \cos(m\varphi_{ijkl})) \quad (2.14)$$

com

$$\varphi_{ijkl} = \text{sgn}(\vec{r}_{ij} \cdot (\vec{r}_{kj} \times \vec{r}_{kl})) \arccos\left(\frac{\vec{r}_{im'} \cdot \vec{r}_{ln'}}{r_{im'} r_{ln'}}\right) \quad (2.15)$$

sendo

$$\vec{r}_{im'} = \vec{r}_{ij} - \frac{\vec{r}_{ij} \cdot \vec{r}_{kj}}{r_{kj}^2} \vec{r}_{kj} \quad \text{e} \quad \vec{r}_{ln'} = -\vec{r}_{kl} + \frac{\vec{r}_{kl} \cdot \vec{r}_{kj}}{r_{kj}^2} \vec{r}_{kj} \quad (2.16)$$

Figura 19: Gráfico da função potencial de diedro $U_{dihedral}$ para diferentes modos m . Unidades adaptadas para as constantes k_φ e ϕ_0 . Neste exemplo: $k_\varphi = 1.0$ e $\varphi_0 = -\pi$.

Improvers - O diedro impróprio trata dos casos de encadeamento (fig 20 – a), tripla ligação (planar ou piramidal - fig 20 – b) ou tetraédrica (fig 20 – c) que não apresentam rotação, movimento fora do plano ou abertura respectivamente.

Figura 20: Esquematização do potencial $V_{improper}$. a) Impróprio em cadeia; b) Impróprio planar; c) Impróprio tetraédrico [60].

$$V_i(\xi_{ijkl}; k_\xi, \xi_0) = \frac{k_\xi}{2} (\xi_{ijkl} - \xi_0)^2 \quad (2.17)$$

com

$$\xi_{ijkl} = \text{sgn}(\vec{\mathbf{r}}_{ij} \cdot \vec{\mathbf{r}}_{nk}) \arccos \left(\frac{\vec{\mathbf{r}}_{mj} \cdot \vec{\mathbf{r}}_{nk}}{r_{mj} r_{nk}} \right) \quad (2.18)$$

sendo

$$\vec{\mathbf{r}}_{mj} = \vec{\mathbf{r}}_{ij} \times \vec{\mathbf{r}}_{kj} \quad \text{e} \quad \vec{\mathbf{r}}_{nk} = \vec{\mathbf{r}}_{kj} \times \vec{\mathbf{r}}_{kl} \quad (2.19)$$

Figura 21: Gráfico da função potencial de diedro impróprio U_{improp} para diferentes valores de equilíbrio ξ_0 . Unidades adaptadas para as constantes k_ξ e ξ_0 . Neste exemplo: $k_\xi = 1.0$.

A variável angular restringe-se ao intervalo $[-\pi, \pi]$, com o zero definido a conformação *cis*, enquanto que π o isômero oposto *trans*.

Os parâmetros de equilíbrio $(r_0, \theta_0, \varphi_0, \xi_0)$ e de intensidade $(k_b, k_\theta, k_\varphi, k_\xi)$ são especificados para cada tipo de ligação, ângulo, diedro ou impróprio, respectivamente; seus valores são fornecidos por arquivos de topologia, apresentados no apêndice A.

Para os lipídios, foi utilizada a parametrização proposta por Kukol [61], construída de forma a replicar propriedades estruturais experimentais. Para as demais moléculas, a sonda DPH e líquido iônico, foram selecionadas com base em resíduos de aminoácidos quimicamente similares, previamente parametrizados e disponíveis no manual referenciado [60].

Além do GROMOS, outros campos de força aplicados à DM diferem em relação a forma dos potenciais, definição e implementação dos parâmetros, incorporação ou não

de átomos e cálculo da lista de vizinhos. Entre eles, os mais difundidos para sistemas clássicos são OPLS, CHARMM e AMBER. Também, são feitas descrições simplificadas das moléculas pela incorporação de grupos químicos inteiros em um único objeto (*coarse grained*), para reprodução de propriedades estruturais com custo computacional reduzido.

2.1.3 Condições de contorno periódicas & Método das imagens

Nos processos simulados, os átomos do sistema restringem-se ao espaço delimitado por caixas em distintos formatos: cúbico, retangular, dodecaedro rômico, hexagonal etc. Devido à limitação da caixa, os átomos de borda experimentam menos interações que os localizados internamente, totalmente circundados. A diferença implica efeitos de borda, como deformação, perda de moléculas e afins. Ainda, os sistemas experimentais compõem-se de número elevado de átomos, enquanto que os simulados restringem-se a quantidades reduzidas, perdendo a característica do limite termodinâmico (ou amostragem infinita).

Como aproximação, é feita a réplica da caixa de simulação ao seu entorno (método das imagens) além da condição de movimento periódica, garantindo a permanência dos átomos e moléculas dentro da caixa. Ao condicionar o contorno da caixa de simulação à sua réplica, as moléculas de borda passam a interagir com as cópias feitas, mimetizando um ambiente solvatado – figura 22). Note-se que as interações referidas são apenas as intermoleculares (LJ e Coulomb), restritas ao raio de corte.

Figura 22: Método das imagens exemplificado com a réplica da caixa de simulação em duas dimensões.

Sobre as condições periódicas, o algoritmo resume-se em avaliar a posição da partícula e realocá-la caso ultrapasse os limites da caixa. Exemplificando o algoritmo para uma dimensão, é assumida uma caixa de lado L centrada em $x = 0$, caso a posição x esteja fora do intervalo $[-L/2, L/2]$, a nova posição é atualizada de acordo com:

- Se $x < -\frac{L}{2} \longrightarrow x = x + L$
- Se $x \geq \frac{L}{2} \longrightarrow x = x - L$

Desta forma, ao se ultrapassar uma face da caixa, ressurge-se instantaneamente na face oposta com a mesma velocidade, simulando o fluxo natural de partículas [62],[57]. Para outros sistemas de coordenadas ou formato de caixa, as condições de distância são calculadas por outras expressões, mas mantendo o mesmo princípio.

Apesar de dito ser replicado, o artifício do método de imagens não copia explicitamente cada átomo ao redor da caixa original, mas mede a posição relativa às extremidades da caixa e determina que os átomos de uma face interajam com os átomos da face oposta mais distante – figura 22.

Em detalhe, o algoritmo avalia a distância entre um par de partículas interagentes i e j e considera a distância de interação $\delta x = x_i - x_j$ de acordo com as condições:

- Se $\delta x < -\frac{L}{2}$, então $\delta x = \delta x + L$
- Se $\delta x \geq \frac{L}{2}$, então $\delta x = \delta x - L$

Por conta da esfera de corte, o tamanho da caixa de simulação deve ser maior que o raio especificado, evitando que as partículas projetadas interajam com si mesmas. Em geral, controla-se isto com a adição de solvente, aumentando o sistema a ponto de encobrir completamente a molécula considerada de soluto, gerando uma caixa de dimensões maiores que r_c .

Ambos os métodos podem ser aplicados tanto a átomos quanto moléculas inteiras, considerando a posição do centro de massa como critério de distância e aplicando a correção para todos os átomos. Ainda, o método de imagem é bem aplicado para formatos de caixa que preencham completamente o espaço, garantindo que cada face possua uma oposta e simétrica.

2.1.4 Constraints

Frequentemente é desejável ou necessário que pares ou grupos de átomos não se movam uns em relação aos outros, mas que transladem e rotacionem conjuntamente, como corpo rígido. Por exemplo, é possível simplificar a descrição das moléculas N_2 , O_2 , CO_2 como hastes rígidas, água (H_2O) com angulação fixa e butano (C_4H_{10}) com apenas rotação da ligação central. Em particular, ao se congelarem ligações com átomos de hidrogênio, descartando movimentos rápidos de oscilação, é possível o aumento do *timestep*, ampliando o tempo total de simulação.

Para que se fixem os comprimentos e ângulos de ligação entre os átomos são estabelecidos vínculos por meio dos métodos de *constraint*. Sendo os mais difundidos: SETTLE, SHAKE (com variações M-SHAKE, RATTLE, SHAPE e WIGGLE) e LINCS, onde o último será elaborado adiante.

Em qualquer um dos algoritmos listados, os vínculos são representados por meio de um sistema de K equações (K vínculos portanto) holônicas, i.e. na forma:

$$g_h(\vec{r}) = 0 \quad h \in [1, \dots, K] \quad (2.20)$$

Onde $\vec{r}$ indica o vetor de $3N$ coordenadas cartesianas e $g_h(\vec{r})$ a equação de cada um dos vínculos; por exemplo, para o caso de ligação entre os átomos a e b :

$$g_h(\vec{r}) := \|\mathbf{r}_a(t) - \mathbf{r}_b(t)\|^2 - d^2 = 0 \quad \forall t \quad (2.21)$$

Com o tamanho de ligação d constante. As equações de vínculo são impostas no sistema através da equação dinâmica 2.1, pela soma de termo extra no potencial, acompanhado por um multiplicador λ – eq 2.22:

$$m_j \frac{d^2 \vec{\mathbf{r}}_j}{dt^2}(t) = -\frac{\partial}{\partial \mathbf{r}_j} \left(V(\vec{\mathbf{r}}(t)) - \vec{\lambda}(t) \cdot \vec{g}(\vec{\mathbf{r}}(t)) \right) \quad (2.22)$$

Com $j \in [1, \dots, N]$, m_j a massa, $\mathbf{r}_j(t)$ a posição e $\vec{g}$ vetor de K elementos de vínculo e $\vec{\lambda}$ vetor de K multiplicadores (ditos multiplicadores de Lagrange). Note-se que o termo adicionado é nulo, pela condição holônômica, não alterando a energia total. As próximas etapas consistem em determinar os multiplicadores a cada passo de tempo de forma a satisfazer os vínculos.

Os algoritmos listados acima se igualam até então, diferindo nos métodos de resolução do sistema de equações e obtenção dos multiplicadores λ , determinados como extremantes da função de Lagrange $\mathcal{L} = -\frac{\partial}{\partial \mathbf{r}_j} \left(V(\vec{\mathbf{r}}(t)) - \vec{\lambda}(t) \cdot \vec{g}(\vec{\mathbf{r}}(t)) \right)$ [63]. Em resumo, o algoritmo SHAKE [64] executa um processo iterativo na resolução do sistema linear pelo método de Gauss-Seidel, enquanto que o SETTLE reseta analiticamente as posições e velocidades cartesianas.

O LINCS (LINear Constraint Solver) baseia-se no método precedente desenvolvido por Edberg, Evans e Morris (EEM [65]), sumarizado na resolução do sistema matricial (eq 2.22), em junção com duas técnicas de correção, sobre a distorção de ligações por rotação e outra de precisão. No que segue, apresenta-se o algoritmo da forma como inicialmente proposto no artigo de Hess et al. [66], adaptada para o método de integração *leap-frog*.

Expressando de forma matricial o sistema de equações vinculadas (eq 2.22) e introduzindo nova notação, temos a seguinte equação vinculada:

$$\mathbf{M} \frac{d^2 \mathbf{r}}{dt^2} - \mathbf{B}^T \boldsymbol{\lambda} - \mathbf{f} = 0 \quad (2.23)$$

Com $\mathbf{M}$ sendo a matriz $3N \times 3N$ de coeficientes de massa, $\mathbf{f}$ o vetor de $3N$ forças e $\mathbf{B}$ a matriz $K \times 3N$ dos seguintes elementos:

$$B_{hi} = \frac{\partial g_h}{\partial r_i} \quad (2.24)$$

A fim de determinar os multiplicadores, impõe-se a condição de constância dos vínculos e de anulação de suas duas primeiras derivadas:

$$\frac{d\mathbf{g}}{dt} = \mathbf{B} \frac{d\mathbf{r}}{dt} = 0 \quad \frac{d^2 \mathbf{g}}{dt^2} = \mathbf{B} \frac{d^2 \mathbf{r}}{dt^2} + \frac{d\mathbf{B}}{dt} \frac{d\mathbf{r}}{dt} = 0 \quad (2.25)$$

Multiplicando pela esquerda a equação 2.23 por $\mathbf{B}\mathbf{M}^{-1}$ e substituindo a condição 2.25:

$$(\mathbf{B}\mathbf{M}^{-1}) \left(\mathbf{M}\mathbf{B}^{-1} \left(-\frac{d\mathbf{B}}{dt} \frac{d\mathbf{r}}{dt} \right) - \mathbf{B}^T \boldsymbol{\lambda} - \mathbf{f} \right) = 0 \quad (2.26)$$

$$\frac{d\mathbf{B}}{dt} \frac{d\mathbf{r}}{dt} + \mathbf{B}\mathbf{M}^{-1}\mathbf{B}^T \boldsymbol{\lambda} + \mathbf{B}\mathbf{M}^{-1}\mathbf{f} = 0 \quad (2.27)$$

Os multiplicadores ficam então determinados em função das variáveis dinâmicas:

$$\mathbf{B}^T \boldsymbol{\lambda} = -\mathbf{B}^T (\mathbf{B}\mathbf{M}^{-1}\mathbf{B}^T)^{-1} \mathbf{B}\mathbf{M}^{-1}\mathbf{f} - \mathbf{B}^T (\mathbf{B}\mathbf{M}^{-1}\mathbf{B}^T)^{-1} \frac{d\mathbf{B}}{dt} \frac{d\mathbf{r}}{dt} \quad (2.28)$$

A matriz $\mathbf{B}^T$ é evidenciada de modo a indicar que o produto matricial corresponde à mudança de base, nesse caso das coordenadas vinculadas para cartesianas livres. Substituindo 2.28 na equação dinâmica 2.23 temos a equação de movimento com vínculos:

$$\frac{d^2 \mathbf{r}}{dt^2} = (\mathbf{I} - \mathbf{T}\mathbf{B})\mathbf{M}^{-1}\mathbf{f} - \mathbf{T}\frac{d\mathbf{B}}{dt}\frac{d\mathbf{r}}{dt} \quad (2.29)$$

Renomeando o produto $\mathbf{M}^{-1}\mathbf{B}^T(\mathbf{B}\mathbf{M}^{-1}\mathbf{B}^T)^{-1}$ por $\mathbf{T}$, temos uma matriz de ordem $3N \times K$ que leva a equação de movimento com vínculos para a forma cartesiana sem alterar sua forma geral, em relação ao caso desvinculado. O termo $(\mathbf{I} - \mathbf{T}\mathbf{B})$ aplicado ao vetor de direção das coordenadas com vínculo é nulo, sendo portanto um projetor nesta direção. O último termo é dito ser a força centrífuga decorrente da rotação da ligação no espaço.

Ao se implementar a equação vinculada, a discretização da equação de movimento 2.29 é feita de acordo com método *leap-frog*:

$$\mathbf{v}_{n+\frac{1}{2}} = (\mathbf{I} - \mathbf{T}_n\mathbf{B}_n)(\mathbf{v}_{n-\frac{1}{2}} + \Delta t\mathbf{M}^{-1}\mathbf{f}_n) \quad (2.30)$$

Assim, resume-se o cálculo a uma projeção ortogonal ao sentido da ligação (com vínculo), que quando aplicada à coordenadas vinculadas deve retornar o vetor nulo.

Ao se usar a substituição da segunda derivada nula em 2.25, acúmulo de erros impedem que o vínculo se anule completamente. A correção então é feita pela adição de diferença entre o comprimento predito ($\mathbf{d}$) e as posições vinculadas calculadas ($\mathbf{B}_n\mathbf{r}_n$):

$$\mathbf{v}_{n+\frac{1}{2}} = (\mathbf{I} - \mathbf{T}_n\mathbf{B}_n)(\mathbf{v}_{n-\frac{1}{2}} + \Delta t\mathbf{M}^{-1}\mathbf{f}_n) - \frac{1}{\Delta t}\mathbf{T}_n(\mathbf{B}_n\mathbf{r}_n - \mathbf{d}) \quad (2.31)$$

Em caso exato, o termo de correção se reduz a zero, por serem o comprimento e a direção iguais. Em função da posição, o cálculo é feito pela seguinte expressão (vide figura 23, segundo quadro):

$$\mathbf{r}_{n+1} = (\mathbf{I} - \mathbf{T}_n\mathbf{B}_n) \left(\mathbf{r}_n + (\Delta t)\mathbf{v}_{n-\frac{1}{2}} + (\Delta t)^2\mathbf{M}^{-1}\mathbf{f}_n \right) + \mathbf{T}_n\mathbf{d} \quad (2.32)$$

Figura 23: As três etapas de movimento realizadas no LINC64 em cada passo de tempo exemplificado para uma ligação e um eixo cartesiano. Os círculos brancos indicam a posição da etapa anterior e em verde translúcido a posição inicial. Os tamanhos indicados são: $l = d \cos \theta$ e $p = \sqrt{2d^2 - l^2}$. Imagem reproduzida a partir de [66].

O acréscimo do termo $\mathbf{T}_n \mathbf{d}$ a cada passo impede o acúmulo de erros ao longo do tempo, porém, o método acima apenas projeta o movimento sem *constraint* no sentido original da ligação, sem corrigir o novo comprimento completamente. O erro cometido a cada passo amplia o comprimento de ligação por um fator $(\cos \theta)^{-1}$, com θ o ângulo de rotação entre as duas ligações. Para tempos de integração de 2fs (valor utilizado), o erro é de ordem 5×10^{-4} (r.m.s.). Por consequência, aplica-se um novo deslocamento no sentido da ligação inicial aproximando-a do valor inicial $\mathbf{d}$ – figura 23, terceiro quadro e eq 2.33:

$$\mathbf{r}_{n+1}^* = (\mathbf{I} - \mathbf{T}_n \mathbf{B}_n) \mathbf{r}_{n+1} + \mathbf{T}_n \mathbf{p} \quad (2.33)$$

Com o módulo do deslocamento sendo $p_i = \sqrt{2d^2 - l^2}$ e l o comprimento da ligação após o deslocamento inicial, sem vínculos. Apesar desta etapa ainda consistir da projeção na direção do passo anterior, exigindo portanto um processo iterativo, a precisão alcançada com o primeiro ciclo é satisfatória (10^{-6}).

Outro detalhe de implementação consiste no cálculo do produto matricial $\mathbf{T}_n \mathbf{B}_n = \mathbf{M}^{-1} \mathbf{B}_n (\mathbf{B}_n \mathbf{M} \mathbf{B}_n^T)^{-1}$. Com uma matriz auxiliar $\mathbf{S} = \text{Diag} \left(\sqrt{\frac{1}{m_i} + \frac{1}{m_j}} \right)$ é possível fazer a redução do último termo:

$$(\mathbf{B}_n \mathbf{M}^{-1} \mathbf{B}_n^T)^{-1} = \mathbf{S} (\mathbf{S} \mathbf{B}_n \mathbf{M}^{-1} \mathbf{B}_n^T)^{-1} \mathbf{S} \quad (2.34)$$

$$= \mathbf{S} (\mathbf{I} - \mathbf{A}_n)^{-1} \mathbf{S} \quad (2.35)$$

A etapa de inversão matricial concentra a maior parte do tempo de cálculo, podendo ser agilizada se expressa pela expansão de potências de matrizes:

$$(\mathbf{I} - \mathbf{A}_n)^{-1} = \mathbf{I} + \sum_{i=1}^{\infty} \mathbf{A}_n^i \quad (2.36)$$

tendo boa precisão se truncado até quarta ordem.

2.1.5 Termostato & Barostato

Tanto em laboratório quanto em processos naturais, é frequente a constância da temperatura e pressão durante processos biológicos, como em equilíbrio térmico ou pressão ambiente, por exemplo. Em razão disso, para o controle do valor destes parâmetros ao longo do tempo são aplicados banho térmico (*thermal bath*) para a temperatura, e "banho isóbar" (*pressure bath*) para a pressão.

Para simulações de DM, em ambos o controle é realizado de maneira similar, com o reescalamento das variáveis de velocidade e posição, para temperatura e pressão respectivamente. Assim, pode-se produzir simulações nos *ensembles* NVT e NPT, alternativamente ao NVE.

A seguir é exposto o algoritmo base, apresentado por Berendsen et al. de acordo com [67]. Junto apresenta-se também uma adição ao termostato desenvolvida por Bussi et al [68], na forma como aplicada neste trabalho. Ambos são nomeados em referência ao autor original, mas a adição de Bussi promove um novo termostato por sua vez denominado *V-rescale*; portanto, apesar da mesma base de origem, termostato e barostato são nomeados distintamente.

Termostato - Berendsen e V-rescale

Desde a proposta do primeiro modelo atômico e cinético para gases por Maxwell e Boltzmann, é conhecida a relação entre a temperatura (T) e as velocidades de suas partículas, ou, equivalentemente, a energia cinética total (E_k) – eq 2.37:

$$T(t) = \frac{1}{3Nk_B} \sum_i^N m_i v_i^2(t) = \frac{2}{3Nk_B} E_k(t) \quad (2.37)$$

sendo k_B a constante de Maxwell-Boltzmann. Com isso, os primeiros métodos de controle de temperatura consistiam no simples reescalonamento das velocidades por um fator de compensação $\lambda = \sqrt{\frac{E_k(t)}{E_{k_0}}}$ a intervalos periódicos, adequando-as a energia cinética alvo E_{k_0} (idem para temperatura). Porém, sendo o fator de reescala o mesmo para todas as partículas, restrições sobre posições, ligações ou centro de massa são ignorados, implicando efeitos não físicos ao sistema. Mesmo que as médias macroscópicas se mantenham, propriedades dependentes da flutuação (desvios quadráticos) são diretamente afetadas.

Ainda, o reescalonamento simples, por conta de imprecisões numéricas, pode levar à transferência da energia de graus internos da molécula para os graus de translação ou rotação do centro de massa. Esta quebra do princípio de equipartição de energia causa o congelamento dos movimentos de vibração internos com aumento da velocidade de translação e rotação do sistema, problema conhecido como *The Flying Ice Cube* [69]. A solução exige que se corrija o centro de massa a intervalos periódicos.

Neste contexto Berendsen, junto a 4 autores, propuseram novo método de reescalonamento gradual e menos perturbativo. Partindo da equação de Langevin 2.38:

$$m_i \frac{dv_i}{dt} = F_i - m_i \gamma_i v_i + R_i(t) \quad (2.38)$$

com F_i a força dinâmica, γ_i fator de amortecimento e $R(t)$ uma função estocástica gaussiana de média nula e autocorrelação 2.39:

$$\langle R_i(t) R_j(t + t') \rangle = 2m_i \gamma_i k_B T_0 \delta(t') \delta_{ij} \quad (2.39)$$

Das equações 2.38 e 2.39, e considerando $R(t)$ descorrelacionada das forças e velocidades, obtêm-se a relação para a variação da energia cinética E_k :

$$\frac{dE_k}{dt} = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \left[\sum_i^{3N} \frac{1}{2} m_i v_i^2(t + \Delta t) - \sum_i^{3N} \frac{1}{2} m_i v_i^2(t) \right] \frac{1}{\Delta t} \quad (2.40)$$

$$\frac{dE_k}{dt} = \sum_{i=1}^{3N} v_i F_i + 2\gamma \left(\frac{3N}{2} k_B T(t) - E_k(t) \right) \quad (2.41)$$

Por facilidade, as constantes γ_i são igualadas para todas as partículas, dispensando o índice. Em 2.40, o primeiro termo corresponde às forças usuais, enquanto que o segundo origina-se da força de amortecimento e da função estocástica, correspondentes ao acoplamento ao banho térmico. Equivalentemente, de acordo com 2.37, pode-se escrever a energia em função da temperatura e a equação de acoplamento 2.43:

$$\frac{dE_k}{dt} = \sum_{i=1}^{3N} v_i F_i + 3Nk_B \gamma (T_0 - T) \quad (2.42)$$

$$\left(\frac{dT}{dt}\right)_{acop} = 2\gamma(T_0 - T) \quad (2.43)$$

Onde destaca-se a relação do amortecimento γ e o tempo de acoplamento $\tau_T = (2\gamma)^{-1}$. A essa altura, é proposta nova equação de movimento com amortecimento modificado e ausência de termo estocástico:

$$m_i \frac{dv_i}{dt} = F_i - m_i \gamma \left(\frac{T_0}{T} - 1\right) v_i \quad (2.44)$$

o que leva ao resultado 2.42 e permite o reescalonamento das velocidades como antes, mas com λ modificado:

$$\lambda = \sqrt{1 + \frac{\Delta t}{\tau_T} \left(\frac{T_0}{T} - 1\right)} \quad (2.45)$$

Embora ainda consista em um reescalonamento, o termostato de Berendsen permite flutuações das velocidades e executa as mudanças de forma gradual, com rapidez ajustável pelo fator τ_T . Com isso, o sistema não é forçado à temperatura alvo a cada instante, mas de forma gradual até a temperatura alvo T_0 , permitindo que se mantenham vínculos e transferência de energia entre graus internos e externos.

Porém, as velocidades ainda não apresentam flutuações de acordo com nenhum *ensemble* termodinâmico. Mesmo que as médias não se alterem, por serem independentes de *ensemble*, propriedades que dependam de flutuações são afetadas pelo comportamento microscópico.

Sobre este aspecto, é proposto por Bussi et al. [68] a introdução de flutuações aleatórias de acordo com uma distribuição desejada, garantindo a descrição correta do *ensemble*. A partir do método de Berendsen, é introduzido um termo extra de energia K_t (valor alvo), o qual o sistema é conduzido estocasticamente.

Como exposto em [68], o método é sumarizado em 4 passos:

- Realiza-se um passo de dinâmica das equações de Newton com integrador simplético.
- Calcula-se a energia cinética instantânea.
- Calcula-se a energia cinética seguinte estocasticamente de acordo com a distribuição 2.46.

$$\bar{P}(K_t) dK_t \propto K_t^{\left(\frac{N_f}{2}-1\right)} e^{-\beta K_t} dK_t \quad (2.46)$$

sendo N_f o número de graus de liberdade.

- Reescala-se as novas velocidades com o vínculo da nova energia.

Na terceira etapa, a evolução da energia é feita com dinâmica estocástica através de processos de Wiener:

$$dK = (K_t - K) \frac{dt}{\tau_T} + 2 \sqrt{\frac{K K_t}{N_f}} \frac{dW}{\sqrt{\tau_T}} \quad (2.47)$$

sendo $K = K(t)$ tratado como variável e K_t a energia cinética alvo; W é denominado ruído de Wiener. Na equação 2.47, o primeiro termo do lado direito corresponde exatamente ao obtido por Berendsen, enquanto o segundo à contribuição estocástica. No limite

$\tau_T \rightarrow 0$ o acoplamento aproxima-se do instantâneo, enquanto que para $\tau_T \rightarrow \infty$ ele se perde, equivalendo à termalização espontânea do sistema.

