UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE FÍSICA

SERGIO LEANDRO ESPÍNDOLA PREZA

**Localização e dinâmica de sondas fluorescentes em
modelos de membranas: estudos por Dinâmica
Molecular e Anisotropia de Fluorescência Resolvida
no Tempo**

Ribeirão Preto - SP
2013

SERGIO LEANDRO ESPÍNDOLA PREZA

**Localização e dinâmica de sondas fluorescentes em
modelos de membranas: estudos por Dinâmica
Molecular e Anisotropia de Fluorescência Resolvida
no Tempo**

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração:

Física aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador:

Prof. Dr. Amando Siuiti Ito.

Coorientador:

Prof. Dr. Munir Salomão Skaf.

Versão original

Disponível na FFCLRP-USP

Ribeirão Preto - SP

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preza, Sergio Leandro Espíndola

Localização e dinâmica de sondas fluorescentes em modelos de membranas: estudos por Dinâmica Molecular e Anisotropia de Fluorescência Resolvida no Tempo / Sergio Leandro Espíndola Preza; orientador Prof. Dr. Amando Siuiti Ito. coorientador Prof. Dr. Munir Salomão Skaf. Ribeirão Preto - SP, 2013.

75 f.:il.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em Física aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2013.

1. Sondas Fluorescentes. 2. Dinâmica Molecular. 3. Anisotropia.

Nome: PREZA, Sergio Leandro Espíndola

Título: Localização e dinâmica de sondas fluorescentes em modelos de membranas:
estudos por Dinâmica Molecular e Anisotropia de Fluorescência Resolvida
no Tempo

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor
em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico esta tese às pessoas mais importantes para mim, minha querida mãe Leila Teresinha Espíndola e meu querido pai Sabino Gonçalves Preza Junior, principais responsáveis pela minha vida e a quem devo meu caráter e disciplina ao trabalho, e também às minhas queridas tia Marli e vó Maria, por todo amor e carinho que sempre demonstraram.

Dedico especialmente e com muito carinho à minha companheira Ana Carolina Silva Biscalchin, sempre paciente e generosa em meus momentos de desânimo e falta de estímulo. *Haja paciência né!*

AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever esta Tese, foi utilizar estas poucas páginas para agradecer as pessoas que fizeram parte da minha trajetória e destes 4 anos de doutorado.

Primeiramente agradeço aos meus pais, que sempre primaram pela minha educação. Obrigado Sr. Sabino e Sra. Leila por, além de me oferecerem a oportunidade de estudar, sempre estarem presentes e não me deixar desistir. Agradeço à minha irmã Natalie, pela amizade e incentivo.

Se existe uma pessoa fundamental nesta minha trajetória, essa pessoa é a Ana Carolina, mais do que uma companheira, você foi minha base, meu alicerce, e não teria chegado até aqui sem sua presença na minha vida. Obrigado!

Agradeço também ao Danilo Olivier, pela grande amizade que construímos, dentro e fora da Universidade, e pelas palavras de conforto nos momentos de dificuldades. Obrigado meu amigo!

Não poderia deixar de falar do colombiano mais gente boa que conheço, o César Ceballos, uma pessoa com a alma de cientista que, com suas opiniões contundentes, sempre oferece um ponto de vista interessante nas discussões que temos. Muchas gracias César!

Rafael Pianca, obrigado pela paciência e amizade durante esse pouco tempo que nos conhecemos, sem duvidas você foi importante e me ajudou muito em alguns dos momentos mais difíceis que passei em Ribeirão. Obrigado!

Dentro da Universidade, algumas pessoas foram fundamentais para eu continuar os estudos após a graduação, mostrando-me a nobre função da pesquisa: produzir novos conhecimentos. O Prof. Marcos S. do Amaral foi uma dessas pessoas, com sua maneira impar de ser, sempre me induzindo a pensar criticamente e me sentir responsável pelo meu trabalho. Obrigado!

Não poderia deixar de falar do Prof. Iouri, uma grande pesquisador e um exemplo de cidadão, sempre disposto a ajudar e ensinar. Ah! Agradeço pelas festas de fim de ano na sua casa e pelas vodcas russas. Obrigado!

Também agradeço ao Prof. Dr. Antônio Costa Filho, que foi fundamental para realização do meu trabalho, ao emprestar o cluster para as simulações e imprescindível na minha vida, por sua gentileza em me ajudar com a minha casa aqui em Ribeirão. Obrigado Jabah!

Agradeço ao meu coorientador, Prof. Dr. Munir Skaf, pelas dicas valiosas e empréstimo dos computadores para realização das simulações. Muito Obrigado!

Estendo meus agradecimentos aos funcionários da FFCLRP-USP, bem como aos amigos da graduação e pós-graduação, em especial: Fernando, André Pavanelli, Luis (Militar), Antônio (Tonin), Luis Felipe, Assuero, Mariana (Pops) e especialmente à Amanda Câmara, pelo carinho. Muito Obrigado!

Ao colega do grupo, Wallance Pazin, pela ajuda com a parte experimental do meu projeto de doutorado.

Agradeço ainda a minha avó Maria e minha tia Marli, que sinto estarem próximas a mim, sempre tenho vocês em meus pensamentos.

Agradeço especialmente ao meu orientador, Prof. Dr. Amando S. Ito, que com sua calma e serenidade, me ensinou muito, me dando a oportunidade de aprender e crescer, não só na ciência, mas também na vida. Se eu conseguir ser 10% do que o Sr. é, já me considerarei uma pessoa muito especial. Muito Obrigado!

Agradeço por poder citar todas estas pessoas neste momento tão importante. Obrigado por estarem tão caprichosamente em minha vida.

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, pelo apoio acadêmico.

Aos professores da pós-graduação, ao coordenador do programa Marcelo Mulato, ao Ricardo dos Santos e à Nilza Marino da secretaria do Departamento de Física, por estarem sempre dispostos a ajudar e tirar as dúvidas.

À CAPES e ao INCT-FCx, pelo suporte financeiro.

Também à CNPQ e à FAPESP, pelo apoio.

Agradeço a todos que, diretamente ou indiretamente, fizeram parte deste trabalho. Obrigado!

*Um homem catava pregos no chão.
Sempre os encontrava deitados de comprido,
ou de lado,
ou de joelhos no chão.
Nunca de ponta.
Assim eles não furam mais - o homem pensava.
Eles não exercem mais a função de pregar.
São patrimônios inúteis da humanidade.
Ganharam o privilégio do abandono.
O homem passava o dia inteiro nessa função de catar
pregos enferrujados.
Acho que essa tarefa lhe dava algum estado.
Estado de pessoas que se enfeitam a trapos.
Catar coisas inúteis garante a soberania do Ser.
Garante a soberania de Ser mais do que Ter.
Manoel de Barros - 'O Catador'*

...Os caminhos mudam com o tempo.

Só o tempo muda um coração...

Almir Sater - 'Peão'

Do not worry about your difficulties in Mathematics.

I can assure you mine are still greater.

Albert Einstein (1879 - 1955)

RESUMO

PREZA, S. L. E. **Localização e dinâmica de sondas fluorescentes em modelos de membranas: estudos por Dinâmica Molecular e Anisotropia de Fluorescência Resolvida no Tempo**. 2013. 75 f. Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em Física aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2013.

As moléculas AHBA (2-Amino-N-hexadecil-benzamida) e DPH (1,6-Difenil-1,3,5-hexatrieno) são sondas fluorescentes com características particulares, comumente utilizadas para monitorar diferentes regiões das bicamadas lipídicas, no entanto, pouco se sabe sobre a mobilidade e dinâmica destas sondas em membranas e quais os principais fatores que influenciam as suas interações com solventes polares e apolares. Esta tese teve por objetivo estudar essas sondas em diferentes ambientes, para ampliar o entendimento de suas estruturas, mobilidade e dinâmicas rotacionais em diferentes solventes e em bicamadas lipídicas. Utilizou-se a técnica de Dinâmica Molecular (DM) para obter as trajetórias das sondas em caixas com diferentes proporções de água e 1,4-dioxano e também nas membranas de POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina) e DMPC (1,2-dimiristoil-sn-glicerol-3-fosfocolina). Com as trajetórias geradas, foram analisadas a estrutura, a solvatação e a dinâmica rotacional das sondas em misturas de solventes e membranas modelo. Para as DM em solventes, os resultados indicaram um comportamento atípico das duas moléculas, com a diminuição da interação com a água a medida que diminuía-se a proporção de 1,4-dioxano na caixa. Em membranas, a localização e mobilidade da sonda AHBA apresentaram comportamento semelhante em POPC e DMPC, com os tempos obtidos a partir

da curva de autocorrelação rotacional do seu dipolo comparáveis aos medidos pelo experimento de anisotropia de fluorescência resolvida no tempo. Já para o DPH, os resultados em POPC indicaram que a sonda alinha-se paralelamente à superfície da membrana e apresenta muito mais liberdade para se movimentar quando comparada às aos resultados de DM em DMPC, onde a sonda se alinhou paralelamente às caudas dos fosfolipídios e teve uma restrição bem maior para seus movimentos. Os tempos de correlação rotacional do seu dipolo em POPC apresentaram boa concordância com os obtidos experimentalmente. Em contrapartida, os resultados em DMPC mostraram que é preciso mais tempo de DM para comparação entre a correlação rotacional teórica e a experimental, por ser um sistema mais compactado. De qualquer forma, os resultados indicam que a DM é uma técnica promissora para modelagem da dinâmica rotacional de moléculas em membranas.

Palavras-chave: 1. Sondas Fluorescentes. 2. Dinâmica Molecular. 3. Anisotropia.

ABSTRACT

PREZA, S. L. E. **Location and dynamics of fluorescent probes in model membranes: study by Molecular Dynamics and Time-resolved Fluorescence Anisotropy**. 2013. 75 f. Thesis (Ph.D. - Postgraduate program in Physics applied to Medicine and Biology) - Faculty of Philosophy, Sciences and Literature, University of São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2013.

AHBA (2-Amino-N-hexadecyl benzamide) and DPH (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene) molecules are fluorescent probes with particular characteristics commonly used to monitor different regions of the lipid bilayers, however, little is known about the mobility and dynamics of these probes in membranes and the main factors that influence their interactions with polar and non-polar solvents. This thesis aimed to study these probes in different environments, to extend the understanding of their structures, mobility and rotational dynamics in different solvents and in lipid bilayers. It was used the Molecular Dynamic (MD) technique to obtain the trajectories of the probes in boxes with different proportions of water and 1,4-dioxane, and also in membranes of POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine) and DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine). With the trajectories generated, the structure, solvation and rotational dynamics of the probes were analyzed in solvent mixtures and model membranes. For simulations in solvents, the results indicate an atypical behavior of the two molecules with the decrease of the interaction with water, when decreased the proportion of 1,4-dioxane in the box. In membranes, the location and mobility of AHBA showed similar behavior for on DMPC and POPC, with the decay times obtained from the dipole rotational autocorrelation curve comparable to experimental time-resolved

fluorescence anisotropy data. For the DPH in POPC, the results indicated that the probe is aligned parallel to the membrane surface and is much more free to move when compared to simulations in DMPC, where the probe is aligned parallel to the tails of the phospholipids, and had a greater restriction for their movement. The rotational correlation times of their dipole in POPC showed good agreement with those obtained experimentally. On the other hand, the results in DMPC, showed that it needs more time of simulation for comparison between the theoretical and experimental rotational correlation, because it a more compressed system. In any way, the results indicate that MD is a promising technique for modeling the rotational dynamics of molecules in membranes.

Key-words: 1. Fluorescent Probes. 2. Molecular Dynamics. 3. Anisotropy.

LISTA DE FIGURAS

1.1	Representação em 3D da molécula de o-Abz.	4
1.2	Representação em 3D da molécula de AHBA.	5
1.3	Representação em 3D da molécula de DPH.	6
1.4	Difenilpolienos em 2D.	6
1.5	Rotações do dipolo do DPH.	7
1.6	Representação 3D da molécula de DIOX ($C_4 O_2 H_8$).	8
1.7	Representação 3D da molécula de água.(Adaptado de Wikipedia:Water)	9
1.8	Esquema representativo das estruturas formadoras da membrana celular. (Adaptado de Wikipedia:Cell Membrane)	10
1.9	Estrutura base de um fosfolipídio.	11
1.10	Representação em 2D da molécula de POPC.	12
1.11	Representação em 2D da molécula de DMPC.	12
2.1	Representação das oscilações das ligações, ângulos e diedros e das interações entre átomos não ligados utilizados pelos campos de força.	17
2.2	Interações entre os átomos não ligados tratados pela Eq.2.21 (Lennard-Jones).	20
2.3	Replicação da caixa de simulação em duas dimensões em função da Condição Periódica de Contorno (PBC) aplicada.	20
2.4	Lei de Lambert-Beer.	24
2.5	Diagrama de Jablonski.	25
2.6	Representação do deslocamento de Stokes.	27
2.7	Representação dos campos elétrico e magnético da luz.	29
2.8	Representação do aparato para o experimento de anisotropia.	30
2.9	Representação dos dipolos de absorção e emissão no plano cartesiano.	33

2.10	Representação da rotação dos dipolos entre a absorção e a emissão dos fótons pela molécula.	34
3.1	Representação em 2D da molécula de AHBA.	36
3.2	Representação em 2D da molécula de DPH.	37
3.3	Representação 3D das membranas de POPC(a) e DMPC(b) após a equilibração.	40
3.4	Representação 2D da LUV. (aproximadamente 100 nm de diâmetro) .	44
4.1	Numeração atômica utilizada na molécula de AHBA.	47
4.2	Numeração atômica utilizada na molécula de DPH.	49
4.3	RMSD da AHBA durante as DM em solventes.	50
4.4	RMSF dos átomos pesados da AHBA durante as DM em solventes. .	51
4.5	Representação 3D da cabeça polar da sonda AHBA.	51
4.6	Representação 3D do sistema AHBA+100% Dioxano.	52
4.7	RDF dos oxigênios do DIOX em torno dos hidrogênios ligados aos nitrogênios da sonda.	52
4.8	Representação 3D do sistema AHBA+75% Dioxano.	53
4.9	RDF dos oxigênios da água e do DIOX em torno do 'H5' da sonda. .	54
4.10	RDF dos oxigênios da água e do DIOX em torno do 'H6' da sonda. .	54
4.11	RDF dos oxigênios da água e do DIOX em torno do 'H7' da sonda. .	55
4.12	RDF dos hidrogênios da água em torno do oxigênio 'O' da sonda. . .	56
4.13	Representação 3D do sistema AHBA+50% Dioxano.	56
4.14	RDF dos oxigênios da água e do DIOX em torno do 'H5' da sonda. .	57
4.15	RDF dos oxigênios da água e do DIOX em torno do 'H6' da sonda. .	57
4.16	RDF dos oxigênios da água e do DIOX em torno do 'H7' da sonda. .	58
4.17	RDF dos hidrogênios da água em torno do 'O' da sonda.	59
4.18	Representação 3D do sistema AHBA+25% Dioxano.	59
4.19	RDF dos oxigênios da água e do DIOX em torno do 'H5' da sonda. .	60
4.20	RDF dos oxigênios da água e do DIOX em torno do 'H6' da sonda. .	60
4.21	RDF dos oxigênios da água e do DIOX em torno do 'H7' da sonda. .	61
4.22	RDF dos hidrogênios da água em torno do 'O' da sonda.	61
4.23	Representação 3D do sistema AHBA+0% Dioxano.	62

4.24 RDF dos oxigênios da água em torno do 'H5', 'H6' e 'H7' e também do 'O' da sonda.	63
4.25 RDF dos oxigênios da água em torno do centro de massa da cabeça polar da AHBA.	63
4.26 RDF dos oxigênios do DIOX em torno do centro de massa da cabeça polar da AHBA.	64
4.27 RMSD do DPH nas DM em solventes.	65
4.28 Representação 3D dos átomos pesados do DPH usados no cálculo do RMSF.	66
4.29 RMSF do DPH nas DM em solventes.	66
4.30 Representação 3D do sistema DPH+0% de água.	67
4.31 RDF do DIOX em torno do DPH.	67
4.32 Representação 3D do sistema DPH+25% de água.	68
4.33 RDF do DIOX e da água em torno do DPH para a caixa com 25% de água.	68
4.34 Representação 3D do sistema DPH+50% de água.	69
4.35 RDF do DIOX e da água em torno do DPH para a caixa com 50% de água.	69
4.36 Representação 3D do sistema DPH+75% de água.	70
4.37 RDF do DIOX e da água em torno do DPH para a caixa com 75% de água.	70
4.38 Representação 3D do sistema DPH+100% de água.	71
4.39 RDF da água em torno do DPH para a caixa com 100% de água. . .	71
4.40 Comparação da RDF do DIOX em torno do DPH para todas as 5 DM.	72
4.41 Representação 3D das DM (NpT1 e NpT2) da AHBA em POPC. . .	73
4.42 EDP para as DM da sonda AHBA em POPC.	73
4.43 RMSF da sonda durante as simulações NpT1 e NpT2.	74
4.44 Numeração atômica para os átomos pesados da sonda AHBA. . . .	74
4.45 Representação dos dipolos de transição da AHBA (* Assumindo que os dipolos de absorção ($S_0 \rightarrow S_1$) e emissão ($S_1 \rightarrow S_0$) são colineares).	75
4.46 Distribuição do ângulo entre o dipolo de transição e a normal da membrana.	76

4.47	RDF da água em torno dos átomos 'O', 'H5' e 'H7' da AHBA.	77
4.48	Histograma do número de LH durante as DM.	77
4.49	Média da autocorrelação rotacional do dipolo da AHBA nas DM NpT1 e NpT2 em POPC.	78
4.50	Anisotropia de fluorescência da AHBA em POPC.	79
4.51	Representação 3D das DM (NpT1 e NpT2) da AHBA em DMPC. . .	80
4.52	EDP para as DM da sonda AHBA em DMPC.	80
4.53	RMSF da AHBA durante as simulações NpT1 e NpT2.	81
4.54	Distribuição do ângulo entre o dipolo de transição e a normal da membrana de DMPC.	82
4.55	RDF da água em torno dos átomos 'O', 'H5' e 'H7' da AHBA.	83
4.56	Histograma do número de LH durante as DM.	83
4.57	Média da autocorrelação rotacional do dipolo da AHBA nas DM NpT1 e NpT2 em DMPC.	84
4.58	Anisotropia de fluorescência da AHBA em DMPC.	84
4.59	Representação 3D das DM (NpT1 e NpT2) do DPH em POPC. . . .	85
4.60	EDP para as DM da sonda DPH em POPC.	86
4.61	Numeração dos átomos pesados do DPH usados no cálculo do RMSF.	86
4.62	RMSF da DPH durante as simulações NpT1 e NpT2.	87
4.63	Representação dos dipolos de transição sobre o eixo principal do DPH (* Assumindo que os dipolos de absorção ($S_0 \rightarrow S_1$) e emissão $S_1 (\rightarrow S_0)$ são colineares).	87
4.64	Distribuição do ângulo entre o dipolo de transição e a normal da membrana de POPC.	88
4.65	Evolução temporal da coordenada 'z' dos carbonos 2 e 10 do DPH durante as DM.	89
4.66	Projeção das coordenadas 'x' e 'y' no plano $z=0$ para os carbonos 2 e 10 do DPH.	90
4.67	Média da autocorrelação rotacional do dipolo do DPH nas DM NpT1 e NpT2 em POPC.	91
4.68	Anisotropia de fluorescência do DPH em POPC.	92
4.69	Representação 3D das DM (NpT1 e NpT2) do DPH em DMPC. . . .	93

4.70	EDP para as DM da sonda DPH em DMPC.	93
4.71	RMSF da DPH em DMPC durante as simulações NpT1 e NpT2. . . .	94
4.72	Distribuição do ângulo entre o dipolo de transição e a normal da membrana de DMPC.	95
4.73	Evolução temporal da coordenada 'z' dos carbonos 2 e 10 do DPH durante as DM.	96
4.74	Projeção das coordenadas 'x' e 'y' no plano z=0 para os carbonos 2 e 10 do DPH.	96
4.75	Autocorrelação rotacional do dipolo do DPH nas DM NpT1 e NpT2 e a média em DMPC.	97
4.76	Média da autocorrelação rotacional do dipolo do DPH nas DM NpT1 e NpT2 em DMPC.	98
4.77	Anisotropia de fluorescência do DPH em POPC.	99

LISTA DE TABELAS

3.1	Tipos atômicos presentes na cabeça polar da sonda AHBA.	36
3.2	Tipos atômicos presentes na ligação peptídica da sonda AHBA. . . .	37
3.3	Tipos atômicos presentes na cauda apolar da sonda AHBA.	37
3.4	Tipos atômicos presentes na sonda apolar DPH.	38
3.5	Nomenclatura e representação das cadeias alifática dos lipídios de acordo com seu tamanho.	39
3.6	Caixas de solventes utilizadas na DM das sondas DPH e AHBA. . . .	42
4.1	Cargas Parciais Atômicas da AHBA.	48
4.2	Cargas Parciais Atômicas do DPH.	49
4.3	Valores obtidos para os ajustes da curvas de autocorrelação rotacional (figura 4.49) e anisotropia (figura 4.50) para a AHBA em POPC. . .	79
4.4	Valores obtidos para os ajustes da curvas de autocorrelação rotacional (figura 4.57) e anisotropia (figura 4.58) para a AHBA em DMPC. . .	85
4.5	Valores obtidos para os ajustes da curvas de autocorrelação rotacional (figura 4.67) e anisotropia (figura 4.68) para o DPH em POPC. . . .	92
4.6	Valores obtidos para os ajustes da curvas de autocorrelação rotacional (figura 4.76) e anisotropia (figura 4.77) para o DPH em DMPC. . . .	99
5.1	Valores obtidos para os ajustes das curvas de autocorrelação rotacional para a AHBA em POPC e em DMPC.	104
5.2	Valores obtidos para os ajustes das curvas de anisotropia de fluorescência para a AHBA em POPC e em DMPC.	104

LISTA DE ABREVIATURAS

DM	Dinâmica Molecular (<i>Molecular Dynamics</i>).
MC	Monte Carlo (<i>Monte Carlo</i>).
CQ	Cálculos Quânticos (<i>Quantum Calculations</i>).
DIOX	1,4-dioxano (<i>1,4-dioxane</i>).
AHBA	2-Amino-N-hexadecil-benzamida (<i>2-amino-N-hexadecyl-benzamide</i>).
DPH	1,6-Difenil-1,3,5-hexatrieno (<i>1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene</i>).
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina (<i>1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>).
DMPC	1,2-dimiristoil-sn-glicerol-3-fosfocolina (<i>1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>).
RMSD	Desvio Quadrático Médio (<i>Root Mean Square Deviation</i>).
RMSF	Flutuação Quadrática Média (<i>Root Mean Square Flutuation</i>).
o-Abz	Ácido ortho-aminobenzoico (<i>2-aminobenzoic acid</i>).
EDDnp	N-[2,4-dinitrofenil]-etileno-diamina (<i>N-[2,4-dinitrofenil]-ethylenediamine</i>).
MSH	Hormônio Estimulante de Melanócitos (<i>Melanocyte-Stimulating Hormone</i>).
FRET	Energia por Ressonância de Förster (<i>Förster Resonance Energy Transfer</i>).

