



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Simulação computacional de monocamadas fosfolipídicas de 1,2-dioleoil-*sn*-glicerol-3-fosfatidilcolina (DOPC) e 1,1',2,2'-tetraoleoil-cardiolipina (CLP): efeito de hidroxidação e adsorção do fotossensibilizador Azul de Metileno”

Rafael Maglia de Souza

Dissertação 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 Mestre em Ciências, Área: **Química**

Ribeirão Preto – SP

2016



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Simulação computacional de monocamadas fosfolipídicas de 1,2-dioleoil-*sn*-glicerol-3-fosfatidilcolina (DOPC) e 1,1',2,2'-tetraoleoil-cardiolipina (CLP): efeito de hidroperoxidação e adsorção do fotossensibilizador Azul de Metileno”

Rafael Maglia de Souza

Dissertação 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 Mestre em Ciências, Área: **Química**
Orientador: Prof. Dr. Luis Gustavo Dias

Ribeirão Preto – SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

de Souza, Rafael Maglia

Simulação computacional de monocamadas fosfolipídicas de 1,2-dioleoil-*sn*-glicerol-3-fosfatidilcolina (DOPC) e 1,1',2,2'-tetraoleoil-cardiolipina (CLP): efeito de hidroxidação e adsorção do fotossensibilizador Azul de Metileno. Ribeirão Preto, SP, 2016.

96 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientador: Dias, Luis Gustavo.

1. Dinâmica Molecular. 2. Monocamada Fosfolipídica. 3. Hidroxidação. 4. Azul de Metileno. 5. Energia Livre

“Você é recompensado em público pelo que você pratica por anos nos bastidores”

– Anthony Robbins

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, Silvia Helena Maglia, Adelino Bernardo de Souza e Antônio Carlos de Almeida, por todo o incentivo aos estudos e suporte financeiro desde os primeiros anos de vida até a fase adulta.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Gustavo Dias, pela oportunidade de trabalho, pela disponibilidade em atender minhas dúvidas, por todas as explicações e estímulos que carregarei comigo na vida acadêmica e pela amizade.

Ao meu colega de laboratório, Paulo Siani, pelas imensas ajudas nesses dois anos de mestrado.

À Nathalia Nossi Davanzo, pela compreensão e pela presença em vários momentos difíceis.

À todos os meus amigos, que fazem a caminhada pela vida ser extremamente prazerosa.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

DE SOUZA, R.M. **Simulação computacional de monocamadas fosfolipídicas de 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina (DOPC) e 1,1',2,2'-tetraoleoil-cardiolipina (CLP): efeito de hidroperoxidação e adsorção do fotossensibilizador Azul de Metileno.** 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química - Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras de Ribeirão Preto, 2016.

Este trabalho se propôs a estudar via simulação computacional por dinâmica molecular o comportamento estrutural e energético de monocamadas fosfolipídicas – um modelo mimético de membrana biológica – de 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina (DOPC) e 1,1',2,2'-tetraoleoil-cardiolipina (CLP) sobre efeito de oxidação branda e na presença de um fotossensibilizador da classe das fenotiazinas, o azul de metileno (AM). Sobre efeito deste fotossensibilizador, caudas insaturadas de fosfolípidios são primeiramente hidroperoxidadas. Assim, tanto o ambiente do fotossensibilizador como a natureza da cauda lipídica alteram-se, dando oportunidade de serem também estudados.

De forma concreta, simularam-se monocamadas puras de DOPC e CLP, bem como monocamadas destes lípidios após serem hidroperoxidados, com uma e duas hidroperoxidações. Tais lípidios foram nomeados DOPC-OOH, DOPC-2OOH, CLP-OOH e CLP-2OOH, conforme o grau de hidroperoxidação. Estes novos sistemas permitiram avaliar como as propriedades físico-químicas das monocamadas (p.e., empacotamento lipídico, potencial eletrostático) foram afetadas pelo tipo de grupo cabeça aliado ao grau de hidroperoxidação da cauda.