A contribuição de cada um dos termos da equação 2.47 é ressaltada em diferentes regimes. Enquanto fora do equilíbrio, as maiores contribuições ocorrem da parte dinâmica ($\frac{K_t - K}{\tau_T}$) por serem proporcionais a primeira ordem em K_t , assemelhando-se à velocidade de acoplamento de Berendsen; quando termalizado, o termo estocástico domina e apenas regula as flutuações de acordo com a distribuição 2.46.

Por conta de erros numéricos, o termostato é comumente aplicado para grupos distintos que compõe o sistema. A principal razão é a diferença de velocidade entre eles, pela diferença de massa entre as moléculas, implicando em acúmulo de erro em ordens diferentes em cada parte.

Barostato - Berendsen

Similarmente ao que foi feito com a temperatura, o acoplamento da pressão é feito com a adição de um termo na equação dinâmica:

$$\left(\frac{dP}{dt} \right)_{acop} = \frac{P_0 - P}{\tau_P} \quad (2.48)$$

Com a pressão instantânea calculada pelo teorema virial:

$$P(t) = \frac{2}{3V} \left(E_k(t) + \frac{1}{2} \sum_{i < j}^N \mathbf{r}_{ij} \cdot \mathbf{F}_{ij} \right) \quad \text{com} \quad \mathbf{r}_{ij} = \mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j \quad (2.49)$$

Onde as forças $\mathbf{F}_{ij}$ contam apenas para as interações intermoleculares, sendo que as internas não contribuem na pressão. Portanto, as coordenadas usadas são simplificadas às de centro de massa, juntamente das velocidades. O controle da pressão é feito então a partir da adição de um termo de posição na equação de velocidade, implicando alteração proporcional no volume:

$$\dot{x} = v + \alpha x \quad \implies \quad \dot{V} = 3\alpha V \quad (2.50)$$

O parâmetro α fica determinado pela relação do volume e pressão na definição de compressibilidade isotérmica β e pela substituição da eq 2.50:

$$\frac{dP}{dt} = -\frac{1}{\beta V} \frac{dV}{dt} = -\frac{3\alpha}{\beta} \quad (2.51)$$

Por comparação com 2.48, temos então:

$$\alpha = -\beta \frac{P_0 - P}{3\tau_P} \quad (2.52)$$

Tanto as posições quanto dimensões da caixa, assumida cúbica, sofrem reescalamentos por um fator μ em função do passo de integração, análogo ao obtido para λ no termostato:

$$\mu = \sqrt[3]{1 - \frac{\Delta t}{\tau_P}(P_0 - P)} \quad (2.53)$$

Pela equação 2.52 nota-se que o fator β interfere apenas no tempo de acoplamento τ_P , em razão disso, seu valor não precisa ser acurado em relação ao sistema aplicado, dispensando a determinação da compressibilidade para cada caso. Usualmente em simulações de bio-sistemas utiliza-se o valor de referência para a água: $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$

As equações apresentadas assumem um sistema isotrópico, porém, para o acoplamento anisotrópico ou outros formatos de caixa não cúbicos, a adaptação das equações é feita na forma tensorial. O volume é adaptado a forma escalar como o determinante da matriz de vetores de caixa (vetores de aresta), mantendo o fator β escalar.

2.2 Propriedades de Análise

Como mencionado anteriormente, a partir dos frames gerados na simulação, são realizadas análises pelas coordenadas impressas de todos os átomos do sistema. Após estabilizados por termalização, propriedades estruturais são calculadas sobre as trajetórias de produção, as medidas comumente realizadas são descritas nas subseções a seguir.

2.2.1 Anisotropia de Fluorescência

Quando aplicada radiação polarizada a uma amostra fluorescente (sonda), o movimento por ela realizado entre o instante de absorção e reemissão altera a direção da radiação reemitida – fig 24. Caso o movimento realizado seja rápido suficiente, especificamente, mais rápido que a vida-média de fluorescência τ , a diferença entre as duas radiações pode ser medida.

Esta técnica de comparação é denominada anisotropia de fluorescência, e usada como indicativo do movimento da sonda no ambiente que se encontra imersa. Com isso, é possível aferir sobre as condições ambientes; em particular para membranas, a fase que o sistema se encontra: gel ou gel-líquida.

Figura 24: Esquematização do fenômeno de anisotropia pelo movimento rotacional da sonda fluorescente no tempo τ . Na imagem, I_E indica a direção e intensidade da radiação incidente; I_V e I_H as direções e intensidades da radiação emitida nos sentidos vertical e horizontal, respectivamente; θ e Φ os ângulos de movimento.

Diferentes modelagens são aplicadas a diferentes sondas e restrições de movimento; utilizou-se o modelo de sonda cilíndrica com movimento de rotação (tombamento) em torno do centro de massa, aplicado por Lentz [33] e desenvolvido por Kinosita et al. [70].

Para um movimento genérico, irrestrito, são assumidos eixos ortonormais: ξ, ϵ, η e definidos os versores de absorção μ_a e emissão μ_e , paralelos aos dipolos respectivos, formando ângulo λ entre si. A função de anisotropia $r(t)$ fica definida a partir da diferença entre a intensidade absorvida I_e e a reemitida I_ξ sobre a intensidade total:

$$r(t) = \frac{I_e(t) - I_\xi(t)}{I_e(t) + 2I_\xi(t)} \quad (2.54)$$

As intensidades dos eixos perpendiculares ao de emissão inicial (ϵ) são assumidas isotrópicas, implicando: $I_\xi = I_\eta$ e portanto $I_{total} = I_e + I_\xi + I_\eta = I_e + 2I_\xi$. Nota-se então que quanto mais afastado da posição inicial, menor o valor de $r(t)$. As intensidades por sua vez são calculadas através das projeções médias:

$$I_k(t) = K(t) \langle (\mathbf{k} \cdot \mu_e)^2 \rangle \quad (2.55)$$

para $\mathbf{k} = \xi, \epsilon, \eta$. A função $K(t) = \exp(-t/\tau)$ conta a dependência temporal do decaimento entre absorção e emissão da sonda (de vida média τ). Por normalização, a soma das projeções dos versores deve ser 1:

$$(\epsilon \cdot \mu_e)^2 + (\xi \cdot \mu_e)^2 + (\eta \cdot \mu_e)^2 = 1 \quad (2.56)$$

e novamente por isotropia, os dois últimos termos, ortogonais à emissão, são iguais em média. Portanto:

$$\langle (\epsilon \cdot \mu_e)^2 \rangle = \left\langle \frac{1}{2}(1 - (\eta \cdot \mu_e)^2) \right\rangle \quad (2.57)$$

Com as intensidades em função da projeção no sentido de emissão: $I_\xi(t) = I_\eta(t) = \frac{1}{2}K(t) < 1 - (\epsilon \cdot \mu_e)^2 >$, e substituindo-se na eq 2.54, temos:

$$r(t) = \left\langle \frac{1}{2}(3(\epsilon \cdot \mu_e)^2 - 1) \right\rangle \quad (2.58)$$

que pode ser identificado como a média do polinômio de Legendre de segunda ordem $\langle P_2(\epsilon \cdot \mu_e) \rangle$. O termo de projeção $\epsilon \cdot \mu_e$, depende da forma do movimento realizado; Kinosita et al. [70], usando funções de distribuição de Green e assumindo-o restrito a um cone, obtém a seguinte expressão:

$$r(t) = r_\infty + (r_0 - r_\infty)e^{-t/\Psi} \quad (2.59)$$

onde r_∞ é a anisotropia no limite $r(t \rightarrow \infty)$ e $r_0 = 0.4P_2(\cos(\lambda))$ a anisotropia intrínseca, devido a diferença entre os versores de absorção e emissão; Ψ o tempo de correlação angular. Equivalentemente a anisotropia é expressa como:

$$\frac{r(t)}{r_0} = A_\infty + (1 - A_\infty)e^{-t/\Psi} \quad (2.60)$$

sendo

$$\sqrt{A_\infty} = \sqrt{\frac{r_\infty}{r_0}} = \frac{1}{2} \cos(\theta_{max}) (1 + \cos(\theta_{max}))$$

com θ_{max} o ângulo máximo médio preenchido pelo cone de movimento. O objetivo de se obter a função explícita de anisotropia é de medir, a partir da trajetória, a orientação instantânea do vetor de eixo maior da sonda e calcular o produto $\epsilon \cdot \mu_e$. O ajuste dos parâmetros da curva fornece um indicativo da fluidez da membrana, com maiores valores de θ_{max} e menores de A_∞ conforme o aumento da temperatura.

2.2.2 Área por Lipídio

Para confirmação da estabilidade do sistema, observa-se o movimento da estrutura da membrana como um todo, como sua área superficial e espessura. Mesmo com flutuações, em média o sistema estabilizado é constante, a partir do qual é considerado termalizado. As simulações conduzidas a partir da configuração termalizada (simulações de produção) fornecem os dados para análise sobre o sistema.

A área superficial, definida pela superfície paralela à bicamada, traz informação sobre a proximidade dos lipídios. Porém, dado que o valor absoluto da superfície varia com o tamanho do sistema, é preferível a análise de parâmetros independentes de escala. Portanto, analisa-se a área média circundante a cada lipídio (APL – Área Por Lipídio), obtida pela divisão da área superficial pelo número de lipídios das monocamadas. O parâmetro intrínseco de APL permite comparação direta com outros sistemas simulados e resultados experimentais.

Como primeira aproximação, a APL pode ser calculada a cada instante pela divisão da área transversal da caixa (plano xy) pelo número de lipídios. No entanto, o cálculo de APL por seção plana é preciso na medida em que a membrana não apresente curvatura ou rugosidades; neste caso, a área superficial difere da seção reta.

A medida de APL portanto, pode ser corrigida a partir da superfície ajustada a cada monocamada – figura 25; procedimento aplicado através do software SuAVE (Surface Assessment Via grid Evaluation) [71].

Figura 25: Superfícies ajustadas às interfaces da membrana em azul, no meio em branco, a superfície média entre elas. Produzidas a partir do software SuAVE.

A criação destas superfícies é feita a partir do ajuste numérico em uma rede, construída com base em átomos de referência da região de interface. Para cada lipídio, foram

utilizados os fósforos do grupo fosfato, por apresentarem menor mobilidade que os mais externos da cabeça: colina e glicerol.

A precisão do ajuste é verificada pelo desvio quadrático médio entre a posição dos átomos de referência e a superfície ajustada, sendo menor quanto mais próximos, e portanto melhor ajustado. Os detalhes de implementação do software SuAVE são expostos na referência [71].

Além da APL, os perfis de densidade (descritos adiante), foram calculados de acordo com esta correção. Também, para medidas explícitas de rugosidade e curvatura, utilizou-se as funções s_thick , para medida da espessura ponto a ponto; e s_order , para medida da angulação dos vetores normais da rede em relação à z .

2.2.3 Perfil de Densidade

Com o sistema equilibrado, é possível determinar a distribuição espacial dos grupos que compõe os lipídios através do perfil de densidade. Seccionando a caixa de simulação em camadas perpendiculares ao eixo z , ao contar os átomos em cada uma obtém-se a distribuição, ao longo de z , do grupo ao qual os átomos pertencem.

O histograma formado permite portanto avaliar o intervalo de profundidade que os grupos se situam. Os sistemas simulados foram decompostos em: colina (DPPC) ou glicerol (DPPG); fosfato; ésteres; caudas; carbonos da extremidade das caudas (C16); água e contraíon Na^+ – figura 26. Nos casos com sonda ou líquido iônico, acrescenta-se ainda: sonda DPH, cabeça do LI, cauda do LI e contraíon Cl^- .

Figura 26: Perfil de densidade atômica exemplificado para uma bicamada de DPPC. A curva de água é saturada em $90(N/nm^3)$ a partir de $|z| > 2.8nm$.

O levantamento da densidade pode ser feito pela contagem numérica de átomos (DP), massa (MDP) ou elétrons (EDP). Tomando a média entre todos os frames de uma trajetória, produz-se o perfil ilustrado na figura 26. Como mencionado na seção de APL, a análise foi feita tanto pelo seccionamento plano, com a função *gmx density* do GROMACS, quanto pela superfície ajustada SuAVE, com a função *s_dens*. Em todos os casos, as caixas de simulação foram particionadas em 50 intervalos (*bins*) de espessura $\approx 0.16\text{nm}$.

A partir das curvas DP pode-se definir distâncias características da bicamada: entre os picos do grupo fosfato (D_{PP}) [5]; entre cabeças (grupo fosfato+colina(glicerol)) (D_{HH}) [10]; entre superfícies de Gibbs dos hidrocarbonetos (caudas) ($2D_C$) [6] e [10]; entre superfícies de Gibbs das curvas de água (D_B) [72] e [10], assumida como a espessura da bicamada.

As superfícies de Gibbs mencionadas consistem na linha divisória das curvas de DP que separam áreas integrais iguais. As áreas em questão são indicadas por $\alpha(\bar{\alpha})$ e $\beta(\bar{\beta})$ na figura 27.

Figura 27: Superfícies de Gibbs indicadas para as curvas de densidade da água, à esquerda, e hidrocarbonetos, à direita. A posição z da superfície é tal que iguale as áreas preenchidas ($\alpha = \beta$ e $\bar{\alpha} = \bar{\beta}$).

As distâncias relacionadas aos picos de cabeça ou fosfato foram calculadas ajustando-se gaussianas às curvas e medindo-se a diferença das posições médias.

2.2.4 Parâmetro de Ordem Deutérica S_{CD}

Em adição às medidas de organização dos lipídios na membrana, é possível avaliar a dispersão da cadeia de hidrocarbonetos a partir da angulação entre suas ligações; procedimento aplicável também à cauda de LI. Para cadeias carbônicas simples, com carbonos CH_2 ou CH (C-deutério), é definido o parâmetro de ordem deutérica S_{CD} (Deuter Order Parameter).

O parâmetro de ordem é determinado pelos elementos S_{ij} do tensor de ordem, calculados a partir do ângulo θ_i ($i = x, y, z$) entre a direção do eixo formado pelo carbonos antecessor C_{k-1} e predecessor C_{k+1} e o eixo normal à bicamada (figura 28) – eq 2.61 [73]:

$$S_{ij} = \frac{1}{2} \langle 3 \cos \theta_i \cos \theta_j - 1 \rangle \quad (2.61)$$

A média é tomada sobre o tempo (frames) e sobre lipídios. Neste caso, é de interesse apenas a componente S_{zz} (θ_z), indicativo do ordenamento dos carbonos ao longo da cadeia

de acordo com seu afastamento do eixo de simetria do sistema.

Figura 28: Esquemática da definição dos eixos para o cálculo dos parâmetros de ordem S_{CD} – adaptado de [74].

Como pode-se ver a partir da eq 2.61, quanto mais próximo à normal ($\theta_z \rightarrow 0$), maior o valor de S_{CD} . Os elementos S_{zz}^k são calculados para cada carbono k que se possa associar um antecessor e predecessor, ou seja, a partir dos grupos dos esteres, os carbonos C2 a C15.

Para os lipídios estudados, o cálculo é feito para cada cauda separadamente, a partir da função interna *gmX order* do GROMACS, analisada sobre a trajetória calculada.

2.2.5 Funções de Distribuição Radial $g(r)$

Para a análise da estruturação ao redor de um átomo, faz-se uso da função de distribuição radial de pares $g(r)$ (Radial Distribution Function - RDF). Dados dois tipos de átomos, ou grupos deles, i e j , pode-se avaliar sua organização relativa pela contagem de átomos em função da distância de separação r (figura 29).

Figura 29: Estruturação local ao redor de uma molécula contada a partir de cascas esféricas concêntricas para o cálculo de $g(r)$ – retirado de [75].

A contagem dos átomos é feita pela distância radial entre os pares i e j , computando-se um histograma g_{ij} – eq 2.62. Por se considerar a distância radial, analisa-se portanto o número de partículas dentro da casca esférica entre as esferas de raio r e $r + dr$:

$$g_{ij}(r + \frac{1}{2}dr) = \frac{n_{ij}(r, r + dr)}{n^{id}(r, r + dr)} \quad (2.62)$$

onde n_{ij} é o número de pares ij com distância no intervalo $[r, r + dr]$, e n^{id} o número de pares no caso dum gás ideal de mesma densidade:

$$n^{id}(r, r + dr) = \frac{4\pi}{3}\rho ((r + dr)^3 - r^3) \quad (2.63)$$

A distribuição $g_{ij}(r)$ (eq 2.62) consiste então no histograma de distribuição entre os pares selecionados. Portanto, pode-se usa-la como função peso no cálculo de médias sobre partículas; por exemplo, para uma propriedade $\mathbb{A}$ – eq 2.64 [52]:

$$\langle \mathbb{A} \rangle = \left\langle \sum_i \sum_{i < j} a(r_{ij}) \right\rangle = \frac{1}{2}N\rho \int_0^\infty a(r)g(r)4\pi r^2 dr \quad (2.64)$$

Sendo N o número de partículas e ρ a densidade de massa. Nos sistemas simulados, focou-se a utilização da função RDF para o cálculo de partículas nas vizinhanças dos grupos de interesse: colina, glicerol, fosfatos, íons, etc.

Uma vez que a função $g(r)$ consiste no histograma numérico, normalizado pelo volume e densidade de partículas, sua integração deve retornar o número de partículas no intervalo integrado, e portanto, o número de partículas envoltórias (número de coordenação). Fazendo $a(r) = 1$ na eq 2.64, vem:

$$N(r) = \frac{1}{2}N\rho \int_0^r g(r')4\pi r'^2 dr' = \frac{3}{2}N \int_0^r \frac{n_{ij}(r')}{r'} dr' \quad (2.65)$$

A partir da trajetória, realizou-se o cálculo pelo GROMACS, com a função *gmx rdf*. Os valores finais de RDF provêm da média entre os frames com a função $g(r)$ calculada a cada um; portanto, o número de coordenação $N(r)$ calculado representa também a média temporal de aproximação entre os pares.

Os pares considerados consistem tanto em átomos individuais quanto em grupos inteiros. Neste último caso, são avaliadas as distâncias entre átomos dos conjuntos. Para que se evite a contagem de átomos intramoleculares, aplicou-se exclusão, restringindo a contagem apenas entre moléculas distintas.

2.3 Metodologia

NESTE estudo, considerou-se diferentes formas de distribuição do LI nas membranas. Inicialmente, estudou-se três condições iniciais distintas de organização de lipídios com LI: DPPC(G) com LI aleatório, com orientação e posição aleatória de todas as moléculas; DPPC(G) com subdomínio de LI centralizado e DPPC(G) com agregado de LI, externo à membrana. Todas descritas em detalhe, juntamente de sua construção, na seção 3.1.

Além destas, foram construídas bicamadas de DPPC(G) puros (sem LI) e bicamadas com LI uniforme (concentração 30%mol de LI), descritas nesta subseção. Descreve-se ainda o processo de minimização da configuração construída e a posterior inserção de moléculas na membrana, neste caso a sonda DPH.

Para estes casos, o número de lipídios e a proporção de água foram padronizados para todas as bicamadas uniformes (com leves modificações para os casos com LI), a fim de permitir comparação entre os sistemas. De outra forma, o efeito de escala ou pressão das camadas de água podem gerar diferenças na estrutura termalizada não decorrentes de propriedades dos lipídios propriamente ditos. As bicamadas puras são constituídas por 512 moléculas com 50 águas para cada uma. Na presença de líquido iônico, são inseridos 216 deles com leve redução dos lipídios para 504, enquanto que a proporção de água é mantida em relação a soma, ou seja, 50 águas para cada uma das 720 moléculas.

2.3.1 Construção das Bicamadas

Além da topologia individual das moléculas componentes do sistema, é necessário fornecer a configuração inicial da simulação. Nas bicamadas puras, com LI uniforme e em subdomínio, foram construídas a partir de funções internas do software GROMACS [57], enquanto que as condições iniciais com LI aleatório e agregado, utilizou-se do software PACKMOL [76]. A seguir são descritos separadamente os métodos de construção para os casos com e sem líquido iônico.

Bicamadas puras

Para as bicamadas puras, a estrutura inicial é separada em duas partes, a bicamada em si, feita a partir da estrutura de um único lipídio replicado, e a solução aquosa, dividida em duas camadas, inseridas acima e abaixo na forma de caixas retangulares, previamente equilibradas.

A membrana é construída com a cópia (nos sentidos x e y) de um único lipídio orientado com o eixo mais longo paralelo à z (fig 30-A), em uma rede de 16 por 16, gerando uma monocamada de 256 moléculas (fig 30-B). Ao refleti-la no eixo z e coloca-la abaixo da primeira, de forma a deixar as caudas viradas para dentro e as cabeças delimitando a parte externa, obtém-se a bicamada (fig 30-C), composta então por 512 moléculas de lipídio.

Figura 30: Etapas de construção da bicamada a partir da estrutura de um lipídio. **A)** Lipídio individual; **B)** Perfil da monocamada de 16×16 moléculas replicadas no plano xy ; **C)** Perfil da bicamada feita a partir da monocamada refletida; **D)** Perfil da bicamada alocada entre as caixas de água.

Em seguida, caixas retangulares de água de mesma dimensão lateral (x, y) da bicamada são geradas pela função *gmx solvate*. A espessura das caixas é controlada de forma a garantir o número de águas desejado (usualmente $\approx 1\text{nm}$). Uma cópia é feita e ambas são transladadas para acima e abaixo da bicamada. Com isso, o sistema completo constitui um número de ordem 10^5 de átomos e dimensões aproximadas $(L_x, L_y, L_z) = (16.0, 16.0, 7.5)\text{nm}$. Apesar de ser desejável a não sobreposição de átomos, as distâncias entre os lipídios e a camada de água são melhores quanto menores forem, diminuindo a chance de desorganização da estrutura pela aplicação de pressão nos momentos iniciais da dinâmica.

Nos passos descritos acima, foi usada a função de edição de arquivos do GROMACS (*gmx editconf*) com subcomandos para cada etapa: translação (*-translate $\Delta_x \Delta_y \Delta_z$*), rotação (*-rotate $\theta_x \theta_y \theta_z$*) e inversão/reflexão (*-scale 0 0 -1*).

Para o caso do fosfolipídio DPPG, o grupo aniônico da cabeça exige que se insiram contra-íons positivos de sódio (Na^+) para neutralização do sistema. A função *gmx genion* permite a substituição aleatória das moléculas de água pelos íons, mesmo processo necessário para os contra-íons negativos de cloro (Cl^-) do líquido iônico C14MImCl.

Minimização

Antes de simulação de dinâmica propriamente dita, o sistema passa por uma verificação de geometria, superposição de átomos, forças excessivas devido à proximidade dos átomos ou topologia inapropriada. Este processo de verificação, denominado minimização, reduz a intensidade das forças garantindo que, na dinâmica em si, os deslocamentos sejam pequenos, mantendo a aproximação utilizada nos algoritmos.

Para isso, foi utilizado o algoritmo de minimização *steepest descent*, que executa deslocamentos nos átomos na direção de diminuição do gradiente energético (forças), acomodando as partículas. Considerando o vetor de posição de $3N$ coordenadas $\mathbf{r}_n$, as novas posições são calculadas por:

$$\mathbf{r}_{n+1} = \mathbf{r}_n + \frac{\mathbf{F}_n}{\max(|\mathbf{F}_n|)} h_n \quad (2.66)$$

a cada passo de integração n . A força máxima $\max(|\mathbf{F}_n|)$ é determinada sobre o maior módulo entre os átomos, junto com o deslocamento máximo h_n , iniciado com $h_0 = 0.02 \text{ nm}$. Após a tentativa de deslocamento dos átomos, analisa-se a energia potencial: no caso de diminuição, aceitam-se as novas posições com atualização do deslocamento máximo do passo seguinte: $h_{n+1} = 1.2h_n$; no caso de aumento, mantém-se as posições mas com atualização de $h_{n+1} = 0.2h_n$. Por conta dos pequenos deslocamentos ($\approx 10^{-2} \text{ nm}$), se bem organizada, a estrutura geral sofre modificações pequenas, não perceptíveis na escala do sistema inteiro.

Por a força $\mathbf{F}_n$ corresponder ao negativo do gradiente potencial, os deslocamentos aceitos diminuem a energia do sistema até um mínimo local ou até que se ultrapasse uma força mínima (ϵ) ou número de passos. Neste caso, optou-se por um número de passos elevados (50000) e uma força mínima de $1000 \text{ kJmol}^{-1}\text{nm}^{-1}$, como recomendado pelo manual para sistemas biológicos desta natureza (átomos de carga baixa).

A minimização também considera aplicação de raio de corte, correção de longo alcance e de energia. Uma vez minimizada, a configuração final resultante é utilizada como configuração inicial da simulação de dinâmica.

Bicamadas com Líquido Iônico uniforme

Para a inserção de líquido iônico uniformemente distribuído nas bicamadas, foi adotado procedimento semelhante ao anterior mas com a réplica de uma célula contendo ambas as moléculas (lipídio e LI). A proporção entre elas foi escolhida de acordo com a maior concentração usada no estudo experimental base deste trabalho [42]. Para $30 \text{ mol}\%$, de cada 10 moléculas da membrana, 3 são de LI; a célula unitária usada como base então foi construída na proporção 3 : 7, como visto na figura 31.

Figura 31: Célula unitária da monocamada com líquido iônico à esquerda e sua replicação em rede 6×6 . Para evidenciar a distribuição das moléculas, destacou-se o líquido iônico em azul e os lipídios em verde.

Replicando esta estrutura, a bicamada formada mantém a razão desejada entre as moléculas e segue o mesmo procedimento adotado para o caso puro. O número de lipídios altera-se minimamente, neste caso a célula unitária foi replicada em uma rede 6×6 , correspondendo a $7 \times 36 \times 2 = 504$ moléculas de DPPC(G) e $3 \times 36 \times 2 = 216$ de LI. Com a adição das novas moléculas, o sistema tem um crescimento de 40%, passando para 140 mil átomos, principalmente ao acréscimo de água, mantida na razão de 50 para cada molécula, considerando-se ambos os tipos ($504 + 216 = 720 \rightarrow 36 \times 10^3$ águas).