SDS	Dodecil Sulfato de Sódio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>).
CTAB	Brometo hexadeciltrimetilamônio (<i>Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i>).
HPS	3-(N-hexadecil-N,N-dimetilammonio)-propano-sulfonato (<i>3-(N-hexadecyl-N,N-dimethyl-ammonio)-propanesulfonate</i>).
DPS	3-(N,N-dimetildodecil)-ammonio-propano-sulfonato (<i>3-(N,N-dimethyl dodecyl)-ammonium-propanesulfonate</i>).
NAMD	<i>Not (just) Another Molecular Dynamics Program.</i>
CHARMM	<i>Chemistry at HARvard Molecular Mechanics.</i>
PBC	Condição Periódica de Contorno (<i>Periodic Boundary Conditions</i>).
EDP	Perfis de Densidade Eletrônica (<i>Electron Density Profile</i>).
RDF	Distribuição Radial entre Pares (<i>Radial Distribution Function</i>).

SUMÁRIO

Lista de Figuras	xvii
Lista de Tabelas	xxiii
Lista de Abreviaturas	xxv
1 Introdução	1
1.1 Absorção óptica e Fluorescência	1
1.2 Dinâmica Molecular	2
1.3 Sondas Fluorescentes	3
1.3.1 AHBA	3
1.3.2 DPH	5
1.4 Ambientes	8
1.4.1 Solventes	8
1.4.1.1 1,4-Dioxano	8
1.4.1.2 Água	9
1.4.2 Membranas Biológicas	9
2 Bases Teóricas	13
2.1 Simulações Computacionais	13
2.1.1 Dinâmica Molecular	13
2.1.1.1 O algoritmo de <i>Velocity</i> -Verlet	15
2.1.2 Potenciais de Interação Clássicos	16
2.1.2.1 Condição Periódica de Contorno e Interações de Longo Alcance	20
2.1.2.2 Parâmetros de um Campo de Forças	22

2.2	Interação da Luz com a Matéria	23
2.2.1	Fluorescência	26
2.2.1.1	Rendimento Quântico ($\phi_{fl}(\lambda)$)	27
2.2.1.2	Tempo de Vida (τ)	27
2.2.2	Resolução Temporal na Fluorescência	27
2.2.3	Anisotropia de Fluorescência	29
2.2.3.1	Resolução Temporal na Anisotropia	31
2.2.3.2	Anisotropia e Dipolo de Emissão	31
2.2.3.3	Rotação Livre do Dipolo de Transição	34
3	Metodologia	35
3.1	Simulações Computacionais	35
3.1.1	Parametrização das sondas	35
3.1.1.1	AHBA	35
3.1.1.2	DPH	37
3.1.2	Cargas Parciais das Sondas	38
3.1.3	Solventes e Membranas	38
3.2	Dinâmica Molecular em Membranas	39
3.3	Dinâmica Molecular em Solventes	42
3.4	Etapa Experimental	43
3.4.1	Equipamentos	43
3.4.2	Preparação das Amostras e Condições Experimentais	44
4	Resultados	47
4.1	Cargas Parciais	47
4.1.1	AHBA	47
4.1.2	DPH	49
4.2	Dinâmica Molecular em Solventes	50
4.2.1	AHBA	50
4.2.1.1	RMSD e RMSF	50
4.2.1.2	RDF	51
4.2.1.3	0% de H ₂ O	52
4.2.1.4	25% de H ₂ O	53

4.2.1.5	50% de H ₂ O	56
4.2.1.6	75% de H ₂ O	59
4.2.1.7	100% de H ₂ O	62
4.2.2	DPH	65
4.2.2.1	RMSD e RMSF	65
4.2.2.2	RDF	66
4.2.2.3	0% de H ₂ O	67
4.2.2.4	25% de H ₂ O	68
4.2.2.5	50% de H ₂ O	69
4.2.2.6	75% de H ₂ O	70
4.2.2.7	100% de H ₂ O	71
4.3	Dinâmica Molecular em Membranas Modelo	72
4.3.1	AHBA	73
4.3.1.1	POPC	73
4.3.1.2	DMPC	80
4.3.2	DPH	85
4.3.2.1	POPC	85
4.3.2.2	DMPC	93
5	Conclusões e Perspectivas	101
5.1	DM em Solventes	102
5.2	DM em Membranas	103
5.2.1	AHBA	103
5.2.2	DPH	105
5.3	Conclusões Gerais	106
5.4	Perspectivas para Continuidade do Trabalho	106
	Referências	109

xxx

INTRODUÇÃO

1.1 Absorção óptica e Fluorescência

Em boa parte do século passado os pesquisadores dedicaram-se muito na tentativa de compreender o funcionamento de estruturas biológicas e sua importância para a manutenção da vida, e para isso muitas pesquisas foram realizadas e diversas técnicas foram desenvolvidas. Atualmente as espectroscopias de absorção óptica e fluorescência são ferramentas eficientes em estudo de propriedades destes sistemas [1, 2, 3].

Trabalhos envolvendo este tipo de espectroscopia podem ser encontrados facilmente na literatura, as aplicações no estudo do fluxo iônico [3], em homotransferência de energia por ressonância [4], monitoramento de modificações estruturais provenientes de interações entre proteína e hemoglobina [5], em trabalhos sobre estrutura de peptídeos e proteínas e cinética enzimática [3, 6, 7], ação de enzimas proteolíticas [8] e análise de interação de complexos fármaco-bio-receptor [9], dentre outras.

As técnicas espectroscópicas se estendem a estudos de membranas, e neste caso são encontrados trabalhos sobre estados de agregação de componentes da superfície celular e dinâmica de lipídios na superfície de membranas [10, 11, 12], análise de microdomínios e formação de *rafts* [13, 14], interação entre peptídeos e membranas [15, 16], quantificação e controle da orientação de polímeros ancorados em membranas utilizando microscopia de fluorescência [17], dentre outros.

Com espectrofluorímetros de estado estacionário, pode-se obter a posição espectral e a intensidade de fluorescência, e com a utilização de polarizadores, dados

sobre a despolarização da emissão são coletadas. Além disso, muitas informações relevantes estão associadas ao tempo característico (10^{-9} s) dos processos de absorção e emissão fluorescente e, com a utilização de técnicas que permitem a resolução temporal, é possível observar eventos relacionados à interação da molécula emissora com o ambiente. Desse modo, as técnicas de fluorescência estática combinadas com as técnicas resolvidas no tempo são particularmente atraentes para o estudo de diversos fenômenos relacionados às propriedades dinâmicas de sistemas biológicos.

Para estes experimentos são utilizados modelos de membranas formadas por uma bicamada de moléculas anfifílicas, esta é uma alternativa para a mimetização de uma membrana biológica, pois pode-se ter o controle das estruturas envolvidas e do tamanho médio das vesículas formadas. Nestes experimentos há a necessidade da presença de moléculas que absorvam e/ou emitam radiação na região do UV-visível e além de interagir com diferentes regiões da membrana [18], estas moléculas, chamadas de sondas lipofílicas, podem estar ligadas [19, 20, 21, 22] ou não [23, 24] à algum lipídio, e em muitos casos há a necessidade de utilização de duas ou mais sondas para que a caracterização se torne mais completa.

1.2 Dinâmica Molecular

Outra técnica cada vez mais importante para área de Biofísica Molecular é a simulação computacional e com o aumento do poder de processamento dos computadores e desenvolvimento de novas técnicas e programas capazes de reproduzir com qualidade as propriedades de moléculas biológicas, tem se tornado cada vez mais frequente nas pesquisas desenvolvidas em biofísica [21, 22, 25], destacando-se a Dinâmica Molecular (DM), o Monte Carlo (MC) e os Cálculos Quânticos (CQ).

As técnicas de DM e MC podem ser aplicadas a um número consideravelmente grande de átomos (centenas de milhares) e com elas pode-se obter informações das propriedades conformacionais, termodinâmicas (DM e MC) e dependentes do tempo (DM) destes sistemas.

Para realização da DM, as interação entre os átomos (tamanho e ângulo de ligação, diedros, interações eletrostáticas) são definidas por parâmetros obtidos

a partir de CQ ou de experimentos que são utilizados pelas equações (Campo de Força) para fazer a evolução temporal das posições, velocidades e forças em cada átomo.

A DM é uma técnica que pode ser aplicada a diversos sistemas para estudo de propriedades biológicas, desde simulações envolvendo pequenas moléculas [26, 27] até estudos de enovelamento de proteínas [28, 29, 30] e canais iônicos [31]. Em particular encontra-se muitos trabalhos envolvendo DM de membranas modelo, por exemplo, simulações de proteínas transmembrana para avaliação da sua estrutura secundária e modificações estruturais nos lipídios [32], além de trabalhos sobre interação de esteróis com membranas [33, 34, 35] e análise das fases gel e líquido cristalina de bicamadas insaturadas e saturadas [36].

Neste trabalho, são apresentados os resultados de propriedades estruturais das sondas 2-Amino-N-hexadecil-benzamida (AHBA) e 1,6-Difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) em membrana de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina (POPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicerol-3-fosfocolina (DMPC), e misturas entre água e 1,4-dioxano (DIOX) em 5 proporções diferentes. Os resultados apresentados incluem, anisotropia de fluorescência estática e com resolução temporal e autocorrelação rotacional das sondas nestes ambientes, formação de ligação de hidrogênio (LH), desvio quadrático médio *Root Mean Square Deviation* (RMSD) e flutuação quadrática média *Root Mean Square Flutuation* (RMSF) das sondas e dos lipídios e espectros de absorção e fluorescência experimentais. Os resultados experimentais serão comparados aos resultados teóricos obtidos a partir de técnicas de simulações computacionais como DM e CQ *Ab-Initio*.

1.3 Sondas Fluorescentes

1.3.1 AHBA

O ácido ortho-aminobenzoico (o-Abz, figura 1.1), conhecido também como ácido antranílico é uma sonda fluorescente usada frequentemente em estudos de peptídeos. Tem uma estrutura comparável à de amino-ácidos naturais e pode ser ligada ao grupo N^α-amino de peptídeos sem mudanças significativas em suas propriedades espectroscópicas [37]. Peptídeos fluorogênicos

com supressão interna contendo o-Abz têm sido usados como substratos eficientes em ensaios de enzimas proteolíticas, formando par com o grupo aceitador N-[2,4-dinitrofenil]-etileno-diamina(EDDnp) [38].

Figura 1.1: Representação em 3D da molécula de o-Abz.

Propriedades conformacionais de peptídeos derivados de bradicinina [39], peptídeos que interagem com heparina [40] e análogos de hormônio estimulante de melanócitos (MSH) [41] contendo o par Abz-EDDnp foram estudados usando técnicas baseadas na transferência de energia por ressonância de Förster (FRET).

As propriedades espectroscópicas fundamentais do o-Abz e derivados foram obtidas em vários solventes orgânicos e verificou-se que mudanças na absorção e na emissão refletem mudanças na estrutura eletrônica do fluoróforo, que têm origem em interações gerais e específicas com o solvente [42, 43]. Assim como em outros fluoróforos, a emissão do o-Abz depende da polaridade do meio, o que permite que a molécula seja usada como sonda para monitorar a interação entre peptídeos e membranas modelo [44].

Recentemente uma nova sonda lipofílica baseada na estrutura do o-Abz foi sintetizada, a AHBA (figura 1.2) foi construída ligando-se, ao o-Abz, uma estrutura chamada de hexadecilamida, formando uma cadeia alquila com propriedades fluorescentes. Resultados de fluorescência e absorção óptica mostraram que o composto é solúvel em solventes como etanol e formando agregados em meio aquoso devido à baixa solubilidade em água.

Dados como deslocamento espectral, intensidade, tempo de vida, anisotropia estática e resolvida no tempo mostraram que na presença de surfactantes e fosfolipídios os agregados formados na água se rompem e a sonda insere-se nas

regiões hidrofóbicas de micelas de *Sodium dodecyl sulfate* (SDS), *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB), 3-(N-hexadecil-N,N-dimetilammonio)-propanosulfonato (HPS) e 3-(N,N-dimetildodecil)-ammoniopropanosulfonato (DPS), bem como vesículas de DMPC [45].

Mostrou-se também que a sonda é capaz de monitorar transições entre fases gel e líquido-cristalina de vesículas e, dada à sensibilidade ao pH do meio, pode também auxiliar na determinação do potencial elétrico da superfície de agregados micelares e vesículas [16].

Figura 1.2: Representação em 3D da molécula de AHBA.

Apesar do conjunto de dados já obtidos, permanece em aberto a questão da localização e da mobilidade da sonda incorporada em micelas e vesículas. Essa informação é relevante quando se pretende usar a sonda para monitorar alterações provocadas em membranas por compostos cuja ação biológica envolve interações locais no ambiente da bicamada.

Por esse motivo, o uso de técnicas de DM torna-se uma ferramenta muito importante, pois a partir dela é possível obter informações, em nível molecular, de solvatação, formação de ligações de hidrogênio além de modificações conformacionais provocadas pela interação com o ambiente e de maneira indireta, a distribuição do dipolo de transição durante a simulação.

1.3.2 DPH

O DPH (figura 1.3), é um hidrocarboneto fluorescente usado para monitorar membranas biológicas que apesar de não ter emissão em água, apresenta uma alta intensidade de fluorescência quando localizada em membranas lipídicas. Ele

Figura 1.3: Representação em 3D da molécula de DPH.

é comumente utilizado para monitoramento de micro-viscosidade e polaridade do ambiente devido ao fato de ser apolar e apresentar uma cadeia alongada, que facilita a inserção entre os lipídios [46, 47]. Durante medições experimentais, as propriedades espectroscópicas deste composto estão associadas ao ambiente em que se localiza e informações significativas sobre estes sistemas podem ser obtidas. [3]

1,2-difenileteno - (TS)

1,4-difenil-1,3-butadieno - (DPB)

1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno - (DPH)

Figura 1.4: Difenilpolienos em 2D.

Mesmo imersa entre os lipídios, esta sonda apresenta exposição à água [47] e essa característica pode afetar de maneira significativa as suas propriedades ópticas, podendo facilmente levar a interpretações equivocadas. Alguns trabalhos relacionados a estrutura eletrônica dos compostos derivados difenilpolienos são encontrados na literatura e, em geral, trazem informações a respeito da absorção e da fluorescência destes compostos em solventes orgânicos. Além disso, sabe-se que

o aumento das conjugações entre os anéis fenílicos (figura 1.4) desloca a absorção óptica para maiores comprimentos de onda.

O dipolo de transição para a sonda DPH está localizado sobre seu eixo principal (conjugação- π entre os anéis, figura 1.4) [48] e saber sua orientação é importante, pois ao decaimento da anisotropia de um fluoróforo qualquer, está associada a mobilidade dos seus momentos de transição no ambiente em que se localiza.

Discussões acerca da despolarização de emissão da molécula de DPH são amplamente encontradas e, segundo a literatura, quando está livre em solução e não apresenta restrições de movimento, pode rotacionar em torno dos seus três eixos, porém, quando esta rotação é em torno do seu eixo principal ($D_{//}$, figura 1.5), não existe decréscimo na anisotropia porque os dipolos de transição não se deslocam.

Figura 1.5: Rotações do dipolo do DPH.

Seguindo a mesma ideia, pode-se perceber que as duas outras rotações ($D_{\perp}$, figura 1.5) contribuem para o decaimento da anisotropia da sonda, pois ambas provocam o deslocamento dos dipolos de transição da sua posição inicial.

Em miméticos de membranas, além das rotações em torno do eixo perpendicular ao eixo principal da molécula ($D_{\perp}$, figura 1.5) surge um outro movimento característico, chamado de 'wobbling-in-a-cone' (D_{Δ} , figura 1.5) [49], e juntamente com a rotação perpendicular ao eixo principal do DPH são os

responsáveis pelo deslocamento do seu dipolo de transição eletrônica e o consequente decaimento da anisotropia com perfil bi-exponencial.

Porém, ainda não está clara a natureza dos movimentos que provocam este decaimento bi-exponencial e permanece em aberto a questão da orientação e localização da sonda em relação ao eixo normal à bicamada. Neste sentido, o uso das técnicas de DM também podem auxiliar a obter informações, em nível molecular, de solvatação, ligações de hidrogênio, modificações conformacionais provenientes das interações com o ambiente e sobre o alinhamento da molécula quando está encaixada entre as caudas dos lipídios.

1.4 Ambientes

1.4.1 Solventes

Simulações e experimentos em solventes também foram realizados, teve por objetivo verificar a influência da quantidade de solvente orgânico DIOX em mistura com a água. Existem muitos trabalhos na literatura envolvendo a mistura entre estes dois solventes e algumas características importantes do DIOX fazem com que seu comportamento na presença de água seja bastante estudado.

1.4.1.1 1,4-Dioxano

Figura 1.6: Representação 3D da molécula de DIOX ($C_4O_2H_8$).

Esta molécula é um composto orgânico heterocíclico (figura 1.6), classificado como um éter e com outros dois isômeros mais raros (1,2-Dioxano e 1,3-Dioxano). Com caráter higroscópico, ela é miscível em água e por apresentar oxigênio em sua estrutura, ela é capaz de formar ligações de hidrogênio, apresenta uma baixa constante dielétrica (2.25) e quando misturada com a água este valor aumenta de acordo com a sua porcentagem na mistura. [50]

1.4.1.2 Água

Figura 1.7: Representação 3D da molécula de água. (Adaptado de Wikipedia: Water)

A água (H₂O) é uma molécula composta por oxigênio e hidrogênio e por isso é doadora e aceitadora de ligação de hidrogênio (figura 1.7), é comumente utilizada como solvente ou reagente em laboratório e quando os experimentos envolvem reações inorgânicas, a água é um solvente comum e solubiliza muito bem compostos iônicos e polares. Alguns compostos não se misturam com ela (hidrofóbicos) e essa propriedade é fundamental, como por exemplo, para a manutenção da estrutura de membranas e proteínas, no controle da interação entre os meios intra e extra-celulares.

1.4.2 Membranas Biológicas

As membranas biológicas (figura 1.8) desempenham um papel chave nos organismos vivos por criar um compartimento para células, separando o citoplasma e as organelas celulares do meio extracelular, além de serem responsáveis pela sua diferenciação. São sistemas muito complexos devido à diversidade de proteínas,

esteróis e lipídios que estão presentes em diferentes proporções em cada célula e organela e pode-se dizer que os fosfolipídios constituem a base estrutural destas bicamadas.

Figura 1.8: Esquema representativo das estruturas formadoras da membrana celular. (Adaptado de Wikipedia:Cell Membrane)

Algumas propriedades desta estrutura lhe concedem características únicas: apesar de serem eficientes na separação entre diferentes ambientes e servirem muito bem como barreiras interfaciais, elas apresentam uma estrutura bem flexível, e muitas vezes descrita como um líquido bidimensional, permitindo que outras estruturas se acoplem a ela. A estruturação da membrana celular em bicamadas é ocasionada principalmente pela presença dos fosfolipídios anfipáticos que se agrupam, voltando suas caudas hidrofóbicas uma para as outras e expondo as cabeças polares hidrofílicas para o a água, e este equilíbrio hidrofóbico, concede estabilidade às bicamadas.

Seymour Jonathan Singer e Nicolson Garth, em 1972, propuseram o modelo de mosaico fluido, mostrando que, em condições fisiológicas, no estado líquido-cristalino a membrana é melhor representada por um líquido bidimensional onde os lipídios e as proteínas podem se difundir mais ou menos facilmente [51].

A dinâmica em membranas podem ser caracterizadas em escala molecular pelas movimentações de rotação e vibração de grupos moleculares além das difusões de lipídios e proteínas. Já em escala macroscópica, a membrana apresenta flutuações fora do seu plano, que são responsáveis pela deformação das células e suas organelas. É atribuída a flexibilidade das membranas, as habilidades das células se fundirem e se dividirem quando necessário.

Figura 1.9: Estrutura base de um fosfolípido.

Os lipídios se dividem em quatro principais grupos: fosfolipídios, esfingolipídios, glicolipídios e esteróis. Os fosfolipídios, já mencionados anteriormente, são derivados do grupo glicerol, e suas cadeias alifáticas (R^1 e R^2) na figura 1.9 podem ser saturadas ou insaturadas e geralmente apresentam de 10 à 28 carbonos. A nomenclatura de um fosfolípido é dada pelos tamanhos das cadeias alifática e pelo grupo ligado na 'posição X' no fosfato. (figura 1.9) [52]

A molécula de POPC (figura 1.10) consiste em um grupo colina ligado ao fosfato, uma cauda C_{16} insaturada e outra C_{18} saturada e, devido a esta insaturação, as membranas formadas por POPC apresentam temperatura de transição de fase abaixo da temperatura ambiente ($T_T = -4^\circ\text{C}$) e por esse motivo encontra-se na fase líquido-cristalina em meio fisiológico. As membranas de POPC estão presentes na maioria das células eucarióticas e são comumente usadas em estudos de formação de *rafts* em membranas.