Adicionalmente, simulou-se também a molécula de AM frente às monocamadas de DOPC, DOPC-OOH, CLP e CLP-OOH, com o intuito de avaliar como sua localização interfacial, mobilidade e dependência da interação eletrostática AM-água-grupos polares dos lípidios afetam estas propriedades. Como esta interação eletrostática é dependente dos momentos de 2ⁿ-polos das espécies envolvidas, incluiu-se esta informação de forma empírica simulando o AM em dois modelos de distribuição de cargas atômicas diferentes, MP2/TZVPP e B3LYP/TZVPP, gerando um limite inferior e superior para o seu momento dipolar.

Variações de energia livre para o processo de transferência do AM do meio aquoso para regiões específicas das monocamadas de DOPC e DOPC-OOH complementaram o trabalho, proporcionando uma visão clara de como as contribuições eletrostáticas e não-eletrostáticas afetam o processo de adsorção do corante em interface zwitteriônica na presença e ausência do grupo hidroperóxido.

PALAVRAS-CHAVE: Dinâmica Molecular, Monocamadas Fosfolipídicas, DOPC, CLP, Hidroperoxidação, Azul de Metileno, Energia Livre.

ABSTRACT

DE SOUZA, R.M. **Computer simulation of phospholipid monolayer of 1,2-dioleoyl-sn-glycerol-3-phosphatidylcholine (DOPC) and 1,1',2,2'-tetraoleoyl-cardiolipin (CLP): hydroperoxidation effect and methylene blue photosensitizer adsorption.** 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química - Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras de Ribeirão Preto, 2016.

This work presents a molecular dynamics computer simulation study of the structural and energy behavior of phospholipid monolayers – a mimetic model of biological membranes – of 1,2-dioleoyl-sn-glycerol-3-phosphatidylcholine (DOPC) and 1,1',2,2'-tetraoleoyl-cardiolipin (CLP) on mild oxidizing effect in the presence of a photosensitizer of phenothiazinium class, the methylene blue (AM), which has as a first target the carbon chain insaturation, triggering hydroperoxidation. Thus, both the photosensitizer environment as the nature of the lipid tails suffers some changes, giving the opportunity to be studied.

Concretely, pure monolayers of DOPC and CLP were simulated, as well as monolayers of these lipids with one and two hydroperoxide groups. Such lipids were named DOPC-OOH, DOPC-2OOH, CLP-OOH and CLP-2OOH according to the degree of hydroperoxidation. These new systems allowed to evaluate how the physical-chemistry properties of the monolayers (e.g, lipid packing, electrostatic potential) were affected by the head group type allied to the hydroperoxidation degree.

Additionally, it was also simulated the AM in DOPC, DOPC-OOH, CLP and CLP-OOH monolayers, in order to assess the interfacial behavior, mobility and the methylene blue electrostatic interaction dependence with water and lipid polar groups. As this electrostatic interaction is dependent on the 2ⁿ-pole moments of the involved species, this information was included empirically simulating AM in two partial atomic charges distribution model, MP2/TZVPP and B3LYP/TZVPP, generating a lower and upper limits for the dipole moment.

Free energy changes for transferring the AM from aqueous medium to the specific regions of the DOPC and DOPC-OOH monolayers complemented the work, providing a view of how the electrostatic and non-electrostatic contributions affect the dye adsorption process in the zwitterionic interface in the presence and absence of the hydroperoxide group.