A escolha de se montar a bicamada a partir de uma célula leva em consideração a hipótese das moléculas de líquido iônico se distribuírem de maneira uniforme. Análises posteriores indicam que de fato não houve formação de aglomerados dentro do tempo simulado, junto com simulações específicas da interação de LI em diferentes configurações iniciais, apresentados posteriormente na seção de resultados.

Inserção da Sonda DPH

Por fim, a inserção da sonda fluorescente DPH, feita através da função interna *gmx solvate*. Por conta da natureza altamente apolar, é esperado da sonda que se mantenha dentro da região das caudas da bicamada. Por isso, em todos os casos a mesma foi alocada inicialmente nesta região a partir de estruturas já termalizadas das membranas, de acordo com o ilustrado na figura 32.

Figura 32: Corte em perfil da bicamada de DPPC termalizada com a alocação da sonda DPH. Átomos da cabeça destacados por tubos verdes, caudas em linhas finas azuis e águas em tubos alvirrubros.

Uma vez posicionada na caixa de simulação, as moléculas ao redor da sonda que apresentam sobreposição, considerada pela distância do raio de Van der Waals, são apagadas. A fim de garantir que a introdução da sonda não altere a estrutura local da membrana ou apague lipídios, aplicou-se um fator de escala ao raio tornando-o nulo. Eventuais sobreposições são removidas pelo processo de minimização. O procedimento é simplificado para este caso por conta do tamanho e planaridade da sonda, moléculas maiores ou de estrutura mais complexa podem causar distúrbios indesejados na membrana, sendo recomendado a eliminação de lipídios seguida de curta termalização.

O posicionamento da sonda dentro da bicamada, imersa na região das caudas, se dá pela razão de sua polaridade citada acima e tem respaldo nos relatos de artigos de simulação feitos em DPPC: Repáková et al. [36], Loura [38] e [39], simulado também para POPC, lipídio que difere apenas em uma ligação dupla na cauda, similar ao utilizado. Lentz [33] conclui que a sonda DPH e os derivados DPHpPC (ou CE-DPH) e TMA-DPH todos se alocam na parte interior, variando apenas em profundidade. Por fim, Cascales et al. [40] relata o mesmo para sistemas em concentrações maiores de DPH, para até 3 sondas em bicamadas de 72 lipídios. É imediato assumir que o mesmo se mantém válido para a versão com glicerol, por conta da igualdade das caudas, mantendo a sonda afastada da região polar da interface. Experimentalmente, as medidas feitas por Kaiser [35] expõe um número de variantes de DPH em membranas com e sem colesterol também imersas por completo.

2.3.2 Parâmetros de Simulação

Nas simulações realizadas, parametrizou-se as moléculas com campo de força *gromos54a7*, com dinâmica realizada pelo software GROMACS, na versão 5.1.4. Dentro do contexto da seção de métodos, esta seção apresenta explicitamente os parâmetros termodinâmicos e operacionais utilizados nas simulações conduzidas. Para sua submissão ao software, é fornecido um arquivo de extensão *.mdp*, exposto no apêndice C. Abaixo seguem os parâmetros das simulações de termalização e produção, ambas conduzidas em *ensemble* NPT.

- Integrador: *LeapFrog* com intervalo de integração $\Delta t = 2\text{fs}$ em um total de 25×10^6 passos, resultando em simulações de 50ns cada.
- Subtração de translação do centro de massa corrigida a cada 10 passos para o sistema como um todo.
- As posições cartesianas foram salvas a cada 1000 passos, resultando 25000 configurações (*frames*) na trajetória, espaçados 2ps entre si ($\Delta t \cdot n_{steps} = 1000 \times 0.002 = 2\text{ps}$).
- As velocidades e forças foram salvas a cada 10000 passos.
- O arquivo de *.log* foi salvo a cada 1000 passos.
- As energias foram calculadas e salvas para cada grupo separadamente (lipídio, água, íons (*Cl* e *Na*), LI e DPH) a cada 10 passos.
- Utilizou-se o algoritmo LINCS para restrição de ligações covalentes com átomos de hidrogênio, com 1 iteração e ordem 4 de precisão (truncamento da expansão matricial).
- Raio de corte $r_C = 1.4\text{nm}$ com esquema de corte de Verlet para interações de Coulomb e LJ e lista de vizinhos, feita através de gradeamento.
- Correção de longo alcance para o potencial eletrostático calculada com método PME com interpolação de quarta ordem e espaçamento 0.14 no grid de Fourier.
- Condições periódicas de contorno nas 3 direções cartesianas e método das imagens.
- Acoplamento de temperatura com termostato *V-rescale* (constante de acoplamento $\tau = 0.1\text{ps}$) separadamente para a bicamada e solvente com íons.
- Acoplamento da pressão com barostato de Berendsen em 1bar, de forma semi-isotrópica, nas direções *xy* e *z* (constante de acoplamento $\tau_P = 2.0\text{s}$ em ambos). A compressibilidade foi usada como próxima a da água: $\beta = 4.5 \times 10^{-5}\text{bar}^{-1}$.
- Nas simulações iniciais de termalização, foram geradas velocidades de acordo com uma distribuição de Maxwell-Boltzmann nas temperaturas 293 e 343K. Nos demais casos, as velocidades iniciais proviam das configurações finais anteriores.

Os parâmetros não especificados na descrição acima foram assumidos como os valores padrão do programa.

As simulações foram realizadas em GPU Tesla K20c, com 16 processadores, rendendo desempenho médio de 12ns/dia. Os sistemas possuem número de partículas entre 90 e 110mil, nos casos com líquido iônico. Para lipídios e líquidos iônicos, não foram considerados os hidrogênios das caudas lipídicas, incorporados aos carbonos. Exclusivamente para os hidrogênios restantes foi aplicada restrição do comprimento de ligação. Na tabela 1 segue o resumo dos sistemas simulados com suas especificações. Para os casos listados, todos foram simulados em fase gel (293K) e fluida (343K), com exceção de LI puro em água. Os sistemas de membrana puros e com LI uniforme foram também simulados com e sem presença de DPH, seguindo as mesmas especificações.

Os arquivos de trajetórias gerados nas simulações variam de acordo com o intervalo de impressão dos frames. Para os salvos a cada 1000 passos, em simulações de 50ns obteve-se arquivos de 40GB, reduzidos para 4GB nos casos salvos a cada 10mil passos.

Tabela 1: Compilação dos sistemas simulados; nas colunas constam o número N de lipídios (*lipid*), líquidos iônicos (*LI*), com sua concentração molar em parênteses, águas (*H2O*) e tempo total simulado t em fase gel, seguido em parênteses do tempo em gel-líquido.

	N_{lipid}	N_{LI}	N_{H2O}	$t(ns)$
DPPC puro	512	–	27918	450(150)
DPPG puro	512	–	24656	420(350)
DPPC com LI uniforme	504	216(30%mol)	36760	300(300)
DPPG com LI uniforme	504	216(30%mol)	32046	300(300)
DPPC com LI aleatório	504	216(30%mol)	31784	300(300)
DPPG com LI aleatório	504	216(30%mol)	31280	300(300)
DPPC com LI subdom.	464	216(32%mol)	36646	300(300)
DPPG com LI subdom.	464	216(32%mol)	34214	300(300)
DPPC com LI agregado	512	41(7%mol)	46410	150(150)
DPPG com LI agregado	512	41(7%mol)	40184	150(150)
LI em água – Disperso	–	80	39655	100
LI em água – Agregado	–	84	42125	100

As figuras originais e reproduzidas deste trabalho foram geradas e editadas pelos softwares abertos VMD [77] e Inkscape [78]. Os gráficos e análises numéricas independentes do software de dinâmica molecular GROMACS foram realizados com auxílio da linguagem Python [79] e o software SuAVE [71].

3

Resultados

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos das análises das simulações de dinâmica molecular, de acordo com as propriedades descritas no capítulo de Métodos. Foram realizadas análises sobre diferentes condições iniciais, para estudo da formação da mistura de fosfolipídios com líquido iônico, propriedades estruturais da membrana, comportamento dinâmico da sonda e análises energéticas das interações relacionadas à mudança de fase gel para gel-liquida.

"Good judgement is the result of experience; experience is the result of bad judgement."
Mark Twain

3.1 Análise de condições iniciais

NOS sistemas simulados, adotou-se como hipótese a distribuição uniforme das moléculas de LI ao longo da membrana. Porém, diferentes métodos de preparo da mistura de fosfolipídios e líquido iônico podem induzir configurações diferentes. Como forma de análise da formação dos agregados de lipídio e LI, juntamente com a validação da hipótese de distribuição uniforme, foram conduzidas simulações a partir de diferentes condições iniciais.

No estudo experimental base [42], as misturas foram preparadas com lipídios e líquido iônico misturados em solvente apolar, secados e posteriormente misturados em água, para então formarem uma membrana mista. Neste caso portanto, espera-se organização a partir de uma configuração aleatória (fig 33–(A)). Nesta seção, as figuras apresentadas possuem coloração padronizada, sendo mostradas em vermelho as cabeças dos lipídios, em verde suas caudas, em azul os líquidos iônicos, amarelo os contra íons de cloro e rosa os contra íons de sódio. Moléculas de água foram omitidas por simplicidade.

De outra forma, com líquido iônico já imerso na bicamada, procura-se saber se um agregado ou subdomínio formado mantém-se ao longo do tempo ou tende a se difundir. Assim, construiu-se também como condição inicial membranas com agrupamento de LIs centralizados em ambas as camadas (fig 33–(B)).

Para o caso da mistura diretamente em água (com lipídios e LI adicionados posteriormente na solução), espera-se a interação entre agregados, ou micelas, de LI com a membrana pura de fosfolipídios (fig 33–(C)).

Figura 33: Diferentes configurações iniciais simuladas: (A) Lipídios e moléculas de LI aleatoriamente distribuídos; (B) Subdomínio de LI imerso na membrana; (C) Interação entre agregado de LI com bicamada pura. Notação de cores: cabeças lipídicas em vermelho, suas caudas em verde, LI em azul, contra íons de cloreto em amarelo, contra íons de sódio em rosa. Moléculas de água omitidas por simplicidade.

A partir destas condições, foram simulados ambos fosfolipídios, DPPC e DPPG, em ambas as temperaturas, 293 e 343K, por 300ns nos casos A e B, e 150ns em C. Utilizaram-se os mesmos parâmetros de DM que nas simulações com distribuição uniforme, apresentados no apêndice C. Apenas para o caso de distribuição aleatória, alterou-se a pressão de semi-isotrópica para anisotrópica, sem acoplamento entre as direções cartesianas.

A configuração (A) da figura 33 foi gerada com auxílio do software PackMol [76], distribuindo 512 lipídios e 216 LIs em orientação e posição aleatórias, permeados por

água. A estrutura (B) por sua vez foi construída com 464 lipídios e 216 LIs (32% mol) e mesma técnica usada em bicamadas uniformes, a partir da junção de blocos menores. Para a condição (C), obteve-se o agregado a partir da simulação de LI em água, retirando a estrutura micelar formada (41 moléculas) e aproximando-a da bicamada pura termalizada (concentração 7.5% mol de LI).

3.1.1 Condição inicial aleatória

Em todos os casos simulados de fosfolipídios e temperaturas (figs 34(PC a 293K); 35(PC a 343K); 36(PG a 293K) e 37(PG a 343K)), houve rápida agregação entre líquido iônico e lipídios. Após a aproximação do agregado inicial, entre 36 e 50ns, os aglomerados passam a se estabilizar, com o LI completamente misturado, em formatos parcialmente lamelares.

Para as misturas em DPPC (figuras 34 e 35), os aglomerados formados apresentam formato lamelar a partir de 50ns nos dois casos, com desprendimento momentâneo de duas moléculas de LI. Note-se que a estrutura lamelar formada leva em conta as condições periódicas de contorno da caixa de simulação.

Em 343K, é particularmente clara a forma lamelar, sem infiltração de água nas regiões organizadas, apenas no intermédio da junção dos pedaços de membrana formados (canto esquerdo superior). Na temperatura mais baixa, houve aprisionamento de moléculas de água, visíveis pelos agrupamentos de cabeças entre as caudas, porém sem aberturas de poros ou canais. Ainda, entre 7 e 100ns ocorre o desmanche do canal de lipídios formado entre as faces verticais.

Nas misturas com DPPG (figuras 36 e 37), foi encontrado tempo de agregação similar ao de DPPC, também com mistura entre lipídios e LI desde o início. Por conta do canal de lipídios formado entre as faces da membrana (36ns), maior e mais duradouro que no caso neutro, o tempo de estabilização do agregado foi maior. Porém, após a ruptura entre 150 e 170ns, observa-se a formação de estrutura lamelar com maiores infiltrações e aprisionamento de água mantidas até o fim do tempo simulado.

Os contra íons aniônicos provenientes do líquido iônico concentraram-se mais próximos da interface na membrana de DPPC que DPPG, resultado da leve atração com o nitrogênio do primeiro e repulsão pelos oxigênios do segundo.

Figura 34: Evolução temporal (300ns) da mistura de DPPC e LI a 293K a partir de condição inicial aleatória.

Figura 35: Evolução temporal (300ns) da mistura de DPPC e LI a 343K a partir de condição inicial aleatória.

Figura 36: Evolução temporal (300ns) da mistura de DPPG e LI a 293K a partir de condição inicial aleatória.

Figura 37: Evolução temporal (300ns) da mistura de DPPG e LI a 343K a partir de condição inicial aleatória.

3.1.2 Condição inicial com subdomínio de LI

Entre os diferentes fosfolipídios, o subdomínio de LI apresentou comportamento distinto nos primeiros instantes de simulação. Em bicamada neutra de DPPC (fig 38), tanto a 293 quanto 343K, houve abertura de poro no subdomínio com canal de água atravessando toda a espessura da membrana. A entrada de água ficou restrita ao poro, sem inserção na região entre LI e lipídios. Ainda mais, a ruptura do subdomínio foi acompanhada da separação de pequeno agregado de líquido iônico, descolado tanto do subdomínio quanto da membrana.

Na abertura, as cabeças polares dos LIs ficam voltadas para a parte interna do poro, em contato com o canal de água formado, isolando a membrana. Em menor temperatura, ao longo de 300ns houve diminuição do diâmetro mas não fechamento do poro. Enquanto que no caso mais quente a abertura é completamente fechada em 60ns. Mesmo sem fechamento, é possível ver pequena difusão de LI em torno do poro a parti de 100ns. Na temperatura mais alta, as moléculas de LI encontram-se dispersas aos 60ns e uniformemente distribuídas pela membrana ao final do tempo simulado.

Figura 38: Evolução temporal (300ns) da mistura de DPPC e LI a partir da condição inicial com subdomínio de LI.

O perfil lateral da evolução temporal pode ser visto na figura 39, indicando efeito de curvatura na estrutura lamelar apenas em 343K. É possível ver o desprendimento completo do agregado formado na abertura do poro no caso de temperatura mais baixa.

Figura 39: Visão em perfil lateral da evolução temporal da mistura de DPPC e LI a partir da condição inicial com subdomínio de LI (fig 38).

Devido à atração entre os fosfatos dos lipídios e imidazóis, a constrição da membrana ao redor do subdomínio de LI foi suficiente para evitar a penetração de água e abertura do poro (fig 40). Mesmo assim, a dispersão de LI, em 293K, aparenta similaridade nos casos neutro e carregado, apresentando pequenos agregados até 300ns.

Figura 40: Evolução temporal (300ns) da mistura de DPPG e LI a partir da condição inicial com subdomínio de LI.

Análogo ao observado em DPPC, a dispersão de LI na membrana de DPPG apresenta perturbação da estrutura em temperatura alta, porém em maior grau (fig 41). Novamente devido à atração entre fosfatos e a parte polar do subdomínio, ocorre um espaçamento entre as monocamadas na região das caudas próximo à borda da caixa de simulação (fig 42), permitindo entrada de água. As moléculas de água adentradas ficam retidas na membrana ao longo de toda a evolução, ampliando a perturbação na estrutura.

Figura 41: Visão em perfil lateral da evolução temporal da mistura de DPPG e LI a partir da condição inicial com subdomínio de LI (fig 40).

Figura 42: Reprodução de 1ns de evolução de DPPG com LI em 343K (fig 40) em ângulo ressaltando a abertura entre as monocamadas. Por clareza as cabeças dos lipídios são mostradas em amarelo.

3.1.3 Condição inicial com agregado de LI

Nas condições com agregado de LI próximo à bicamada, o mesmo foi alocado o mais próximo possível da membrana sem sobreposição com as cabeças dos lipídios. Partindo desta configuração, as simulações com DPPC apresentaram comportamentos qualitativos distintos nas duas temperaturas.

Em temperatura mais baixa, nos primeiros nanossegundos o aglomerado de LI afasta-se da membrana, movimentando-se livremente região com solvente, sem interação significativa com os lipídios (fig 43). Uma única molécula de LI é desprendida e assentada na interface da bicamada, porém sem imersão.

No caso mais quente ocorre interação significativa com forte atração nos momentos iniciais, seguido do desmanche do agregado em 100ns e posterior dispersão de LIs na monocamada de contato. Apenas uma molécula é transpassada para a monocamada

inferior. Ao se dissolver na membrana, o agregado provoca curvatura local, retornando à forma planar ao longo de sua dispersão.

A visão superior do processo de difusão é destacada na figura 44. Em 50ns, quatro moléculas desprendem-se do aglomerado e imergem na membrana, sendo uma alocada na monocamada inferior. Note-se que a região do agregado em contato com água apresenta conformação com os contra íons negativos, afastados após adentrar a membrana.

Figura 43: Evolução temporal (300ns) da mistura de DPPC e LI a partir da condição inicial com agregado de LI.

Figura 44: Visão superior da evolução temporal da mistura de DPPC e LI a partir da condição inicial com agregado de LI a 343K (fig 43).

As interações do agregado de LI com DPPG por sua vez são mais acentuadas. Em 293K o agregado é atraído pela membrana nos primeiros instantes, mantendo-se colado à interface por todo o intervalo simulado (figs 45 e 46). Porém, mesmo com a forte interação, não houve desprendimento significativo de moléculas de LI e tampouco sua difusão; a estrutura lamelar não sofreu perturbações consideráveis. No caso mais quente há também forte aproximação sem difusão porém com alta deformação da membrana. Apesar de não penetrar além das cabeças, moléculas de água são carregadas pelo agregado, mantendo-se entre o LI e a membrana, dificultando desta forma seu desmembramento.

Figura 45: Evolução temporal (300ns) da mistura de DPPG e LI a partir da condição inicial com agregado de LI.

Figura 46: Visão superior da evolução temporal da mistura de DPPG e LI a partir da condição inicial com agregado de LI (fig 45).

3.2 Análise estrutural

PARA validação da parametrização utilizada, comparam-se medidas da estrutura das bicamadas com os obtíveis experimentalmente. Dentre estas, listam-se as principais: área por lipídio (APL), espessuras características (D_{PP} , D_{HH} , D_C e D_B , comentados em Métodos) e curva de parâmetros de ordem deutérica (S_{CD}). Ainda mais, o efeito de temperatura e inserção de líquido iônico é medido a partir dos parâmetros mencionados. Através de funções de distribuição radial de pares foi construído o perfil local médio de primeira vizinhança para a região de interface das membranas.

3.2.1 Área por Lipídio

Medida a partir da área superficial transversal à membrana, a convergência da área livre média por lipídio foi utilizada como indicador de estabilidade do sistema. Nas figuras 47 e 48 apresenta-se a evolução temporal da APL para as bicamadas puras e com LI em ambas as fases, sem a presença da sonda DPH. Por conta do tamanho reduzido e da baixa interação, não é esperada modificação deste ou de outros parâmetros estruturais da bicamada com a inserção da sonda; os resultados neste caso constam no apêndice D.

A partir da estrutura inicial uniforme, o sistema é rapidamente comprimido e posteriormente estabilizado em torno do valor médio. Os sistemas em maior temperatura apresentam convergência acelerada por conta da proximidade ao valor médio final, em torno de 100ns tanto para DPPG quanto DPPC, puros ou não, contra ≈ 250 ns na fase gel.

Qualitativamente observa-se o comportamento esperado, com sistemas em fase gel-líquida expandidos em relação à fase gel por conta da maior amplitude de movimento dos lipídios. Por conta disso, nota-se também maior flutuação do parâmetro na fase gel-líquida. Ainda, a presença de líquido iônico compactado entre lipídios aumenta a APL em torno de 0.3nm^2 para DPPC e 0.5nm^2 para DPPG em fase gel e cerca de 0.7nm^2 para ambos os lipídios na fase gel-líquida.

Apesar da maior atração entre as cabeças de PG e imidazóis, o maior aumento na APL em DPPG (com inserção de LI) pode ser explicado pela alocação do LI na bicamada. Como apresentado posteriormente na subseção 3.2.4, o grupo colina é repelido pelos imidazóis, mantendo-as mais alinhadas ao eixo z e permitindo maior empacotamento das cabeças em DPPC. Em DPPG por sua vez, o grupo glicerol se aproxima das cabeças de LI, dificultando a aproximação dos grupos PG e dificultando o empacotamento, aumentando com isso a APL.

Sobre os trechos de produção indicados, foi aplicada correção de rugosidade como descrito na seção 2.2.2 (figs 49 e 50). Os valores médios obtidos por ambos os métodos são apresentados na tabela 2.

Figura 47: APL em função do tempo para bicamada de DPPC pura e com LI nas fases gel e gel-líquida, sem DPH, calculada a partir da seção plana da caixa. Os processos de produção de 50ns são destacados nos trechos finais; em tracejado, a média neste intervalo.

Figura 48: APL em função do tempo para bicamada de DPPG pura e com LI nas fases gel e gel-líquida, sem DPH, calculada a partir da seção plana da caixa. Os processos de produção de 50ns são destacados nos trechos finais; em tracejado, a média neste intervalo.

Figura 49: APL em função do tempo no intervalo de produção (fig 47) com correção de curvatura para a bicamada de DPPC pura e com LI nas fases gel e gel-líquida, sem DPH. Valores médios indicados em tracejado.

Figura 50: APL em função do tempo no intervalo de produção (fig 48) com correção de curvatura para a bicamada de DPPG pura e com LI nas fases gel e gel-líquida, sem DPH. Valores médios indicados em tracejado.

Tabela 2: Parâmetros médios de APL sobre os trechos termalizados de 50ns para bicamadas puras e com líquido iônico (30% mol) – figs 47, 48, 49 e 50.

$\langle APL \rangle$ (nm^2)	Puro		LI (30%mol)	
	293	343	293	343
DPPC (Plana)	0.578 ± 0.002	0.637 ± 0.004	0.610 ± 0.002	0.711 ± 0.005
DPPC (SuAVE)	0.586 ± 0.002	0.648 ± 0.004	0.625 ± 0.002	0.720 ± 0.005
DPPG (Plana)	0.556 ± 0.002	0.630 ± 0.005	0.606 ± 0.002	0.705 ± 0.006
DPPG (SuAVE)	0.568 ± 0.002	0.641 ± 0.006	0.620 ± 0.002	0.719 ± 0.007

As incertezas da tabela 2 correspondem ao desvio-padrão ($\sqrt{\langle x^2 \rangle - \langle x \rangle^2}$), dadas as distribuições gaussianas de flutuação da APL em torno da média. Nas superfícies interpoladas, a precisão do ajuste foi validada pelos desvios-quadráticos médios, não ultrapassando 0.14 ([71]).

Dos resultados calculados em ambos os métodos, houve diferenças de ordem $0.010nm^2$, valor pequeno embora distinguível, indicando baixa curvatura das membranas. A análise detalhada deste aspecto é feita na subseção de curvatura 3.2.2.

Os valores de APL da tabela 2 nos casos com LI foram calculados dividindo-se a área pelo número de lipídios, e não o total de moléculas (lipídios mais LI). Desta forma, esta área não corresponde mais ao espaço vazio médio ao redor dos lipídios. No caso da divisão pelo número total de moléculas na monocamada ($252+108=360$), os valores passam a ser menores pela maior compactação, por exemplo, em fase gel, as novas APL seriam de $0.417nm^2$ em DPPC e $0.404nm^2$ em DPPG, em relação ao obtido com ajuste de curvatura.

Em relação à literatura, experimental e teórica, são comparados os valores aqui obtidos na tabela 3. As comparações nos casos com LI não são apresentadas por conta da falta de resultados sobre estes sistemas específicos. Nos casos puros, a temperatura da fase gel-líquida utilizada não é comumente encontrada, porém pode ser comparada com resultados em condições próximas.

Tabela 3: Valores de referência da literatura de APL para membranas de DPPC e DPPG. Ao lado da referência, constam a temperatura e método, experimental ou teórico, utilizado. Os valores obtidos aqui são apresentados com correção de curvatura.

APL (nm^2)	DPPC		DPPG	
	Gel	Gel-Líqu.	Gel	Gel-Líqu.
Neste trab. (20 e 70°C)	0.586 ± 0.002	0.648 ± 0.004	0.568 ± 0.002	0.641 ± 0.006
[9](24°C)(X-ray)	0.479 ± 0.020			
[10](20 e 50°C)(Review)	0.479	0.640		
[12](50°C)(Neut.)		0.631		
[61](52°C)(MD)		0.623 ± 0.11		
[8](65°C)(NMR Spec.)		0.671		
[23](50°C)(MD)		0.630		
[30](50°C)(MD)		0.640		
[3](60°C)(MD)		0.634 ± 0.040		
[11](60°C)(Neut. & X-ray)		0.650		
[6](50°C)(X-ray)				0.670 ± 0.070
[6](60°C)(X-ray)				0.694 ± 0.070
[32](60°C)(MD)				0.665
[13](19°C)(X-ray)			0.645	
[5](20°C)(MD)			0.483 ± 0.030	

A APL da fase gel-líquida de DPPC foi bem reproduzida em relação ao encontrado experimentalmente. Observa-se que os valores variam em ordem $0.040 nm^2$ entre diferentes técnicas experimentais. Como esperado, o valor em relação à fonte da parametrização utilizada [61] também foi compatível.

Por outro lado, a fase gel de DPPC calculada encontra-se acima dos valores de referência. Em Nagle [10], é apresentada revisão sobre diversos valores de APL em fase gel medidos por diferentes técnicas. Neste ponto é ressaltado pelo autor a grande variação de valores das diferentes referências, entre 0.523 e $0.479 nm^2$ em 25 e $20^\circ C$ respectivamente. Em sequência, são aplicadas correções e considerações, obtendo-se por fim o valor apresentado na tabela 3. Considerando-se as flutuações, observa-se que o valor aqui calculado é próximo do limite superior, sendo qualitativamente válido.