Figura 1.10: Representação em 2D da molécula de POPC.

Para comparação com os resultados obtidos com lipídios saturados (POPC), foi escolhido uma membrana formada por um lipídio sem saturação, o DMPC (figura 1.11) consiste em um grupo colina ligado ao fosfato e duas caudas C_{14} insaturadas, eles apresentam temperatura de transição de fase abaixo da fisiológica ($T_T = 23^\circ\text{C}$), encontrando-se também na fase líquido-cristalina à 36°C .

Figura 1.11: Representação em 2D da molécula de DMPC.

A complexidade destes sistemas reais é muito alta, por isso, o uso de membranas modelo tem sido uma ferramenta muito útil, tanto do ponto de vista teórico quanto experimental, sendo possível obter informações sobre a função dos componentes individualmente, como lipídios puros, misturas de lipídios, misturas reconstituídas de lipídio-proteína, lipídios-fármaco, etc.

BASES TEÓRICAS

2.1 Simulações Computacionais

Quase todos os aspectos da vida foram projetados no nível molecular, e sem compreender as moléculas, só podemos ter um conhecimento muito superficial da própria vida.

Francis Crick - 1988

2.1.1 Dinâmica Molecular

Na década de 50, Alder e Wainwright introduziram o conceito de dinâmica molecular [53] estudando interações entre esferas rígidas, objetivando contribuir nas análises de mecânica estatística para líquidos simples. Algum tempo depois, a técnica avançou com a introdução de potenciais realísticos contínuos para simular argônio líquido [54] e água [55].

Como já foi dito no capítulo 1, as simulações por DM ocupam um papel muito importante nos estudos de sistemas biológicos. Apesar disso, sabe-se que para uma descrição quantitativa precisa, seria necessário introduzir conceitos de mecânica quântica às simulações por DM, porém, devido ao seu alto custo computacional, a maioria dos problemas na modelagem molecular são inviáveis de serem tratados desta forma por serem sistemas de muitas moléculas interagentes ou moléculas muito grandes, além de levar em consideração os orbitais moleculares, que tornaria os resultados muito mais confiáveis, porém o cálculo muito mais demorado. [56, 57].

Quando não se pode utilizar as técnicas baseadas em mecânica quântica, a DM se torna uma ferramenta bastante eficiente, onde a carga total de uma molécula é tratada como a soma de cargas parciais dos átomos representados por esferas com massa atômica e submetidos a um conjunto de potenciais (seção 2.1.2). Por estes motivos, a DM clássica se torna aproximada, no entanto, mesmo com a utilização de parâmetros para os potenciais através do campo de força, os resultados apresentam boa concordância com resultados experimentais.

Em simulações por DM clássica, o sistema é descrito por partículas interagentes entre si através de forças descritas de forma analítica, sendo seu movimento regido pelas leis de Newton da mecânica clássica [57, 58]. A descrição microscópica deste sistema pode ser em termos das posições e momentos das partículas que o constituem, assim sendo, é possível escrever o Hamiltoniano H de um sistema molecular clássico como uma soma de termos cinético e potencial, utilizando as séries de momentos generalizados p_i de todos os N átomos do sistema com coordenadas generalizadas q_i :

$$H = \sum_i K_{p_i} + \sum_{i,j} U_{q_i,p_i} \quad (2.1)$$

A energia potencial U_{q_i,q_j} leva em consideração as interações inter e intramoleculares, de curto e longo alcance.

Tratando as coordenadas q_i cartesianas como coordenadas de posição r_i , e p_i os seus respectivos momentos conjugados, a energia cinética do sistema pode ser escrita como:

$$K = \sum_i^N \left(\frac{p_i^2}{2m_i} \right) \quad (2.2)$$

onde m_i é a massa do elemento i .

A partir do Hamiltoniano (Eq. 2.1) é possível construir as equações de movimento para evolução temporal do sistema, além de suas propriedades e a como a energia potencial não depende das velocidades e a energia cinética não depende das posições, as equações de movimento são dadas por:

$$\dot{q}_i = \frac{\delta H}{\delta p_i} \quad (2.3)$$

$$\dot{p}_i = \frac{\delta H}{\delta q_i} \quad (2.4)$$

Na DM, ao utilizarmos resoluções numéricas para as equações do movimento e integrarmos passo a passo no tempo, obtêm-se as energias e trajetórias para os átomos com a possibilidade de obter várias outras propriedades para todo o sistema.

$$\ddot{r}_i(t) = \frac{F(r)}{m} \quad (2.5)$$

Os principais algoritmos utilizados atualmente nas simulações são o algoritmo de Verlet [59] e o *Velocity*-Verlet [59, 60] também chamado de *leapfrog*. O NAMD (*Not (just) Another Molecular Dynamics program*) [61] tem implementado em seu código o *leapfrog*.

2.1.1.1 O algoritmo de *Velocity*-Verlet

Na mecânica clássica, a equação de movimento é uma equação diferencial de segunda ordem (Eq. 2.5) que pode ser reduzida a duas equações de primeira ordem (Eq. 2.6, 2.7). Elas são:

$$\dot{r}_i(t) = v(t) \quad (2.6)$$

e

$$\dot{v}_i(t) = \frac{F(r)}{m} \quad (2.7)$$

Um algoritmo de diferenças finitas pode ser montado utilizando a expansão de Taylor da função posição.

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t \dot{r}(t) + \frac{\Delta t^2}{2} \ddot{r}(t) + \Omega(\Delta t^3) \quad (2.8)$$

Substituindo $v(t)$ no lugar de $\dot{r}$ e utilizando a 2ª Lei de Newton, pode-se truncar a série na segunda ordem e obter a seguinte equação:

$$r_{i+1}(t + \Delta t) = r_i(t) + \Delta t v(t) + \frac{\Delta t^2}{2} \frac{F(r(t))}{m} \quad (2.9)$$

Já a velocidade, no instante $t + \delta t$, é computada pela média das acelerações nos instantes $t + \delta t$:

$$v_{i+1}(t + \Delta t) = v_i(t) + \frac{\Delta t}{2} \frac{F(r(t))}{m} + \frac{\Delta t}{2} \frac{F(r(t + \Delta t))}{m} \quad (2.10)$$

Este tipo de algoritmo fornece a solução das equações de movimento, que podem ser separadas em três equações básicas.

$$v_{i+\frac{1}{2}} = v_i + \frac{\Delta t}{2} \frac{F(r_i)}{m} \quad (2.11)$$

$$r_{i+1} = r_i + v_{i+\frac{1}{2}} \Delta t \quad (2.12)$$

$$v_{i+1} = v_{i+\frac{1}{2}} + \frac{\Delta t}{2} \frac{F(r_{i+1})}{m} \quad (2.13)$$

Desta maneira, pela Eq. 2.11, são calculadas as velocidades para um 'meio passo' de integração ($i + \frac{1}{2}$) usando as forças e velocidades do passo anterior (i).

Isso já é suficiente para se calcular a posição no passo seguinte ($i + 1$) através da Eq. 2.12 e a partir deste passo já são conhecidas as forças para o passo $i + 1$ sendo que possível a atualização da velocidade para este passo pela Eq. 2.13.

A vantagem deste método é que requer menos memória para efetuar os cálculos, pois só um conjunto de forças, velocidade e posições são calculados para um tempo qualquer. O *Velocity-Verlet* é considerado um aprimoramento ao algoritmo Verlet, pois as velocidades são calculadas com maior precisão e menos vetores são armazenados.

2.1.2 Potenciais de Interação Clássicos

Na DM, as interações são modeladas por um potencial efetivo que pode ser descrito por uma soma dos Hamiltonianos clássicos de partículas ligadas (intermoleculares) e não-ligadas (intramoleculares). [58]

$$H_{Total} = H_{inter} + H_{intra} \quad (2.14)$$

O potencial intramolecular do campo de força é definido como um conjunto de equações que descrevem as interações entre átomos ligados. A energia potencial

da molécula, descrita pelo campo de força, é calculada utilizando a soma das energias referentes à alterações no tamanho das ligações, inflexão do ângulo entre três átomos e também pelas torções de ligações. Além disso, aparecem os termos referentes às interações eletrostática e de van der Waals, modelados pelos potenciais de Coulomb e Lennard Jones, que também são utilizados para descrever as interações intermoleculares. [58]

$$U_{Total} = \sum^{Lig} U_r + \sum^{Âng} U_{\theta} + \sum^{Diedrais} U_{\phi} + \sum^{Não-Lig} U_{nb} \quad (2.15)$$

onde U_r , U_{θ} e U_{ϕ} são as energias de ligação, ângulo, diedrais e U_{nb} para interações de átomos não ligados.

Existe na literatura diferentes campos de força comumente utilizados e, dentre eles, destacam-se: GROMOS [62, 63], OPLS [64], AMBER [65] e CHARMM [66, 67] para biomoléculas, além dos campos de forças para polímeros COMPASS [68, 69, 70] e para as moléculas inorgânicas como o Dreiding [71, 70] e o UFF [72, 73].

Figura 2.1: Representação das oscilações das ligações, ângulos e diedros e das interações entre átomos não ligados utilizados pelos campos de força.

Para o *Chemistry at HARvard Molecular Mechanics* (CHARMM) , utilizado neste trabalho, para o movimento de oscilação das ligações (figura 2.1) assim como na maioria dos campos de força, adota uma função harmônica que descreve a energia associada ao desvio da distância r entre dois átomos ligados covalentemente da distância de equilíbrio r_{eq} , sendo que, para os átomos de uma molécula o potencial do estiramento é dado pelo somatório da Eq.2.16 sobre todas as ligações.

$$U_r = \sum_{Lig} K_r (r - r_{eq})^2 \quad (2.16)$$

onde K_r é a constante de força do estiramento que descreve a deformação, r é o comprimento da ligação entre dois átomos 1 e 2, r_{eq} é o comprimento de equilíbrio.

As deformações angulares entre três átomos (figura 2.1) ligados covalentemente de seus valores de equilíbrio também são normalmente descritas usando um potencial harmônico:

$$U_\theta = \sum_{\hat{Ang}} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 \quad (2.17)$$

onde θ é o ângulo formado pelos átomos 1, 2, 3, K_θ é a constante de força da abertura angular e θ_{eq} o valor de equilíbrio do ângulo da ligação (figura 2.1).

Os potenciais de torção representam de forma explícita a torção própria das ligações covalentes entre dois átomos (figura 2.1). Para um conjunto de átomos 1, 2, 3, 4, o potencial próprio de rotação (diedro próprio) pode ser expresso por:

$$U_\chi = \sum_{Diedrais} K_\chi [1 + \cos(n\chi - \delta)] \quad (2.18)$$

onde K_χ é a constante que define a barreira rotacional, n é o número de mínimos para a rotação de uma ligação química específica, χ é o ângulo torcional para a ligação central e δ é a fase no ângulo diedral.

O CHARMM utiliza mais duas funções harmônicas para alguns tipos atômico.

O potencial para diedro impróprio, que é responsável por manter grupos planos no plano (por exemplo, anéis aromáticos) ou para prevenir que moléculas

deformem-se em suas imagens espectrais é definido como:

$$U_{\xi} = \frac{1}{2} K_{\xi} (\xi - \xi_{eq})^2 \quad (2.19)$$

onde K_{ξ} é a constante de Hooke, ξ o ângulo entre os planos e ξ_0 é o ângulo de equilíbrio.

O potencial de Urey-Bradley, que define uma ligação virtual entre os átomos 1 e 3 da inflexão angular e trata como uma função harmônica semelhante a usada para as ligações covalentes (Eq.2.20).

$$U_{UB} = \sum_{UB} K_{UB} (\omega - \omega_{eq})^2 \quad (2.20)$$

onde K_{UB} é a constante de mola para a ligação virtual entre 1 e 3, e ω_{eq} é a distância de equilíbrio entre os átomos.

Como já mencionado, as conformações das macromoléculas no meio biológico são definidas por interações intramoleculares entre os átomos não diretamente ligados e por interações intermoleculares com os átomos vizinhos, que podem ser o solvente e/ou outras moléculas vizinhas. A maneira mais comum para se descrever a interação de van der Waals é através do potencial de Lennard-Jones:

$$U_{vdW} = 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (2.21)$$

onde ϵ_{ij} é a profundidade do potencial e σ_{ij} é o diâmetro de Lennard-Jones, com i e j representando 2 tipos de átomos.

O segundo componente da interação não ligante é o termo eletrostático. Este é normalmente calculado usando-se a carga (q) parcial dos átomos, que pode ser obtida por cálculos *ab-initio* considerando a densidade de carga no estado eletrônico fundamental. A energia potencial eletrostática é dada pela Lei de Coulomb:

$$U_{Coul} = \left(\frac{q_i q_j}{4\epsilon_0 \epsilon_r r_{ij}} \right) \quad (2.22)$$

onde q_i e q_j são as cargas parciais sobre os átomos i e j, separadas pela distância r_{ij} , ϵ_0 é a permissividade do espaço livre e ϵ_r é a constante dielétrica relativa, que corrige ϵ_0 para considerar a polarizabilidade do meio. A interação eletrostática é de longo alcance pois varia com o inverso da distância de separação entre os átomos.

Figura 2.2: Interações entre os átomos não ligados tratados pela Eq.2.21 (Lennard-Jones).

2.1.2.1 Condição Periódica de Contorno e Interações de Longo Alcance

Várias propriedades macroscópicas podem ser obtidas a partir da simulação de moléculas, porém, um número elevado de partículas faz-se necessário, contrapondo uma das limitações da DM clássica onde o sistema simulado é uma fração dos sistemas reais, ou seja, trabalha-se com um número pequeno de partículas na 'caixa de simulação', onde surge o indesejado efeito de borda.

Figura 2.3: Replicação da caixa de simulação em duas dimensões em função da Condição Periódica de Contorno (PBC) aplicada.

Uma técnica utilizada nestes casos é a aplicação de Condição Periódica de Contorno (do inglês *Periodic Boundary Conditions - PBC*), que possibilita a realização de simulações utilizando um número relativamente pequeno de partículas com os efeitos de superfície eliminados, onde as partículas que estariam 'na borda da caixa' sofrem o efeito das forças como se estivessem no interior de um sistema [56].

Utilizando um *ensemble* em que o volume da caixa é fixado (canônico ou micro-canônico, por exemplo), as dimensões são escolhidas de tal forma que a densidade numérica $\frac{N}{V}$, corresponda àquela do sistema real nas condições termodinâmicas desejadas e isto é equivalente a replicar periodicamente a caixa original em todas as direções do espaço (figura 2.3), não sendo necessário definir as coordenadas para os átomos que estão nas caixas réplicas.

No decorrer da simulação, quando um átomo se move na caixa original, sua imagem periódica, em cada uma das caixas imagens, move-se da mesma maneira, ou seja, quando um átomo sai da caixa original atravessando uma das faces da caixa, uma de suas imagens periódica entra pela face oposta com velocidade idêntica e desta forma, o número total de átomos na caixa central e no sistema como um todo, é conservado.

Ao fazer uso dessas técnicas, geram-se consequências sobre os potenciais de interação e no tratamento destas interações de curto alcance, usualmente é empregado o truncamento do potencial em um “raio de corte” esférico (*Cutoff*) representado na figura 2.3. Geralmente este raio de corte é na ordem de $\frac{A}{2}$ (A é a aresta da caixa de simulação) para evitar a interação da partícula com sua própria imagem ou com a mesma molécula duas vezes [56].

Devido ao truncamento do potencial dentro de um raio de corte, as interações eletrostáticas de longo alcance devem ser aproximadas de alguma forma e os métodos mais utilizados são os baseados em somas de Ewald, tais como PME (*Particle Mesh Ewald*) [74], SPME (*Smooth Particle-Mesh*) [75], PPPM ou P3M (*Particle-Particle-Particle-Mesh*) [76, 77], que produzem trajetórias mais estáveis. Desta forma, cada partícula interage com partículas reais ou imagens mais próximas e uma escolha adequada do raio de corte é importante para evitar gastos de recursos computacionais com cálculos de interações de partículas muito distantes, que não contribuiriam significativamente para os resultados da simulação.

2.1.2.2 Parâmetros de um Campo de Forças

O campo de força é definido não somente por suas equações, mas também é preciso especificar seus parâmetros (como as constantes para os átomos ligados: K_r , K_θ , K_ξ , K_χ , K_{UB} , n , δ nas Eq. 2.16, 2.17, 2.19, 2.18). Além disso, exige-se muita atenção nesta tarefa, pois dela depende o quão confiáveis serão os resultados obtidos a partir das simulações por DM e mesmo para pequenas modificações ou adições no conjunto de parâmetros de um campo de força, ainda não existe um protocolo específico que seja considerado 'correto'.

Em geral, os parâmetros de campos de força são ajustados para reproduzir algumas propriedades experimentais termodinâmicas, como a compressibilidade em função da pressão de gases, densidade e entalpia de vaporização além de propriedades estruturais como ligação de hidrogênio. Em sistemas no estado líquido, as interações atrativas e repulsivas entre os componentes do sistema estão relacionadas a estas propriedades e os potenciais obtidos a partir desta interações são capazes de dar informações prévias sobre várias outras propriedades do sistema.

Com a mesma finalidade, os cálculos *ab-initio* de estrutura eletrônica podem ser usados em casos onde os dados termodinâmicos experimentais são escassos, como em proteínas por exemplo. No caso do campo de força CHARMM, o conjunto de parâmetros foi desenvolvido à partir de dados experimentais e complementado com resultados de cálculos quânticos.

Em muitos casos, um mesmo conjunto de parâmetros pode ser utilizado para representar moléculas diferentes que apresentem estruturas semelhantes, não sendo necessário definir um novo conjunto de parâmetros para cada molécula [78], esta característica é conhecida como transferibilidade.

Em geral, os parâmetros de estiramento de ligação e deformação angular pouco influenciam no desempenho de um campo de força, além de serem especialmente transferíveis e também, assume-se frequentemente, que um mesmo conjunto de parâmetros de van de Walls pode ser utilizado para a maioria, senão todos, os átomos de um mesmo elemento.

Para os cálculos de potenciais não ligados é necessário o conhecimentos das cargas parciais atômicas da estrutura de interesse e elas podem ser determinadas pelo ajuste do potencial eletrostático. Além disso os parâmetros de torção são

comumente obtidos através de CQ para diferentes ângulos de torção, onde é possível ajustar o potencial do diedro (Eq. 2.18) à curva de energia obtida.

Os campos de força foram e têm sido testados e aprimorados de maneira muito minuciosa em diversos trabalhos de DM envolvendo mono e bicamadas de fosfolipídios, incluindo POPC [79, 80] e DMPC [81, 82, 83]. Para as simulações deste trabalho, foi usado o campo de força CHARMM [84, 85] para os lipídios, para a água adotou-se o modelo TIP3P que reproduz bem as propriedades estruturais e termodinâmicas encontradas experimentalmente para a água [86].

2.2 Interação da Luz com a Matéria

A luz tem um papel vital em nossas vidas: ela está envolvida na maioria de nossas atividades. Os antigos gregos já sabiam bem; sobre aqueles que 'morriam', eles diziam que 'perderam a luz'.

Louis de Broglie - 1941

De todo o espectro eletromagnético, uma pequena parte dos comprimentos de onda (λ entre 180nm e 800nm) apresenta características importantes quando interagem com a matéria e é essa faixa de radiação que provoca as transições eletrônicas em átomos ou molécula. A energia do fóton absorvido corresponde à diferença de energia entre seus estados vibrônicos¹ fundamental e excitado.

Usando a relação de Einstein, calcula-se a energia do fóton absorvido sabendo a frequência (ν) ou o comprimento de onda (λ) da radiação incidente (Eq. 2.23).

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.23)$$

onde h é a constante de Planck, c é a velocidade da luz no vácuo e λ é o comprimento de onda da radiação.

¹Termo que define o conjunto dos níveis vibracionais e eletrônicos.

Experimentalmente a absorção óptica pode ser descrita pela lei de Lambert-Beer (figura 2.4), que faz uma conexão da absorbância com as propriedades da solução.

Legenda

- $c \rightarrow$ Concentração do Soluto.
- $\epsilon \rightarrow$ Coeficiente de Absorção Molar do Soluto.

Figura 2.4: *Lei de Lambert-Beer.*

Posto isso, quando incide-se radiação sobre uma molécula em seu estado de menor energia, para que ela seja excitada, a energia do fóton incidente tem que ser igual a diferença de energia entre os seus estados eletrônico (UV-Visível), vibracional (Infra-vermelho) ou rotacional (micro-ondas). O tempo característico da absorção óptica é em torno de 10^{-15} s e quando a molécula se encontra no seu estado eletrônico excitado, ela pode perder essa energia absorvida do fóton por diferentes caminhos.

Um esquema representativo destes processos de perda de energia radiativa e não-radiativa pode ser observado na figura 2.5.

Legenda

- - - - - **CI** ➔ Conversão Interna, $S_i \rightarrow S_j$ transição não-radiativa.
- - - - - **CIS** ➔ Cruzamento Intersistemas, $S_i \rightarrow T_j$ transição não-radiativa.
- ~ ~ ~ **RV** ~ Relaxação Vibracional.

Figura 2.5: Diagrama de Jablonski.

Em seu estado excitado, a molécula pode não estar no menor nível vibracional, devido à transição vertical pelo Princípio de Franck-Codon, e como o tempo característico de relaxação por vibração é da ordem de 10^{-12} s, menor do que os tempos de vida dos estados excitados (10^{-9} s para a fluorescência e 10^{-6} s a 10^{-3} s para fosforescência), a molécula perde energia por vibração antes mesmo de emitir fótons.