Ainda mais, a topologia utilizada, retirada de Kukol [61], é construída em relação à fase fluida, sem garantias de reprodução da fase gel. O ponto de discrepância se dá sobre a organização específica que os lipídios assumem nesta fase, podendo apresentar organização inclinada (*tilted*) ou cruzada (*cross-tilted*) das caudas ([29] e [28]), alterando o empacotamento e portanto sua APL. Por a condição inicial utilizada ser menos compactada, tempos mais longos de simulação podem ser necessários para reproduzir espontaneamente estas formas particulares de organização.

Para DPPG, a escassez de resultados em fase gel não permite validação confiável da parametrização, porém ainda assim foi encontrado valor dentro dos limites e comparável ao obtido em DPPC. Em relação aos casos apresentados, o valor simulado é de mesma ordem e dentro dos limites. Na fase fluida é encontrado bom acordo, dentro das variações obtidas experimentalmente. Entre os dois fosfolipídios observa-se semelhança nos valores de área por lipídio, predominantemente por conta da similaridade das caudas.

É relevante ressaltar que o presente protocolo de simulação não faz uso de forças superficiais para adequar o valor de APL, sendo o valor calculado resultado da organização

dinâmica do sistema, dependente apenas da parametrização utilizada. Dentro das flutuações experimentais e teóricas, considera-se boa a concordância dos valores obtidos, especialmente para as fases fluidas.

3.2.2 Análise de Curvatura e Espessura

Sobre as estruturas estabilizadas foram feitos levantamentos sobre a rugosidade e curvatura das membranas. Com o software SuAVE, utilizou-se de três funções internas: *s_order*, *s_topog* e *s_thick* para análise (descritas adiante). Com as superfícies ajustadas a cada monocamada juntamente da superfície mediana, medem-se os desvios da forma planar de cada uma. Nas três funções aplicadas, após medidos ângulo, posição z e espessura, respectivamente, ponto a ponto da superfície para cada frame da trajetória, e posteriormente promediados, os valores são apresentados por um mapeamento em cores em cada ponto da grade sobre a superfície.

Por serem avaliados sobre os pontos da grade, igualmente espaçados nos sentidos x e y , o mapa topográfico final apresenta forma quadrada, desconsiderando as dimensões espaciais da membrana, não correspondendo à sua exata forma. Note que apenas a apresentação dos dados é deformada, não a grade ajustada em si, não alterando portanto as propriedades medidas. Com isso, nos resultados das figuras 51 a 54, os eixos de posição não apresentam unidades de distância.

Com a função *s_order*, o desvio do vetor ortogonal à superfície da normal z é calculado indiretamente pela função $P_2(\cos(\phi))$, sendo ϕ o ângulo propriamente dito e P_2 o segundo polinômio de Legendre. Sendo a função P_2 decrescente para ângulos em $[0, \pi/2]$, a relação de ordem entre ϕ e $P_2(\cos(\phi))$ é invertida, de forma que maiores valores de P_2 indicam vetores mais próximos de z ($\phi \rightarrow 0$), e portanto superfícies mais planas.

Os resultados obtidos são apresentados desta forma nas figuras 51 para DPPC e 52 para DPPG. Nos dois casos, com ou sem LI, nota-se poucos pontos de alta angulação. Nestes pontos, interdigitações parciais ou rugosidades, além de leve penetração de água entre as cabeças causam pequenos desvios, porém pouco expressivos. Ademais, a mudança para fase gel-líquida suaviza o superfície nos dois casos, aplainando-as. A inserção de LI contribui levemente para a suavização. Em geral, não ocorre deformação da estrutura lamelar, verificada pela ausência de gradientes angulares ao longo de toda a superfície.

Figura 51: Parâmetro de ordem angular $P_2(\cos(\phi))$ para as superfícies das bicamadas de DPPC puras e com LI. Em cada caso, à esquerda consta a superfície superior e à direita a inferior.

Figura 52: Parâmetro de ordem angular $P_2(\cos(\phi))$ para as superfícies das bicamadas de DPPG puras e com LI. Em cada caso, à esquerda consta a superfície superior e à direita a inferior.

A partir das superfícies inferior e superior, obtém-se também a superfície intermediária pela média em z entre elas. Desta nova superfície, a função s_topog constrói o mapa topográfico de sua altura z – figura 53. Rugosidades ou flutuações das monocamadas tendem a se anular em média, assim como afastamentos ou aproximações entre as monocamadas, fazendo com que a superfície final indique a curvatura da membrana como um todo.

Figura 53: Mapa topográfico da altura z da superfície média ajustada entre as monocamadas dos sistemas de bicamadas simulados.

Analogamente ao observado com o parâmetro de ordem angular, as diferenças encontradas são distinguíveis entre temperaturas, com efeito de aplainamento da superfície. Note que neste mapeamento, a curvatura é indicada pela mudança das regiões coloridas, e não seu valor absoluto, que descreve o deslocamento da bicamada como um todo. Os maiores desníveis encontrados não ultrapassam 1.5nm (em DPPG com LI a 293K), e são em geral de ordem 0.6nm, menor que o tamanho das cabeças dos lipídios ($\approx 0.7nm$). A presença de LI parece não promover efeito significativo neste parâmetro.

Similar ao mapa topográfico de altura, com a função s_thick mede-se a espessura ponto a ponto da grade ajustada como a diferença z entre as superfícies superior e inferior. Apesar de semelhante, a espessura indica flutuações locais devido ao afastamento ou aproximação das monocamadas – figura 54. As superfícies ajustadas neste caso consideraram os átomos mais externos da interface, e não mais os fósforos internos.

Figura 54: Mapa topográfico da espessura entre as superfícies ajustadas pelos átomos mais externos das bicamadas.

Concomitante ao mencionado antes, a mudança para fase gel-líquida atenua a rugosidade expressivamente. Nos sistemas puros em fase gel, nota-se regiões bem delimitadas com variação de 1nm de espessura, especialmente DPPG. Esta mudança, como detalhada na subseção de perfis de densidade 3.2.4, corresponde à interdigitação dos lipídios. A interpenetração das caudas, e consequente aproximação dos lipídios, provoca afundamento local da membrana. A espessura sofre considerável aumento com a inserção de LI, enquanto que entre as fases gel e gel-líquido ocorre leve diminuição.

Assim como a APL, a espessura das membranas pode ser usada como parâmetro de estabilidade. Neste caso, sua relevância se dá nos casos de ocorrência de interdigitação parcial dos lipídios (processo detalhado na subseção 3.2.4), indicando possível espalhamento da região interdigitada pela membrana, influenciando nas propriedades medidas. Com isso, avaliou-se a espessura T_z no tempo para sistemas de DPPC (fig 55) e DPPG (fig 56), reconfirmando sua estabilidade e restrição de regiões interdigitadas.

Em suma, com os mapas topográficos calculados e da proximidade dos valores de APL nos diferentes métodos, conclui-se que as estruturas simuladas não apresentam curvatura, apenas rugosidades nas fases gel junto de interdigitações, especialmente em DPPG puro, dissipadas sob mudança de fase.

Figura 55: Espessura T_z (média sobre superfície) em função do tempo para bicamadas de DPPC puras e com LI nas fases gel e fluida. Linhas tracejadas indicam o valor médio.

Figura 56: Espessura T_z (média sobre superfície) em função do tempo para bicamadas de DPPG puras e com LI nas fases gel e fluida. Linhas tracejadas indicam o valor médio.

3.2.3 Parâmetro de Ordem Deutérica S_{CD}

Na mudança de fase gel→gel-líquida o principal aspecto estrutural modificado, além da APL, é a organização das caudas. Sendo mais alinhadas e possivelmente interdigitadas em gel, a transição provoca quebra desta organização, permitindo às caudas torções e maior amplitude de movimento.

Para a medida de alinhamento das caudas, calcula-se o perfil de ordem deutérica (fig 57) a partir do ângulo médio formado por cada ligação alifática com a normal da membrana. Vale ressaltar que embora possuam 16 carbonos, a definição do ângulo exclui o primeiro (C11 e C12) e último (C116 e C216) por não possuírem carbonos antecedentes e precedentes, respectivamente. Os rótulos de cada átomo são apresentados no apêndice A.

Notando a proporcionalidade de S_{CD} com a organização das caudas, de acordo com o critério mencionado, observa-se comportamento qualitativo específico em cada fase. Em fase gel, a região central das caudas apresenta alta organização, diminuindo próximo à extremidade por conta do espaçamento entre as monocamadas. Em gel-líquido, devido à torção e flutuação maior de movimento, a desorganização é crescente na direção da extremidade.

Figura 57: Parâmetro de ordem deutérica S_{CD} para os carbonos C_i das caudas de DPPC, à esquerda, e DPPG, à direita. Cada cauda é apresentada separadamente (T_1 , T_2).

Em forma pura, as caudas de DPPG apresentam organização levemente maior que as de DPPC, relacionada à maior interdigitação com alto alinhamento das caudas, processo detalhado na subseção adiante. Entretanto, na presença de LI a diferença é praticamente eliminada. No caso fluido, apesar de não alterar o comportamento qualitativo, a presença de LI eleva a curva S_{CD} como um todo (em PC e PG), promovendo maior organização por conta do empacotamento dos lipídios.

Por conta da menor mobilidade dos esteres, especialmente rotacional, os carbonos próximos desta região alinham-se similarmente nas duas fases, visível nos perfis pela aproximação do parâmetro de ordem na duas temperaturas para os carbonos C_1 . Em DPPC, observou-se diferença entre as caudas, T_1 e T_2 , para estes carbonos em ambas as fases. Em geral, devido à equivalência entre as caudas de DPPG e DPPC, observa-se tendência semelhante nos dois sistemas.

Assim como os parâmetros de APL, apenas os sistemas puros são passíveis de comparação na literatura. O comportamento qualitativo observado é o mesmo em todos os casos, com platô de organização em fase gel e decaimento a partir dos esteres para fase fluida, variando apenas o intervalo das curvas. Na tabela 4 constam os intervalos dos parâmetros de ordem encontrados em condições semelhantes às simuladas aqui.

Tabela 4: Intervalos ([Máx, Mín]) de valores de referência de parâmetros de ordem deutérica S_{CD} encontrados na literatura para membranas de DPPC e DPPG. Ao lado da referência, constam a temperatura e método, experimental ou teórico, utilizado.

$[S_{max}, S_{min}]$	DPPC		DPPG	
	Gel	Gel-Líqu.	Gel	Gel-Líqu.
Neste trab. (20 e 70°C)	[0.32, 0.20]	[0.22, 0.08]	[0.37, 0.24]	[0.23, 0.08]
[29](17°C)(MD)	[0.27, 0.20]			
[61](70°C)(MD)		[0.23, 0.10]		
[29](67°C)(MD)		[0.22, 0.07]		
[27](77°C)(MD e NMR)		[0.21, 0.08]		
[80](65°C)(NMR)		[0.175, 0.01]		
[8](65°C)(NMR)				[0.18, 0.06]
[21](50°C)(Electron spin ressonance)				[0.39, 0.10]

Pela falta de referência os sistemas puros em fase gel não podem ser validados precisamente, porém para DPPC observa-se valores de mesma ordem, diferindo apenas no valor máximo. Em fase fluida é observada boa concordância, dentro das variações encontradas. Em particular, a diferença entre carbonos C_1 mencionada anteriormente é verificada em DPPC, em ambas as fases, por Kukol [61] e [27].

Ainda, em sistemas com pressão superficial aplicada, é possível induzir a organização do sistema por empacotamento dos lipídios, aproximando-se dos perfis calculados. Neste contexto, Cascales et al. [31](MD) obtém comportamentos similares para fase gel de DPPC com pressões altas (40mN/m), dentro do intervalo [0.40,0.26] e baixas (1mN/m), no intervalo [0.21,0.07].

O mesmo cálculo é feito de maneira análoga para a cauda única das moléculas de LI, obtendo o perfil da figura 58.

Figura 58: Parâmetro de ordem deutérica S_{CD} para os carbonos C_i da cauda de líquido iônico nas temperaturas (293 e 343K) e fosfolipídios (DPPC e DPPG) simulados.

Para caudas de LI, não ocorre diferença de organização quando imerso em membranas dos diferentes fosfolipídios simulados. O perfil encontrado é similar ao de caudas lipídicas, com maior organização na fase gel, em particular na região central da cauda. Devido ao comprimento menor da cauda de LI, afastadas do espaço entre as camadas da membrana, a organização decresce em direção à ponta mas de forma menos acentuada que a dos lipídios.

3.2.4 Perfil de Densidade

Sobre os trechos de produção ressaltados nos gráficos de APL foram calculados os perfis de densidade numérica dos principais grupos componentes: colina (PC), glicerol (PG), fosfato, ésteres, caudas (com metil C16 separado), água, íons, DPH e líquido iônico (separado em cabeça e cauda).

Os perfis foram calculados a partir da secção da caixa pelas superfícies com correção de rugosidade, não apresentando diferença significativa com o método de secção plana. Como evidenciado pelos valores de APL e mapas topográficos, não ocorrem curvaturas significativas. Com isso, os resultados a seguir correspondem aos perfis de densidade numérica (DP) dos sistemas sem sonda DPH, estes por sua vez apresentados na seção de dinâmica da sonda 3.3.

Nas figuras 59 e 60 constam os perfis de densidade para DPPC e DPPG puros, respectivamente. Os casos com LI por sua vez são mostrados nas figuras 63 (PC) e 64 (PG). Por clareza, os grupos são apresentados em gráficos separados mas com mesmo intervalo do eixo da abscissa z .

Figura 59: Perfis de densidade numérica DP para os diversos grupos da bicamada de DPPC pura nas fases gel (293K) e fluida (343K).

Sob mudança da temperatura todos os grupos (figuras 59 e 60) apresentam aproximação dos picos, especialmente das cabeças (fosfato, colina/glicerol e éster), diminuindo a espessura da membrana na fase fluida (343K) comparativamente a fase gel (293K). Com a diminuição da rugosidade da membrana, observado pelos mapas de espessura na subseção 3.2.2, os grupos limitam-se a uma região de espessura menor em 343K, implicando no aumento da altura dos picos uma vez que o número de partículas (integral volumétrica) permanece constante. Além disso, a presença de interdigitação em fase gel resulta em divisão parcial das curvas, como detalhado adiante.

DPPG Puro

Figura 60: Perfis de densidade numérica DP para os diversos grupos da bicamada de DPPG pura nas fases gel (293K) e fluida (343K).

Analisando o perfil do grupo fosfato nas figuras 59 e 60, observa-se a formação de dois picos em fase gel. Isto ocorre devido à interdigitação parcial de algumas regiões da membrana. Com a sobreposição das caudas de alguns lipídios, a região interdigitada diminui de espessura conjuntamente, aprofundando todos os grupos lipídicos. O efeito da interdigitação parcial sobre o perfil de densidade é exemplificado na figura 61. Presente em todos os casos em gel, em especial em DPPG puro, estas regiões desaparecem na mudança de fase, como visto nos perfis destes grupos com um único pico na temperatura de 343K.

Figura 61: Exemplificação do efeito da interdigitação sobre o perfil de densidade – imagem adaptada de [13]

Embora presente em todos os casos em fase gel, em DPPG puro observa-se o caso mais pronunciado de interdigitação, ilustrado na figura 62. Além de sua sobreposição, nota-se grande alinhamento das caudas. Este tipo de organização, incluindo a maior prevalência em DPPG, é comentado na literatura em sistemas em fase gel (medidas por SAXS) [13] ou submetidos a pressão superficial [7].

Figura 62: Regiões com e sem interdigitação (espessuras de 3.42nm e 4.56nm respectivamente) na bicamada de DPPG pura em fase gel. As distâncias indicadas correspondem aos picos nos perfis do grupo fosfato.

Assim como os perfis dos grupos mais externos, os esteres também apresentam efeito de interdigitação. Da mesma forma para as curvas das caudas, mas menos pronunciado, o aumento de temperatura define os picos e elimina saliências decorrentes de sua sobreposição.

De forma geral e em ambas as fases, observa-se nas curvas de éster a sobreposição com as curvas de água, indicando sua penetração sem adentrar a região das caudas. Alguns contra íons positivos de DPPG também penetram até esta região, observável na figura 60 pela proximidade do pico do sódio (Na^+) com o do fosfato, mas em fração muito pequena em relação aos lipídios. Portanto, a bicamada de DPPG passa a apresentar carga efetiva negativa.

DPPC com LI (30%mol)

Figura 63: Perfis de densidade numérica DP para os diversos grupos da bicamada de DPPC com LI (30%mol) nas fases gel (293K) e fluida (343K). IoL-H e IoL-T denominam respectivamente os perfis para a cabeça e cauda do LI.

Com LI inserido (figuras 63 e 64) a interdigitação parcial é diminuída em fase gel, aparente apenas como saliência nas curvas de fosfato e colina. A diminuição da espessura pela temperatura é maior nestes grupos. Para DPPC, colina e fosfato afastam-se entre si na presença de LI. Como exemplo, a separação entre os picos dos grupos fosfato e colina, em 343K, decai de 0.09nm sem LI (fig 59) para 0.21nm com inserção de LI (fig 63).

A penetração de água não é modificada, continuando restrita até os esteres. Os contra íons do LI aproximam-se da interface em DPPC porém sem grande penetração, próximos às colinas (fig 63). No caso de DPPG, os contra íons negativos Cl^- são completamente afastados e a atração de seus contra íons positivos é diminuída mas não eliminada (fig 64).

DPPG com LI (30%mol)

Figura 64: Perfis de densidade numérica DP para os diversos grupos da bicamada de DPPG com LI (30%mol) nas fases gel (293K) e fluida (343K). IoL-H e IoL-T denominam respectivamente os perfis para a cabeça e cauda do LI.

Comparado entre fosfolipídios as cabeças de LI localizam-se em mesma profundidade (figura 65), entre fosfato e éster. Evidencia-se a aproximação dos contra íons aniônicos Cl^- da interface em DPPC mas não em DPPG, condição que se mantém mesmo com o aumento da temperatura.

Figura 65: Perfis de densidade numérica comparados entre DPPC e DPPG com LI nas fases gel (293K) e fluida (343K).

Com os picos definidos de cada grupo são calculadas espessuras características do sistema, como descrito no capítulo de Métodos. Os resultados obtidos constam na tabela 5. Em resumo, as distâncias mais caracteristicamente usadas são definidas como:

- $2D_C$ - Distância entre superfícies divisórias de Gibbs da curva de hidrocarbonetos (caudas).
- D_B - Distância entre superfícies divisórias de Gibbs das curvas de água.
- D_{PP} - Distância entre picos dos grupos fosfatos.
- D_{CC} - Distância entre picos dos grupos colina (PC) ou glicerol (PG).
- D_{HH} - Distância entre picos dos grupos da cabeça, considerando a soma dos grupos colina e fosfato.

No caso do parâmetro D_{PP} , nas curvas de sistemas com interdigitação foi considerado a distância entre as posições médias entre o pico mais externo e interno (interdigitado). Os parâmetros extras ao final da tabela 5, $\langle T_z \rangle_{PP}$ e $\langle T_z \rangle_{Outer}$, consistem nas espessuras calculadas pela distância entre as superfícies ajustadas considerando rugosidade. O primeiro ajustado considerando os fósforos de cada fosfato e o segundo pelo átomo mais externo da membrana.

Tabela 5: Espessuras características calculadas para as bicamadas de DPPC e DPPG nas fases gel e fluida, em estado puro ou com líquido iônico (30%mol). Os valores médios de espessura possuem desvio-padrão menor que 0.03.

Espessuras (nm)	DPPC				DPPG			
	Pure		IL		Pure		IL	
	293	343	293	343	293	343	293	343
$2D_C$	3.17	3.02	3.52	3.11	3.30	2.97	3.53	3.19
D_B	4.13	3.92	4.62	4.19	4.16	3.85	4.52	4.12
D_{CC}	4.04	3.84	4.73	4.25	4.22	3.88	4.46	4.02
D_{PP}	3.90	3.72	4.33	3.88	4.07	3.76	4.31	3.89
D_{HH}	3.96	3.77	4.51	4.04	4.14	3.81	4.37	3.94
$\langle T_z \rangle_{PP}$	3.94	3.76	4.25	3.87	4.05	3.83	4.28	3.90
$\langle T_z \rangle_{Outer}$	4.63	4.42	5.22	4.77	4.73	4.54	5.05	4.64

No estudo experimental de Oliveira [43] sobre o efeito do líquido iônico C14MImCl em bicamadas de DPPC e DPPG foram obtidas informações do perfil de densidade eletrônica a partir de medidas de SAXS (small angle X-ray scattering). Em suma, foi observado efeito do LI (a 22°C e concentrações entre 0-45%mol) sobre DPPC nas cabeças, alargando a espessura da curva de $1.11 \pm 0.06\text{nm}$ em vesículas puras para $1.7 \pm 0.09\text{nm}$ com concentração 30%mol de LI. Em DPPG por sua vez, o LI foi localizado mais próximo a interface polar/apolar, em torno do grupo fosfato, como obtido também aqui. Ao contrário do obtido em DPPC, ocorre leve diminuição da espessura de $1.19 \pm 0.02\text{nm}$ no sistema puro para $8.5 \pm 0.06\text{nm}$ com 30%mol de LI.

Estimando a espessura dos picos das curvas das cabeças como a diferença entre a espessura D_B e o comprimento das curvas das caudas $2D_C$, podemos comparar com os valores obtidos aqui. Em fase gel, condição mais próxima da utilizada por Oliveira, o DPPC também apresenta aumento, de 0.96nm no sistema puro para 1.10nm com 30%mol de LI. Contrário à tendência experimental, observou-se também aumento em DPPG, de 0.86nm para 0.99nm entre a membrana pura e com LI, respectivamente.

A espessura da região das caudas também foi analisada, podendo ser comparada com o parâmetro $2D_C$. Neste caso, o DPPG apresentou leve aumento entre o caso puro e com LI, de 3.3 para 3.53nm (experimentalmente obteve-se respectivamente 2.82 e 3.28nm). Em DPPC, o resultado calculado no caso puro (3.17nm) aproxima-se do experimental (3.18nm) porém com tendência qualitativa contrária com a inserção de LI, enquanto o calculado aumenta para 3.52nm o experimental diminui para 2.42nm.

Analogamente para a espessura total, a soma das distância experimentais de cabeça e cauda fornece uma estimativa da espessura. Desta forma, o valor experimental para DPPC varia de 5.4nm na forma pura para 5.8nm com LI, enquanto que DPPG apresenta queda de 5.2nm para 5.0nm com a inserção de 30%mol de LI. Apesar de maiores que os obtidos aqui pelo cálculo do parâmetro D_B (4.13 e 4.62 para DPPC puro e com LI, respectivamente e 4.16 e 4.52 para DPPG da mesma forma), os valores apresentam proximidade razoável.

Como feito por Oliveira, o perfil de densidade é obtido através do ajuste dos dados de SAXS, de acordo com um modelo de densidade constante para as curvas do perfil. Com isso, pode-se fazer o processo inverso, com base nos parâmetros aqui obtidos, um novo ajuste da curva de SAXS pode ser feito e avaliado em relação aos dados experimentais.

Os resultados para sistemas puros podem ser comparados com o presente na literatura, compilados nas tabelas 6 e 7 para DPPC e DPPG respectivamente. Em todos os casos

com variação da temperatura é relatada a diminuição da espessura com o aumento da temperatura.

Tabela 6: Compilação de medidas de espessuras características de membranas de DPPC da literatura. Na primeira coluna listam-se a referência, temperatura e método utilizados. Os valores marcados por (*) são estimados visualmente dos gráficos da referência. MD: Molecular Dynamics; NSLD: Neutron Scatter Length Density; SDP: Surface Picks Density.

(nm)	DPPC							
	Gel				Gel-Líquido			
	D_{PP}	D_{HH}	$2D_C$	D_B	D_{PP}	D_{HH}	$2D_C$	D_B
Neste trab. (20 e 70°C)(MD)	3.90	3.96	3.17	4.13	3.72	3.77	3.02	3.92
[11](60°C)(NSLD)							2.79	3.81
[25](77°C)(MD)					3.7*	3.8*		
[3](60°C)(MD)							2.8*	3.8*
[27](54°C)(MD)					4.0*	4.1*	3.3*	4.0*
[12](50°C)(SDP fit – X-ray)						3.80	2.86	3.90
[10](20° e 50°C)(EDP and NSLD)		4.42	3.44	4.77		3.83	2.85	3.85
[8](65°C)(NMR)							2.72	

Para fase gel do DPPC, o resultado simulado dista entre 10 e 15% da referência experimental encontrada, relacionado à mesma diferença obtida na APL, porém ainda válido qualitativamente. Por conta da escassez de resultados desta fase, não é possível comparações mais profundas. Em fase fluida, os valores estão em bom acordo com os encontrados, com $2D_C$ encontrado levemente acima da média mas dentro do intervalo em que flutuam.

Tabela 7: Compilação de medidas de espessuras características de membranas de DPPG da literatura. Na primeira coluna listam-se a referência, temperatura e método utilizados. Os valores marcados por (*) são estimados visualmente dos gráficos da referência. MD: Molecular Dynamics; SDP: Surface Picks Density.

(nm)	DPPG							
	Gel				Gel-Líquido			
	D_{PP}	D_{HH}	$2D_C$	D_B	D_{PP}	D_{HH}	$2D_C$	D_B
Neste trab. (20 e 70°C)(MD)	4.07	4.14	3.30	4.16	3.76	3.81	2.97	3.85
[32](60°C)(MD)						3.49		3.62
[5](30°C)(MD)	4.47±0.02		3.3*	4.8*				
[6](60°C)(SDP - X-ray)							2.61	3.45

Assim como em DPPC, a fase gel de DPPG apresenta pior descrição mas ainda dentro dos limites esperados, dada as flutuações decorrentes da simulação e entre métodos experimentais. Por conta da ausência de referências nas condições simuladas, não é possível comparações adicionais. Em fase fluida, foram encontrados valores acima do experimental mas mais próximos do simulado neste trabalho, dentro dos intervalos de variação. A inserção de LI nas membranas provoca um aumento médio de 9% na espessura (D_B), enquanto que o efeito do aumento de temperatura é de redução de 8%.

3.2.5 Funções de distribuição radial

Para análise de vizinhanças dos principais grupos de interesse, utilizou-se as curvas de distribuição radial de pares $g(r)$. Os cálculos foram feitos entre grupos da cabeça dos lipídios, cabeças de LI e contra íons. Os grupos lipídicos foram considerados inteiros, isto é, com todos os seus átomos, avaliando a distância entre átomos com os dos demais grupos. Nos casos de $g(r)$ entre grupos iguais, por exemplo colina-colina, foram excluídos as contagens de átomos internos do grupo, evitando auto-contagem.

Os resultados apresentados nesta seção consideram apenas os mais relevantes. No apêndice E constam os demais resultados obtidos. No cálculo, feito pela função interna do gromacs *gmx rdf*, foi utilizado *bin* de 0.002nm e raio máximo de 2.0nm. A integral da curva para o cálculo do número de coordenação foi feito pela mesma função interna.

Comparando-se curvas de um mesmo sistema em diferentes temperaturas, espera-se observar translação dos picos por conta da mudança de espaçamento relacionado à APL. De acordo com os resultados apresentados, o aumento de distância média entre lipídios de uma mesma monocamada relaciona-se com a APL. Desta forma, a variação do distanciamento médio fica dada por $\Delta r = \sqrt{\frac{Apl_F}{\pi}} - \sqrt{\frac{Apl_G}{\pi}}$, com as áreas por lipídio em gel (G) e fluido (F). Substituindo o maior e menor valor de mudança de APL obtido, as mudanças respectivas são: 0.021nm (DPPC puro) e 0.035nm (DPPC LI). Como pode ser notado nos gráficos adiante, a menor escala é de ordem 0.05nm, duas vezes maior que a mudança Δr , tornando pouco distinguível a translação do pico. Ainda, a $g(r)$ sobre grupos de átomos atenua a diferença por conta de flutuações.

Nas figuras 66, 67 e 68 constam as curvas entre grupos lipídicos para diferentes temperaturas nos casos com e sem LI. As tabelas 8, 9 e 10 adjacentes às figuras apresentam os números de coordenação para diferentes distâncias, referentes às integrais das curvas $g(r)$.

Figura 66: Função de distribuição radial $g(r)$ entre colinas (chol) de bicamadas de DPPC puro e com LI (IoL) a 293 e 343K.

Figura 67: Função de distribuição radial $g(r)$ entre gliceróis (gly) de bicamadas de DPPG puro e com LI (IoL) a 293 e 343K.

Tabela 8: Número de vizinhos $N(r)$ para diferentes raios de integração das curvas entre Colinas de DPPC – fig 66.

$N(r)$	N(0.5)	N(1.0)	N(1.5)
Puro 293K	0.7	26	62
Puro 343K	0.7	24	57
IoL 293K	0.6	23	59
IoL 343K	0.5	21	52

Tabela 9: Número de vizinhos $N(r)$ para diferentes raios de integração das curvas entre Gliceróis de DPPG – fig 67.

$N(r)$	N(0.2)	N(0.5)	N(1.0)	N(1.5)
Puro 293K	0.02	2.90	30	76
Puro 343K	0.01	2.46	27	68
IoL 293K	0.01	2.08	26	68
IoL 343K	0.01	1.92	23	60

Em um mesmo sistema, as curvas em diferentes temperaturas apresentam apenas diferença de altura, comportamento similar ao obtido nos perfis de densidade, por conta da diminuição da movimentação dos grupos. Pelas figuras 66, 67, nota-se maior aproximação entre os gliceróis (máximo no 1º pico em 0.53nm) do que entre colinas (primeiro máximo em 0.73nm). Nas tabelas 8 e 9 também pode-se notar esta aproximação com relação ao número de vizinhos. Por exemplo, na distância de 0.5nm, contam-se 0.7 vizinhos do grupo colina e entre 1.9 e 2.9 do grupo glicerol dependendo da condição.

A pequena estruturação em $r \approx 0.15\text{nm}$ observada nos sistemas de DPPG (fig 67) apresenta baixo número de átomos coordenados, podendo corresponder portanto à ligações de hidrogênio esporádicas entre gliceróis ou entre gliceróis e fosfatos (intramolecular).

A posição dos máximos, estimativa da distância média entre grupos, diferencia-se entre colina e glicerol (aproximadamente 0.72 e 0.55nm respectivamente), parecendo contrariar a proximidade dos valores de APL calculados entre DPPC e DPPG, com e sem LI (tabela 2). Levando em consideração o resultado obtido dos perfis de densidade (subseção 3.2.4), o grupo glicerol aproxima-se mais do fosfato que o grupo colina, sugerindo com isso uma inclinação dos grupos glicerol um em direção ao outro. Com isso, o distanciamento do lipídio como um todo, ocasionado em maior parte pelo movimento das caudas, causa uma maior APL, porém a aproximação parcial dos gliceróis causa picos de $g(r)$ mais próximos. Em resumo, o parâmetro de APL reflete o espaçamento entre lipídios provocados pelas caudas (idênticas entre DPPC e DPPG) e as medidas de RDF distâncias médias locais, e neste caso a aproximação entre gliceróis.

Figura 68: Função de distribuição radial $g(r)$ entre o contra íon Na^+ e gliceróis (gly) em bicamadas pura e com LI (IoL) a 293 e 343K.

Tabela 10: Número de vizinhos $N(r)$ para diferentes raios de integração das curvas entre Gliceróis e contra íon Na^+ de DPPG – fig 68.

$N(r)$	N(0.3)	N(0.4)	N(0.5)	N(0.7)	N(1.0)	N(1.50)
Puro 293K	0.06	0.22	0.40	1.48	4.12	10
Puro 343K	0.05	0.20	0.36	1.36	3.80	9
IoL 293K	0.02	0.09	0.17	0.70	2.17	6
IoL 343K	0.02	0.08	0.15	0.64	1.96	6

Na distribuição radial entre glicerol e íons (fig 68), dois picos são destacados no início (com máximos em 0.24 e 0.31nm e respectivos mínimos em 0.28 e 0.39nm), correspondentes à aproximação do contra íon com os oxigênios do glicerol, seguido do pico mais esparsos relacionado à distribuição próxima do fosfato e éster (máximo em 0.51nm e mínimo 0.67nm), já na região do solvente. Como visto pelos perfis de densidade, a penetração do íon restringe-se a mesma região que a da água, até a região dos esteres.

Entretanto, a integração até estes pontos indica baixa permanência dos íons. Por conta da repulsão eletrostática, a inserção de líquido iônico provoca diminuição de 50% na aproximação de íons de sódio. Como exposto na seção 3.4, este afastamento implica diminuição da energia de interação relacionada à mudança de fase, que será discutido a seguir.

Figura 69: Função de distribuição radial $g(r)$ entre os grupos colina (Chol) e glicerol (Gly) com as cabeças de LI (H) nas temperaturas 293K e 343K.

Figura 70: Função de distribuição radial $g(r)$ entre as cabeças de LI (H) nas bicamadas de DPPC e DPPG em duas temperaturas: 293K e 343K.

Tabela 11: Número de vizinhos $N(r)$ para diferentes raios de integração das curvas entre cabeças de LI e Glicerol/Colina – fig 69.

$N(r)$	N(0.5)	N(1.0)	N(1.5)
DPPC 293K	0.89	24.0	60.7
DPPC 343K	0.88	22.3	53.7
DPPG 293K	4.27	32.5	73.6
DPPG 343K	4.01	30.7	66.6

Tabela 12: Número de vizinhos $N(r)$ para diferentes raios de integração das curvas entre cabeças de LI em DPPC(G) – fig 70.

$N(r)$	N(0.5)	N(1.0)	N(1.50)
DPPC 293K	0.36	10.8	31.7
DPPC 343K	0.27	8.45	29.0
DPPG 293K	0.33	12.2	32.7
DPPG 343K	0.30	10.7	30.6

As figuras 69 e 70 mostram as curvas $g(r)$ feitas a partir das cabeças de LI com grupos colina/glicerol e entre si, respectivamente, com os correspondentes números de coordenação nas tabelas 11 e 12.

Em acordo com o observado anteriormente entre colinas e gliceróis, as cabeças de LI encontram-se mais próximas do grupo glicerol (DPPG) que colina (DPPC), com distância mais provável de 0.40 e 0.70nm respectivamente. Com isso, o número de vizinhos calculado em PG é 5 vezes maior que PC para uma distância de 0.5nm (tab 11).

Quando avaliados entre si, as cabeças de LI encontram-se com distanciamento médio levemente menor em PC que PG, sendo em fase gel 0.77nm para o primeiro e 0.88nm para o segundo, com diminuição da diferença na fase fluida (0.87nm e 0.92nm respectivamente – fig 70). Ainda assim, quando comparados os números de coordenação, observa-se quantidade similar de LIs circundantes a cada lipídio nos dois casos. Em DPPC, a mudança de fase modifica o perfil da curva.

Figura 71: Função de distribuição radial $g(r)$ entre cabeças de LI (H) e água nas bicamadas de DPPC e DPPG em duas temperaturas: 293K e 343K.

Figura 72: Função de distribuição radial $g(r)$ entre cabeças de LI (H) e contra íons Cl^- nas bicamadas de DPPC e DPPG em duas temperaturas: 293K e 343K.

Tabela 13: Número de vizinhos $N(r)$ para diferentes raios de integração das curvas entre cabeças de LI e água – fig 71.

$N(r)$	N(0.5)	N(1.0)	N(1.5)
DPPC 293K	11	12.8	487
DPPC 343K	12	13.6	515
DPPG 293K	10	11.0	531
DPPG 343K	10	11.3	545

Tabela 14: Número de vizinhos $N(r)$ para diferentes raios de integração das curvas entre cabeças de LI e Cl^- – fig 72.

$N(r)$	N(0.33)	N(0.5)	N(1.0)	N(1.5)
DPPC 293K	0.002	0.03	0.62	2.59
DPPC 343K	0.003	0.04	0.66	2.48
DPPG 293K	0.000	0.00	0.07	0.54
DPPG 343K	0.000	0.00	0.11	0.68

Nas figuras 71 e 72, seguidas das tabelas 13 e 14, são mostradas os perfis radiais de distribuição de cabeças de LI com água e seu contra íon de cloro, respectivamente.

Nas curvas em relação a água, ocorre pequena estruturação em DPPC em torno de 0.3nm, implicando em duas moléculas de água a mais solvatadas até um raio de 0.5nm na primeira vizinhança. Porém, para distâncias maiores (cerca de 1.5nm) as moléculas de DPPG encontra-se mais rodeada por águas.

A aproximação do contra íon aniônico de sódio da interface ocorre apenas em DPPC, mesmo com baixa frequência calculada pelo número de coordenação. A alta mobilidade dos íons impede sua fixação na interface, porém a atração das cabeças de LI e do nitrogênio das colinas facilita a aproximação. Enquanto que em DPPG a repulsão pelos oxigênios do glicerol afastam-nos completamente.

Em relação aos contra íons, foi calculado também sua distribuição de pares em relação aos grupos colina, glicerol e fosfato (fig 73). Conjuntamente, a tabela 15 mostra a quantidade de vizinhos. Entre PC e PG, a presença de cloro é expressamente maior no primeiro em todos os intervalos de integração. Os picos observados na curva com colina correspondem à interação com nitrogênio e o segundo à cabeça de LI, localizada 0.2nm mais fundo.

Figura 73: Função de distribuição radial $g(r)$ entre o contra íon Cl^- e os grupos colina (Chol), glicerol (Gly) e fosfato (Phosp) nas bicamadas de DPPC e DPPG em duas temperaturas: 293K e 343K.

Tabela 15: Número de vizinhos $N(r)$ para diferentes raios de integração das curvas entre contra íon Cl^- e grupos Colina, Glicerol e Fosfato – fig 73.

$N(r)$	N(0.5)	N(0.76)	N(1.0)	N(1.5)
Chol DPPC 293K	0.13	0.57	1.21	3.41
Chol DPPC 343K	0.11	0.50	1.06	2.98
Gly DPPG 293K	0.01	0.04	0.15	0.81
Gly DPPG 343K	0.01	0.05	0.18	0.90
Phosp DPPC 293K	0.02	0.29	0.91	2.98
Phosp DPPC 343K	0.02	0.26	0.80	2.63
Phosp DPPG 293K	0.00	0.02	0.11	0.71
Phosp DPPG 343K	0.00	0.03	0.14	0.80

A partir dos resultados elaborados acima, construiu-se a figura ilustrativa 74. Nela, são expostas as vizinhanças num raio de 0.5nm com os grupos circundantes da interface. A proximidade entre as moléculas e sua quantidade foram alocadas de forma condizente com os gráficos de $g(r)$ e números de vizinhos $N(r)$. Nos casos em que obteve-se contagem menor que 1 átomo coordenado, apresentou-se as moléculas com borda tracejada. Da mesma forma, a parte não inteira dos números de coordenação foi representada por círculos parcialmente dentro das bordas.

Os dados brutos utilizados de números de vizinhos entre os diferentes grupos são expostos na tabela 16. O efeito da temperatura é minoritário, portanto foram utilizados apenas os dados dos sistemas em fase gel (293K). O número de vizinhos entre colina/glicerol e água não são expostos aqui, porém a curva de $g(r)$ consta no apêndice E.

Tabela 16: Resumo dos resultados de número de vizinhos $N(r)$ entre diferentes grupos para um raio de 0.5nm. Utilizado como base para construção da figura 74. Foram considerados os resultados na fase gel (293K), uma vez que o efeito da temperatura é minoritário.

$N(r)$	Colina/Glicerol	Água	Cabeça LI	Cl^-	Na^+
Colina (Puro)	0.70	18			
Glicerol (Puro)	2.90	19			0.40
Colina (com LI)	0.60	22	0.89	0.13	
Glicerol (com LI)	2.08	19	4.27	0.01	0.17
Cabeça LI (DPPC)	0.89	11	0.36	0.03	
Cabeça LI (DPPG)	4.27	10	0.33	0.00	0.06

Figura 74: Corte em perfil da interface da membrana (perpendicular à z) da vizinhança até $r = 0.5\text{nm}$ com posicionamentos ilustrados de acordo com o obtido pelas funções $g(r)$ e números de vizinhos $N(r)$ – tab 16. Em azul, cabeças de LI; em laranja e rosa os íons Cl^- e Na^+ respectivamente; em círculos maiores, grupos colina, em verde e glicérol em roxo. As bordas tracejadas indicam a fração do número de vizinhos quando este é menor que 1.

Sobre um raio de 0.5nm, comparou-se a presença de LI e contra íons para avaliação da carga efetiva. Em DPPC, neutro em sua forma pura, a inserção de LI não é totalmente blindada por seus contra íons aniônicos, visível pela diferente contagem média de LI (0.89 - tab 11) e contra-íons (0.13 - tab 15), garantindo carga efetiva positiva. Similarmente em DPPG, em estado puro, a contagem média de contra íons positivos de sódio (0.4 - tab 10) não compensa a contagem de lipídios negativos (2.9 - tab 9). Com a inserção de LI, o número de sódios positivos de (0.17 - tab 10), a baixa contagem de Cl^- (0.01 - tab 15) e a contagem média de 4 LIs (tab 11) em torno dos grupos glicерóis compensa suas cargas e também fornece uma carga efetiva positiva.

Estes resultados estão de acordo com o encontrado no trabalho experimental base deste estudo (Oliveira [43]). Nele, medidas de potencial ζ indicam que na presença de 30%mol de LI, lipossomas de DPPC e DPPG (a 25°C) apresentam carga efetiva positiva, indicada pelo sinal adquirido pelo potencial medido. Nos sistemas simulados, a carga total não pode ser totalmente neutralizada pelo LI, sendo os resultados obtidos referentes apenas a medida local. Contudo, o comportamento obtido experimentalmente pode resultar da presença de íons extras para neutralização.

Em suma, os principais comportamentos encontrados consistem na maior aproximação entre glicерóis do que entre colinas. Assim como a proximidade entre cabeças de LI com estes respectivos grupos. Os contra íons de sódio sofrem afastamento considerável por repulsão elétrica na presença de LI, enquanto que seus contra íons de cloro são afastados da mesma maneira pelos glicерóis. Em DPPC, estes íons permanecem mais próximos à interface.

3.3 Dinâmica da sonda DPH

UMA vez inserida nas membranas, o comportamento dinâmico da sonda DPH pode ser dividida em dois aspectos principais: translação e rotação, com a última relacionada à anisotropia. Por sua rigidez, não foram analisados seus movimentos intramoleculares, como torção dos anéis ou da cadeia alifática, denominada haste.

3.3.1 Translação

Em razão da simetria molecular, tanto o centro geométrico quanto o de massa da sonda encontram-se no ponto médio da haste, entre os carbonos alifáticos CL3 e CL4. Com isso, utilizou-se da posição média $z = \frac{1}{2}(z_i + z_j)$ entre estes pontos como referência de profundidade da sonda na membrana (figuras 75 e 76). Para centralização da posição z em relação ao centro da bicamada, foram considerados dois referenciais da mesma trajetória, um com centro de massa na membrana e outro na sonda, com a subtração entre as duas coordenadas em cada configuração.

Figura 75: Profundidade z da sonda DPH em função do tempo nas bicamada de DPPC puro e com LI (30%mol), medida a partir do centro da sonda entre $CL3$ e $CL4$. Interface membrana-água destacada por linhas tracejadas.

Figura 76: Profundidade z da sonda DPH em função do tempo nas bicamada de DPPG puro e com LI (30%mol), medida a partir do centro da sonda entre $CL3$ e $CL4$. Interface membrana-água destacada por linhas tracejadas.

Nos casos simulados em fase gel, a sonda DPH não apresenta translação entre as monocamadas, isto é, a mudança entre positivo-negativo, restringindo-se à face inicialmente inserida. Considerando o comprimento maior da molécula, de 1.4nm, ou seja, 0.7nm acima e abaixo da curva traçada nos gráficos, as extremidades nos anéis aromáticos encontram-se também dentro dos limites da membrana. A fase gel-líquida, marcada por maior movimento das caudas, acentua a flutuação de profundidade permitindo movimento da sonda entre as monocamadas e alocando-a mais próxima ao centro.

Na tabela 17 constam os valores médios e os respectivos desvios-padrões. Através da média, é possível observar que a sonda, nas membranas em fase fluida, localiza-se mais próxima do centro em DPPG (0.00 e 0.08nm, puro e com LI respectivamente) que DPPC (0.40 e 0.36nm, puro e com LI respectivamente), porém com amplitude de deslocamento muito similar, em torno de 0.50nm.

Tabela 17: Profundidade média do centro de massa da sonda DPH em relação ao centro da membrana – figuras 75 e 76. Flutuações calculadas pelo desvio-padrão.

DPPC				
$\langle(z_i + z_j)/2\rangle(\text{nm})$	Pure		IL	
	293	343	293	343
	0.81 ± 0.13	0.40 ± 0.52	0.50 ± 0.20	0.36 ± 0.57
DPPG				
$\langle(z_i + z_j)/2\rangle(\text{nm})$	Pure		IL	
	293	343	293	343
	0.84 ± 0.28	0.08 ± 0.59	0.79 ± 0.14	0.00 ± 0.56

Como esperado devido à apolaridade, a sonda aloca-se majoritariamente na região das caudas, comportamento verificado nas referências mencionadas na construção das bicamadas [36], [38] e [39], justificando a alocação da sonda DPH nas caudas. A região de distribuição de toda a sonda em relação aos demais grupos da membrana pode ser observada nos perfis de densidade eletrônica (figura 77).

Figura 77: Perfil de densidade eletrônica (EDP) dos grupos da cauda, cabeça e sonda DPH. Por clareza, multiplicou-se as curvas de DPH por 50.

3.3.2 Rotação

Considerando o eixo maior da molécula de DPH, entre os carbonos CB6 e CB9, como referência, o ângulo θ formado com a normal à interface ($\hat{z}$) foi avaliado ao longo do tempo. As figuras 78 e 79 mostram os histogramas das evoluções temporais deste ângulo para DPPC e DPPG, respectivamente, nos casos puros e com líquido iônico misturado.

Figura 78: Histograma da distribuição angular do eixo maior (CB6–CB9) da sonda DPH em bicamadas de DPPC puro e com LI.

Figura 79: Histograma da distribuição angular do eixo maior (CB6–CB9) da sonda DPH em bicamadas de DPPG puro e com LI.

Entre as fases, nota-se restrição angular da sonda com a restrição das caudas em gel. Em fase fluida, com a maior amplitude de movimento, a distribuição angular passa a ocupar todo o intervalo $[0, 180)$, com pequenas concentrações em torno de 20° e 160° .

Particularmente em DPPG com LI misturado em fase fluida, a sonda apresenta menor mobilidade angular, porém ainda executando rotações completas de seu eixo. Nas fases gel, nota-se modificação da inclinação da sonda sob inserção de LI em DPPC mas não DPPG. A figura 80 apresenta a sobreposição das posições da sonda nas diferentes trajetórias com o movimento de translação do centro de massa retirado, enfatizando o efeito da temperatura e presença de LI na angulação.

Em um dos casos em fase gel, ocorreu fixação da sonda entre as caudas, não viabilizando seu movimento. Neste caso, a trajetória foi descartada e reexecutada com posição inicial distinta.

Figura 80: Sobreposição das configurações da trajetória de DPH nos sistemas simulados. Por clareza, imprimiu-se as configurações em intervalos de 100, ou seja, distantes 200ps entre si, com coordenadas centralizadas no centro de massa.

3.3.3 Anisotropia

Como detalhado no capítulo de métodos, a função de anisotropia é calculada a partir do produto dos eixos de emissão entre a normal z e o vetor do eixo maior da sonda DPH ($\vec{\mu}(t)$), definido pelos carbonos extremantes dos anéis CB6 e CB9. Ao longo da trajetória, considerou-se então a posição inicial do vetor e o desvio subsequente, em diferentes intervalos de tempo, por meio da autocorrelação dos vetores ao longo do tempo:

$$r(t) = r_0 P_2(\langle \vec{\mu}(\tau) \cdot \vec{\mu}(\tau + t) \rangle) \quad (3.1)$$

que para o modelo de sonda e movimentos realizados é modelada pela expressão obtida por Kinosita et al. [70]:

$$r(t) = r_\infty + (r_0 - r_\infty)e^{-t/\Phi} \quad (3.2)$$

Como no instante inicial $r(0)$ temos a auto-correlação de vetores idênticos, a constante r_0 é dada por $\frac{2}{5}$, por conta da relação:

$$r_0 = 0.4P_2(\cos \lambda) \quad (3.3)$$

sendo λ a anisotropia intrínseca, entre dipolos de absorção e emissão, nulo neste caso [33].

Sobre o cálculo feito com a equação 3.1, ajustou-se a função modelo 3.2 para determinação dos parâmetros de anisotropia. O intervalo de tempo de correlação utilizado no ajuste foi considerado, levando em conta o efeito de flutuações estatísticas. Ajustou-se a curva com os dados que representam 10%, 20% e 30% do tempo total. Sendo o melhor ajuste com 20% do intervalo, exposto na figura 81 e tabela 18, por consistência foi utilizado o mesmo em todos os casos. Houve diferença nos parâmetros ajustados com diferentes intervalos porém sem mudança da tendência qualitativa; os resultados obtidos do ajuste com 10 e 30% constam no material suplementar no apêndice F.

Figura 81: Cálculo da função de anisotropia $r(t)$ ajustado com 20% do intervalo total de correlação, de 0 a 10ns.

Tabela 18: Parâmetros ajustados da função $r(t)$ com r_0 fixado em 0.4. $\langle S_{CD} \rangle$ corresponde ao parâmetro de ordem deutérica médio das caudas de lipídios (*Lip*) ou LIs (*Iol*).

	DPPC				DPPG			
	Pure		IL		Pure		IL	
	293	343	293	343	293	343	293	343
Φ	1340	206	436	208	1787	259	602	193
r_∞	0.26	0.09	0.26	0.08	0.27	0.03	0.33	0.08
$\langle S_{CD} \rangle_{Lip}$	0.294	0.174	0.326	0.206	0.327	0.180	0.322	0.206
$\langle S_{CD} \rangle_{Iol}$			0.338	0.234			0.340	0.228

O termo Φ , relacionado ao coeficiente de difusão rotacional, apresentou maior dependência com o intervalo de ajuste (vide material suplementar). Porém, em todos os casos com tendência similar, sendo maior (difusão mais lenta) em fase gel, de acordo com o esperado pela restrição de movimento da sonda.

O cálculo de anisotropia por sua vez é feito pelo parâmetro r_∞ . Experimentalmente, compara-se a radiação incidente, de direção conhecida, com a emitida após tempos maiores que o de rotação da sonda. Com isso, tomando o limite $t \rightarrow \infty$ na equação 3.2 obtemos o parâmetro de anisotropia estática r_∞ . Desta forma, os valores obtidos apresentaram maiores valores em fase gel que gel-líquida, porém, com muita similaridade entre os dois fosfolipídios, esperado por conta da equivalência entre as caudas.

Este resultado concorda com o observado nas análises de anisotropia em estado estacionário feitas por Oliveira e Barbosa [42] e Oliveira [43]. As medidas realizadas variaram no intervalo de temperaturas entre 20 e 55°C aproximadamente, sendo comparáveis ao parâmetro r_∞ aqui calculado em 20 e 70°C (tabela 18). Com isso em conta, observou-se no experimento a diminuição da anisotropia em DPPC puro de 0.35 (fase gel) para 0.11 (fase fluida), enquanto que com 30%mol de LI ela ocorre de 0.35 para 0.06 nas respectivas fases. Os valores calculados por sua vez foram de 0.26 (gel) e 0.09 (fluido) na membrana pura, e 0.26 (gel) e 0.08 (fluido) com LI. Apesar da diferença em 0.1 na fase gel, o resultado reproduz qualitativamente bem a equivalência com e sem LI nesta fase, com posterior queda para valores de ordem 0.1 na fase fluida. Em DPPG, mediu-se valores em fase gel de 0.34 (puro) e 0.27 (com LI), com respectivas quedas na fase fluida para 0.05 (puro) e 0.04 (com LI). Dos valores simulados, obteve-se na fase gel 0.27 (puro) e 0.33 (com LI), e em fase fluida 0.03 (puro) e 0.08 (com LI). A diferença nos casos puro e com LI difere qualitativamente do experimental porém ainda sendo próxima numericamente (diferença de 0.06 e 0.07), com diferenças ainda menores na fase fluida.