A relaxação vibracional ocorre dentro de um mesmo nível eletrônico ou

mesmo entre níveis diferentes, chamada de conversão interna, e a fluorescência ocorre quando os fótons emitidos são provenientes de transições entre estados singletos.

No estado excitado há a possibilidade da inversão do momento de spin da molécula e esse processo é conhecido como cruzamento inter-sistemas (figura 2.5) que leva a molécula ao seu estado excitado tripleto, podendo perder energia por relaxação vibracional ou por fosforescência.

2.2.1 Fluorescência

A fluorescência é um processo caracterizado por 3 principais estágios:

- Absorção de um fóton com energia $\frac{hc}{\lambda}$.
- Relaxação para o menor nível vibracional que geralmente se localiza no menor estado eletrônico excitado (S_1).²
- Emissão de fótons provenientes da transição entre estados singletos.

Os fótons emitidos tem maior comprimentos de onda do que os absorvidos pela perda de energia do fluoróforo por efeitos de solvente, formação de complexos, transferências de energia e reações no estado excitado. Este deslocamento é chamado de deslocamento de Stokes e pode ser representado pela figura 2.6 e definido pela expressão da Eq. 2.24.

$$\Delta\lambda_{Stokes} = \lambda_{max.fl.} - \lambda_{max.abs.} \quad (2.24)$$

A emissão fluorescente é bastante sensível às características do ambiente, sendo que o rendimento quântico de fluorescência e o tempo de vida no estado excitado podem estar associado a fatores como:

- Polaridade do ambiente (micelas, vesículas, água, solventes orgânicos, etc).
- Proximidade de espécies supressoras de fluorescência.
- pH do ambiente.
- Temperatura.

²Existem moléculas que emitem fótons por fluorescência do segundo estado excitado(S_2), por exemplo, o aminoácido triptofano [87].

Figura 2.6: Representação do deslocamento de Stokes.

2.2.1.1 Rendimento Quântico ($\phi_{fl}(\lambda)$)

O rendimento quântico de fluorescência é a razão entre o número de fótons emitidos e absorvidos de acordo com a expressão da Eq. 2.25.

$$\phi_{fl}(\lambda) = \frac{k_{fl}}{k_{fl} + k_{nr}} \quad (2.25)$$

2.2.1.2 Tempo de Vida (τ)

O tempo de vida (Eq. 2.26) de um fluoróforo é o tempo médio que ele permanece no estado excitado antes de retornar ao seu estado fundamental.

$$\tau = \frac{1}{k_{fl} + k_{nr}} \quad (2.26)$$

onde k_{fl} é a taxa de emissão fluorescente e k_{nr} é a taxa de emissão não-radiativa (vibração).

2.2.2 Resolução Temporal na Fluorescência

Na fluorescência de estado estacionário, a radiação incide de maneira contínua na amostra, e as informações retiradas são uma média no tempo dos processos que estão ocorrendo.

Para uma descrição mais detalhada destes processos em que o fluoróforo está envolvido é necessária a utilização de uma técnica que permita a resolução temporal

das interações moleculares e uma maneira eficiente de fazer isso é excitando a amostra com pulsos curtos de luz e medindo o tempo entre a absorção e a emissão de fluorescência.

Sendo assim, considere um pulso infinitamente curto e uma quantidade inicial de fluoróforos excitados (N_0), a expressão para a taxa de decaimento desta população é dada pela Eq. 2.27.

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(k_{fl} + k_{nr})N(t) \quad (2.27)$$

Sabendo então que em $t = 0$ o número de partículas excitadas é N_0 e integrando a Eq. 2.27, a expressão para o número de partículas que decaem com o tempo pode ser escrita de acordo com a Eq. 2.28.

$$N(t) = N_0 \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right) \quad (2.28)$$

onde τ é dado pela Eq. 2.26

De maneira geral sabe-se que a intensidade de fluorescência é proporcional ao número de partículas no estado excitado, dada pela Eq. 2.29

$$I(t) = k_{fl}N(t) \quad (2.29)$$

Utilizando as Eq. 2.29 e 2.28, tem-se que a intensidade para um decaimento mono-exponencial é dada pela Eq. 2.30.

$$I(t) = \alpha \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right) \quad (2.30)$$

onde $\alpha = k_{fl}N_0$ é chamado de fator pré exponencial e está associado à amplitude do pulso.

Para decaimentos onde se tem mais de um tempo de vida, seja ele multi-exponencial ou não-exponencial, utiliza-se a expressão da Eq. 2.31

$$I(t) = \sum_{i=1}^N \alpha_i \exp\left(\frac{-t}{\tau_i}\right) \quad (2.31)$$

2.2.3 Anisotropia de Fluorescência

A luz é uma onda eletromagnética sem uma direção preferencial de propagação com os campos elétrico (E) e magnético (B) oscilando perpendicularmente entre si e entre a direção de propagação (figura 2.7).

Figura 2.7: Representação dos campos elétrico e magnético da luz.

Quando se incide luz sobre um fluoróforo, os fótons preferencialmente absorvidos são os que tem seu vetor elétrico alinhado com o dipolo de transição da molécula. Nesse caso, se a absorção é anisotrópica, a emissão fluorescente também é, e qualquer mudança na direção do dipolo de transição resulta no decréscimo desta anisotropia.

Resultados de anisotropia de fluorescência são importantes no entendimento da mobilidade de moléculas, seu tamanho, forma e flexibilidade, fluidez do ambiente e em parâmetros de ordem lipídica por exemplo [1].

Figura 2.8: Representação do aparato para o experimento de anisotropia.

Na maior parte dos experimentos de anisotropia a amostra é excitada verticalmente, ou seja, o vetor campo elétrico alinha-se paralelamente ao eixo z (figura 2.8) e com a ajuda de polarizadores obtêm-se as intensidades de fluorescência paralela ($I_{//}$) e perpendicular ($I_{\perp}$) ao eixo de excitação, sendo possível calcular a anisotropia do fluoróforo (r) pela expressão da Eq. 2.32.

$$r = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}} \quad (2.32)$$

A excitação horizontal da amostra é normalmente usada para correção de erros devido ao ajuste imperfeito do aparato óptico [1] e os valores de intensidade de fluorescência paralela (I_1) e perpendicular (I_2) ao eixo de excitação horizontal são introduzidos numa contante de correção chamada de fator G , deixando a expressão para anisotropia da seguinte forma:

$$r = \frac{I_{//} - GI_{\perp}}{I_{//} + 2GI_{\perp}} \quad (2.33)$$

onde $G = I_1/I_2$.

2.2.3.1 Resolução Temporal na Anisotropia

Para uma amostra excitada com pulsos de luz com intensidade total $I(t) = I_{//}(t) + 2I_{\perp}(t)$, a anisotropia pode ser calculada pela expressão da Eq. 2.34 [1].

$$r(t) = \frac{I_{//}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{//}(t) + 2I_{\perp}(t)} = \frac{I_{//}(t) - I_{\perp}(t)}{I(t)} \quad (2.34)$$

Para uma amostra contendo mais de um fluoróforo com intensidades de fluorescência fracionadas (f_i) é dada pela Eq. 2.35

$$f_i = \frac{I_i}{I} \rightarrow \left(\sum_i^N f_i = 1 \right) \quad (2.35)$$

e sabendo que:

$$I_{\perp} = \sum_i^N I_{\perp}^i \text{ e } I_{//} = \sum_i^N I_{//}^i \quad (2.36)$$

se chega à expressão da Eq. 2.37, que é válida tanto para experimentos de estado estacionário quanto para resolvido no tempo.

$$r = \sum_i^N f_i r_i \quad (2.37)$$

No caso de um decaimento exponencial com tempo de vida do fluoróforo τ_i , a equação para a intensidade de fluorescência fracionada é dada pela Eq. 2.38.

$$f_i(t) = \frac{\alpha_i \exp(\frac{-t}{\tau_i})}{I(t)} \quad (2.38)$$

e utilizando a Eq. 2.31, obtêm-se a expressão para a anisotropia em função do tempo (Eq. 2.39).

$$r(t) = \sum_i^N \frac{\alpha_i \exp(\frac{-t}{\tau_i})}{I(t)} r_i(t) \quad (2.39)$$

2.2.3.2 Anisotropia e Dipolo de Emissão

Uma maneira particular de despolarização de emissão é por rotação livre, devido ao movimento Browniano, durante o tempo de vida no estado excitado.

Para um fluoróforo qualquer, pode-se decompor seu dipolo de emissão (μ) nos 3 eixos de coordenadas (Eq. 2.40).

$$\mu_x = \mu\alpha_i \quad ; \quad \mu_y = \mu\beta_i \quad ; \quad \mu_z = \mu\gamma_i \quad (2.40)$$

onde α_i, β_i e γ_i são os cossenos dos ângulos entre o dipolo de transição e os eixos x,y e z respectivamente.

A contribuição da intensidade de fluorescência para N moléculas em cada um dos eixos é proporcional ao quadrado das componentes de μ (Eq. 2.41).

$$I_x(t) = C \mu^2 N \overline{\alpha_i^2(t)} \quad ; \quad I_y(t) = C \mu^2 N \overline{\beta_i^2(t)} \quad ; \quad I_z(t) = C \mu^2 N \overline{\gamma_i^2(t)} \quad (2.41)$$

onde C é uma constante de proporcionalidade.

Por existir simetria axial no sistema, devido à excitação estar alinhada paralelamente ao eixo de coordenadas z, sabe-se que:

$$\overline{\alpha_i^2(t)} = \overline{\beta_i^2(t)} \quad e \quad \overline{\alpha_i^2(t)} + \overline{\beta_i^2(t)} + \overline{\gamma_i^2(t)} = 1 \quad (2.42)$$

então:

$$\overline{\gamma_i^2(t)} = 1 - 2\overline{\alpha_i^2(t)} \quad (2.43)$$

Utilizando a Eq. 2.34, se chega a expressão para a anisotropia.

$$r(t) = \overline{\gamma_i^2(t)} - \overline{\alpha_i^2(t)} \quad (2.44)$$

ou seja:

$$r(t) = \frac{3\overline{\gamma_i^2(t)} - 1}{2} \quad (2.45)$$

Como foi definido que γ_i é o cosseno do ângulo entre μ e o eixo z ($\cos(\theta_E)$), é possível escrever a Eq. 2.47 como:

$$r(t) = \frac{3\overline{\cos^2(\theta_E(t))} - 1}{2} \quad (2.46)$$

Figura 2.9: Representação dos dipolos de absorção e emissão no plano cartesiano.

De acordo com as regras da trigonometria, o valor de $\cos(\theta_E)$ (figura 2.9) pode ser determinado utilizando a seguinte relação.

$$\cos(\theta_E) = \cos(\theta)\cos(\omega) + \cos(\xi)\sin(\theta)\sin(\omega) \quad (2.47)$$

onde ξ é o ângulo entre os planos dos vetores μ e μ_0 . Sabendo que $\overline{\cos(\xi)} = 0$ e que $\overline{\cos^2(\xi)} = 1/2$, chega-se a seguinte expressão.

$$\overline{\cos^2(\theta_E)} = \overline{\cos^2(\theta)}\cos^2(\omega) + \frac{1}{2}\overline{\sin^2(\theta)}\sin^2(\omega) \quad (2.48)$$

Ajustando a expressão para que fique em termos de cossenos.

$$\overline{\cos^2(\theta_E)} = \frac{3}{2}\overline{\cos^2(\theta)}\cos^2(\omega) - \frac{1}{2}\overline{\cos^2(\theta)} - \frac{1}{2}\cos^2(\omega) + \frac{1}{2} \quad (2.49)$$

A fórmula para a anisotropia fundamental é dada pela Eq. 2.50.

$$r_0 = \frac{3\overline{\cos^2(\theta_E)} - 1}{2} = \frac{3\overline{\cos^2(\theta)}}{2} \times \frac{3\overline{\cos^2(\omega)}}{2} \quad (2.50)$$

Mostra-se facilmente que $\overline{\cos^2(\theta(0))} = 3/5$, e portanto a anisotropia fundamental pode ser escrita como:

$$r_0 = \frac{2}{5} \frac{3\overline{\cos^2(\omega)} - 1}{2} \quad (2.51)$$

2.2.3.3 Rotação Livre do Dipolo de Transição

Figura 2.10: Representação da rotação dos dipolos entre a absorção e a emissão dos fótons pela molécula.

O efeito do movimento Browniano é considerado simplesmente multiplicando a equação da anisotropia fundamental (Eq. 2.50) por $3(\overline{\cos^2(\delta(t))} - 1)/2$ resultando na expressão para a anisotropia dependente do tempo da variação do ângulo do dipolo de emissão.

$$r(t) = r_0 \frac{3\overline{\cos^2(\delta(t))} - 1}{2} \quad (2.52)$$

A expressão $3(\overline{\cos^2(\delta(t))} - 1)/2$ é chamada de *função autocorrelação rotacional* e tem a característica de um polinômio de Legendre de segunda ordem ($P_2(x)$). Portanto é possível encontrar a expressão da Eq. 2.52 escrita da seguinte forma:

$$r(t) = r_0 \langle P_2[\cos(\delta(t))] \rangle \quad (2.53)$$

A Eq. 2.53 será usada para obtenção das curvas de autocorrelação do dipolo das sondas a partir das trajetórias geradas pela DM.

METODOLOGIA

3.1 Simulações Computacionais

3.1.1 Parametrização das sondas

A variedade de compostos orgânicos de interesse biológico é a grande responsável pela necessidade de desenvolver parâmetros para moléculas em simulações de DM. Como foi dito no capítulo anterior, em muitos casos pode-se obter parâmetros de moléculas semelhantes ou até mesmo de grupos químicos comuns a outras moléculas, porém, em situações mais específicas, cálculos quânticos são necessários para que estas constantes representem bem a interação atômica para um determinado campo de força.

Os cálculos quânticos de otimização de geometria deste trabalho foram realizados utilizando nível de teoria DFT com funcional B3LYP [88] e base 6-311G(d,p) [89] no vácuo, e as cargas foram calculadas utilizando Hartree-Fock com base 6-31G(d) que melhor se adéqua ao campo de força CHARMM [90].

Tanto a AHBA, que foi desenvolvida recentemente para ser utilizada como sonda lipofílica [91] quanto a sonda DPH, que é uma sonda muito utilizada em biofísica, não apresentam descrições específicas no campo de força CHARMM, e portanto, foi preciso gerar os seus parâmetros a partir do campo de força geral do CHARMM (*CHARMM General FF*) [92] utilizando o servidor **ParamChem** [93].

3.1.1.1 AHBA

A molécula AHBA apresenta três grupos específicos (figura 3.1) que podem ser transferíveis de outras moléculas já parametrizadas, para isso foram definidos os

tipos atômicos (tabelas 3.1, 3.2, 3.3) para estes grupos e assim foi possível construir os arquivos de topologia e parâmetros para simulação.

Figura 3.1: Representação em 2D da molécula de AHBA.

Tabela 3.1: Tipos atômicos presentes na cabeça polar da sonda AHBA.

Tipos Atômicos	Descrição
Cabeça Polar	<i>figura 3.1</i>
ACA	Carbono de Anéis Aromáticos
AHP	Hidrogênios ligados à Carbonos Aromáticos
ANH2	Nitrogênio Ligados a Carbonos
AHC	Hidrogênios em Amino-Terminal

A cabeça polar apresenta um anel aromático, muito comum em moléculas orgânicas, e nele está ligada uma amina. Os parâmetros para este grupo foram os mais complicados pois não existem muitas estruturas com amina ligada à anéis aromáticos, e por isso, foram adaptados os parâmetros do amino-terminal neutro de uma proteína.

A molécula apresenta uma ligação peptídica que funciona como uma ponte entre a cabeça polar e a cauda apolar de 16 carbonos. Este é um grupo muito comum, pois aparece nas ligações entre os aminoácidos nas proteínas, por isso não houve problemas em transferir os parâmetros para este grupo.

A cauda é basicamente formada por sequências de carbonos sp^3 e no final dela encontra-se um carbono sp^3 primário. Esta estrutura é encontrada em caudas de fosfolipídios com parâmetros bem testados e estabelecidos, e por esse motivo, não houve problemas em transferi-los para este grupo.

Tabela 3.2: Tipos atômicos presentes na ligação peptídica da sonda AHBA.

Tipos Atômicos	Descrição
Amida	<i>figura 3.1</i>
AO	Oxigênios de Carbonilas. (Amidas)
AC	Carbonos de Carbonilas. (Amidas)
ANH1	Nitrogênio de Amidas.
AH	Hidrogênios em Regiões Polares.

Tabela 3.3: Tipos atômicos presentes na cauda apolar da sonda AHBA.

Tipos Atômicos	Descrição
Cauda Apolar	<i>figura 3.1</i>
ACTL2	Carbonos sp^3 em alcanos secundários.
AHAL2	Hidrogênios ligados à Carbonos sp^3 em alcanos secundários.
ACTL3	Carbonos sp^3 em alcanos primários.
AHAL3	Hidrogênios ligados à Carbonos sp^3 em alcanos primários.

3.1.1.2 DPH

Figura 3.2: Representação em 2D da molécula de DPH.

O DPH apresenta é uma molécula apolar com dois anéis aromáticos nas extremidades ligados por uma conjugação π de 6 carbonos (figura 3.2) e os seus parâmetros podem ser obtidos de outros grupos moleculares já parametrizados.

Foram definidos os tipos atômicos presentes e assim foi possível construir os arquivos de topologia e parâmetros para simulação.

Tabela 3.4: *Tipos atômicos presentes na sonda apolar DPH.*

Tipos Atômicos	Descrição
Molécula de DPH	<i>figura 3.2</i>
DCB	Carbono de Anéis Aromáticos.
DC	Carbonos sp^2 não cíclicos.
DHCMM	Hidrogênios ligados aos carbonos sp^2 .

3.1.2 Cargas Parciais das Sondas

Existem diversos modelos de cálculos de cargas parciais atômicas, a maioria deles está implementada nos principais pacotes computacionais de cálculos quânticos. A escolha mais simples para cargas parciais seriam as obtidas por Mulliken, que é baseada em nos orbitais moleculares, porém, outros modelos de cálculo reproduzem melhor o potencial eletrostáticos para moléculas em fase condensada, dentre eles estão o ChelpG [94] e o ESP [95, 96]. Neste trabalho, as cargas para a molécula da AHBA foram calculadas segundo o modelo de Merz-Singh-Kollman (MK ou ESP) e os valores obtidos estão na seção 4 nas tabelas 4.1 para a AHBA e 4.2 para o DPH.

3.1.3 Solventes e Membranas

Os parâmetros para os solventes DIOX e água, assim como para os lipídios, já estão presentes nos arquivos do campo de força CHARMM(versão CHARMM36). Todos os arquivos de parâmetros estão disponíveis no site do Prof. Mackerell da Escola de Farmácia da Universidade de Maryland [97].

3.2 Dinâmica Molecular em Membranas

As bicamadas lipídicas apresentam diversas características específicas relacionadas aos tipos de lipídios que a formam, e no caso de membranas modelo, as características estão intimamente ligadas a esta estrutura molecular. Em geral os lipídios apresentam duas cadeias alifática com variação de tamanho entre C_{10} e C_{28} e podem ser saturadas ou insaturadas. A nomenclatura do fosfolipídio é dada conforme o tamanho da sua cadeia carbônica e alguns nomes são apresentados na tabela 3.5) [98].

Tabela 3.5: *Nomenclatura e representação das cadeias alifática dos lipídios de acordo com seu tamanho.*

Cadeia Acil	Nome Sistemático	Nome Trivial	Símbolo
$CH_3(CH_2)_{10}CO-$	n-Dodecanoil	Lauroil	L
$CH_3(CH_2)_{12}CO-$	n-Tetradecanoil	Miristoil	M
$CH_3(CH_2)_{14}CO-$	n-Hexadecanoil	Palmitoil	P
$CH_3(CH_2)_{16}CO-$	n-Octadecanoil	Estearoil	S
:	:	:	
:	:	:	
$CH_3(CH_2)_7CH =$ $(CH_2)_7CO - (cis\Delta^9)$		Oleoil	O
:	:	:	
:	:	:	
$CH_3(CH_2)_4(CH = CHCO-$ $CH_2)_4(CH_2)_2$ $(cis\Delta^5, \Delta^8, \Delta^{11}, \Delta^{14})$		Aracdonoil	

Para a DM, foi necessária a construção das bicamadas de POPC e DMPC com moléculas de água modelo TIP3P distribuídas nas regiões polares. No processo de construção das bicamadas, utilizou-se o servidor **CHARMM-GUI** [99, 100] que constrói as bicamadas pré-equilibrada de acordo com as especificações desejadas e gera os inputs necessários para a etapa de equilibração. Foram criados os sistemas

com 64 lipídios (POPC e DMPC) em cada mono-camada e aproximadamente 36 moléculas de água para cada lipídio (figura 3.3).

Figura 3.3: Representação 3D das membranas de POPC(a) e DMPC(b) após a equilíbrio.

Após a construção, realizou-se uma DM de equilíbrio para cada membrana, utilizando o programa NAMD com passo de integração de 2 fs e aplicação do algoritmo de passos de tempo múltiplos RESPA [101], sem restrições.

Nesta etapa, a relação *área/lipídio* foi monitorada até que convergisse à valores próximos dos experimentais encontrados na literatura (cerca de $68.0 \text{ \AA}^2$ para o POPC e $60.0 \text{ \AA}^2$ para o DMPC, em $T = 310\text{K}$) [102]. Também foram monitoradas as espessuras das membranas e os valores comparados aos experimentais.