Ainda na tabela 18, constam os parâmetros de ordem deutérica médios para lipídios e líquido iônico. Foi encontrada alta correlação de 96% (eq 3.4) entre r_∞ e $\langle S_{CD} \rangle_{Lip}$, figura 82.

$$corr(X, Y) = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{j=1}^n (y_j - \bar{y})^2}} \quad (3.4)$$

Figura 82: Correlação estatística (eq 3.4) entre o parâmetro de ordem médio $\langle S_{CD} \rangle_{Lip}$ e a anisotropia limite r_∞ . Barras em azul e verde indicam o intervalo experimental de valores medidos para r_∞ por Oliveira [43].

A relação entre as duas quantidades é relevante por serem realizadas sobre simulações independentes de um mesmo sistema, reproduzindo a propriedade da sonda de identificação da organização do ambiente que se encontra. Dos resultados obtidos, expostos na tabela 18, estima-se o tempo de correlação pelo parâmetro Φ . Nos sistemas puros em fase gel, DPPC e DPPG apresentaram tempo de 1.3 e 1.8ns respectivamente, sofrendo diminuição nos casos com LI, para 0.4 e 0.6ns. Já em fase fluida, os valores sofrem menor variação, de 0.20ns para 0.21ns em DPPC puro e com LI respectivamente, e de 0.25ns para 0.19ns para DPPG nas mesmas condições.

Em análises similares de autocorrelação, encontram-se resultados na literatura de tempos de correlação rotacional da mesma ordem ao obtido aqui. Repakova et al. [36], analisando a sonda DPH em DPPC a 325K, obtém com ajuste de exponencial simples tempo de correlação de 4ns, enquanto que em POPC, estudado por Cascales et al. [40], o tempo total simulado (250ps) não converge completamente, sugerindo tempo de correlação de ordem de 1ns.

3.4 Energias de Interação

ADICIONALMENTE às alterações estruturais, espera-se influência do líquido iônico nas interações entre os grupos constituintes do sistema. Estas interações comparadas na presença e ausência de LI ressaltam as contribuições específicas relacionadas à diferença na mudança de fase entre os dois fosfolipídios.

Para o cálculo, considerou-se os termos potenciais de Coulomb e LJ, limitados ao raio de corte devido à limitação do software, não incluindo portanto correção de longo

alcance. Por conta da ausência de correção, foi comparado o cálculo feito com raios de corte r_c distintos: 1.4 e 2.0nm. Os resultados explícitos constam no apêndice G. Em resumo, foram encontradas diferenças consideráveis, entre 10 e 60% para interações majoritariamente eletrostáticas, em especial para DPPG.

Na função interna usada para cálculo das energias de interação (*gmx energy*), a lista de vizinhos próximos à cada molécula não sofre atualização, mantendo a lista do instante inicial, podendo excluir interações de possíveis moléculas que se aproximam. Para o teste de possíveis erros devido à falta de atualização da lista de vizinhos, dividiu-se a trajetória em intervalos de 1ns, calculando a energia em cada intervalo, gerando portanto 50 cálculos (em simulações de 50ns) de energia, posteriormente promediadas. Entretanto, não foram obtidas diferenças significativas, ou seja, a média feita sobre toda a trajetória e sobre os 50 intervalos diferiram em menos de 0.2 kJ/mol (vide apêndice G).

Para a análise que segue, exposta nas tabelas 19 e 20, utilizou-se o cálculo com maior raio de corte e trajetória única. Os valores brutos obtidos constam no apêndice G.

Tabela 19: Diferenças das energias de interação média ($Coul + LJ$) dos grupos componentes do sistema entre os estados puro e com LI (30% mol): $\Delta E_{Puro \rightarrow LI} = E_{LI} - E_{Puro}$; unidades de ($10^3 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$).

$\Delta E(Puro \rightarrow LI)$ 10 ³ kJ/mol	DPPC		DPPG	
	293	343	293	343
Lipid-Lipid	56	51	19	17
Lipid-Water	7	5	9	12
Lipid- Na^+			89	78
$\Delta \sum_{Lipid}$	63	56	117	107
Lipid-IonLiq	-80	-70	-102	-93
Lipid- Cl^-	-14	-12	1	1
$\Delta \sum_{IonLiq}$	-94	-82	-101	-92
IonLiq-IonLiq	-8	-8	-8	-8
IonLiq- Cl^-	-3	-4	-0.3	-0.5
IonLiq-Water	-10	-12	2	1
IonLiq- Na^+			8	7
Na^+-Cl^-			-34	-44
Na^+-Na^+			-3	-1
Cl^--Cl^-	-24	-25	-24	-23
Sol- Cl^-	-99	-97	-90	-79
Sol- Na^+			-44	-27

A tabela 19 apresenta as diferenças das energias de interação entre bicamadas puras e com LI inserido. Da forma calculada, a variação negativa da energia com a inserção de LI implica diminuição da energia total, ou seja, fortalecimento da interação, enquanto que a variação positiva por sua vez implica o enfraquecimento. Considerando-se isto, nota-se maior influência do LI nas interações lipídio-lipídio em DPPC (cerca de $51(56) \times 10^3 \text{ kJ/mol}$), possivelmente por seu afastamento e diminuição do termo LJ, que em DPPG (cerca de $17(19) \times 10^3 \text{ kJ/mol}$). Porém, considerando conjuntamente a interação com seu contra íon e solvente, especialmente o primeiro, a influência no lipídio carregado passa ao dobro do caso neutro (de $107(117) \times 10^3 \text{ kJ/mol}$ para DPPG e $63(56) \times 10^3 \text{ kJ/mol}$ para DPPC). Da mesma forma, as novas interações provenientes apenas do LI com contra

íon e água são maiores em DPPG que DPPC ($-101(-92) \times 10^3 \text{ kJ/mol}$ no primeiro e $-94(-82) \times 10^3 \text{ kJ/mol}$ no segundo), mas de forma a diminuir a energia.

No que concerne à distribuição da energia para mudança de fase, foram consideradas todas as energias de interação com os lipídios por conta de sua equipartição, não apenas a específica lipídio-lipídio. Com base nisso, o balanço final é feito sobre as contribuições sobre interações da membrana consigo mesma e solvente (indicadas por $\Delta \sum_{Lipid}$) e as novas existentes sobre LI (indicadas por $\Delta \sum_{IonLiq}$). Com as duas contribuições, a interferência em DPPG sobre os lipídios aumenta a energia de forma mais significativa que a diminuição causada pelo LI ($+15 \times 10^3 \text{ kJ/mol}$), enquanto que em DPPC observa-se o efeito contrário, em mesma ordem de grandeza ($-30 \times 10^3 \text{ kJ/mol}$).

As demais interações referentes ao líquido iônico, não referentes à membrana, apresentam semelhanças nas duas temperaturas e fosfolipídios, exceptuando os casos com Cl^- , com diminuição em DPPG por conta da repulsão, com o consequente aumento da interação com o solvente.

Em resumo, o efeito gerado pela inserção de líquido iônico é o de enfraquecimento das interações em DPPG e fortalecimento em DPPC. Requerendo menor energia térmica para a transição de fase, espera-se com isso menor temperatura de transição no primeiro, e maior no segundo. A diferença estabelecida ocorre majoritariamente devido à repulsão dos contra íons aniônicos (Na^+) pelas cabeças de LI, de acordo com o observado pelas curvas de distribuição radial de pares. As diferenças de energia (entre puro e LI) com raio de corte maior são acentuadas pela soma das interações de Coulomb de maior alcance. Levando isto em conta, evidencia-se a contribuição eletrostática como responsável pela modificação da interação na presença de líquido iônico.

De acordo com o obtido experimentalmente por Oliveira e Barbosa [42] e Oliveira [43], a inserção de 30%mol de LI causa queda da temperatura de transição de fase em DPPG de 42.5 para 25.3°C, enquanto que a mesma é não alterada em DPPC, mantendo-se em torno de 38°C. Com isso, os resultados aqui obtidos replicam qualitativamente o experimento, observando o comportamento esperado em DPPG, de enfraquecimento das interações e por consequência a diminuição da temperatura de transição de fase, porém uma interação maior em DPPC, implicando o comportamento contrário.

O efeito da temperatura nas interações (tabela 20) é menos pronunciado que o de inserção de LI, sendo semelhante entre os lipídios, com diferenças nos casos com Cl^- , pela repulsão, como comentado, e dos casos com Na^+ , exclusivos de DPPG.

Tabela 20: Comparação das energias de interação média ($Coul + LJ$) dos grupos componentes do sistema entre as temperaturas 293 e 343K: $\Delta E_T = E_{343} - E_{293}$; unidades de ($10^3 \frac{kJ}{mol}$).

ΔE_T 10^3 kJ/mol	DPPC		DPPG	
	Puro	LI	Puro	LI
Lipid-Lipid	15	10	14	12
Lipid-Sol	6	4	3	6
Lipid-Na			11	0
$\Delta \sum_{lipid}$	21	14	28	18
Lipid-IonLiq		10		9
Lipid-Cl		2		0.3
$\Delta \sum_{Extra-IonLiq}$		12		9
IonLiq-IonLiq		-0.5		-0.4
IonLiq-Cl		-0.4		-0.2
IonLiq-Sol		-2		-2
IonLiq-Na				-1
Na-Cl				-10
Na-Na			-2	0
Cl-Cl		-0.5		0.7
Sol-Cl		2		11
Sol-Na			-1	16

A energia entre lipídios obtida neste caso é similar entre DPPC e DPPG tanto na forma pura (15 e $14 \times 10^3 \text{ kJ/mol}$ respectivamente) quanto com LI (10 e $12 \times 10^3 \text{ kJ/mol}$ respectivamente), porém a energia total apenas entre lipídios ($\Delta \sum_{Lipid}$) sofre influência levemente maior em DPPG, com decréscimo de $10 \times 10^3 \text{ kJ/mol}$ contra $7 \times 10^3 \text{ kJ/mol}$ em DPPC. Considerando-se entretanto as interações provenientes da inserção de LI, observa-se queda de $1 \times 10^3 \text{ kJ/mol}$ em DPPG ($(28 - (18 + 9)) \times 10^3 \text{ kJ/mol}$) enquanto que em DPPC a contribuição aumenta a energia em $5 \times 10^3 \text{ kJ/mol}$ ($(21 - (14 + 12)) \times 10^3 \text{ kJ/mol}$).

Por conta de a transição de fase depender do calor latente do sistema, as comparações feitas neste caso entre as fases não permitem inferir sobre a temperatura de transição. Neste caso o que se constata é a diferença da energia de interação entre as fases, sem considerar esta energia necessária para a transição.

Conclusões

ESTE trabalho buscou estudar, por meio de simulações de DM, o comportamento atomístico de sistemas de bicamadas de DPPC e DPPG sob influência do líquido iônico C14MImCl. Motivado pelos resultados obtidos experimentalmente por Oliveira e Barbosa [42] e Oliveira [43] sobre o efeito do LI sobre a temperatura de fase das membranas, foram conduzidas simulações dos dois fosfolipídios, em bicamadas puras e com concentração 30%mol de LI uniformemente distribuído, em duas temperaturas, 293 e 343K, correspondendo às fases gel e gel-líquida respectivamente.

Das simulações feitas, analisou-se parâmetros estruturais característicos de membranas, como área por lipídio, curvatura, parâmetro de ordem das caudas, perfis de densidade (fornecendo espessuras e distâncias entre grupos moleculares dos lipídios) e curvas de distribuição radial de pares. Com isso, foi possível a comparação com resultados disponíveis na literatura, validando o modelo utilizado e fornecendo informações atomísticas a respeito destas propriedades. Desta forma, os resultados aqui encontrados complementam futuras análises ou releituras dos dados.

As energias de interação dos lipídios com os demais grupos foram analisadas visando identificar o efeito do LI na membrana. Comparando-se o efeito nas interações entre lipídios e os demais grupos do sistema, é possível identificar as interações específicas responsáveis pela diferença obtida nos experimentos entre o efeito do LI em DPPG e DPPC.

Ainda, os sistemas acima foram todos simulados com presença da sonda DPH, permitindo a análise do sistema também por meio de sua anisotropia de fluorescência, medida a partir de sua dinâmica de rotação. Os valores calculados foram diretamente comparados aos obtidos nos estudos experimentais base deste trabalho, acrescidos de análises sobre a alocação da sonda nas membranas.

Precedendo as análises sobre bicamadas com LI uniforme, simulou-se também 3 condições iniciais distintas de mistura de lipídios com líquido iônico: LI e lipídios aleatoriamente distribuídos; bicamadas com subdomínio centralizado de LI e agregados de LI próximos à interface de membranas puras. As configurações estabilizadas ao longo de centenas de nanosegundos (300ns para o caso aleatório e com subdomínio e 150ns no agregado), servem de modelo para validação da hipótese utilizada de distribuição uniforme das simulações posteriores.

Abaixo consta o resumo das principais conclusões retiradas dos resultados, apresentados em detalhe em seu respectivo capítulo.

Condições Iniciais

Inicialmente, a agregação espontânea e mistura uniforme entre líquido iônico e fosfolipídios, a partir da condição inicial de distribuição aleatória, foi observada em todos os sistemas simulados. Ao longo de 300ns, os sistemas misturaram-se nos instantes iniciais com a formação de um aglomerado disforme, evoluindo para forma lamelar. Em DPPG, o aprisionamento de água provocou perturbação da estrutura, porém sem abertura de canais ou poros.

Com subdomínio de LI centralizado, houve evoluções distintas entre os fosfolipídios. Em membrana neutra, a organização central de LI sofre abertura de poro e penetração de água através de toda a espessura da membrana. Neste caso, em 293K ocorre desprendimento de parte do LI formando pequeno agregado. O poro aberto mantém-se por 300ns sem variação expressiva de diâmetro, enquanto que em 343K é fechado em 60ns com posterior difusão uniforme do LI, induzindo curvatura da membrana. Em DPPG, a maior

atração com as cabeças de lipídio restringe o subdomínio impedindo a abertura de poro e entrada de água, permitindo sua difusão nas duas temperaturas com maior perturbação da estrutura no processo.

Quando interagentes com bicamadas puras, aglomerados de LI apresentaram interação maior em PG que PC. No primeiro caso é observada forte atração nos momentos iniciais com o agregado aderindo à superfície causando deformação porém sem difusão ao longo do tempo simulado (150 ns). Com DPPC na fase gel não ocorre interação significativa, sem aproximação do agregado, enquanto que na fase fluida o agregado é atraído para a interface difundindo-se completamente na monocamada.

Em geral, fica evidenciada a formação espontânea da mistura uniforme entre lipídios e LI no caso iniciado randomicamente, situação mais próxima da condição experimental de referência. Quando iniciado com subdomínio, houve novas estruturas com formação de poro mas ainda assim com difusões em diferentes graus. Embora iniciada em condição artificial, a abertura do poro apenas no caso neutro revela o caráter de interação entre as duas membranas utilizadas. Apesar de mais significativas em DPPG, a interação com agregado de LI ocorre em DPPC em sua fase fluida com total dissolução do agregado. Com isso, detalha-se o processo de mistura e difusão, realizada uniformemente, validando a hipótese de distribuição adotada nas simulações posteriores.

Análise Estrutural

Nos sistemas com distribuição uniforme de LI, o tempo de termalização foi de ordem 100ns para sistemas em fase gel e 250ns em fase fluida. Os parâmetros estruturais seguiram a tendência qualitativa esperada sob aumento da temperatura: aumento das áreas médias por lipídio e diminuição da espessura, medida a partir das superfícies de Gibbs dos perfis de densidade da água. Os parâmetros de ordem deutérica das caudas indicam a desorganização esperada na fase fluida, sendo equivalentes nos dois fosfolipídios por conta de sua equivalência, compatível com o apresentado na literatura.

Quantitativamente encontrou-se boa concordância da parametrização utilizada na fase fluida, como verificada pela APL, parâmetro de ordem e parâmetros de espessuras, retirados a partir dos perfis de densidade. A fase gel encontrou-se qualitativamente válida e de mesma ordem que os obtidos na literatura, com diferenças atribuídas à organização específica dos lipídios nesta fase. A partir da condição inicial utilizada, o tempo total simulado foi suficiente para a estabilização do sistema porém não para a organização esperada em fase gel. Ainda, as estruturas termalizadas das membranas foram obtidas sem aplicação de forças externas, provenientes puramente da interação interatômica.

Em fase gel, os sistemas puros apresentaram interdigitação parcial, especialmente DPPG, levemente diminuída na presença de LI. A inserção de LI nas membranas provocou aumento médio de 10% nas APLs e de 9% nas espessuras, porém ainda seguindo o padrão de comportamento qualitativo dos sistemas puros sobre mudanças de fase.

Através dos mapas topográficos foi verificada leve rugosidade das superfícies em fase gel, sofrendo considerável diminuição após a transição de fase. A presença de LI não altera o caráter rugoso das superfícies. Ademais, as mesmas análises não indicaram curvatura nas membranas como um todo.

As funções de distribuição radial de pares revelaram maior proximidade entre gliceróis (0.5nm) que colinas (0.7nm), sendo maior também a proximidade das cabeças de LI ao grupo glicerol que do grupo colina. Os contra íons catiônicos de DPPG sofrem repulsão

eletrostática considerável na presença de LI, enquanto que os aniônicos mantêm proximidade da interface no caso neutro mas não no carregado.

Dinâmica do DPH

A sonda DPH, alocada inicialmente nas caudas, permanece constantemente na região hidrofóbica com rápidas aproximações aos esteres. A orientação angular da sonda em relação à normal da membrana na fase gel sofre influência do líquido iônico no caso neutro, de 50° , mas não no carregado. Por outro lado, na fase fluida de DPPG com LI, a sonda mantém certa restrição de movimento com eventuais flips.

O cálculo do parâmetro de anisotropia, correspondente ao limite de $r(t)$ para $t \rightarrow \infty$, foi similar nas bicamadas de DPPC e DPPG em todos os casos devido à equivalência das caudas. Concomitantemente o comportamento qualitativo de diminuição de r_∞ na fase fluida também foi verificado em todos os sistemas (diferenças menores que 0.1), ou seja, evidenciando maior mobilidade da sonda na fase fluida. Na fase gel, a similaridade entre DPPC puro e com LI foi bem reproduzida e os valores em DPPG ficaram próximos do experimental.

Além disso, os parâmetros r_∞ foram vistos ser altamente correlacionados (0.96) com os valores médios das curvas dos parâmetros de ordem deutérica $\langle S_{CD} \rangle$. Vale ressaltar que a comparação é feita sobre simulações distintas, portanto independentes, do mesmo sistema, reproduzindo portanto a propriedade da sonda de indicar características de ordenamento das caudas do sistema que está inserida.

Energias de Interação

Considerando as energias de interação, o comportamento encontrado experimentalmente foi parcialmente reproduzido. O efeito do LI na energia de interação foi oposto entre os fosfolípidios. Comparando-se casos com e sem LI, a energia de interação em DPPG sofre queda, indicando diminuição da energia térmica necessária para transição de fase, enquanto que o oposto é obtido em DPPC, com aumento em mesma ordem de grandeza. As diferentes energias foram levadas em consideração com base no princípio de equipartição de energia, supondo que para transição de fase, a energia térmica absorvida pela membrana é distribuída em todas suas interações intermoleculares.

Apesar de as interações lipídio-lipídio serem mais afetadas em PC, o afastamento dos contra íons de sódio em DPPG, como indicado pelas análises estruturais, provoca diminuição maior na energia, passando a ser mais afetado do que PC. Ainda, a proximidade dos contra íons de cloro da interface de PC incrementa levemente a energia, compensando o aumento causado pelas interações presentes no caso puro (lipid-lipid e lipid-water). Comparações de energia entre temperaturas não apresentaram diferenças significativas.

Referências

- [1] D.L. Nelson and M.M. Cox. *Principles of Biochemistry*. Lehninger, 5th edition, 2008.
- [2] A. Blume. *Dynamic properties*. In *Phospholipids Handbook* edited by G. Cevc. Marcel Dekker Inc, 1993.
- [3] X. Zhuang et al. A systematic molecular dynamics simulation study of temperature dependent bilayer structural properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, (1838):2520–2529, 2014.
- [4] <https://pt.wikipedia.org/wiki/Lipossoma>.
- [5] J. Pimthon et al. All-atom molecular dynamics simulation studies of fully hydrated gel phase DPPG and DPPE bilayers. *Journal of Molecular Structure*, (921):38–50, 2009.
- [6] J. Pan et al. Molecular structures of fluid phase phosphatidylglycerol bilayers as determined by small angle neutron and X-ray scattering. *Biochim Biophys Acta*, (1818(9)):2135–2148, 2012.
- [7] H. Singh et al. Pressure induces interdigitation differently in DPPC and DPPG. *Eur. Biophys. J.*, (37):783–792, 2008.
- [8] H.I. Petrache et al. Area per Lipid and Acyl Length Distribution in Fluid Phosphatidylcholines Determined by 2H NMR Spectroscopy. *Biophys. J.*, (79):3172–3192, 2000.
- [9] W.J. Sun et al. Order and Disorder in Fully Hydrated Unoriented Bilayers of gel phase DPPC. *Phys. Rev.*, (E 49):4665–4676, 1994.
- [10] J.F. Nagle; S. Tristram-Nagle. Structure of lipid bilayers. *S. Biochim. Biophys. Acta*, (1469):159–195, 2000.
- [11] N. Kučerka et al. Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. *Biochimica et Biophysica Acta*, (1808):2761–2771, 2011.
- [12] N. Kučerka et al. Lipid Bilayer Structure Determined by the Simultaneous Analysis of Neutron and X-Ray Scattering Data. *Biophys. J.*, (95):2356–2367, 2008.
- [13] J.L. Ranck et al. The low temperature phases of dipalmitoylphosphatidyl-glycerol. *Biochimica et Biophysica Acta*, (488):432–441, 1977.
- [14] A. Watts et al. Charge-induced tilt in ordered-phase phosphatidylglycerol bilayers evidence from X-ray diffraction. *Biochimica et Biophysica Acta*, (645):91–96, 1981.
- [15] J. Li et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(2):81–98, 2014.
- [16] G.C.A. Da Hora et al. Membrane negative curvature induced by a hybrid peptide from pediocin PA-1 and plantaricin 149 as revealed by atomistic molecular dynamics simulations. *Soft Matter*, 12(43):8884–8898, 2016.

- [17] D. Gidalevitz et al. Interaction of antimicrobial peptide protegrin with biomembranes. *PNAS*, 100(11):6302–6307, 2003.
- [18] C. Ege and K.Y.C. Lee. Insertion of Alzheimer’s A β 40 Peptide into Lipid Monolayers. *Biophys J.*, (87):1732–1740, 2004.
- [19] W.L. Ash et al. Computer simulations of membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1666:158–189, 2004.
- [20] A.G. Lee. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1666:62–87, 2004.
- [21] J.M. Boggs and M.A. Moscarello. Effect of Basic Protein from Human Central Nervous System Myelin on Lipid Bilayer Structure. *J. Membrane Biol.*, (39):75–96, 1977.
- [22] M.L. Berkowitz. Detailed molecular dynamics simulations of model biological membranes containing cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788:86–96, 2009.
- [23] S. Chiu et al. Cholesterol-Induced Modifications in Lipid Bilayers: A Simulation Study. *Biophys J*, (83):1842–1853, 2002.
- [24] Y. Wang et al. DPPC-cholesterol phase diagram using coarse-grained Molecular Dynamics Simulations. *Biochimica et Biophysica Acta*, (1858):2846–2857, 2016.
- [25] A. Sum et al. Molecular Simulation Study of Phospholipid Bilayers and Insights of the Interactions with Disaccharides. *Biophys Journal*, (85):2830–2844, 2003.
- [26] S.E. Feller. Molecular dynamics simulations of lipid bilayers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, (5):217–223, 2000.
- [27] D.P. Tieleman et al. A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems. *Biochim. et Biophys. Acta*, (1331):235–270, 1997.
- [28] K. Tu et al. Molecular Dynamics Investigation of the Structure of a Fully Hydrated Gel-Phase Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayer. *Biophys. J.*, (70):595–608, 1996.
- [29] S. Leekumjorn et al. Molecular Simulation Study of Structural and Dynamic Properties of Mixed DPPC/DPPE Bilayers. *Biophys Journal*, (90):3951–3965, 2006.
- [30] O. Edholm and J.F. Nagle. Areas of Molecules in Membranes Consisting of Mixtures. *Biophys. J.*, (89):1827–1832, 2005.
- [31] J.J.L. Cascales et al. Phase Transition of a DPPC Bilayer Induced by an External Surface Pressure: From Bilayer to Monolayer Behavior. A Molecular Dynamics Simulation Study. *Langmuir*, (22):5818–5824, 2006.
- [32] J.P.M. Jämbek and A.P. Lyubartsev. Another Piece of the Membrane Puzzle: Extending Slipids Further. *J. Chem. Theory Comput.*, (9):774–784, 2013.
- [33] B.A. Lentz. Membrane ‘fluidity’ as detected by diphenylhexatriene probes. *Chemistry and Physics of Lipids*, (50):171–190, 1989.

- [34] K.A. Riske et al. Thermal transitions of DMPG bilayers in aqueous solution: SAXS structural studies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1511(2):297–308, 2001.
- [35] R.D. Kaiser and E. London. Location of Diphenylhexatriene (DPH) and Its Derivatives within Membranes: Comparison of Different Fluorescence Quenching Analyses of Membrane Depth. *Biochemistry*, (37):8180–8190, 1998.
- [36] J. Repáková et al. Distribution, Orientation, and Dynamics of DPH Probes in DPPC Bilayer. *J. Phys. Chem. B*, (108):13438–13448, 2004.
- [37] G.F. Schröder; U. Alexiev; and H. Grubmüller. Simulation of Fluorescence Anisotropy Experiments: Probing Protein Dynamics. *Biophys J*, (89):3757–3770, 2005.
- [38] L.M.S. Loura; J.P. Prates Ramalho. Recent Developments in Molecular Dynamics Simulations of Fluorescent Membrane Probes. *Molecules*, 16:5437–5452, 2011.
- [39] L.M.S. Loura; J.P. Prates Ramalho. Fluorescent membrane probes behavior in lipid bilayers: Insights from molecular dynamics simulations. *Biophys Review*, pages 141–148, 2009.
- [40] J.J.L. Cascales et al. Molecular Dynamics Simulation of a Dye Molecule in the Interior of a Bilayer: 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene in Dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biophysical Chemistry*, (69):1–8, 1997.
- [41] M.T.M.A. Canto et al. Diphenylhexatriene membrane probes DPH and TMA-DPH: A comparative molecular dynamics simulation study. *Biochimica et Biophysica Acta*, (1858):2647–2661, 2016.
- [42] N.F. de Oliveira; L.R.S. Barbosa. A influência termodinâmica e estrutural de líquidos iônicos em sistemas biomiméticos de membrana: Relatório de iniciação científica, projeto FAPESP: 2016/05019-0. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 2016.
- [43] L.M. Oliveira. A Influência do Líquido Iônico [C14MIm][Cl] nas características estruturais e termodinâmicas de membranas modelos zwiterionicas e ânionicas. *Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brazil*, (2017).
- [44] A. Kokorin. *Ionic Liquids: Applications and Perspectives*. InTech, 1st edition, 2011.
- [45] S. Pandey. Analytical applications of room-temperature ionic liquids: A review of recent efforts. *Analytica Chimica Acta*, (556):38–45, 2006.
- [46] J.N. Pendleton and B.F. Gilmore. The antimicrobial potential of ionic liquids: A source of chemical diversity for infection and biofilm control. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2015.
- [47] H. Lee et al. Effects of imidazolium-based ionic liquids on the stability and dynamics of gramicidin a and lipid bilayers at different salt concentrations. *J. Molec. Graph. and Model.*, (61):53–60, 2015.
- [48] N. Kimizuka and T. Nakashima. Spontaneous Self-Assembly of Glycolipid Bilayer Membranes in Sugar-philic Ionic Liquids and Formation of Ionogels. *Langmuir*, 17:6759–6761, 2001.

- [49] B. Jing et al. Interaction of Ionic Liquids with Lipid Bilayers: A Biophysical Study of Ionic Liquid Cytotoxicity. *J. Phys. Chem. B*, 120(10):2781–2789, 2016.
- [50] A. Benedetto et al. Structure and Stability of Phospholipid Bilayers Hydrated by a Room-Temperature Ionic Liquid/Water Solution: A Neutron Reflectometry Study. *J. Phys. Chem. B*, (118):12192–12206, 2014.
- [51] T.T. Young et al. Study of the effects of ionic liquids on lipid bilayers. *Bioinspiration, Biomimetics and Bioreplication*, 8339(06), 2012.
- [52] M.P. Allen and D.J. Tildesley. *Computer Simulation of Liquids*. Oxford Science Publications – Clarendon Press, 1st edition, 1989.
- [53] P. Langevin. Sur la Théorie du Mouvement Brownien. *Comptes Rendus de l’Académie des Sciences*, (146):530–533, 1908.
- [54] D.S. Lemons and A. Gythiel. On the Theory of Brownian Motion. *Am. J. Phys.*, 65(11):1079–1081, 1997.
- [55] N. Metropolis et al. Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. *J. Chem. Phys.*, (21 (6)):1087–1092, 1953.
- [56] S.R.A. Salinas. *Introdução à Física Estatística*. Edusp, 2nd edition, 1999.
- [57] M.J. Abraham; D. van der Spoel; E. Lindahl; B. Hess and the GROMACS development team. GROMACS User Manual version 5.1.4, www.gromacs.org. 2016.
- [58] R.P. Feynman. *The Feynman Lectures on Physics*. Addison-Wesley Pub. Co., online edition, 1963-1965.
- [59] R.J. Sadus. *Molecular Simulation of Fluids: Theory, Algorithms and Object-Oriented*. Elsevier, 2nd edition, 2002.
- [60] W. F. van Gunsteren and H. J. C. Berendsen. GROMOS (GRONingen MOlecular Simulation package), BIOMOS B.V., Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands.
- [61] A. Kukol. Lipid Models for United-Atom Molecular Dynamics Simulations of Proteins. *J. Chem. Theory Comput.*, (5 (3)):615–626, 2009.
- [62] U.K. Deiters. Efficient Coding of the Minimum Image Convention. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, (V 227):345–352, 2013.
- [63] H. Goldstein; C. Poole and J. Safko. *Classical Mechanics*. Addison Wesley, 3rd edition, 2001.
- [64] J.P. Ryckaert; G. Ciccotti and H.J.C. Berendsen. Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. *Journal of Computational Physics*, (V 23):327–341, 1977.
- [65] R. Edberg; D.J. Evans and G.P. Morriss. Constrained Molecular Dynamics: Simulations of Liquid Alkanes with a New Algorithm. *Journal of Chemical Physics*, (V 84):6933–6939, 1986.

- [66] B. Hess; H. Bekker; H.J.C. Berendsen and J.G.E.M. Fraaije. LINCS: a Linear Constraint Solver for Molecular Simulations. *Journal of Computational Chemistry*, (V 18 n 12):1463–1472, 1997.
- [67] H.J.C. Berendsen et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.*, (81):3684, 1984.
- [68] G. Bussi; D. Donadio and M. Parrinello. Canonical sampling through velocity rescaling. *J Chem Phys.*, 126(1):014101, 2007.
- [69] S. Harvey et al. The Flying Ice Cube: Velocity Rescaling in Molecular Dynamics Leads to Violation of Energy Equipartition. *J. Comput. Chem.*, (19, N 7):726–740, 1998.
- [70] K. Kinosita et al. A Theory of Fluorescence Polarization Decay in Membranes. *Biophysical Journal*, 20:289–305, 1977.
- [71] D.E.S. Santos et al. SuAVE: A Tool for Analyzing Curvature-dependent Properties in Chemical Interfaces. *Journal of Computational Chemistry*, (in submission).
- [72] V.A. Parsegian; R.P. Rand. Interaction in Membrane Assemblies. *Elsevier Science B.V., Handbook of biological physics*, (V1 chap 13):643–690, 1995.
- [73] T.J. Piggot et al. On the Calculation of Acyl Chain Order Parameters from Lipid Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, (13):5683–5696, 2017.
- [74] J.P. Douliez; A. Léonard and E.J. Duforc. Restatement of Order Parameters in Biomembranes: Calculation of C-C Bond Order Parameters from C-D Quadrupolar Splittings. *Biophysical Journal*, (Vol 68):1727–1739, 1995.
- [75] K. Coutinho. Modelo Discreto de Solvente. Solvatocromismo no Espectro de Absorção Molecular. *Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brazil*, (1997).
- [76] L. Martínez; R. Andrade; E. G. Birgin and J.M. Martinez. Packmol: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *J. of Comput. Chem.*, (30(13)):2157–2164, 2009.
- [77] W. Humphrey; A. Dalke and K. Schulten. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics*, 14.1:33–38, 1996.
- [78] Inkscape Project. Inkscape, version 0.91 (2011); <https://inkscape.org>.
- [79] Python Software Foundation. Python Language Reference, version 3.6.4 (2018); <http://www.python.org>.
- [80] R.L. Thurmond et al. Molecular areas of phospholipids as determined by ²H NMR spectroscopy. *Biophys. Soc.*, (59):108–113, 1991.
- [81] M.J. Frisch; G.W. Trucks; H.B. Schlegel and many others. Gaussian 09 (Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009).
- [82] Z. Liu et al. A Refined Force Field for Molecular Simulation of Imidazolium-Based Ionic Liquids. *J. Phys. Chem. B*, (108):12978–12989, 2004.

Apêndice

A Topologias

Como mencionado nos Métodos, o campo de força escolhido para modelar o sistema exige a seleção dos parâmetros constantes dos potenciais de interação. Os parâmetros dos fosfolipídios foram extraídos da referência [61], enquanto que as demais parametrizações foram construídas com base nos parâmetros tabelados de aminoácidos para grupos químicos semelhantes [60]. Para o líquido iônico, baseou-se no anel de cinco elementos do aminoácido Desoxiadenosina, e o DPH no benzeno de Fenilalanina.

A parametrização para cada tipo de molécula foi feita em grupos, denominados *resíduos*, permitindo a divisão em partes posteriormente conectadas. Para as moléculas de líquido iônico e sonda fluorescente, utilizou-se um único resíduo cada, denominados **IOL** e **DPH** respectivamente. Os fosfolipídios por sua vez foram divididos em cabeça: **PCH** (DPPC) ou **PGH** (DPPG) e cauda **DPT**, equivalente entre ambos.

A conexão entre resíduos é feita com a indicação dos átomos de junção com símbolos (+) e (-) prefixados ao nome. Cada resíduo contém uma única ponta externa (digamos +) e interna (-), sendo a conexão feita apenas entre tipos opostos, em encadeamento. Além do átomo da junção, contido no resíduo, especifica-se também a qual átomo do resíduo adjacente é feita a conexão (inclusive também na especificação dos ângulos e diedrais). Ambos os fosfolipídios foram cortados no mesmo ponto, entre os grupos fosfato e éster, nos átomos nomeados por C3 e O31 (figs 83, 84 e 85).

Na parametrização *gromos*, são necessários os parâmetros sobre os tipos dos átomos (*atoms*), ligações (*bonds*), ângulos (*angles*), diedrais (*dihedrals*), diedros impróprios (*impropers*), e exclusões (*exclusions*).

Para orientação de leitura das tabelas a seguir, segue abaixo a organização para os diferentes constituintes da topologia:

- *atoms*: Lista com os átomos contidos no resíduo, com nome de referência (Label), tipo do átomo (Type), podendo conter hidrogênios incorporados, carga (Charge) e número do grupo de carga pertencente.
- *bonds*: Lista com as ligações, especificadas pelos átomos a_i e a_j e código no formato gromos (gb_x).
- *angles*: Lista com os ângulos, especificados pelos átomos a_i , a_j e a_k (vértice em a_j) e código no formato gromos (ga_x).
- *dihedrals*: Lista com os ângulos diedrais, especificados pelos átomos a_i , a_j , a_k e a_l (rotação em torno da ligação $a_j - a_k$) e código no formato gromos (gd_x).
- *impropers*: Lista com os ângulos de diedro impróprio, especificados pelos átomos a_i , a_j , a_k e a_l (caso seja trigonal plano ou piramidal, a_i indica o átomo central, de outra forma, os átomos encadeiam-se na ordem apresentada) e código no formato gromos (gi_x).
- *exclusions*: Lista com os pares de vizinhos excluídos da interação de Van der Waals.

As cargas atômicas foram selecionadas de acordo com o campo de força; na seção seguinte é apresentada a comparação com o cálculo quântico. No que segue, os nomes dos átomos apresentados nas figuras 83 à 87 correspondem aos labels, podendo representar grupos com hidrogênios incorporados.

A.1 Topologia Lipídios (PCH, PGH e DPT)

DPT

[DPT]

Figura 83: Representação do resíduo da cauda dos fosfolipídios [DPT] com os *labels* utilizados. Em cinza claro é indicado o ponto de conexão com os resíduos da cabeça: PCH ou PGH.

Tabela 21: Parâmetros *atoms* para o resíduo DPT.

Label	[DPT] - [atoms]		
	Type	Charge(e)	C-Group
C1	CH2	0.5	13
O11	OE	-0.7	13
C11	CH0	0.8	13
O12	O	-0.6	13
C12	CH2	0.0	14
C13	CH2	0.0	14
C14	CH2	0.0	15
C15	CH2	0.0	15
C16	CH2	0.0	16
C17	CH2	0.0	16
C18	CH2	0.0	17
C19	CH2	0.0	17
C110	CH2	0.0	18
C111	CH2	0.0	18
C112	CH2	0.0	19
C113	CH2	0.0	19
C114	CH2	0.0	20
C115	CH2	0.0	20
C116	CH3	0.0	21
C3	CH2	0.4	3
C2	CH1	0.3	3
O21	OE	-0.7	3
C21	CH0	0.7	3
O22	O	-0.7	3
C22	CH2	0.0	4
C23	CH2	0.0	4
C24	CH2	0.0	5
C25	CH2	0.0	5
C26	CH2	0.0	6
C27	CH2	0.0	6
C28	CH2	0.0	7
C29	CH2	0.0	7
C210	CH2	0.0	8
C211	CH2	0.0	8
C212	CH2	0.0	9
C213	CH2	0.0	9
C214	CH2	0.0	10
C215	CH2	0.0	11
C216	CH3	0.0	12

Tabela 22: Parâmetros *bonds* para o resíduo DPT.

[DPT] - [bonds]		
a_i	a_j	gb
-031	C3	gb_18
C3	C2	gb_27
C2	021	gb_18
C2	C1	gb_27
021	C21	gb_10
C21	022	gb_5
C21	C22	gb_23
C22	C23	gb_27
C23	C24	gb_27
C24	C25	gb_27
C25	C26	gb_27
C26	C27	gb_27
C27	C28	gb_27
C28	C29	gb_27
C29	C210	gb_27
C210	C211	gb_27
C211	C212	gb_27
C212	C213	gb_27
C213	C214	gb_27
C214	C215	gb_27
C215	C216	gb_27
C1	011	gb_18
011	C11	gb_10
C11	012	gb_5
C11	C12	gb_23
C12	C13	gb_27
C13	C14	gb_27
C14	C15	gb_27
C15	C16	gb_27
C16	C17	gb_27
C17	C18	gb_27
C18	C19	gb_27
C19	C110	gb_27
C110	C111	gb_27
C111	C112	gb_27
C112	C113	gb_27
C113	C114	gb_27
C114	C115	gb_27
C115	C116	gb_27

Tabela 23: Parâmetros *angles* para o resíduo DPT.

[DPT] - [angles]			
a_i	a_j	a_k	ga
-P	-031	C3	ga_26
-031	C3	C2	ga_15
C3	C2	021	ga_13
C3	C2	C1	ga_13
021	C2	C1	ga_13
C2	021	C21	ga_22
021	C21	022	ga_31
021	C21	C22	ga_16
022	C21	C22	ga_35
C21	C22	C23	ga_15
C22	C23	C24	ga_15
C23	C24	C25	ga_15
C24	C25	C26	ga_15
C25	C26	C27	ga_15
C26	C27	C28	ga_15
C27	C28	C29	ga_15
C28	C29	C210	ga_15
C29	C210	C211	ga_15
C210	C211	C212	ga_15
C211	C212	C213	ga_15
C212	C213	C214	ga_15
C213	C214	C215	ga_15
C214	C215	C216	ga_15
C2	C1	011	ga_15
C1	011	C11	ga_22
011	C11	012	ga_31
011	C11	C12	ga_16
012	C11	C12	ga_35
C11	C12	C13	ga_15
C12	C13	C14	ga_15
C13	C14	C15	ga_15
C14	C15	C16	ga_15
C15	C16	C17	ga_15
C16	C17	C18	ga_15
C17	C18	C19	ga_15
C18	C19	C110	ga_15
C19	C110	C111	ga_15
C110	C111	C112	ga_15
C111	C112	C113	ga_15
C112	C113	C114	ga_15
C113	C114	C115	ga_15
C114	C115	C116	ga_15

Tabela 24: Parâmetros *dihedrals* para o resíduo DPT.

[DPT] - [dihedrals]				
a_i	a_j	a_k	a_l	gd
-032	-P	-031	C3	gd_20
-032	-P	-031	C3	gd_27
-P	-031	C3	C2	gd_29
-031	C3	C2	C1	gd_34
C3	C2	021	C21	gd_29
C3	C2	C1	011	gd_34
C2	021	C21	C22	gd_13
021	C21	C22	C23	gd_40
C21	C22	C23	C24	gd_34
C22	C23	C24	C25	gd_34
C23	C24	C25	C26	gd_34
C24	C25	C26	C27	gd_34
C25	C26	C27	C28	gd_34
C26	C27	C28	C29	gd_34
C27	C28	C29	C210	gd_34
C28	C29	C210	C211	gd_34
C29	C210	C211	C212	gd_34
C210	C211	C212	C213	gd_34
C211	C212	C213	C214	gd_34
C212	C213	C214	C215	gd_34
C213	C214	C215	C216	gd_34
C2	C1	011	C11	gd_29
C1	011	C11	C12	gd_13
011	C11	C12	C13	gd_40
C11	C12	C13	C14	gd_34
C12	C13	C14	C15	gd_34
C13	C14	C15	C16	gd_34
C14	C15	C16	C17	gd_34
C15	C16	C17	C18	gd_34
C16	C17	C18	C19	gd_34
C17	C18	C19	C110	gd_34
C18	C19	C110	C111	gd_34
C19	C110	C111	C112	gd_34
C110	C111	C112	C113	gd_34
C111	C112	C113	C114	gd_34
C112	C113	C114	C115	gd_34
C113	C114	C115	C116	gd_34

Tabela 25: Parâmetros *impropers* para o resíduo DPT.

[DPT] - [impropers]				
a_i	a_j	a_k	a_l	gi
C2	C1	C3	021	gi_2
C21	021	C22	022	gi_1
C11	011	C12	012	gi_1

PCH

Figura 84: Representação do resíduo da cabeça do fosfolípido DPPC [PCH] com os *labels* utilizados. Em cinza claro é indicado o ponto de conexão com outros resíduos.

Tabela 26: Parâmetros *atoms* para o resíduo PCH.

[PCH] - [atoms]			
Label	Type	Charge(<i>e</i>)	C-Group
C33	CH3	0.4	1
C34	CH3	0.4	1
C35	CH3	0.4	1
N	NL	-0.5	1
C32	CH2	0.3	1
C31	CH2	0.4	2
O32	OA	-0.8	2
P	P	1.7	2
O33	OM	-0.8	2
O34	OM	-0.8	2
O31	OA	-0.7	2

Tabela 27: Parâmetros *bonds* para o resíduo PCH.

[PCH] - [bonds]		
<i>a_i</i>	<i>a_j</i>	gb
C33	N	gb_21
C34	N	gb_21
C35	N	gb_21
N	C32	gb_21
C32	C31	gb_27
C31	O32	gb_18
O32	P	gb_28
P	O33	gb_24
P	O34	gb_24
P	O31	gb_28
O31	+C3	gb_18

Tabela 28: Parâmetros *angles* para o resíduo PCH.

[PCH] - [angles]			
a_i	a_j	a_k	ga
C33	N	C34	ga_13
C33	N	C35	ga_13
C33	N	C32	ga_13
C34	N	C35	ga_13
C34	N	C32	ga_13
C35	N	C32	ga_13
N	C32	C31	ga_15
C32	C31	032	ga_15
C31	032	P	ga_26
032	P	033	ga_14
032	P	034	ga_14
032	P	031	ga_5
033	P	034	ga_29
033	P	031	ga_14
034	P	031	ga_14
P	031	+C3	ga_26
031	+C3	+C2	ga_15

Tabela 29: Parâmetros *dihedrals* para o resíduo PCH.

[PCH] - [dihedrals]				
a_i	a_j	a_k	a_l	gd
C33	N	C32	C31	gd_29
N	C32	C31	032	gd_4
N	C32	C31	032	gd_36
C32	C31	032	P	gd_29
C31	032	P	031	gd_20
C31	032	P	031	gd_27
032	P	031	+C3	gd_20
032	P	031	+C3	gd_27
P	031	+C3	+C2	gd_29
031	+C3	+C2	+C1	gd_34

PGH

Figura 85: Representação do resíduo da cabeça de DPPG [PGH] com os *labels* utilizados. Em cinza claro é indicado o ponto de conexão com outros resíduos.

Tabela 30: Parâmetros *atoms* para o resíduo PGH.

[PGH] - [atoms]			
Label	Type	Charge(<i>e</i>)	C-Group
H03	H	0.417	0
OC3	OA	-0.574	0
C33	CH2	0.157	0
C32	CH1	0.157	1
OC2	OA	-0.574	1
H32A	H	0.417	1
C31	CH2	0.400	2
O32	OE	-0.800	2
P	P	1.700	2
O34	OM	-0.800	2
O33	OM	-0.800	2
O31	OE	-0.700	2

Tabela 31: Parâmetros *bonds* para o resíduo PGH.

[PGH] - [bonds]		
<i>a_i</i>	<i>a_j</i>	gb
C31	O32	gb_18
O32	P	gb_28
P	O34	gb_24
P	O33	gb_24
P	O31	gb_28
O31	+C3	gb_18
H03	OC3	gb_1
OC3	C33	gb_13
C33	C32	gb_27
C32	OC2	gb_13
OC2	H32A	gb_1
C32	C31	gb_27

Tabela 32: Parâmetros *angles* para o resíduo PGH.

[PGH] - [angles]				
a_i	a_j	a_k	ga	
C32	C31	032	ga_15	
C31	032	P	ga_26	
032	P	034	ga_14	
032	P	033	ga_14	
032	P	031	ga_5	
P	031	+C3	ga_26	
034	P	033	ga_29	
034	P	031	ga_14	
033	P	031	ga_14	
031	+C3	+C2	ga_15	
H03	0C3	C33	ga_12	
0C3	C33	C32	ga_13	
C33	C32	0C2	ga_13	
C32	0C2	H32A	ga_12	
0C2	C32	C31	ga_13	
C33	C32	C31	ga_13	
C32	C31	032	ga_13	

Tabela 34: Parâmetros *dihedrals* para o resíduo PGH.

[PGH] - [dihedrals]				
a_i	a_j	a_k	a_l	gd
H03	0C3	C33	C32	gd_23
H32A	0C2	C32	C31	gd_23
0C2	C32	C31	032	gd_18
0C3	C33	C32	0C2	gd_18
0C3	C33	C32	C31	gd_33
0C3	C33	C32	C31	gd_17
C33	C32	0C2	H32A	gd_23
C33	C32	C31	032	gd_33
C33	C32	C31	032	gd_17
C32	C31	032	P	gd_29
C31	032	P	031	gd_20
C31	032	P	031	gd_27
032	P	031	+C3	gd_20
032	P	031	+C3	gd_27
P	031	+C3	+C2	gd_29
031	+C3	+C2	+021	gd_34
031	+C3	+C2	+C1	gd_34
031	+C3	+C2	+C1	gd_17

Tabela 33: Parâmetros *impropers* para o resíduo PGH.

[PGH] - [impropers]				
a_i	a_j	a_k	a_l	gi
C32	0C2	C31	C33	gi_2

A.2 Topologia DPH

Tabela 35: Parâmetros *atoms* para o resíduo DPH.

Label	[DPH] - [atoms]		
	Type	Charge(<i>e</i>)	C-Group
CB1	C	-0.14	1
CB2	C	-0.14	1
CB3	C	0.00	1
CB4	C	-0.14	1
CB5	C	-0.14	1
CB6	C	-0.14	1
HB1	HC	0.14	1
HB2	HC	0.14	1
HB4	HC	0.14	1
HB5	HC	0.14	1
HB6	HC	0.14	1
CL1	CH1	0.00	2
CL2	CH1	0.00	2
CL3	CH1	0.00	2
CL4	CH1	0.00	2
CL5	CH1	0.00	2
CL6	CH1	0.00	2
CB7	C	-0.14	3
CB8	C	-0.14	3
CB9	C	-0.14	3
CB10	C	-0.14	3
CB11	C	-0.14	3
CB12	C	0.00	3
HB7	HC	0.14	3
HB8	HC	0.14	3
HB9	HC	0.14	3
HB10	HC	0.14	3
HB11	HC	0.14	3

Figura 86: Representação do resíduo da molécula da sonda fluorescente [DPH] com os *labels* utilizados.

Tabela 36: Parâmetros *bonds* para o resíduo DPH.

[DPH] - [bonds]		
a_i	a_j	gb
CB1	CB2	gb_16
CB2	CB3	gb_16
CB3	CB4	gb_16
CB4	CB5	gb_16
CB5	CB6	gb_16
CB6	CB1	gb_16
HB1	CB1	gb_3
HB2	CB2	gb_3
HB4	CB4	gb_3
HB5	CB5	gb_3
HB6	CB6	gb_3
CB3	CL1	gb_27
CL1	CL2	gb_10
CL2	CL3	gb_27
CL3	CL4	gb_10
CL4	CL5	gb_27
CL5	CL6	gb_10
CL6	CB12	gb_27
CB12	CB7	gb_16
CB7	CB8	gb_16
CB8	CB9	gb_16
CB9	CB10	gb_16
CB10	CB11	gb_16
CB11	CB12	gb_16
HB7	CB7	gb_3
HB8	CB8	gb_3
HB9	CB9	gb_3
HB10	CB10	gb_3
HB11	CB11	gb_3

Tabela 37: Parâmetros *angles* para o resíduo DPH.

[DPH] - [angles]			
a_i	a_j	a_k	ga
CB1	CB2	CB3	ga_27
CB2	CB3	CB4	ga_27
CB3	CB4	CB5	ga_27
CB4	CB5	CB6	ga_27
CB5	CB6	CB1	ga_27
CB6	CB1	CB2	ga_27
HB1	CB1	CB6	ga_25
HB1	CB1	CB2	ga_25
HB2	CB2	CB1	ga_25
HB2	CB2	CB3	ga_25
HB4	CB4	CB3	ga_25
HB4	CB4	CB5	ga_25
HB5	CB5	CB4	ga_25
HB5	CB5	CB6	ga_25
HB6	CB6	CB1	ga_25
HB6	CB6	CB5	ga_25
CB4	CB3	CL1	ga_27
CB2	CB3	CL1	ga_27
CB3	CL1	CL2	ga_27
CL1	CL2	CL3	ga_27
CL2	CL3	CL4	ga_27
CL3	CL4	CL5	ga_27
CL4	CL5	CL6	ga_27
CL5	CL6	CB12	ga_27
CL6	CB12	CB7	ga_27
CL6	CB12	CB11	ga_27
CB7	CB8	CB9	ga_27
CB8	CB9	CB10	ga_27
CB9	CB10	CB11	ga_27
CB10	CB11	CB12	ga_27
CB11	CB12	CB7	ga_27
CB12	CB7	CB8	ga_27
HB7	CB7	CB12	ga_25
HB7	CB7	CB8	ga_25
HB8	CB8	CB9	ga_25
HB8	CB8	CB7	ga_25
HB9	CB9	CB10	ga_25
HB9	CB9	CB8	ga_25
HB10	CB10	CB11	ga_25
HB10	CB10	CB9	ga_25
HB11	CB11	CB12	ga_25
HB11	CB11	CB10	ga_25

Tabela 38: Parâmetros *dihedrals* para o resíduo DPH.

[DPH] - [dihedrals]				
a_i	a_j	a_k	a_l	gd
CB4	CB3	CL1	CL2	gd_34
CL1	CL2	CL3	CL4	gd_34
CL3	CL4	CL5	CL6	gd_34
CL5	CL6	CB12	CB7	gd_34

Tabela 39: Parâmetros *impropers* para o resíduo DPH.