Utilizando a geometria final da etapa de equilíbrio, foram construídos os sistemas 'sonda (AHBA,DPH)' + 'lipídio (DMPC,POPC)' com o programa PACKMOL [103], e para cada um deles realizou-se uma DM onde a sonda foi colocada na camada de água. O objetivo foi verificar a localização preferencial das sondas em cada uma das bicamadas e neste ponto foi monitorada a energia, o desvio quadrático médio, a espessura e a *área/lipídio* dos sistemas.

Uma terceira etapa de DM foi realizada para coleta das trajetórias das sondas e cada sistema lipídio+sonda foi submetido a duas DM de 100 ns utilizando a geometria final da etapa anterior. Nesta etapa a trajetória foi salva a cada 2 ps.

A temperatura nas simulações foi de 310 K que está acima da temperatura de transição das membranas de POPC (269 K) e DMPC (296 K), portanto, ambas na

fase líquido-cristalina. Utilizando *ensemble* NpT, empregou-se condições periódicas de contorno e um raio de corte esférico de decaimento suave a partir de 10.0 Å até 12.0 Å.

As interações de vdW entre átomos separados por distâncias maiores do que este raio não são calculadas e as forças de Coulomb foram tratadas por somas de Ewald.

O protocolo seguido para as simulações por Dinâmica Molecular deste trabalho pode ser resumido da seguinte forma:

1 Construção do sistema:

- 1.1 Bicamadas de POPC e DMPC.
- 1.2 64 Lipídios em cada monocamada.
- 1.3 36 moléculas de água por lipídio.

2 Etapa de equilibração das bicamadas:

- 2.1 Monitoramento da área/lipídio e espessura das bicamadas.
- 2.2 Validação pela comparação destes resultados com os encontrados na literatura.

3 Teste de localização das sondas nas membranas:

- 3.1 1 DM de 20 ns de cada conjunto sonda+lipídio.
- 3.2 Monitoramento do RMSD e do perfil de densidade eletrônica (EDP) dos sistemas até o equilíbrio das sondas nas bicamadas.

4 Dinâmica Molecular das sondas nas membranas:

- 4.1 2 DM de 100 ns de cada sistema para coleta das trajetórias das sondas para as análises da sua interação com as membranas.
- 4.2 Análises da estrutura e dinâmica das sondas nas membranas.
- 4.3 Obtenção da curva de autocorrelação rotacional ($C(t)$) do dipolo de transição eletrônica das sondas em POPC e DMPC.
- 4.4 Validação da metodologia por meio de comparação com os resultados experimentais de anisotropia.

3.3 Dinâmica Molecular em Solventes

Para as simulações das sondas nas misturas de água e DIOX, primeiramente foram construídas caixas contendo as moléculas de solvente submetidas à 10 ns de DM para equilíbrio dos sistemas. As proporções de solventes utilizados podem ser vistas na tabela a seguir (tabela 3.6):

Tabela 3.6: *Caixas de solventes utilizadas na DM das sondas DPH e AHBA.*

Caixa de Solvente	nº Molec. Água	nº Molec. 1,4-Dioxano	nº Molec. Total
1 ¹	2500	0	2500
2	750	250	1000
3	500	500	1000
4	250	750	1000
5	0	1000	1000

Foram feitas DM de 50 ns para cada conjunto 'caixa de solvente+sonda' utilizando o programa NAMD em *ensemble* NpT e temperatura igual à 298K, com passo de integração de 2 fs. Empregou-se condições periódicas de contorno e um raio de corte esférico de decaimento suave a partir de 9.0 Å até 10.0 Å com trajetórias para análises salvas a cada 1 ps.

Detalhes Adicionais:

Para a visualização das estruturas moleculares foi utilizado o programa **VMD** [104] e **Molden** [105], as figuras foram geradas e tratadas utilizando os programas **Inkscape** [106], **Gimp** [107], **GaussView** [108] e **PYMOL** [109]. Os gráficos foram gerados e tratados com o programa **Grace** [110]. Os scripts para análise foram feitos utilizando o **Scipy** [111], o **Numpy** [112], o **MDAnalysis** [113] e o **Loos** [114].

¹Quantidade maior de água para que as dimensões da caixa fossem satisfatórias, evitando problemas de condições periódicas de contorno devido ao pequeno volume molecular da água.

3.4 Etapa Experimental

3.4.1 Equipamentos

O experimentos de absorção óptica foram realizados no espectrofotômetro UV-visível *Amersham Ultrospec 2100 pro* e as medições de fluorescência estática foram feitas no espectrofluorímetro *Hitachi F-7000* com uma lâmpada de xenônio de 150W como fonte de luz de excitação.

Os experimentos de decaimento da anisotropia de fluorescência foram feitos em um espectrofluorímetro com resolução temporal, utilizando o método de correlação temporal de fótons únicos (*Time-Correlated Single Photon Counting* - *TCSPC*), que está baseado na excitação da amostra com pulsos de luz, correlacionando no tempo os fótons da excitação com os fótons de emissão da amostra.

Para os experimentos com resolução temporal utilizou-se um conjunto de lasers onde, inicialmente um laser de diodos, com dois feixes com 24.0 W de potência e comprimento de onda em 809 nm, 'bombeia' um laser de estado sólido *Millenia Xs* com cristal de ganho de **Nd:YVO₄** da *Spectra Physics* e emissão em 1064 nm. Em seguida, um cristal dobrador de frequências gera um feixe final com até 10.0 W de potência e comprimento de onda em 532 nm, que 'bombeia' um laser de titânio-safira (*Tsunami* - *Spectra Physics*) que gera pulsos de laser em uma largura de 5 ps, na faixa de 840 nm até 1080 nm, com uma repetição de pulsos igual à 82 MHz.

Na sequencia, um filtro bi-refringente seleciona o comprimento de onda do feixe de saída, que ao passar por uma sistema selecionador, divide a frequências em até 8000 vezes, gerando pulsos que são mais adequados para experimentos de contagem de fótons únicos (0,01 MHz à 8 MHz).

Nos experimentos de anisotropia de estado estacionário, foram adicionados filmes polarizadores entre a amostra e os feixes de excitação e de emissão. Nos experimentos com resolução temporal, foi usado prisma polarizador *Glann-Taylor* no feixe de emissão e compensador *Babinet-Soleil* na excitação. Todos os equipamentos estão disponíveis no laboratório de Fotobiofísica, do Departamento de Física da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP) na Universidade de São Paulo.

3.4.2 Preparação das Amostras e Condições Experimentais

Para os experimentos foram utilizados dois fosfolipídios zwitteriônicos POPC e DMPC fornecidos pela *Avanti Polar Lipids*. A sonda fluorescente DPH foi fornecida pela *Sigma-Aldrich* e a sonda AHBA foi sintetizado no laboratório do grupo de Biofísica da Escola Paulista de Medicina da Unifesp, sob responsabilidade do Prof. Dr. Luis Juliano e da Dra. Isaura Y. Hirata. Todas as amostras foram diluídas em tampão Hepes 10 mM e pH 7,4, além disso, os solventes orgânicos utilizados foram de qualidade analítica.

As soluções de estoque da AHBA foram preparadas em etanol em uma concentração de 2.0 mM, sendo que pequenas alíquotas deste estoque foram adicionadas na preparação dos filmes de lipídios para que a concentração final fosse de 20.0 μM . Já para o DPH, as massas foram aferidas no momento da preparação dos filmes lipídicos para uma concentração final de 5.0 μM .

Os lipídios marcados foram diluídos em clorofórmio e a secagem para formação dos filmes foi feita em tubos de ensaio utilizando fluxo de gás nitrogênio (N_2) e logo após, deixados por 3 horas em uma dessecador ligado a uma bomba de vácuo.

Figura 3.4: Representação 2D da LUV. (aproximadamente 100 nm de diâmetro)

Na sequencia, foi adicionado o tampão aos tubos de ensaio e para a obtenção das vesículas unilamelares grandes (do inglês: *Large Unilamellar Vesicle* - *LUV*; figura 3.4), utilizadas neste trabalho, a amostra foi extrusada através de uma membrana de polycarbonato com poros de $0.1\ \mu\text{m}$, inseridas no extrusor *Mini-Extruder Avanti* sendo que a suspensão lipídica foi transpassada pelo micro-poro por 17 vezes, para garantir uma maior homogeneidade do tamanho das vesículas.

Todos os experimentos foram realizados na temperatura de 310 K (37 °C) controlada por uma banho térmico e as sondas AHBA e DPH foram excitadas no mesmo comprimento de onda, em 310 nm, com a contagem dos fótons emitidos em 416 nm.

RESULTADOS

4.1 Cargas Parciais

As cargas parciais calculadas para as sondas são utilizadas na DM para interações entre átomos não ligados distantes de mais de 4 ligações.

Os valores para a AHBA e para o DPH estão nas tabelas a seguir.

4.1.1 AHBA

Figura 4.1: *Numeração atômica utilizada na molécula de AHBA.*

Tabela 4.1: *Cargas Parciais Atômicas da AHBA.*

N°	Átomo	Carga ESP	N°	Átomo	Carga ESP	N°	Átomo	Carga ESP
1	C	-0.224	23	C	-0.203	45	H	0.013
2	C	-0.082	24	C	0.084	46	H	-0.032
3	C	-0.298	25	C	0.146	47	H	-0.031
4	C	0.437	26	C	-0.296	48	H	0.005
5	C	-0.332	27	H	0.142	49	H	0.006
6	C	-0.008	28	H	0.121	50	H	-0.024
7	N	-0.816	29	H	0.134	51	H	-0.023
8	C	0.665	30	H	0.146	52	H	0.004
9	O	-0.538	31	H	0.287	53	H	0.006
10	N	-0.508	32	H	0.302	54	H	-0.052
11	C	0.108	33	H	0.360	55	H	-0.050
12	C	0.129	34	H	0.015	56	H	0.027
13	C	-0.164	35	H	0.044	57	H	0.029
14	C	0.123	36	H	0.023	58	H	-0.015
15	C	-0.022	37	H	0.035	59	H	-0.013
16	C	0.100	38	H	-0.029	60	H	-0.022
17	C	-0.097	39	H	-0.032	61	H	-0.019
18	C	0.140	40	H	-0.001	62	H	0.072
19	C	-0.058	41	H	0.000	63	H	0.062
20	C	0.072	42	H	-0.028	64	H	0.063
21	C	-0.066	43	H	-0.027	65	H	-0.012
22	C	0.232	44	H	0.009	66	H	-0.019

4.1.2 DPH

Figura 4.2: Numeração atômica utilizada na molécula de DPH.**Tabela 4.2:** Cargas Parciais Atômicas do DPH.

Nº	Átomo	Carga ESP	Nº	Átomo	Carga ESP
1	C	-0.128	18	C	-0.194
2	C	-0.151	19	H	0.131
3	C	-0.111	20	H	0.135
4	C	-0.206	21	H	0.130
5	C	0.178	22	H	0.136
6	C	-0.182	23	H	0.140
7	C	-0.234	24	H	0.144
8	C	-0.110	25	H	0.135
9	C	-0.154	26	H	0.146
10	C	-0.147	27	H	0.144
11	C	-0.113	28	H	0.138
12	C	-0.226	29	H	0.139
13	C	0.166	30	H	0.135
14	C	-0.182	31	H	0.132
15	C	-0.124	32	H	0.135
16	C	-0.152	33	H	0.129
17	C	-0.112	34	H	0.135

4.2 Dinâmica Molecular em Solventes

Com o objetivo de obter informações a respeito da solvatação e dinâmica conformacional das sondas AHBA e DPH em solventes polares e apolares, foram realizadas DM delas em água, DIOX e misturas entre estes dois solvente.

Os resultados das análises estão apresentados na sequência.

4.2.1 AHBA

4.2.1.1 RMSD e RMSF

O RMSD da AHBA (figura 4.3) em solventes é característico de moléculas pequenas, com valores em torno de 2.0 Å e máximo 4.5 Å durante as DM, isto indica que ela teve uma movimentação relativamente baixa durante as simulações, já que sua estrutura é bastante flexível.

Figura 4.3: *RMSD da AHBA durante as DM em solventes.*

O RMSF traz informações da movimentação de cada átomo da sonda em relação a sua configuração média, como observa-se pela figura 4.4, os átomos da sonda tiveram uma flutuação muito semelhante independente da quantidade de água presente na caixa.

Figura 4.4: *RMSF dos átomos pesados da AHBA durante as DM em solventes.*

4.2.1.2 RDF

Figura 4.5: *Representação 3D da cabeça polar da sonda AHBA.*

A molécula de AHBA é uma sonda fluorescente anfifílica, isto quer dizer que uma parte da estrutura é polar e a outra é apolar. Como o interesse da solvatação está na parte onde existe a possibilidade de formação de LH, realizou-se a análise da distribuição radial entre pares (RDF) para os átomos da cabeça polar da sonda (figura 4.5), onde estão localizados os átomos doadores e aceptores de LH.

4.2.1.3 0% de H₂O

Figura 4.6: Representação 3D do sistema AHBA+100% Dioxano.

Informações importantes sobre a solvatação podem ser retiradas da RDF entre pares (figura 4.7) entre os átomos polares do solvente e a os átomos polares da cabeça da sonda AHBA.

Figura 4.7: RDF dos oxigênios do DIOX em torno dos hidrogênios ligados aos nitrogênios da sonda.

O gráfico mostra que houve formação de uma camada de solvatação em torno dos hidrogênios ligados aos nitrogênios (H5, H6 e H7) localizados na parte polar da sonda, aproximadamente em 2.0 Å de raio.

Ao integrar a curva na região do primeiro pico, obtêm-se a informação do número aproximado de átomos presentes nesta primeira camada de solvatação e os valores encontrados indicam a presença de aproximadamente 3 moléculas de DIOX na primeira camada em torno da região polar.

4.2.1.4 25% de H₂O

Figura 4.8: Representação 3D do sistema AHBA+75% Dioxano.

Para a caixa com 25% de água, as análises foram realizadas comparando a distribuição dos átomos polares dos solventes DIOX e água, em torno dos hidrogênios ligados aos nitrogênios da sonda.

O gráfico da figura 4.9 mostra a formação de camadas de solvatação de água e também de DIOX, sendo que pelo número de coordenação, calculado pela integral do primeiro pico, encontra-se em média 2 moléculas de DIOX e 1 molécula de água em torno da sonda.

Figura 4.9: *RDF dos oxigênios da água e do DIOX em torno do 'H5' da sonda.*

O 'H5' é o hidrogênio ligado ao nitrogênio da amida entre o anel aromático e a cauda, portanto, está mais próximo da região apolar da sonda, o que explica a menor quantidade de água, em relação ao DIOX, solvatando esse hidrogênio.

Figura 4.10: *RDF dos oxigênios da água e do DIOX em torno do 'H6' da sonda.*

Já os hidrogênios do nitrogênio ligado ao anel aromático, experimentam um ambiente um pouco mais polar pela menor proximidade com a cauda, e isso faz com que as moléculas de água se concentrem em aproximadamente 4.0 Å em torno de um dos hidrogênios (H6 na figura 4.10) mesmo não formando LH.

Figura 4.11: *RDF dos oxigênios da água e do DIOX em torno do 'H7' da sonda.*

O outro hidrogênio (H7) no gráfico da figura 4.11, percebe-se a formação de uma camada de solvatação à uma distância característica da LH (em torno de 2.0 Å), o que indica que mesmo com a pouca quantidade de água, a parte polar da sonda tende a se aproximar das moléculas de água.

Pela figura 4.12, observa-se formação de camadas de solvatação em torno do 'O' da amida, sendo a primeira em 2.0 Å, correspondente a distância da LH. Pelo número de coordenação cerca de 3 moléculas de água formam a primeira camada.

Figura 4.12: *RDF dos hidrogênios da água em torno do oxigênio 'O' da sonda.*

4.2.1.5 50% de H₂O

Figura 4.13: *Representação 3D do sistema AHBA+50% Dioxano.*

Figura 4.14: *RDF dos oxigênios da água e do DIOX em torno do 'H5' da sonda.*

O gráfico da figura 4.14 mostra que há a formação de camadas de solvatação em torno do 'H5' e pelo número de coordenação, estas camadas são formadas em média por 3 moléculas de DIOX e 1 de água em aproximadamente 2.0 Å.

Figura 4.15: *RDF dos oxigênios da água e do DIOX em torno do 'H6' da sonda.*

As figuras 4.15 e 4.16 apresentam um perfil semelhante para os mesmos átomos 'H6' e 'H7' na caixa com 25% de água, com o pico da primeira camada para o 'H7' menor que o da DM menos água (figura 4.11).

Figura 4.16: *RDF dos oxigênios da água e do DIOX em torno do 'H7' da sonda.*

A RDF da água em torno do oxigênio da AHBA (figura 4.17) indica formar uma camada de solvatação a uma distancia correnpondente a LH, porém o máximo deste pico é menor quando comparado ao da DM com 25% de água.

Figura 4.17: *RDF dos hidrogênios da água em torno do 'O' da sonda.*

4.2.1.6 75% de H₂O

Figura 4.18: *Representação 3D do sistema AHBA+25% Dioxano.*

Para a DM com 75% de água, a camada de solvatação formada por DIOX em torno de 'H5' (figura 4.19) é bem maior quando comparada às outras DM com menos água e que quase não se forma uma camada de água em torno deste hidrogênio.

Figura 4.19: *RDF dos oxigênios da água e do DIOX em torno do 'H5' da sonda.*

Esse comportamento foge do esperado, pois a quantidade de água nesta DM é maior que nas anteriores. Isso pode ser explicado por uma 'blindagem' da sonda feita pelo DIOX, que diminui o acesso das moléculas de água à AHBA.

Figura 4.20: *RDF dos oxigênios da água e do DIOX em torno do 'H6' da sonda.*

Figura 4.21: *RDF dos oxigênios da água e do DIOX em torno do 'H7' da sonda.*

Evidências da quantidade de água acessando a região polar da sonda também podem ser observadas pelos gráficos de distribuição radial das figuras 4.20, 4.21 e 4.22.

Figura 4.22: *RDF dos hidrogênios da água em torno do 'O' da sonda.*

As distribuições indicam que a quantidade de água em torno dos hidrogênios 'H6' e 'H7' e do oxigênio 'O' é menor quando comparadas à RDF em torno dos mesmos átomos para as simulações com 25% (figuras 4.10, 4.11 e 4.12) e 50% (figuras 4.15, 4.16 e 4.17) de água.

4.2.1.7 100% de H₂O

Figura 4.23: Representação 3D do sistema AHBA+0% Dioxano.

Para a DM da AHBA em uma caixa com 100% de água, o gráfico da figura 4.24 mostra a formação de camadas de solvatação em torno dos hidrogênios 'H5', 'H6' e 'H7' além do oxigênio 'O', sendo mais evidente o pico em torno de 'H5' e 'O' a uma distância de aproximadamente 2.0 Å.

Figura 4.24: *RDF dos oxigênios da água em torno do 'H5', 'H6' e 'H7' e também do 'O' da sonda.*

O gráfico a seguir (figura 4.25) mostra distribuição da água em torno do centro de massa da cabeça polar da AHBA.

Figura 4.25: *RDF dos oxigênios da água em torno do centro de massa da cabeça polar da AHBA.*

Apesar da sonda ser anfifílica e não ser solúvel em água, os resultados anteriores mostram que a parte polar da sonda claramente tem afinidade por este solvente, sendo que nas DM com a presença de DIOX, ele acaba blindando o contato da sonda com a água.

Figura 4.26: *RDF dos oxigênios do DIOX em torno do centro de massa da cabeça polar da AHBA.*

A figura 4.26 caracteriza a distribuição do DIOX em torno do centro de massa da AHBA. Pode-se perceber que há a formação de camadas de solvatação, e a medida que a quantidade de água vai aumentando, o pico referente a primeira camada diminui, sem alteração no seu raio (em torno de 6.0 Å). Além disso, em simulações com a presença de água, a camada de solvatação é maior do que na caixa com 100% de DIOX.

É interessante notar, que os gráficos 4.25 e 4.26 se complementam para as DM com misturas entre os solventes, ou seja, a medida que a camada de água vai aumentando, a de DIOX vai diminuindo.

A afinidade desta região da sonda com solvente polar já era esperada e esse tipo de equilíbrio hidrofóbico é o que caracteriza a formação de micelas por moléculas anfifílicas neste tipo de ambiente.

4.2.2 DPH

4.2.2.1 RMSD e RMSF

O RMSD do DPH (figura 4.27) nas DM com solventes também é característico de moléculas pequenas, porém, esta sonda se movimentou muito menos do que a sonda AHBA, com valores de RMSD em torno de 0.75 Å.

Figura 4.27: *RMSD do DPH nas DM em solventes.*

No gráfico de RMSF (figura 4.29) a sonda apresentou o mesmo perfil de mobilidade para os seus átomos pesados em todas as DM, indicando que a alteração da quantidade de água presente na caixa de simulação não influenciou na sua mobilidade relativa a sua estrutura média, indo de acordo com o resultado anterior para de RMSD.

Figura 4.28: Representação 3D dos átomos pesados do DPH usados no cálculo do RMSF.

Figura 4.29: RMSF do DPH nas DM em solventes.

4.2.2.2 RDF

O DPH é uma molécula apolar que não possui átomos doadores ou aceitadores de ligação de hidrogênio (LH). Nesse caso as análises de solvatação serão feitas em torno do centro de massa da molécula e este tipo de análise traz informações a respeito da interação da sonda com o DIOX, que é um solvente orgânico apolar e com a água, que é um solvente polar.

4.2.2.3 0% de H₂O

Figura 4.30: Representação 3D do sistema DPH+0% de água.

Pelo gráfico da figura 4.31 claramente observa-se a formação de seguidas camadas de solvatação de DIOX em torno do DPH, com a primeira distante em torno de 5.5 Å do seu centro de massa.

Figura 4.31: RDF do DIOX em torno do DPH.

4.2.2.4 25% de H₂O

Figura 4.32: Representação 3D do sistema DPH+25% de água.

A figura 4.33 mostra a RDF das moléculas de água e DIOX em torno do centro de massa da sonda onde observa-se a formação de camadas de solvatação para o DIOX em torno de 5.5 Å do DPH.

Figura 4.33: RDF do DIOX e da água em torno do DPH para a caixa com 25% de água.

4.2.2.5 50% de H₂O

Figura 4.34: Representação 3D do sistema DPH+50% de água.

Semelhante ao 4.33, o gráfico 4.35 mostra o mesmo comportamento para os solventes em torno do DPH, com destaque para o pico do RDF do DIOX, que é maior, e para o RDF da água, que é menor em relação à DM com 25% de água.

Figura 4.35: RDF do DIOX e da água em torno do DPH para a caixa com 50% de água.

4.2.2.6 75% de H₂O

Figura 4.36: Representação 3D do sistema DPH+75% de água.

O RDF do gráfico 4.37 mostra que a camada de solvatação de DIOX em torno do DPH é ainda maior que nas DM com menor quantidade de água e o RDF da água denota o comportamento hidrofóbico da sonda, comum em todas as DM.

Figura 4.37: RDF do DIOX e da água em torno do DPH para a caixa com 75% de água.

4.2.2.7 100% de H₂O

Figura 4.38: Representação 3D do sistema DPH+100% de água.

Para a simulação com 100% de água, observa-se uma pequena camada de água em aproximadamente 4.0 Å (figura 4.39), no entanto, a curva caracteriza a interação hidrofóbica entre o DPH e a água.

Figura 4.39: RDF da água em torno do DPH para a caixa com 100% de água.

Na figura 4.40 observa-se a RDF do DIOX em torno do DPH para todas as DM. A comparação dos perfis mostra que ao aumentar a porcentagem de água na caixa, aumenta-se a quantidade de DIOX na primeira camada em torno da sonda, 'blindando' o acesso da água com o DPH localizado preferencialmente na região da caixa que contém o DIOX.

Figura 4.40: Comparação da RDF do DIOX em torno do DPH para todas as 5 DM.

4.3 Dinâmica Molecular em Membranas Modelo

As simulações das sondas AHBA e DPH em membranas modelo foram feitas com o objetivo de caracterizar, em escala nanométrica, a interação e a localização destas sondas nas bicamadas lipídicas e também, a partir destas DM, retirar informações sobre as suas difusões rotacionais. Para isso foram utilizados dois tipos de lipídios (POPC e DMPC), com o objetivo de verificar se o grau de empacotamento lateral das bicamadas influencia na dinâmica rotacional destas sondas, dinâmica essa que está associada as suas anisotropias de fluorescência. Os resultados serão apresentados separadamente para cada sonda, objetivando estabelecer uma relação entre os comportamentos em cada tipo de lipídio.

4.3.1 AHBA

4.3.1.1 POPC

A localização e mobilidade da sonda na membrana de POPC foi monitorada pelos perfis de densidade eletrônica (EDP) e pelo RMSF.

Figura 4.41: Representação 3D das DM ($NpT1$ e $NpT2$) da AHBA em POPC.

Figura 4.42: EDP para as DM da sonda AHBA em POPC.

O EDP mostra que a cabeça polar da sonda ficou localizada na interface entre a água e a parte polar do fosfolipídio, a uma distância de aproximadamente 15.0 Å do centro da bicamada, com sua cauda alinhada paralelamente as caudas dos lipídios, o que já era de se esperar pelo caráter anfipático da sonda. É importante notar que o perfil foi muito semelhante para as duas DM (NpT1 e NpT2), aumentando a confiabilidade dos resultados das simulações.

Figura 4.43: *RMSF da sonda durante as simulações NpT1 e NpT2.*

Figura 4.44: *Numeração atômica para os átomos pesados da sonda AHBA.*

O RMSF da sonda (figura 4.43) mostrou que os átomos das extremidades se movimentaram mais, de acordo com a numeração utilizada pela figura 4.44, com flutuação para os átomos da cabeça polar entre 2.0 Å e 5.0 Å e a ponta da cauda de 2.5 Å à 3.0 Å aproximadamente.

A movimentação da parte polar da sonda é uma característica importante de ser analisada, já que o seu dipolo de transição está localizado nesta região, como representado na próxima figura.

Figura 4.45: Representação dos dipolos de transição da AHBA (* Assumindo que os dipolos de absorção ($S0 \rightarrow S1$) e emissão ($S1 \rightarrow S0$) são colineares).

Para a AHBA, assumiu-se que seus dipolos de absorção e emissão são colineares e apresentam um pequeno desvio angular (aproximadamente 6°) em relação a ligação entre os carbonos 4 e 5 (figura 4.45). Neste caso é possível utilizar o vetor que liga estes 2 átomos como representante dos dipolos de transição para as análises das trajetórias.

A mobilidade dos dipolos de transição está diretamente associada à anisotropia de fluorescência da sonda, sendo que, a partir da trajetória é possível obter informações a respeito da distribuição angular deste dipolo em relação ao vetor normal ao plano 'xy' da membrana durante a DM, relacionando-a com a orientação da sonda na membrana e com a autocorrelação rotacional do dipolo.

Figura 4.46: Distribuição do ângulo entre o dipolo de transição e a normal da membrana.

Pelo gráfico da figura 4.46 é possível observar que o dipolo da sonda alinha-se preferencialmente com um ângulo (θ) entre 40° e 80° em relação à normal da membrana.

Essa distribuição evidencia que a amina primária (NH_2) ligada ao anel fica mais exposta à água quando comparada ao nitrogênio da amida presente na sonda.

Figura 4.47: *RDF da água em torno dos átomos 'O', 'H5' e 'H7' da AHBA.*

O gráfico de RDF da figura 4.47 para a água em torno do 'O' da sonda e dos 'H5' e 'H7' ligados aos 2 nitrogênios apresentaram máximo em torno de 2.0 Å com a indicação de que houve formação de LH com a água, e além disso, forma-se uma segunda camada de solvatação bem evidente em torno do 'O' e do 'H7'.

Figura 4.48: *Histograma do número de LH durante as DM.*

As LH foram monitoradas durante as DM e o histograma da figura 4.48 mostra que, quase todo o tempo de DM (96%), a sonda fez ao menos uma LH com a água, indicando que o solvente tem influencia na dinâmica da sonda na membrana.

Figura 4.49: Média da autocorrelação rotacional do dipolo da AHBA nas DM $NpT1$ e $NpT2$ em POPC.

A partir da DM, foi possível obter a curva de autocorrelação do dipolo de transição da AHBA em POPC, a curva representada na figura 4.49 mostra um perfil de decaimento bi-exponencial, sendo ajustada pela Eq. 4.1.

$$C(t) = A_1 \exp\left(\frac{-t}{\tau_1}\right) + A_2 \exp\left(\frac{-t}{\tau_2}\right) + C_\infty \quad (4.1)$$

$$r(t) = A_1 \exp\left(\frac{-t}{\tau_1}\right) + A_2 \exp\left(\frac{-t}{\tau_2}\right) + r_\infty \quad (4.2)$$

O decaimento da anisotropia experimental para a AHBA em POPC pode ser observado pelo gráfico da figura 4.50 com ajuste também feito por uma curva bi-exponencial (Eq. 4.2).

Os tempos de vida de anisotropia e os fatores pré-exponenciais foram comparados ao obtidos a partir da autocorrelação do dipolo na DM e os valores para os parâmetros estão na tabela 4.3.

Figura 4.50: Anisotropia de fluorescência da AHBA em POPC.

Tabela 4.3: Valores obtidos para os ajustes da curvas de autocorrelação rotacional (figura 4.49) e anisotropia (figura 4.50) para a AHBA em POPC.

	A_1	τ_1 (ns)	A_2	τ_2 (ns)	C_∞/r_∞	χ^2	R^2
DM	0.22 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.12 ± 0.01	3.42 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.35	0.99
Exper.	0.15 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.16 ± 0.01	1.74 ± 0.08	0.00 ± 0.01	1.11	–

Pode-se perceber pela tabela 4.3 que, apesar dos valores ajustados para os tempos de correlação rotacionais não estarem próximos para as curvas experimental e teórica, é possível ver que para as duas curvas existem 2 tempos característicos, um mais longo, de 2.0 ns à 4.0 ns, e um outro mais curto, menor que 1.0 ns. Estes valores podem ser considerados animadores, visto que o objetivo do uso da DM não é a obtenção exata do decaimento da anisotropia teórico, mas sim a identificação dos fatores que afetam a difusão rotacional da sonda em membranas e a validação do modelo usado para os cálculos de DM.

4.3.1.2 DMPC

Figura 4.51: Representação 3D das DM (NpT1 e NpT2) da AHBA em DMPC.

O EDP para a AHBA em membrana de DMPC (figura 4.52) mostrou uma pequena diferença na localização da sua cabeça polar na membrana.

Figura 4.52: EDP para as DM da sonda AHBA em DMPC.

Em uma das DM (NpT1) a sonda penetrou mais na bicamada (aproximadamente 14.0 Å do centro da membrana), quando comparada a outra (NpT2) que ficou a uma distância de 18.0 Å do centro da bicamada.

Essa pequena diferença entre as DM, em torno de 4.0 Å para a localização da cabeça polar da sonda, evidencia uma dinâmica diferente para a AHBA. Essa diferença pode ser observada pelo gráfico de RMSF da figura 4.53.

Figura 4.53: *RMSF da AHBA durante as simulações NpT1 e NpT2.*

Claramente pode-se observar que a mobilidade dos átomos da sonda foi maior na DM em que ela penetrou menos na bicamada (NpT2) com uma diferença na flutuação da sua cabeça polar em torno de 1.0 Å.

Essa característica afeta diretamente a difusão rotacional dos dipolos de transição da sonda, podendo alterar os tempos de autocorrelação rotacional.

Figura 4.54: Distribuição do ângulo entre o dipolo de transição e a normal da membrana de DMPC.

Através da distribuição do ângulo entre o dipolo da AHBA e a normal da membrana (figura 4.54) pode-se observar que ela foi mais homogênea na DM em que a sonda penetrou menos (entre 30° e 130° aproximadamente), deixando claro que o fato de estar mais exposta a água restringe menos a mobilidade da sua cabeça polar, pois na DM que houve maior penetração, a maior população do ângulo do dipolo com a normal variou entre 40° e 80° .

As distribuições radiais da água em torno dos átomos 'O', 'H5' e 'H7' trazem informações importantes da interação da região polar da sonda com a água, e no gráfico da figura 4.55 pode-se perceber que o fato da sonda penetrar menos na bicamada na DM NpT2, alterou claramente a solvatação do 'H7' da amina primária, diminuindo o tamanho do pico, e além disso, houve um pequeno aumento no pico em torno do 'O', evidenciando que, apesar de estar mais exposta ao solvente, existe uma competição entre esses dois átomos na formação de LH da sonda com a água.

Figura 4.55: *RDF da água em torno dos átomos 'O', 'H5' e 'H7' da AHBA.*

Figura 4.56: *Histograma do número de LH durante as DM.*

Pelo gráfico da figura 4.56 observa-se que a maior parte do tempo de DM (98%) a sonda faz ao menos uma LH com a água, e que apesar das diferentes posições em relação ao centro da bicamada, o número de LH é semelhante.

Figura 4.57: Média da autocorrelação rotacional do dipolo da AHBA nas DM NpT1 e NpT2 em DMPC.

A autocorrelação rotacional da AHBA em DMPC está representada pela figura 4.57 e também apresentou um perfil de decaimento bi-exponencial com ajuste feito pela Eq. 4.1.

Figura 4.58: Anisotropia de fluorescência da AHBA em DMPC.

O decaimento da anisotropia experimental para a AHBA em DMPC pode ser visto na figura 4.58 com ajuste também feito por uma curva bi-exponencial (Eq. 4.2). Os tempos de vida de anisotropia e os fatores pré-exponenciais foram comparados ao obtidos a partir da autocorrelação do dipolo na DM e os valores para os parâmetros estão na tabela a seguir.

Tabela 4.4: Valores obtidos para os ajustes das curvas de autocorrelação rotacional (figura 4.57) e anisotropia (figura 4.58) para a AHBA em DMPC.

	A_1	τ_1 (ns)	A_2	τ_2 (ns)	C_∞/r_∞	χ^2	R^2
DM	0.10 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.24 ± 0.01	3.25 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.71	0.99
Exper.	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.18 ± 0.01	2.12 ± 0.06	0.00 ± 0.01	1.08	–

A tabela 4.4 encontram-se os ajustes para os tempos de correlação das curvas experimental e teórica, e neles é possível ver que para as duas curvas existem 2 valores característicos, um mais longo, de 2.0 ns à 3.5 ns, e um outro mais curto, menor que 1.0 ns.

4.3.2 DPH

4.3.2.1 POPC

Figura 4.59: Representação 3D das DM ($NpT1$ e $NpT2$) do DPH em POPC.

As análises de localização e mobilidade da sonda DPH na bicamada de POPC foram feitas através dos gráficos de EDP e RMSF.

Para o DPH em POPC, o EDP (figura 4.60) mostra que a sonda ficou localizada a uma distancia média de aproximadamente 9.0 Å do centro da bicamada. Nota-se que o EDP foi muito semelhante para as duas DM (NpT1 e NpT2), sendo que esta pequena diferença entre os máximos de densidade para o DPH pode estar relacionado com o seu posicionamento em relação as caudas da membrana.

Figura 4.60: EDP para as DM da sonda DPH em POPC.

A análise mais detalhada da localização do DPH e seu posicionamento em relação às caudas dos fosfolípidios será realizada mais a frente.

Figura 4.61: Numeração dos átomos pesados do DPH usados no cálculo do RMSF.

O gráfico de RMSF abaixo (figura 4.62) para a sonda foi muito semelhante nas duas DM (NpT1 e NpT2) e apresentou uma flutuação relativamente baixa, com máximo em torno de 1.5 Å.

Figura 4.62: *RMSF da DPH durante as simulações NpT1 e NpT2.*

Nele é possível perceber que as regiões da sonda que mais flutuaram compreendem os átomos dos anéis que se encontram mais distantes do eixo principal da molécula. De maneira geral, espera-se uma baixa flutuação em relação a sua estrutura média pelo fato de apresentar conjugação- π em todos os carbonos, dando uma caráter mais rígido a molécula.

Figura 4.63: *Representação dos dipolos de transição sobre o eixo principal do DPH (* Assumindo que os dipolos de absorção ($S0 \rightarrow S1$) e emissão $S1 \rightarrow S0$ são colineares).*

Nesse contexto, para representar os dipolos de transição da molécula, foi construído um vetor ligando os carbonos 2 e 10 do DPH (figura 4.61) com o objetivo de analisar a movimentação e a distribuição deste vetor a partir das trajetórias geradas pela DM.

Figura 4.64: Distribuição do ângulo entre o dipolo de transição e a normal da membrana de POPC.

Com isso foi possível obter a orientação do dipolo em relação ao eixo normal à bicamada através da distribuição dos ângulos entre este vetor e o eixo 'z' da membrana, representado na figura 4.64. No gráfico pode-se perceber que os ângulos que apresentam distribuição máxima estão entre 50° e 110° aproximadamente, para as duas DM, e apesar da distribuição ter um caráter homogêneo, os ângulos que representariam o alinhamento paralelo às caudas dos fosfolipídios (em torno de 0° e 180°) apresentam baixa ocorrência nas DM.

Este resultado indica que a molécula se alinha preferencialmente com seu eixo perpendicular em relação ao eixo normal à bicamada. Esse comportamento pode ser considerado uma novidade, devido ao fato da sonda estar localizada na região média das caudas lipídicas (figura 4.60), onde espera-se que a densidade atômica não permita esse tipo de alinhamento.

Figura 4.65: *Evolução temporal da coordenada 'z' dos carbonos 2 e 10 do DPH durante as DM.*

Pelo gráfico da figura 4.65 pode-se observar que a sonda apresenta contantes inversões do sentido do seu eixo principal. Este gráfico foi feito centralizando a trajetória no centro de massa da sonda e medindo a coordenada 'z' dos carbonos 2 e 10 do DPH durante as DM.

A inversão do sentido do eixo principal da molécula está associada a rotação perpendicular do dipolo do DPH em torno do seu eixo principal, e quando as curvas correspondentes aos carbonos 2 e 10 se aproximam da curva do centro de massa, indica que, naquele instante a sonda se alinha perpendicularmente à normal da membrana, com possibilidade de inversão do sentido do dipolo em 'z'.

Figura 4.66: *Projeção das coordenadas 'x' e 'y' no plano z=0 para os carbonos 2 e 10 do DPH.*

Utilizando a mesma trajetória da análise anterior, obtêm-se o gráfico da figura 4.66 projetando as coordenadas 'x' e 'y' dos carbonos 2 e 10 no plano z=0, onde é possível ver a região do plano cujos átomos apresentam maior população nas duas DM. Os pontos formam uma figura com padrão circular com o diâmetro aproximadamente igual ao tamanho da molécula (distância entre os carbonos 2 e 10).

Pelo gráfico observa-se que a os pontos vermelhos e azuis, que representam os carbonos, apresentam uma maior densidade na extremidade do círculo, indicando que a molécula permaneceu a maior parte do tempo alinhada perpendicularmente ao eixo normal à membrana.

Nota-se uma baixa densidade de pontos no centro do círculo, o que indica um alinhamento perpendicular do eixo principal do DPH em relação às caudas dos fosfolipídios.

Figura 4.67: Média da autocorrelação rotacional do dipolo do DPH nas DM NpT1 e NpT2 em POPC.

$$C(t) = A_1 \exp\left(\frac{-t}{\tau_1}\right) + A_2 \exp\left(\frac{-t}{\tau_2}\right) + C_\infty \quad (4.3)$$

A autocorrelação do dipolo da sonda durante a DM foi feita para as duas DM e a curva média está representada na figura 4.67. Com este gráfico é possível analisar os tempos de correlação rotacional da sonda quando imersa entre os fosfolipídios. Para este decaimento, foi feito uma ajuste bi-exponencial, de acordo com a equação 4.3 e os tempos e fatores pré-exponenciais foram comparados aos obtidos experimentalmente.

Figura 4.68: Anisotropia de fluorescência do DPH em POPC.

$$r(t) = A_1 \exp\left(\frac{-t}{\tau_1}\right) + A_2 \exp\left(\frac{-t}{\tau_2}\right) + r_\infty \quad (4.4)$$

O decaimento da anisotropia experimental para o DPH em POPC pode ser visto na figura 4.68 com ajuste também feito por uma curva bi-exponencial (Eq. 4.4). Os tempos de vida de anisotropia e os fatores pré-exponenciais estão na tabela a seguir.

Tabela 4.5: Valores obtidos para os ajustes das curvas de autocorrelação rotacional (figura 4.67) e anisotropia (figura 4.68) para o DPH em POPC.

	A_1	τ_1 (ns)	A_2	τ_2 (ns)	C_∞/r_∞	χ^2	R^2
DM	0.13 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.25 ± 0.01	3.57 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.91	0.99
Exper.	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.21 ± 0.01	1.86 ± 0.05	0.01 ± 0.01	1.16	—

A tabela 4.5 traz os valores ajustados dos tempos de correlação rotacionais para as curvas experimental e teórica do DPH em POPC, com 2 tempos característicos, uma mais longo, de 1.5 ns à 4.0 ns e um outro mais curto, menor que 1.0 ns, associados às duas configurações da sonda em membranas de POPC.

4.3.2.2 DMPC

Assim como para as DM do DPH em POPC, as análises de localização e mobilidade em DMPC foram feitas pelo EDP e RMSF durante as DM.

Figura 4.69: Representação 3D das DM (NpT1 e NpT2) do DPH em DMPC.

O EDP para as DM do DPH em DMPC representados na figura 4.70 mostra que a sonda se posicionou logo abaixo da interface entre os lipídios e a água.

Figura 4.70: EDP para as DM da sonda DPH em DMPC.

Essa distribuição indica que a sonda se alinhou paralelamente às caudas do DMPC, já que, para as duas DM, a sua densidade se distribui em torno de 20.0 Å desde a região da interface com a água até o centro da membrana, que é aproximadamente o tamanho do DPH em seu eixo principal.

O DMPC apresenta um grau de empacotamento maior para os lipídios, quando comparado ao POPC por exemplo e esta característica pode influenciar significativamente na interação da sonda com a membrana, como no caso da AHBA, onde houve uma menor penetração na membrana em uma das DM, possivelmente devido a este fator.

Figura 4.71: *RMSF da DPH em DMPC durante as simulações NpT1 e NpT2.*

O RMSF da sonda em DMPC mostrou que os átomos que mais se moveram foram os carbonos que estão mais distantes da reta que contém o eixo principal da molécula e como já foi dito, esta mobilidade caracteriza a rotação do DPH em torno deste eixo, que não contribui para a anisotropia de fluorescência.

O ângulo entre os dipolos de transição do DPH e o eixo 'z' da membrana foi monitorado durante as DM e o gráfico da figura 4.72 traz a distribuição deles durante as DM. Por essa distribuição é possível perceber que a maior população angular está em torno de 10° à 40°, caracterizando o alinhamento paralelo do eixo principal da sonda com o eixo 'z' da bicamada.

Figura 4.72: Distribuição do ângulo entre o dipolo de transição e a normal da membrana de DMPC.

Na DM NpT1, aparece um pequeno pico em torno de 160° , indicando que houve inversão do dipolo do DPH na direção 'z' e na DM NpT2, o pico em torno de 20° é muito maior do que na NpT1, e não se observa população significativa dos ângulos próximos a 180° , indicando que, para esta DM, não houve inversão do dipolo na direção normal à membrana.

O gráfico da figura 4.73 complementa o resultado anterior, pois por ele, é possível ver que na DM NpT1, a sonda demorou muito mais para entrar na bicamada (cerca de 30 ns) e uma vez imersa entre os lipídios, apresentou uma pequena inversão no sentido do dipolo nos últimos 10 ns de DM. Já para a NpT2, a sonda penetrou na membrana mais rapidamente (em torno de 2 ns), porém, durante os 100 ns de DM, a sonda não inverteu completamente o sentido do seu dipolo nenhuma vez.