[DPH] - [impropers]				
a_i	a_j	a_k	a_l	gi
CB1	HB1	CB6	CB2	gi_1
CB2	HB2	CB1	CB3	gi_1
CB3	CB2	CB4	CL1	gi_1
CB4	HB4	CB3	CB5	gi_1
CB5	HB5	CB6	CB4	gi_1
CB6	HB6	CB1	CB5	gi_1
CB7	HB7	CB12	CB8	gi_1
CB8	HB8	CB9	CB7	gi_1
CB9	HB9	CB10	CB8	gi_1
CB10	HB10	CB11	CB9	gi_1
CB11	HB11	CB12	CB10	gi_1
CB12	CB7	CB11	CL6	gi_1
CB3	CL1	CL2	CL3	gi_4
CL2	CL3	CL4	CL5	gi_4
CL4	CL5	CL6	CB12	gi_4
CB6	CB1	CB2	CB3	gi_1
CB1	CB2	CB3	CB4	gi_1
CB2	CB3	CB4	CB5	gi_1
CB3	CB4	CB5	CB6	gi_1
CB4	CB5	CB6	CB1	gi_1
CB5	CB6	CB1	CB2	gi_1
CB7	CB8	CB9	CB10	gi_1
CB8	CB9	CB10	CB11	gi_1
CB9	CB10	CB11	CB12	gi_1
CB10	CB11	CB12	CB7	gi_1
CB11	CB12	CB7	CB8	gi_1
CB12	CB7	CB8	CB9	gi_1

Tabela 40: Parâmetros *exclusions* para o resíduo DPH.

[DPH] - [exclusions]	
a_i	a_j
CB1	HB5
CB1	CB4
CB1	CL1
CB2	CB5
CB2	HB6
CB2	HB4
CB3	CB6
CB3	HB5
CB3	HB1
CB4	HB6
CB4	HB2
CB5	HB1
CB5	CL1
CB6	HB2
CB6	HB4
CL1	HB2
HB2	HB1
HB1	HB6
HB6	HB5
HB5	HB4
HB4	CL1
CB7	HB11
CB7	CB10
CB7	HB9
CB8	CB11
CB8	CL6
CB8	HB10
CB9	CB12
CB9	HB11
CB9	HB7
CB10	HB9
CB10	CL6
CB11	HB7
CB11	HB9
CB12	HB8
CB12	HB10
CL6	HB7
HB7	HB8
HB8	HB9
HB9	HB10
HB10	HB11
HB11	CL6

A.3 Topologia IOL

[IOL]

Tabela 41: Parâmetros *atoms* para o resíduo IOL.

Label	[IOL] - [atoms]		
	Type	Charge(<i>e</i>)	C-Group
CM	CH3	0.22	1
N1	NR	0.10	1
C1	C	-0.03	1
HC1	HC	0.23	1
C2	C	-0.15	1
HC2	HC	0.23	1
C3	C	-0.15	1
HC3	HC	0.23	1
N2	NR	0.10	1
CT1	CH2	0.22	1
CT2	CH2	0	2
CT3	CH2	0	2
CT4	CH2	0	2
CT5	CH2	0	2
CT6	CH2	0	2
CT7	CH2	0	2
CT8	CH2	0	2
CT9	CH2	0	2
CT10	CH2	0	2
CT11	CH2	0	2
CT12	CH2	0	2
CT13	CH2	0	2
CT14	CH3	0	2

Figura 87: Representação do resíduo da molécula de líquido iônico [IOL] com os *labels* utilizados.

Tabela 42: Parâmetros *bonds* para o resíduo IOL.

[IOL] - [bonds]		
a_i	a_j	gb
CM	N1	gb_23
N1	C1	gb_17
N1	C2	gb_17
C1	HC1	gb_3
C1	N2	gb_17
C2	HC2	gb_3
C2	C3	gb_16
C3	HC3	gb_3
C3	N2	gb_17
N2	CT1	gb_23
CT1	CT2	gb_27
CT2	CT3	gb_27
CT3	CT4	gb_27
CT4	CT5	gb_27
CT5	CT6	gb_27
CT6	CT7	gb_27
CT7	CT8	gb_27
CT8	CT9	gb_27
CT9	CT10	gb_27
CT10	CT11	gb_27
CT11	CT12	gb_27
CT12	CT13	gb_27
CT13	CT14	gb_27

Tabela 43: Parâmetros *angles* para o resíduo IOL.

[IOL] - [angles]			
a_i	a_j	a_k	ga
CM	N1	C1	ga_27
CM	N1	C2	ga_27
C1	N1	C2	ga_27
N1	C1	HC1	ga_25
N1	C1	N2	ga_27
HC1	C1	N2	ga_25
N1	C2	HC2	ga_25
N1	C2	C3	ga_27
HC2	C2	C3	ga_25
C2	C3	HC3	ga_25
C2	C3	N2	ga_27
HC3	C3	N2	ga_25
C1	N2	C3	ga_27
C1	N2	CT1	ga_27
C3	N2	CT1	ga_27
N2	CT1	CT2	ga_27
CT1	CT2	CT3	ga_15
CT2	CT3	CT4	ga_15
CT3	CT4	CT5	ga_15
CT4	CT5	CT6	ga_15
CT5	CT6	CT7	ga_15
CT6	CT7	CT8	ga_15
CT7	CT8	CT9	ga_15
CT8	CT9	CT10	ga_15
CT9	CT10	CT11	ga_15
CT10	CT11	CT12	ga_15
CT11	CT12	CT13	ga_15
CT12	CT13	CT14	ga_15

Tabela 44: Parâmetros *dihedrals* para o resíduo IOL.

[IOL] - [dihedrals]				
a_i	a_j	a_k	a_l	gd
C1	N2	CT1	CT2	gd_14
N2	CT1	CT2	CT3	gd_14
CT1	CT2	CT3	CT4	gd_34
CT2	CT3	CT4	CT5	gd_34
CT3	CT4	CT5	CT6	gd_34
CT4	CT5	CT6	CT7	gd_34
CT5	CT6	CT7	CT8	gd_34
CT6	CT7	CT8	CT9	gd_34
CT7	CT8	CT9	CT10	gd_34
CT8	CT9	CT10	CT11	gd_34
CT9	CT10	CT11	CT12	gd_34
CT10	CT11	CT12	CT13	gd_34
CT11	CT12	CT13	CT14	gd_34

Tabela 45: Parâmetros *impropers* para o resíduo IOL.

[IOL] - [impropers]				
a_i	a_j	a_k	a_l	gi
N1	HC1	N2	C1	gi_1
N1	CM	C1	C2	gi_1
N1	C1	N2	C3	gi_1
N1	C2	C3	N2	gi_1
C1	N2	C3	C2	gi_1
C1	N1	C2	C3	gi_1
C1	CT1	C3	N2	gi_1
C2	N1	HC2	C3	gi_1
C2	N1	C1	N2	gi_1
C3	C2	HC3	N2	gi_1

Tabela 46: Parâmetros *exclusions* para o resíduo IOL.

[IOL] - [exclusions]	
a_i	a_j
HC1	CT1
HC1	C3
HC1	C2
HC2	CM
HC2	HC3
HC2	N2
HC2	C1
HC3	N1
HC3	C1
HC3	CT1
CM	C3
CM	HC1
CM	N2
C1	C2
C1	C3
C2	CT1
C2	N2
C3	N1
N1	N2
N1	CT1

B Seleção de Cargas

Como comparação com as cargas atômicas do campo de força, foi feito o cálculo quântico das cargas com o software *Gaussian09* [81] para as moléculas de DPH e líquido iônico. Em ambos, otimizou-se a estrutura com base HF/6-31g*, usada também no cálculo de cargas com método CHELPG. Do manual do campo de força ([60] - Vol 3), baseou-se as cargas do líquido iônico no anel de cinco elementos do aminoácido Desoxiadenosina e o DPH no benzeno de Fenilalanina.

Para o líquido iônico, calculou-se as cargas em vácuo exclusivamente para o anel da cabeça, em forma carregada, incluindo o grupo metil (CM) e o primeiro carbono da cauda (CT1). As cargas calculadas reproduziram as cargas do campo gromos para o grupo Desoxiadenosina, sendo portanto compatíveis com o campo de força. Ainda, as cargas calculadas foram também replicadas de acordo com as obtidas por Liu et al. [82], calculadas para o líquido iônico 1-butil-3-metilimidazol (vide tabela 47). Em razão disso, utilizou-se as cargas calculadas neste trabalho apresentadas na tabela 47 na coluna Vácuo (+1).

Tabela 47: Cargas atômicas calculadas neste trabalho para o LI no caso carregado (+1) (CHELPG, base HF/6-31g*) e por Liu et al. para 1-butil-3-metilimidazol (ajuste RESP) [82]. Os hidrogênios das caudas (CT*i*) e do grupo metil (*) foram incorporados.

Carga(e)	Vácuo (+1)	Liu et al.
CM*	0.22	0.25
N1	0.10	0.06
C1	-0.03	-0.01
HC1	0.23	0.23
C2	-0.15	-0.14
HC2	0.23	0.26
C3	-0.15	-0.22
HC3	0.23	0.22
N2	0.10	0.07
CT1	0.22	0.15
CT2	0.00	-
CT3	0.00	-
CT4	0.00	-
CT5	0.00	-
CT6	0.00	-
CT7	0.00	-
CT8	0.00	-
CT9	0.00	-
CT10	0.00	-
CT11	0.00	-
CT12	0.00	-
CT13	0.00	-
CT14	0.00	-

As cargas da sonda DPH foram calculadas com hidrogênios explícitos e posteriormente somadas aos carbonos apenas na haste central (tabela 48). Entre os ambientes calculados, água e vácuo, não houve mudança significativa por conta da apolaridade da molécula. Entre os valores calculados e do campo de força, apesar da diferença percentual signifi-

tiva, não houve pronunciamento de carga em nenhum ponto (módulos menores que $0.3e$). Levando em conta a baixa discrepância e a consistência com o campo de força, optou-se pelas cargas do campo de força gromos apresentadas na tabela 48.

Tabela 48: Cargas atômicas calculadas (CHELPG, base HF/6-31g*) e parametrizadas para a sonda DPH. Os átomos marcados (*) consideram inclusas as cargas dos hidrogênios.

Carga(e)	Água	Vácuo	Gromos
CB1	-0.04	-0.03	-0.14
CB2	-0.22	-0.20	-0.14
CB3	0.25	0.25	0.00
CB4	-0.24	-0.22	-0.14
CB5	-0.03	-0.02	-0.14
CB6	-0.13	-0.12	-0.14
HB1	0.09	0.07	0.14
HB2	0.11	0.10	0.14
HB4	0.13	0.11	0.14
HB5	0.08	0.07	0.14
HB6	0.10	0.08	0.14
*CL1	-0.15	-0.14	0.00
*CL2	0.06	0.06	0.00
*CL3	-0.01	-0.01	0.00
*CL4	-0.01	-0.01	0.00
*CL5	0.06	0.06	0.00
*CL6	-0.15	-0.14	0.00
CB7	-0.23	-0.21	-0.14
CB8	-0.03	-0.03	-0.14
CB9	-0.13	-0.12	-0.14
CB10	-0.04	-0.03	-0.14
CB11	-0.22	-0.20	-0.14
CB12	0.25	0.25	0.00
HB7	0.13	0.11	0.14
HB8	0.08	0.07	0.14
HB9	0.10	0.08	0.14
HB10	0.09	0.07	0.14
HB11	0.11	0.10	0.14

C Arquivo *.mdp*

Abaixo segue exemplo de arquivo *.mdp* para simulação de bicamada de DPPC com LI a 293K.

```
integrator = md      ;MD integrator
dt = 0.002      ;2 fs timestep
init-step = 0      ;Starting step
tinit = 0      ;Starting time
nsteps = 25000000    ;Number of steps (25E-9s/0.5E-15s)(Total = 50ns)
comm-mode = linear    ;Remove center of mass translation (If "angular" remove
center of mass translation
nstxout = 1000      ;print positions
nstvout = 10000     ;print velocities
nstfout = 10000     ;print forces
nstlog = 1000      ;update log
nstcalcenergy = 10
nstenergy = 10      ;.edr-file output
energygrps = DPPC IOL SOL CL      ;group(s) to write to energy file
continuation = yes    ;Restarting after NPT
constraint_algorithm = lincs    ;holonomic constraints
constraints = H-bonds    ;atom-H bonds constrained
lincs_iter = 1      ;accuracy of LINCS
lincs_order = 4      ;also related to accuracy
cutoff-scheme = Verlet
ns_type = grid      ;search neighboring grid cels
nstlist = 35      ;Update neighbor list between cut-offs; 10 ns
rlist = 1.4      ;short-range neighborlist cutoff (in nm)
rcoulomb = 1.4      ;short-range electrostatic cutoff (in nm)
rvdw = 1.4      ;Van der Wals cutoff (in nm)
coulombtype = PME      ;Particle mesh Ewald, do not change
pme_order = 4      ;cubic interpolation
fourierspacing = 0.14    ;PME grid
pbc = xyz      ;Periodic boundary conditions in xyz
DispCorr = EnerPres      ;Dispersion corrections to both the potential and pressure
tcoupl = V-rescale      ;Modified Berendsen thermostat
tc-grps = Other Water_and_ions    ;Couple lipids+IONliq and WATER+IONS seperatly
tau-t = 0.1 0.1      ;Time constant for temperature coupling
ref-t = 293 293      ;Desired temperature (K)
Pcoupl = berendsen      ;Barostat
Pcoupltype = semiisotropic    ;Pressure in xy and z couple separately
ref-p = 1.0 1.0      ;Desired pressure (bar)
tau-p = 2.0      ;Time constant for pressure coupling in ps
compressibility = 4.5e-5 4.5e-5    ;Same as for water
gen-vel = no
gen-temp = 293
gen-seed = 51
```

D Extra - Áreas por lipídio

As figuras 88 e 89 apresentam os valores de APL calculados, por seção plana, nas bicamadas com sonda DPH. Por ser inserida em estrutura já termalizada, a curva de APL encontra-se convergida desde o início. Como esperado, a baixa dimensão e interação da sonda com a membrana não altera significativamente os valores médios finais – tabelas 49 e 50.

Figura 88: APL em função do tempo, calculada a partir da seção plana da caixa, de membranas de DPPC com uma sonda DPH inserida.

Figura 89: APL em função do tempo, calculada a partir da seção plana da caixa, de membranas de DPPG com uma sonda DPH inserida.

Tabela 49: Parâmetros médios de APL sobre os trechos termalizados para bicamadas de DPPC com uma sonda DPH em fase gel (293K) e gel-líquida (343K), puras e com líquido iônico (30% mol) – fig 88.

APL (nm^2)	DPPC			
	Pure		IL	
	293	343	293	343
Sem DPH	0.578 ± 0.002	0.637 ± 0.004	0.610 ± 0.002	0.711 ± 0.005
Com DPH	0.576 ± 0.002	0.635 ± 0.004	0.594 ± 0.002	0.706 ± 0.003

Tabela 50: Parâmetros médios de APL sobre os trechos termalizados para bicamadas de DPPG com uma sonda DPH em fase gel (293K) e gel-líquida (343K), puras e com líquido iônico (30% mol) – fig 89.

APL (nm^2)	DPPG			
	Pure		IL	
	293	343	293	343
Sem DPH	0.556 ± 0.002	0.630 ± 0.005	0.606 ± 0.002	0.705 ± 0.006
Com DPH	0.554 ± 0.002	0.630 ± 0.007	0.601 ± 0.003	0.695 ± 0.005

E Extra - Funções de distribuição radiais

E.1 Íons Na^+

Os átomos selecionados para o cálculo de $g(r)$ consideram apenas os casos com módulo de carga maior que $0.6e$, a fim de detectar os principais pontos de atração.

Figura 90: Função de distribuição radial $g(r)$ entre o íon Na^+ e os oxigênios $O11$ e $O12$ do primeiro éster para a bicamada de DPPG pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, $293K$ e $343K$.

Figura 91: Função de distribuição radial $g(r)$ entre o íon Na^+ e os oxigênios $O11$ e $O12$ do segundo éster para a bicamada de DPPG pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, $293K$ e $343K$.

Figura 92: Função de distribuição radial $g(r)$ entre o íon Na^+ e os oxigênios $OC2$ e $OC3$, ligados aos carbonos $C32$ e $C33$ do glicerol respectivamente, para a bicamada de DPPG pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, $293K$ e $343K$.

Figura 93: Função de distribuição radial $g(r)$ entre o íon Na^+ e os oxigênios $O31$ e $O32$ do fosfato para a bicamada de DPPG pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, $293K$ e $343K$.

Figura 94: Função de distribuição radial $g(r)$ entre o íon Na^+ e os oxigênios $O33$ e $O34$ do fosfato para a bicamada de DPPG pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, $293K$ e $343K$.

E.2 Grupos dos Lipídios

Nas seções E.2 e E.2, os grupos considerados: colina, glicerol, fosfato, incluem todos os seus átomos, sendo o cálculo feito pela distância entre átomos dos grupos. Para as funções entre tipos iguais (exemplo: Colina-Colina), foram excluídas as contagens dos átomos pertencentes ao próprio grupo, isto é, a partir de um átomo, os demais que pertencem à mesma colina, glicerol ou fosfato não são inclusos na contagem.

DPPC

Figura 95: Função de distribuição radial $g(r)$ entre os grupos colina (Chol) e fosfato (Phosp) para a bicamada de DPPC pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, 293K e 343K.

Figura 96: Função de distribuição radial $g(r)$ entre os grupos fosfato (Phosp) para a bicamada de DPPC pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, 293K e 343K.

Figura 97: Função de distribuição radial $g(r)$ entre os grupos colina (Chol) e água para a bicamada de DPPC pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, 293K e 343K.

Figura 98: Função de distribuição radial $g(r)$ entre os grupos fosfato (Phosp) e água para a bicamada de DPPC pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, 293K e 343K.

DPPG

Figura 99: Função de distribuição radial $g(r)$ entre os grupos glicerol (Gly) e fosfato (Phosp) para a bicamada de DPPG pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, 293K e 343K.

Figura 100: Função de distribuição radial $g(r)$ entre os grupos fosfato (Phosp) para a bicamada de DPPG pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, 293K e 343K.

Figura 101: Função de distribuição radial $g(r)$ entre os grupos colina (Chol) e água para a bicamada de DPPG pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, 293K e 343K.

Figura 102: Função de distribuição radial $g(r)$ entre os grupos fosfato (Phosp) e água para a bicamada de DPPG pura e com IL (IOL) em duas temperaturas, 293K e 343K.

E.3 Líquido Iônico

Figura 103: Função de distribuição radial $g(r)$ entre as cabeças de IL e os grupos éster das bicamadas de DPPG e DPPC em duas temperaturas, 293K e 343K.

Figura 104: Função de distribuição radial $g(r)$ entre as cabeças de IL e os grupos fosfato (phosp) das bicamadas de DPPG e DPPC em duas temperaturas, $293K$ e $343K$.

F Extra - Anisotropia

Tabela 51: Parâmetros ajustados da função $r(t)$ sobre intervalo de 10% do tempo de correlação. O parâmetro r_0 é fixo (0.4). Ψ denomina o tempo de correlação e r_∞ a anisotropia estática.

10%	DPPC				DPPG			
	Pure		IL		Pure		IL	
	293	343	293	343	293	343	293	343
Ψ	816	202	467	194	1194	256	405	175
r_∞	0.28	0.09	0.26	0.09	0.29	0.03	0.33	0.09

Tabela 52: Parâmetros ajustados da função $r(t)$ sobre intervalo de 30% do tempo de correlação. O parâmetro r_0 é fixo (0.4). Ψ denomina o tempo de correlação e r_∞ a anisotropia estática.

30%	DPPC				DPPG			
	Pure		IL		Pure		IL	
	293	343	293	343	293	343	293	343
Ψ	2208	213	428	221	1805	259	567	204
r_∞	0.24	0.08	0.27	0.08	0.27	0.03	0.33	0.08

G Energia de Interação

Nas tabelas 53 e 56 seguem os valores brutos de energia de interação calculados com raios de corte $r_c = 1.4$ e $r_c = 2.0$ nm respectivamente. Os valores comparativos extraídos de 53 constam em 54, entre bicamadas puras e com LI, e em 55 entre temperaturas.

Tabela 53: Energias de interação média ($Coul + LJ$) com $r_c = 1.4$ nm; unidade $-10^3 \frac{kJ}{mol}$.

-10^3 kJ/mol	DPPC				DPPG			
	Puro		IOL		Puro		IOL	
$r_c = 1.4nm$	293	343	293	343	293	343	293	343
Lipid-Lipid	686±1	673±1	642±1	630±1	466±1	450±1	446±1	431±1
Lipid-Sol	121±1	115±1	112±1	108±1	123±1	121±2	116±1	111±2
Lipid-Na					106±1	99±2	45.5±1.0	47.2±1.5
$\sum_{lipid}$	807	788	754	738	675	670	607	589
Lipid-IonLiq			65.8±0.4	57.9±0.6			74.4±0.3	67.4±0.5
Lipid-Cl			6.2±0.4	5.3±0.4			-0.1±0.1	-0.1±0.1
$\sum_{IonLiq}$			72	63			74	67
IonLiq-IonLiq			17.6±0.1	17.6±0.1			17.3±0.1	17.5±0.1
IonLiq-Cl			1.1±0.2	1.3±0.2			0.1±0.01	0.1±0.01
IonLiq-Sol			7.3±0.4	8.7±0.4			1.0±0.3	2.1±0.3
IonLiq-Na							-2.1±0.1	-1.8±0.1
$\sum_{Extra-IonLiq}$			26.0	27.6			16.3	17.9
Na-Cl							19.8±1.6	26.8±2.0
Na-Na					86.2±0.3	87.0±0.3	85.3±0.4	85.2±0.4
Cl-Cl			37.2±0.1	37.3±0.1			36.9±0.2	36.5±0.3
Sol-Cl			85.7±0.8	83.5±0.7			78.7±1.5	69.9±1.7
Sol-Na					131±1	131±2	162±2	149±2
$\sum_{Extra}$			123	121	217	218	383	367

Tabela 54: Comparação das energias de interação ($Coul + LJ$) entre sistemas puros e com LI: $\Delta E_{Puro \rightarrow LI} = E_{LI} - E_{Puro}$; raio de corte $r_c = 1.4nm$.

$\Delta E(Puro \rightarrow LI)$ -10 ³ kJ/mol	DPPC		DPPG	
	293	343	293	343
Lipid-Lipid	44	43	20	19
Lipid-Sol	9	7	7	10
Lipid-Na			60	52
$\Delta \sum_{lipid}$	53	50	68	81
Lipid-IonLiq	-66	-58	-74	-67
Lipid-Cl	-6	-5	0	0
$\Delta \sum_{IonLiq}$	-72	-63	-74	-67
IonLiq-IonLiq	-18	-18	-17	-17
IonLiq-Cl	-1	-1	0	0
IonLiq-Sol	-7	-9	-1	-2
IonLiq-Na			2	2
Na-Cl			-20	-27
Na-Na			1	0
Cl-Cl	-37	-37	-37	-36
Sol-Cl	-86	-83	-79	-70
Sol-Na			-31	-18

Tabela 55: Comparação das energias de interação ($Coul + LJ$) entre as temperaturas simuladas: $\Delta E_T = E_{343} - E_{293}$; raio de corte $r_c = 1.4nm$.

ΔE_T -10 ³ kJ/mol	DPPC		DPPG	
	Puro	IOL	Puro	IOL
Lipid-Lipid	-13	-12	-16	-15
Lipid-Sol	-6	-4	-2	-5
Lipid-Na			-7	2
$\Delta \sum_{Lipid}$	-19	-16	-5	-18
Lipid-IonLiq		-8		-7
Lipid-Cl		-1		0
$\Delta \sum_{IonLiq}$		-9		-7
IonLiq-IonLiq		0		0
IonLiq-Cl		0		0
IonLiq-Sol		1		1
IonLiq-Na				0
Na-Cl				7
Na-Na			1	0
Cl-Cl		0		0
Sol-Cl		-2		-9
Sol-Na			0	-13

Tabela 56: Energias de interação média ($Coul + LJ$) com $r_c = 2.0nm$; unidades de -10³ $\frac{kJ}{mol}$.

-10 ³ kJ/mol	DPPC				DPPG			
	Puro		IOL		Puro		IOL	
	293	343	293	343	293	343	293	343
$r_c = 2.0nm$								
Lipid-Lipid	684±1	669±1	628±1	618±1	438±1	424±1	419±1	407±1
Lipid-Sol	133±1	127±2	126±2	122±2	137±2	134±2	128±1	122±2
Lipid-Na					161±2	150±3	72±1	72±2
$\sum_{Lipid}$	817	796	754	740	736	708	619	601
Lipid-IonLiq			80±1	70±1			102±1	93±1
Lipid-Cl			13.7±0.7	11.7±0.7			-0.9±0.2	-1.2±0.3
$\sum_{IonLiq}$			94	82			101	92
IonLiq-IonLiq			8.0±0.1	8.5±0.1			7.7±0.1	8.1±0.1
IonLiq-Cl			3.4±0.3	3.8±0.4			0.3±0.1	0.5±0.1
IonLiq-Sol			10.2±0.6	12.3±0.6			-2.5±0.4	-0.7±0.5
IonLiq-Na							-7.8±0.3	-6.9±0.3
$\sum_{Extra-IonLiq}$			22	25			-2.3	1
Na-Cl							34±2	44±3
Na-Na					50±1	52±1	53±1	53±1
Cl-Cl			24.3±0.2	24.8±0.2			23.6±0.4	22.9±0.6
Sol-Cl			99±1	97±1			90±2	79±2
Sol-Na					146±2	147±3	190±2	174±3
$\sum_{Extra}$			123	122	196	199	391	373

Como mencionado nos Resultados, a correção feita sobre a lista de vizinhos considerou o cálculo de energia sobre diversas trajetórias, aplicado neste caso apenas para o sistema de DPPG, com LI a 293, por considerar interações de curto e longo alcance — tabela 57.

Tabela 57: Comparação entre energias de interação promediadas sobre trajetória única, $\langle E \rangle_{50ns}$, e em intervalos de 1ns $\langle E \rangle_{\Delta 1ns}$.

-10^3 kJ/mol	DPPG	
	LI - 293K	
	$\langle E \rangle_{50ns}$	$\langle E \rangle_{\Delta 1ns}$
Lipid-Lipid	445.52	445.30
Lipid-Water	115.68	115.84
Lipid-IonLiq	74.36	74.25
Lipid- Cl^-	-0.09	-0.09
Lipid- Na^+	45.49	45.57
IonLiq-IonLiq	17.31	17.32
IonLiq- Cl^-	0.06	0.06
IonLiq-Water	1.00	1.06