Figura 4.73: Evolução temporal da coordenada 'z' dos carbonos 2 e 10 do DPH durante as DM.

Nas duas DM, a sonda ficou a maior parte do tempo alinhada paralelamente ao eixo 'z' da bicamada, comportamento diferente do que ocorreu nas DM em POPC, onde a sonda alinhou-se perpendicularmente ao eixo normal à membrana.

Figura 4.74: Projeção das coordenadas 'x' e 'y' no plano $z=0$ para os carbonos 2 e 10 do DPH.

A projeção das coordenadas 'x' e 'y' dos carbonos 2 e 10 no plano $z=0$ para as DM em DMPC (figura 4.74) apresentaram o mesmo perfil circular que na análise em POPC, porém, em DMPC as densidades dos pontos foram bem diferentes. Houve um grande acumulo de pontos no centro do círculo, indicando o alinhamento paralelo do eixo principal da sonda em relação ao lipídios.

Nas duas DM quase não é possível observar os pontos referentes ao centro de massa, sendo que na NpT1, houve um preenchimento maior do círculo de projeção, devido ao maior tempo que a sonda ficou fora da membrana.

Essa diferença entre as duas DM, e principalmente o fato de na simulação NpT1 a sonda ficar 30% do tempo total fora da bicamada, afetou significativamente os resultados de autocorrelação rotacional do dipolo. Abaixo, na figura 4.75, pode-se observar a diferença entre o decaimento para a NpT1 e NpT2, além da média entre as duas DM.

Figura 4.75: Autocorrelação rotacional do dipolo do DPH nas DM NpT1 e NpT2 e a média em DMPC.

É possível perceber que para a DM em que a sonda ficou mais tempo fora da membrana (NpT1), o decaimento foi muito mais acentuado quando comparado ao que a molécula imergiu entre os fosfolipídios rapidamente e possivelmente o fato de mover-se livremente na água durante 30 ns, fez com a sua difusão rotacional fosse muito mais rápida, dando este caráter ao decaimento da curva de autocorrelação.

Figura 4.76: Média da autocorrelação rotacional do dipolo do DPH nas DM NpT1 e NpT2 em DMPC.

Com isso, os resultados obtidos para a difusão rotacional do DPH em DMPC, ficaram prejudicados pelo baixo tempo efetivo de DM do DPH entre os lipídios. Para uma melhor autocorrelação dos dipolos da molécula, o tempo de simulação na bicamada deve ser maior, aumentando o tamanho da trajetória, possibilitando um número maior de conformações para a sonda e consequentemente melhorando a estatística do sistema.

Mesmo utilizando a curva obtida da DM NpT1 e ajustando o decaimento com uma curva bi-exponencial, os tempos obtidos não apresentaram boa concordância com os resultados obtidos experimentalmente.

Figura 4.77: Anisotropia de fluorescência do DPH em POPC.

O decaimento da anisotropia experimental para o DPH em DMPC pode ser observado no gráfico 4.77 e o ajuste da curva também foi feito por uma curva bi-exponencial (Eq. 4.4) e os valores de parâmetros obtidos podem ser vistos na tabela a seguir.

Tabela 4.6: Valores obtidos para os ajustes da curvas de autocorrelação rotacional (figura 4.76) e anisotropia (figura 4.77) para o DPH em DMPC.

	A_1	τ_1 (ns)	A_2	τ_2 (ns)	C_∞/r_∞	χ^2	R^2
DM	0.15 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.15 ± 0.01	16.82 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.24	0.98
Exper.	0.17 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.20 ± 0.01	1.74 ± 0.08	0.01 ± 0.01	0.97	—

A tabela 4.6 traz os valores ajustados dos tempos de correlação rotacionais para as curvas experimental e teórica do DPH em DMPC, os tempos encontrados para o decaimento não estão adequados para comparação com o experimental devido às dificuldades encontradas na obtenção da curva teórica correlação rotacional.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, são apresentados resultados das simulações por DM das sondas AHBA e DPH em solventes (DIOX e água) e membrana de POPC e DMPC. Ambas as sondas não apresentam afinidade com a água, devido ao caráter hidrofóbico do DPH e anfifílico da AHBA, que em água forma micelas a partir da concentração de $10\ \mu\text{M}$ [115].

As simulações em DIOX e água foram feitas com o objetivo de analisar a estrutura e solvatação destas sondas em solventes com diferentes constantes dielétricas que apresentam a característica de formar LH [116] entre suas moléculas. Além disso, existem alguns trabalhos na literatura sobre mudanças estruturais e de constante dielétricas envolvendo as misturas entre água e DIOX [117, 118].

Foi observado que em derivados do o-Abz em misturas **água:DIOX**, em razões volumétricas maiores que **50:50**, predominam interações via LH com a água, que resultam no desvio da linearidade da relação entre deslocamento de Stokes e polarizabilidade orientacional [43].

As simulações computacionais em POPC e DMPC foram realizadas na tentativa de se obter as curvas teóricas de autocorrelação rotacional da sonda em modelos de membrana e compará-las aos resultados experimentais de anisotropia de fluorescência obtidos a partir do espectrofotômetro com resolução temporal. Além disso, foi possível determinar qual a configuração que a sonda assume quando imersa na membrana, levando em conta o grau de empacotamento das cadeias dos dois lipídios utilizados.

5.1 DM em Solventes

As simulações em solventes mostraram que as sonda apresentam características bem distintas na interação com a água e DIOX.

No caso da AHBA, sua principal característica como sonda de membranas é a sua capacidade de ancorar-se entre os fosfolipídios e deixar exposta a sua cabeça polar para o solvente. A sua interação com a água deve se dar principalmente pela formação de ligações de hidrogênio, já que nesta região existem átomos doadores e aceptadores de LH.

Nas simulações com água e DIOX, a AHBA apresentou mobilidade característica da sua estrutura molecular, sendo que as regiões que se movimentaram mais foram as suas extremidades.

As análises de solvatação evidenciaram que a cabeça polar da sonda forma LH com a água e com o DIOX, porém, ao aumentar a quantidade de água na caixa de simulação, aumenta-se a interação com o DIOX, possivelmente devido a repulsão entre a cauda apolar da sonda e o cluster formado pelas moléculas de água. Estes resultados merecem estudo mais detalhado, para comparação das observações feitas em derivados do o-Abz que não possuem a cauda alifática [43].

Nesse sentido, simulações com uma maior quantidade de solvente e/ou com um maior número de proporções entre água e DIOX podem ser esclarecedoras a respeito desta interação entre a AHBA e o ambiente, já que a formação de fases entre a água e o DIOX pode afetar o seu alinhamento, mobilidade e dinâmica.

No caso do DPH, que é uma molécula hidrofóbica e com uma estrutura molecular bem mais rígida em relação a AHBA, a alteração nas proporções de água e DIOX não afetou significativamente sua mobilidade em relação a estrutura inicial e nem a mobilidade dos seus átomos em relação a estrutura média.

A distribuição dos solventes em torno do seu centro de massa indicou pouca interação com a água, e a formação de seguidas camadas de solvatação do DIOX em torno da sonda. O resultado mais interessante foi observado ao comparar as camadas de DIOX formadas em todas as DM.

Foi possível perceber que, a medida que aumentava-se a quantidade de água na caixa, as camadas de DIOX em torno do DPH ficavam mais evidentes e além disso, não foi observada mudança na distância das camadas, somente o aumento dos picos de solvatação. Essa característica pode estar associada a maior repulsão entre a água e o DPH.

Simulações com maior quantidade de solventes e/ou com um maior número de proporções entre água e DIOX, também podem ser úteis na caracterização da interação do DPH com o ambiente.

5.2 DM em Membranas

As DM em membranas foram realizadas para coleta de informações sobre a dinâmica rotacional das sondas em bicamadas e para caracterização, em escala atômica, da localização e configuração da sonda em relação aos lipídios. Além disso, na literatura, existem diversos trabalhos envolvendo simulações por DM de sondas fluorescentes [119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127], comprovando a importância desta técnica em estudos deste tipo.

5.2.1 AHBA

As DM da sonda AHBA em POPC e DMPC mostraram que a parte polar da sonda se localiza preferencialmente na interface entre a água e a bicamada, com a cauda funcionando como uma âncora entre os lipídios. funcionando como uma âncora entre os lipídios. Acrescentar Os resultados dão suporte às observações experimentais a respeito da localização da sonda na interface de micelas e vesículas, e sua utilização para determinação, por exemplo, de potenciais elétricos na superfície dos agregados [16].

A AHBA apresentou uma maior penetração em POPC, que tem um grau de empacotamento menor, devido a presença de uma saturação em uma das caudas.

Essa diferença na penetração da sonda foi comprovada pelo EDP e apesar disso, pelo RMSF, a sonda apresentou uma menor flutuação em relação a sua estrutura média para a DM em DMPC, o que pode ser explicado também pelo maior grau de empacotamento das bicamadas formadas por este tipo de lipídio.

Apesar disso, os tempos obtidos para a sua correlação rotacional foram maiores em POPC, com destaque para a componente mais rápida (τ_1), que foi cerca de 7 vezes maior (tabela 5.1) nesta bicamada. O número de LH e a distribuição radial das moléculas de água em torno da cabeça polar da AHBA não apresentaram significativas diferenças nas DM em DMPC e POPC.

Tabela 5.1: Valores obtidos para os ajustes das curvas de autocorrelação rotacional para a AHBA em POPC e em DMPC.

Membrana	A_1	τ_1 (ns)	A_2	τ_2 (ns)	C_∞/r_∞	χ^2	R^2
POPC	0.22 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.12 ± 0.01	3.42 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.35	0.99
DMPC	0.10 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.24 ± 0.01	3.25 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.71	0.99

Pode-se concluir destas análises que a os tempos de correlação rotacional da AHBA estão associados a sua mobilidade no ambiente em que se encontram.

O fato da componente de menor tempo e seu respectivo fator pré exponencial ter diminuído em DMPC e a flutuação da sonda também ter sido menor neste lipídio, cria uma associação entre a contribuição desta componente à flutuação da sonda em relação a sua estrutura média sendo que, a componente de maior tempo, pode estar associada à difusão da sua cabeça polar no plano da membrana.

O mesmo comportamento para os fatores pré exponenciais pode ser observado nos ajustes da curva experimental de anisotropia de fluorescência, apenas com menor intensidade, sendo que os tempos ajustados (τ_1 e τ_2) não foram muito diferentes para as duas membranas (tabela 5.2).

Tabela 5.2: Valores obtidos para os ajustes das curvas de anisotropia de fluorescência para a AHBA em POPC e em DMPC.

Membrana	A_1	τ_1 (ns)	A_2	τ_2 (ns)	C_∞/r_∞	χ^2	R^2
POPC	0.15 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.16 ± 0.01	1.74 ± 0.08	0.00 ± 0.01	1.11	—
DMPC	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.18 ± 0.01	2.12 ± 0.06	0.00 ± 0.01	1.08	—

5.2.2 DPH

As simulações da sonda DPH em membranas foram muito importantes, principalmente devido ao fato de não haver um consenso a respeito da sua localização, difusão rotacional e alinhamento quando imersa entre os fosfolipídios.

Em 1977, Kinosita e colaboradores [128] caracterizaram um tipo de movimento chamado de *woobling-in-a-cone*, assumindo que o DPH se alinha paralelamente às caudas dos lipídios.

Em 1996, Levine e colaboradores [129], interpretam os resultados de fluorescência do DPH em termos de uma curva bi-exponencial, trazendo a ideia da presença de duas populações da sonda em membranas. O mais interessante é que neste trabalho ele conclui que a maior parte dos DPH estão alinhados paralelamente à superfície da bicamada.

Além disso, existem outros trabalhos que levam a crer que existem duas populações de DPH em membranas [130, 131].

Com a aplicação da teoria ergódica [132, 133], que relaciona a média no tempo com a média no espaço, os resultados apresentados neste trabalho confirmam a presença de duas populações de DPH em membranas em POPC, uma com baixa ocorrência, cujo eixo principal da molécula alinha-se paralelamente às caudas dos lipídios, e uma outra, com maior ocorrência, onde a sonda se alinha paralelamente à superfície da membrana, a uma distância de aproximadamente 9.0 Å do centro da bicamada.

A flutuação da sonda foi baixa, devido ao fato da sonda ter uma estrutura molecular bastante rígida, além disso, durante a DM, houve a inversão do sentido do dipolo da sonda na direção 'z'.

Os ajustes para a curva de autocorrelação rotacional do DPH foram comparados aos experimentais, e apesar de não estarem próximos, os fatores pré exponenciais e os tempos de correlação, ficaram na mesma ordem de grandeza.

Para a DM em DMPC, os resultados não foram conclusivos devido ao pouco tempo de simulação, que prejudicou a obtenção da curva de autocorrelação do dipolo, e também pelo fato de em uma das DM a sonda ter demorado muito pra penetrar na membrana.

Mesmo assim, foi possível perceber que para este lipídio, a sonda preferencialmente alinha-se paralelamente às caudas dos lipídios e quase não há a inversão do sentido do dipolo na direção 'z'.

Esse comportamento pode estar associado ao grau de empacotamento dos lipídios de DMPC que pode ter prendido a sonda entre suas caudas, e também ao pouco tempo de DM, já que a sonda não chegou ao centro da bicamada, onde poderia ter mais liberdade para se mover.

Para este sistema, ficou claro que há a necessidade de um tempo maior de simulação para avaliação da autocorrelação rotacional da sonda e para confirmação do tipo de alinhamento que o dipolo da sonda apresenta quando ela está imersa entre os lipídios.

5.3 Conclusões Gerais

Em geral, os resultados obtidos, tanto para as DM em solventes como para as DM em membranas, indicaram que as simulações podem ajudar muito na criação de modelos para a interação das sondas fluorescentes com o ambiente e na interpretação dos resultados de anisotropia de fluorescência.

De certa forma, pode-se concluir que é necessário um tempo maior de DM das sondas em membranas, para que a curva de autocorrelação possa explicar melhor os resultados experimentais, principalmente em condições que a sonda apresenta maior restrição nos seus movimentos.

5.4 Perspectivas para Continuidade do Trabalho

Com o avanço dos métodos e dos computadores, será cada vez mais fácil obter resultados confiáveis e que expliquem os processos envolvidos nas interações em sistemas biológicos.

Sendo assim, como perspectivas para trabalhos futuros, propõe-se:

1. Aumentar o tempo de simulação para que os a trajetória obtida possa representar bem os tempos de autocorrelação rotacional das sondas em ambientes como membranas e proteínas.

2. Simulações em outras temperaturas para construção de um modelo mais completo de interação da sonda com diferentes fases das bicamadas.
3. Complementação dos resultados obtidos da DM com outras técnicas experimentais, como por exemplo, Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) e Espectroscopia de Correlação de Fluorescência (FCS).
4. Término das simulações em esquema *Coarse-Grained* das sondas em vesículas para análise de outras informações a respeito da interação da sonda com membranas, como por exemplo, saturação da sonda nas bicamadas, distância média entre as sondas e penetração das sondas na vesícula.
5. Análise mais detalhada da interação das sondas com os lipídios à sua volta.
6. Realização do mesmo tipo de estudo para outras sondas fluorescentes, como por exemplo o BODIPY, NBD, Pireno, Triptofano, dentre outros, em membrana e também em proteínas e solventes.
7. Obtenção de espectros de absorção e emissão teóricos das sondas em membranas, proteínas e solventes.

REFERÊNCIAS

- [1] VALEUR, B. *Molecular fluorescence: principles and applications*. [S.l.]: Wiley-Vch, 2001. ISBN 9783527299195.
- [2] HOLDE, K. V.; JOHNSON, W.; HO, P. Principles of physical biochemistry. 2006.
- [3] LAKOWICZ, J. R. *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Protein Fluorescence*. [S.l.]: Springer Us, 2000. ISBN 0306464519.
- [4] BLACKMAN, S. M.; PISTON, D. W.; BETH, A. H. Oligomeric state of human erythrocyte band 3 measured by fluorescence resonance energy homotransfer. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 75, n. 2, p. 1117–1130, ago. 1998. ISSN 0006-3495.
- [5] CHEN, Y. X. et al. Interactions of Hemoglobin with Vesicles and Tubes Formed from Mixtures of Histidine-Derived Bolaamphiphile and Conventional Surfactants. *Journal of solution chemistry*, Springer, v. 40, n. 1, p. 1–13, dez. 2010. ISSN 0095-9782.
- [6] SUWALSKY, M. et al. Effects of phenylpropanolamine (PPA) on in vitro human erythrocyte membranes and molecular models. *Biochemical and biophysical research communications*, Elsevier Inc., v. 406, n. 3, p. 320–5, mar. 2011. ISSN 1090-2104.
- [7] BRAND, L.; JOHNSON, M. *Methods in enzymology, Fluorescence Spectroscopy*. 1st editio. ed. [S.l.]: Academic Press, 1997. 628 p. ISBN 012182179X.
- [8] BANERJEE, D.; SRIVASTAVA, S. K. Spectroscopic Studies on Ligand-Enzyme Interactions: Complexation of α -Chymotrypsin with 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI). *The Journal of Physical*, 2008.

- [9] KHAN, Y. Y. R.; DYKSTRA, T. E.; SCHOLLES, G. G. D. Exploring the Förster limit in a small FRET pair. *Chemical Physics Letters*, Elsevier, v. 461, n. 4-6, p. 305–309, ago. 2008. ISSN 00092614.
- [10] EDIDIN, M. Rotational and translational diffusion in membranes. *Annual review of biophysics and bioengineering*, v. 3, p. 179–201, jan. 1974. ISSN 0084-6589.
- [11] MACHÁŇ, R.; HOF, M. Lipid diffusion in planar membranes investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochimica et biophysica acta*, Elsevier B.V., v. 1798, n. 7, p. 1377–1391, fev. 2010. ISSN 0006-3002.
- [12] WILDENBERG, S. M. J. L. van den; BOLLEN, Y. J. M.; PETERMAN, E. J. G. How to quantify protein diffusion in the bacterial membrane. *Biopolymers*, v. 95, n. 5, p. 312–321, jan. 2011. ISSN 0006-3525.
- [13] RAO, M.; MAYOR, S. Use of Forster's resonance energy transfer microscopy to study lipid rafts. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1746, n. 3, p. 221–233, dez. 2005. ISSN 0006-3002.
- [14] ALMEIDA, R. F. M. de; LOURA, L. M. S.; PRIETO, M. Membrane lipid domains and rafts: current applications of fluorescence lifetime spectroscopy and imaging. *Chemistry and physics of lipids*, Elsevier, v. 157, n. 2, p. 61–77, fev. 2009. ISSN 1873-2941.
- [15] THOMAS, L. et al. The interaction of neuropeptide Y with negatively charged and zwitterionic phospholipid membranes. *European Biophysics Journal*, Springer, v. 38, n. 5, p. 663–677, 2009. ISSN 0175-7571.
- [16] MARQUEZIN, C. A. et al. Spectroscopic characterization of 2-amino-N-hexadecyl-benzamide (AHBA), a new fluorescence probe for membranes. *Biophysical chemistry*, v. 124, n. 2, p. 125–133, nov. 2006. ISSN 0301-4622.
- [17] GODULA, K. et al. Control of the Molecular Orientation of Membrane-Anchored Biomimetic Glycopolymers. *Journal of the American*

- Chemical Society*, American Chemical Society, v. 131, n. 29, p. 10263–8, jul. 2009. ISSN 1520-5126.
- [18] KLYMCHENKO, A. S. et al. Bimodal distribution and fluorescence response of environment-sensitive probes in lipid bilayers. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 86, n. 5, p. 2929–2941, 2004. ISSN 0006-3495.
- [19] LAPINSKI, M. M. et al. Comparison of liposomes formed by sonication and extrusion: rotational and translational diffusion of an embedded chromophore. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, v. 23, n. 23, p. 11677–11683, nov. 2007. ISSN 0743-7463.
- [20] CARNINI, A. et al. Revisiting lipid-general anesthetic interactions (II): Halothane location and changes in lipid bilayer microenvironment monitored by fluorescence. *Canadian journal of chemistry*, NRC Research Press, v. 82, n. 7, p. 1139–1149, 2004.
- [21] HUSTER, D.; MÜLLER, P.; ARNOLD, K. Dynamics of membrane penetration of the fluorescent 7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-yl (NBD) group attached to an acyl chain of phosphatidylcholine. *Biophysical Journal*, 2001.
- [22] LOURA, L. M.; CARVALHO, a. P.; RAMALHO, J. P. Direct calculation of Förster orientation factor of membrane probes by molecular simulation. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, v. 946, n. 1-3, p. 107–112, abr. 2010. ISSN 01661280.
- [23] GOTO, M. et al. Prodan fluorescence detects the bilayer packing of asymmetric phospholipids. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, Elsevier B.V., v. 84, n. 1, p. 55–62, maio 2011. ISSN 1873-4367.
- [24] MANITI, O. et al. Acyl chain composition determines cardiolipin clustering induced by mitochondrial creatine kinase binding to monolayers. *Biochimica et biophysica acta*, Elsevier B.V., v. 1808, n. 4, p. 1129–1139, abr. 2011. ISSN 0006-3002.
- [25] POLVERINI, E. et al. Conformational choreography of a molecular switch region in myelin basic protein–molecular dynamics shows induced folding and

- secondary structure type conversion upon threonyl phosphorylation in both aqueous and membrane-associated environments. *Biochimica et biophysica acta*, Elsevier B.V., v. 1808, n. 3, p. 674–683, mar. 2011. ISSN 0006-3002.
- [26] WEBER, I. T.; HARRISON, R. W. Molecular mechanics analysis of drug-resistant mutants of HIV protease. *Protein engineering*, v. 12, n. 6, p. 469–74, jun. 1999. ISSN 0269-2139.
- [27] CHEN, H.-F. Molecular Dynamics Simulation of Phosphorylated KID Post-Translational Modification. *PLoS ONE*, Public Library of Science, v. 4, n. 8, p. 8, 2009.
- [28] ZHOU, R. Replica exchange molecular dynamics method for protein folding simulation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 350, n. November, p. 205–223, jan. 2007. ISSN 1064-3745.
- [29] ZHANG, J. et al. Protein folding simulations: from coarse-grained model to all-atom model. *IUBMB life*, v. 61, n. 6, p. 627–643, jun. 2009. ISSN 1521-6551.
- [30] TALY, J.-F.; MARIN, A.; GIBRAT, J.-F. Can molecular dynamics simulations help in discriminating correct from erroneous protein 3D models? *BMC Bioinformatics*, BioMed Central, v. 9, p. 6, 2008.
- [31] FUERTES, G. et al. A lipocentric view of peptide-induced pores. *European biophysics journal : EBJ*, v. 40, n. 4, p. 399–415, abr. 2011. ISSN 1432-1017.
- [32] ELLENA, J. F. et al. Membrane Thickness Varies Around the Circumference of the Transmembrane Protein BtuB. *Biophysical journal*, Biophysical Society, v. 100, n. 5, p. 1280–1287, mar. 2011. ISSN 1542-0086.
- [33] ONCUL, S. et al. Liquid ordered phase in cell membranes evidenced by a hydration-sensitive probe: effects of cholesterol depletion and apoptosis. *Biochimica et biophysica acta*, Elsevier B.V., v. 1798, n. 7, p. 1436–1443, jul. 2010. ISSN 0006-3002.
- [34] SILVA, C. et al. Molecular aspects of the interaction between plants sterols and DPPC bilayers An experimental and theoretical approach. *Journal of colloid*

- and interface science*, Elsevier Inc., v. 358, n. 1, p. 192–201, jun. 2011. ISSN 1095-7103.
- [35] WYDRO, P.; KNAPCZYK, S.; LAPCZYŃSKA, M. Variations in the Condensing Effect of Cholesterol on Saturated versus Unsaturated Phosphatidylcholines at Low and High Sterol Concentration. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, v. 27, n. 9, p. 5433–5444, maio 2011. ISSN 1520-5827.
- [36] HELLER, H.; SCHAEFER, M.; SCHULTEN, K. Molecular dynamics simulation of a bilayer of 200 lipids in the gel and in the liquid crystal phase. *The Journal of Physical Chemistry*, ACS Publications, v. 97, n. 31, p. 8343–8360, 1993.
- [37] ITO, A. S. et al. Fluorescent properties of amino acids labeled with ortho-aminobenzoic acid. *Biospectroscopy*, v. 4, n. 6, p. 395–402, jan. 1998. ISSN 1075-4261.
- [38] CHAGAS, J. R. et al. Determinants of the unusual cleavage specificity of lysyl-bradykinin-releasing kallikreins. *Biochemical Journal*, Portland Press Ltd, v. 306, n. Pt 1, p. 63, fev. 1995. ISSN 0264-6021.
- [39] SOUZA, E.; HIRATA, I.; JULIANO, L. End-to-end distribution distances in bradykinin observed by fluorescence energy transfer. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000.
- [40] PIMENTA, D. C. et al. Interaction of heparin with internally quenched fluorogenic peptides derived from heparin-binding consensus sequences, kallistatin and anti-thrombin III. *Biochemical Journal*, Portland Press Ltd, v. 366, n. Pt 2, p. 435, 2002.
- [41] ITO, A. S.; SOUZA, E. S. de. Fluorescence study of conformational properties of melanotropins labeled with aminobenzoic acid. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 81, n. 2, p. 1180–1189, ago. 2001. ISSN 0006-3495.

- [42] TAKARA, M.; ITO, A. S. General and specific solvent effects in optical spectra of ortho-aminobenzoic acid. *Journal of fluorescence*, v. 15, n. 2, p. 171–177, mar. 2005. ISSN 1053-0509.
- [43] TAKARA, M. et al. Solvent effects in optical spectra of ortho-aminobenzoic acid derivatives. *Journal of fluorescence*, v. 19, n. 6, p. 1053–1060, nov. 2009. ISSN 1573-4994.
- [44] TURCHIELLO, R. F. et al. Ortho-aminobenzoic acid as a fluorescent probe for the interaction between peptides and micelles. *Biophysical chemistry*, Elsevier, v. 73, n. 3, p. 217–225, jul. 1998. ISSN 0301-4622.
- [45] TURCHIELLO, R. F. et al. Ortho-aminobenzoic acid-labeled bradykinins in interaction with lipid vesicles: Fluorescence study. *Biopolymers*, Wiley Online Library, v. 65, n. 5, p. 336–346, 2002.
- [46] SHINITZKY, M.; BARENHOLZ, Y. Dynamics of the hydrocarbon layer in liposomes of lecithin and sphingomyelin containing dicetylphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, v. 249, n. 9, p. 2652–2657, 1974.
- [47] TROTTER, P. J.; STORCH, J. 3-[p-(6-phenyl)-1,3,5-hexatrienyl]phenylpropionic acid (PA-DPH): characterization as a fluorescent membrane probe and binding to fatty acid binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 982, n. 1, p. 131–139, 1989.
- [48] LAKOWICZ, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. [S.l.: s.n.], 2006. ISBN 9780387312781.
- [49] KINOSITA, K.; IKEGAMI, a.; KAWATO, S. On the wobbling-in-cone analysis of fluorescence anisotropy decay. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 37, n. 2, p. 461–4, fev. 1982. ISSN 0006-3495.
- [50] KERLÖF, G. A.; SHORT, O. The dielectric constant of dioxane—water mixtures between 0 and 80. *Journal of the American Chemical Society*, v. 40, n. 1, p. 3–5, 1936.

- [51] SINGER, S. S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, v. 175, n. 23, p. 720–731, 1972.
- [52] GUVENCH, O.; MACKERELL, A. D. Automated conformational energy fitting for force-field development. *Journal of molecular modeling*, v. 14, n. 8, p. 667–679, ago. 2008. ISSN 0948-5023.
- [53] ALDER, B. J.; WAINWRIGHT, T. E. Studies in Molecular Dynamics. II. Behavior of a Small Number of Elastic Spheres. *The Journal of Chemical Physics*, v. 33, n. 5, p. 1439, 1960. ISSN 00219606.
- [54] RAHMAN, A. Correlations in the motion of atoms in liquid argon. *Physical Review*, APS, v. 136, n. 2A, p. 405–411, 1964.
- [55] RAHMAN, A. Molecular Dynamics Study of Liquid Water. *The Journal of Chemical Physics*, v. 55, n. 7, p. 3336, 1971. ISSN 00219606.
- [56] ALLEN, M. P. *Computer simulation of liquids*. [S.l.]: Clarendon Press, 1999. 385 p.
- [57] FRENKEL, D.; SMIT, B.; RATNER, M. Understanding molecular simulation: from algorithms to applications. *Physics Today*, 1997.
- [58] MORGON, N.; COUTINHO, K. *Métodos de química teórica e modelagem molecular*. [S.l.: s.n.], 2007.
- [59] VERLET, B. Verlet integration. p. 1–11, 1967.
- [60] Van Gunsteren, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. A Leap-frog Algorithm for Stochastic Dynamics. *Molecular Simulation*, Taylor & Francis, v. 1, n. 3, p. 173–185, 1988. ISSN 08927022.
- [61] NAMD. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>. [S.l.]: Technical report, 2013.
- [62] DAURA, X.; MARK, A. E.; Van Gunsteren, W. F. Parametrization of aliphatic CH_n united atoms of GROMOS96 force field. *Journal of Computational Chemistry*, v. 19, n. 5, p. 535–547, abr. 1998. ISSN 0192-8651.

- [63] LIN, Z.; Van Gunsteren, W. F.; LIU, H. Conformational state-specific free energy differences by one-step perturbation: Protein secondary structure preferences of the GROMOS 43A1 and 53A6 force fields. *Journal of Computational Chemistry*, Wiley Online Library, 2011.
- [64] JORGENSEN, W. L.; MAXWELL, D. S.; TIRADO-RIVES, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *Journal of the American Chemical Society*, v. 118, n. 45, p. 11225–11236, jan. 1996. ISSN 0002-7863.
- [65] WEINER, S. J. et al. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *Journal of the American Chemical Society*, v. 106, n. 3, p. 765–784, fev. 1984. ISSN 0002-7863.
- [66] BROOKS, B. R. et al. CHARMM: the biomolecular simulation program. *Journal of computational chemistry*, John Wiley & Sons, v. 30, n. 10, p. 1545–1614, 2009.
- [67] TAYLOR, J. et al. Validation of all-atom phosphatidylcholine lipid force fields in the tensionless NPT ensemble. *Biochimica et biophysica acta*, Elsevier B.V., v. 1788, n. 3, p. 638–649, mar. 2009. ISSN 0006-3002.
- [68] SUN, H. COMPASS: An ab Initio Force-Field Optimized for Condensed-Phase Applications Overview with Details on Alkane and Benzene Compounds. *The Journal of Physical Chemistry B*, American Chemical Society, v. 102, n. 38, p. 7338–7364, 1998. ISSN 15206106.
- [69] SUN, H.; REN, P.; FRIED, J. R. The COMPASS force field: parameterization and validation for phosphazenes. *Computational and Theoretical Polymer Science*, v. 8, n. 1-2, p. 229–246, 1998. ISSN 10893156.
- [70] WANG, G.-X. et al. Packing structures and periodic band calculations on DPO (2,5-dipicryl-1,3,4-oxadiazole). *Journal of Hazardous Materials*, v. 169, n. 1-3, p. 813–818, 2009.

- [71] MAYO, S. L.; OLAFSON, B. D.; GODDARD, W. A. DREIDING: a generic force field for molecular simulations. *Journal of Physical Chemistry*, American Chemical Society, v. 94, n. 26, p. 8897–8909, 1990. ISSN 00223654.
- [72] RAPPÉ, A. K. et al. UFF force field. *Journal of the American Chemical Society*, v. 114, p. 10024, 1992.
- [73] KÜNZEL, D. et al. Bis(terpyridine)-based surface template structures on graphite: a force field and DFT study. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 11, n. 39, p. 8867–8878, 2009.
- [74] DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics*, v. 98, n. April, p. 10089, 1993.
- [75] ESSMANN, U. et al. A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics*, AIP, v. 103, n. 19, p. 8577–8593, 1995. ISSN 00219606.
- [76] SAGUI, C.; DARDEN, T. A. P3M and PME: A Comparison of the two Methods. In: PRATT, L. R.; HUMMER, G. (Ed.). [S.l.]: AIP, 1999. v. 492.
- [77] LUTY, B. A. et al. A comparison of particle-particle, particle-mesh and ewald methods for calculating electrostatic interactions in periodic molecular- systems. *Molec Simul*, v. 14, p. 11–20, 1994.
- [78] LEACH, A. R. Molecular modelling: principles and applications. 2001.
- [79] KANDASAMY, S. K.; LARSON, R. G. Binding and insertion of alpha-helical anti-microbial peptides in POPC bilayers studied by molecular dynamics simulations. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 132, n. 1, p. 113–132, 2004.
- [80] PRATES; SOUZA, P.; PICKHOLZ, M. CHARMM-Based Parameterization of Neutral Articaine—A Widely Used Local Anesthetic. *International Journal of*, v. 111, p. 1339–1345, 2011.
- [81] MOORE, P. B.; LOPEZ, C. F.; KLEIN, M. L. Dynamical properties of a hydrated lipid bilayer from a multnanosecond molecular dynamics simulation. *Biophysical journal*, v. 81, n. 5, p. 2484–94, nov. 2001. ISSN 0006-3495.

- [82] CARL-JOHAN HÖGBERG, ALEXEI M. NIKITIN, A. P. L. Modification of the CHARMM force field for DMPC lipid bilayer. *J. Comput. Chem*, 2008.
- [83] O'CONNOR, J. W.; KLAUDA, J. B.; O'CONNOR, J. Lipid Membranes with a Majority of Cholesterol: Applications to the Ocular Lens and Aquaporin 0. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 115, n. 20, p. 6455–6464, maio 2011. ISSN 1520-5207.
- [84] FOLOPPE, N.; MACKERELL, A. D. All-atom empirical force field for nucleic acids: I. Parameter optimization based on small molecule and condensed phase macromolecular target data. *Journal of Computational Chemistry*, John Wiley & Sons, v. 21, n. 2, p. 86–104, 2000. ISSN 01928651.
- [85] SAPAY, N.; TIELEMAN, D. P. Combination of the CHARMM27 force field with united-atom lipid force fields. *Journal of computational chemistry*, Wiley Online Library, 2010.
- [86] JORGENSEN, W. W. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of chemical physics*, v. 79, p. 926, 1983.
- [87] SERRANO-ANDRÉS, L.; ROOS, B. Theoretical study of the absorption and emission spectra of indole in the gas phase and in a solvent. *Journal of the American Chemical Society*, v. 118, n. 5, p. 185–195, 1996.
- [88] BECKE, A. D. A new mixing of Hartree–Fock and local density-functional theories. *The Journal of Chemical Physics*, v. 98, n. 2, p. 1372, 1993. ISSN 00219606.
- [89] KRISHNAN, R. et al. Self-consistent molecular orbital methods. XX. A basis set for correlated wave functions. *The Journal of Chemical Physics*, v. 72, p. 650, 1980.
- [90] BECKER, O. et al. *Computational biochemistry and biophysics*. [S.l.: s.n.], 2001.

- [91] MARQUEZIN, C. A. *Ácido orto-aminobenzóico-hexadecilamida: uma nova sonda fluorescentes para biomembranas-modelo*. 91 p. Tese (Dissertação de mestrado.) — Universidade de São Paulo, 2004.
- [92] VANOMMESLAEGHE, K. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *Journal of Computational Chemistry*, 2010.
- [93] PARAMCHEM. www.paramchem.org/index.php.
- [94] BRENEMAN, C.; WIBERG, K. Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials. The need for high sampling density in formamide conformational analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 1990.
- [95] SINGH, U.; KOLLMAN, P. An approach to computing electrostatic charges for molecules. *Journal of Computational Chemistry*, 1984.
- [96] BESLER, B.; MERZ, K.; KOLLMAN, P. Atomic charges derived from semiempirical methods. *Journal of Computational Chemistry*, v. 11, n. 4, p. 431–439, 1990.
- [97] MACKEREL. mackerell.umaryland.edu/MacKerell_Lab.html.
- [98] MOLLER, J.; JONES, M.; CHAPMAN, D. *Micelles, monolayers, and biomembranes*. [S.l.]: Wiley-Liss New York, 1995. ISBN 9780471561392.
- [99] CHARMM-GUI. www.charmm-gui.org/.
- [100] JO, S. et al. CHARMM-GUI membrane builder for mixed bilayers and its application to yeast membranes. *Biophysical journal*, Biophysical Society, v. 97, n. 1, p. 50–8, jul. 2009. ISSN 1542-0086.
- [101] TUCKERMAN, M.; BERNE, B. J.; MARTYNA, G. J. Reversible multiple time scale molecular dynamics. *The Journal of Chemical Physics*, v. 97, n. 3, p. 1990, 1992. ISSN 00219606.
- [102] KUCERKA, N.; TRISTRAM-NAGLE, S.; NAGLE, J. F. Structure of fully hydrated fluid phase lipid bilayers with monounsaturated chains. *The Journal of membrane biology*, v. 208, n. 3, p. 193–202, dez. 2005. ISSN 0022-2631.

- [103] MARTÍNEZ, J. M.; MARTÍNEZ, L. Packing optimization for automated generation of complex system's initial configurations for molecular dynamics and docking. *Journal of computational chemistry*, v. 24, n. 7, p. 819–825, maio 2003. ISSN 0192-8651.
- [104] HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD – Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, v. 14, p. 33–38, 1996.
- [105] SCHAFTENAAR, G.; NOORDIK, J. H. Molden: a pre- and post-processing program for molecular and electronic structures*. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, Springer Netherlands, v. 14, n. 2, p. 123–134, mar. 2000. ISSN 0920-654X.
- [106] INKSCAPE. *inkscape.org*. [S.l.]: Technical report, 2011.
- [107] GIMP. *http://www.gimp.org*. [S.l.]: Technical report, 2011.
- [108] DENNINGTON, R.; KEITH, T.; MILLAM, J. *GaussView Version 5*.
- [109] Schrödinger, LLC. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1*. August 2010.
- [110] GRACE. *plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/*. [S.l.]: Technical report, 2011.
- [111] JONES, E. et al. *SciPy: Open source scientific tools for Python*. 2001–. Disponível em: <<http://www.scipy.org/>>.
- [112] BRESSERT, E. *SciPy and NumPy: An Overview for Developers*. [S.l.: s.n.], 2012.
- [113] MICHAUD-AGRAWAL, N. MDAnalysis: A toolkit for the analysis of molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 2011.
- [114] ROMO, T. D.; GROSSFIELD, A. LOOS: an extensible platform for the structural analysis of simulations. *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference*, v. 2009, p. 2332–5, jan. 2009. ISSN 1557-170X.

- [115] MARQUEZIN, C. A. *Ácido orto-aminobenzóico-hexadecilamina: uma nova sonda fluorescente para biomembranas-modelo*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2004.
- [116] CHAUDHARI, A. Hydrogen bonding interaction between 1,4-dioxane and water. *International Journal of Quantum Chemistry*, v. 110, p. 1092–1099, 2010.
- [117] TAKAMUKU, T.; YAMAGUCHI, A.; TABATA, M. Structure and dynamics of 1, 4-dioxane-water binary solutions studied by X-ray diffraction, mass spectrometry, and NMR relaxation. *Journal of molecular Liquids*, v. 83, n. 09740444, p. 163–177, 1999.
- [118] AHN-ERCAN, G.; KRIENKE, H.; SCHMEER, G. Structural and dielectric properties of 1,4-dioxane – water mixtures. *Journal of Molecular Liquids*, v. 129, n. 1-2, p. 75–79, out. 2006. ISSN 01677322.
- [119] LOURA, L. M. S.; RAMALHO, J. P. P. Location and dynamics of acyl chain NBD-labeled phosphatidylcholine (NBD-PC) in DPPC bilayers. A molecular dynamics and time-resolved fluorescence anisotropy study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1768, n. 3, p. 467–478, 2007. ISSN 0005-2736.
- [120] VOS, W. L. et al. Molecular dynamics simulations reveal that AEDANS is an inert fluorescent probe for the study of membrane proteins. *European biophysics journal : EBJ*, n. 2, p. 229–39, jan. ISSN 1432-1017.
- [121] LOURA, L. M. S.; RAMALHO, J. P. P. Recent developments in molecular dynamics simulations of fluorescent membrane probes. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 16, n. 7, p. 5437–52, jan. 2011. ISSN 1420-3049.
- [122] SONG, K. C. et al. Orientation of fluorescent lipid analogue BODIPY-PC to probe lipid membrane properties: insights from molecular dynamics simulations. *The journal of physical chemistry. B*, n. 19, p. 6157–65, maio. ISSN 1520-5207.
- [123] FILIPE, H. a. L.; MORENO, M. J. a.; LOURA, L. M. S. Interaction of 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-labeled fatty amines with 1-palmitoyl,

- 2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine bilayers: a molecular dynamics study. *The journal of physical chemistry. B*, n. 33, p. 10109–19, ago. ISSN 1520-5207.
- [124] KYRYCHENKO, A. et al. Partitioning of 2,6-Bis(1H-Benzimidazol-2-yl)pyridine fluorophore into a phospholipid bilayer: complementary use of fluorescence quenching studies and molecular dynamics simulations. *Biophysical chemistry*, Elsevier B.V., n. 1, p. 8–17, fev. ISSN 1873-4200.
- [125] NITSCHKE, W. K. et al. Molecular dynamics investigations of PRODAN in a DLPC bilayer. *The journal of physical chemistry. B*, n. 9, p. 2713–21, mar. ISSN 1520-5207.
- [126] LOURA, L. M. S.; CANTO, A. M. T. M. do; MARTINS, J. Sensing hydration and behavior of pyrene in POPC and POPC/cholesterol bilayers: a molecular dynamics study. *Biochimica et biophysica acta*, Elsevier B.V., v. 1828, n. 3, p. 1094–101, mar. 2013. ISSN 0006-3002.
- [127] ROBALO, J. a. R. et al. Behavior of fluorescent cholesterol analogues dehydroergosterol and cholestatrienol in lipid bilayers: a molecular dynamics study. *The journal of physical chemistry. B*, n. 19, p. 5806–19, maio. ISSN 1520-5207.
- [128] KINOSITA, K.; KAWATO, S.; IKEGAMI, A. A theory of fluorescence polarization decay in membranes. *Biophysical journal*, v. 20, p. 289–305, 1977.
- [129] HEIDE, U. V. der; GINKEL, G. V.; LEVINE, Y. DPH is localised in two distinct populations in lipid vesicles. *Chemical physics letters*, n. April.
- [130] PEBAY-PEYROULA, E.; DUFOURC, E. J.; SZABO, a. G. Location of diphenyl-hexatriene and trimethylammonium-diphenyl-hexatriene in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers by neutron diffraction. *Biophysical chemistry*, n. 1-2, p. 45–56, dez. ISSN 0301-4622.
- [131] KONOPÁSEK, I. et al. Short-lived fluorescence component of DPH reports on lipid–water interface of biological membranes. *Chemistry and physics of lipids*, n. 2, p. 135–44, jul. ISSN 0009-3084.

-
- [132] BIRKHOFF, G. Proof of the ergodic theorem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of ...*, n. 3, p. 656–660.
- [133] NEUMANN, J. Physical applications of the ergodic hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of ...*, n. 1, p. 263–266.