KEYWORDS: Molecular Dynamics, Phospholipid Monolayers, DOPC, CLP, Hydroperoxidation, Methylene Blue, Free Energy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ilustração esquemática de uma membrana biológica exibindo a dupla camada fosfolipídica, citoesqueleto, glicoproteínas e glicolipídios. *Retirado de [6]*.....2
- Figura 2.** Representação esquemática da constituição de um fosfolipídio (esquerda) e estrutura química de um fosfolipídio do tipo fosfatidilcolina (direita).....3
- Figura 3.** Sistemas modelos de membranas: **a)** representação visual de uma membrana lipídica via simulação computacional; **b)** monocamada de Langmuir; **c)** bicamada fosfolipídica de vesículas — MLV, SUV, GUV; **d)** bicamada fosfolipídica em substrato sólido. *Adaptado de [6 e 24]*.....4
- Figura 4.** **a)** Pressão superficial da monocamada na interface ar-água em uma representação simplificada da cuba de Langmuir. As forças repulsivas entre as moléculas lipídicas (π_{hid} e π_{int}) dá origem a pressão lateral interna que é equilibrada mecanicamente pela barreira móvel **b)** Ilustração de uma isoterma π -A, mostrando as várias regiões de estruturação da monocamada associada as diferentes inclinações da curva. *[Retirado e adaptado de 22 e 36]*.....7
- Figura 5.** Ilustração de uma molécula lipídica em representação *all-atom* e, em círculos azuis, a mesma molécula em representação *coarse-grained* via *beads*. *Retirado de [57]*.10
- Figura 6.** Tipos de arranjos em simulações de monocamadas na interface ar-água **a)** uma única monocamada com uma parede de potencial; **b)** arranjo do tipo *slab*, duas monocamadas simetricamente opostas; **c)** Representação de curvaturas na monocamada mostrando aproximação à parede de potencial. *Retirado e adaptado de [64]*.....12
- Figura 7.** Ilustração simplificada de um tratamento de TFD. **a)** Paciente inicialmente com o tumor. **b)** FS absorvido pelos tecidos e pelo tumor. **c)** Administração de radiação na região do tumor. **d)** Remoção gradativa do FS dos tecidos e começo de eliminação do tumor como resultado da destruição celular provocado pelos efeitos da fotooxidação. **e)** Indivíduo novamente saudável. *Adaptado de [67]*.....13
- Figura 8.** **a) e b)** estruturas planares dos fosfolipídios DOPC e CLP, respectivamente. **c) e d)** Representação planar da inserção do grupo hidroperóxido (-OOH) após o efeito de hidroperoxidação lipídica. Formam-se tanto derivados hidroperoxidados na posição do carbono 9 quanto na 10. Neste trabalho foram simulados os derivados hidroperoxidados de DOPC e CLP apenas na posição 9.....16
- Figura 9.** Estrutura planar do Azul de Metileno.....17
- Figura 10.** Mecanismo da peroxidação lipídica em apenas uma etapa, via mecanismo concertado (via superior) ou com formação de vários intermediários (via inferior).....18
- Figura 11.** Representação dos termos da energia potencial: **a)** estiramento da ligação química; **b)** deformação angular; **c)** ângulo diedro próprio; **d)** ângulo diedro impróprio. *Retirado e adaptado de [97]*.....25

Figura 12. Representação das posições iniciais de todos os constituintes presentes nos sistemas simulados. Moléculas de água estão representadas em azul, azul de metileno em amarelo e o fosfolipídio em cinza (esqueleto carbônico) e vermelho (átomos de fósforo e oxigênio das cabeças polares).....	26
Figura 13. Condição periódica de contorno em duas dimensões. O sistema, destacado pelo quadrado preto, foi replicado em todas as direções. O círculo centralizado em uma das moléculas de borda (destacada) ilustra um raio de corte esférico para o tratamento de interações. <i>Retirado e adaptado de [101]</i>	28
Figura 14. Replicação periódica do sistema em arranjo <i>slab</i> das monocamadas (limites da caixa de simulação aparecem destacados em linhas azuis).....	31
Figura 15. Representação em <i>ball-stick</i> do azul de metileno. Cargas parciais destacadas nos átomos de nitrogênio (azul) e enxofre (amarelo). Magnitude e orientação do momento dipolar da molécula em vermelho para as distribuições a) B3LYP/TZVPP b) MP2/TZVPP.....	33
Figura 16. Ilustração do esquema de obtenção das funções de distribuição radial, a partir da determinação da quantidade de partículas dentro da distância r e $r + dr$. <i>Retirado de [123]</i>	39
Figura 17. Orientação do momento de dipolo do azul de metileno em relação ao eixo z . O ângulo ω assume valores no intervalo de 0 a 180 graus. <i>Retirado de [124]</i>	40
Figura 18. Coordenada de reação unidimensional (ζ) para translocação do AM ⁽⁰⁾ (em rosa) do centro do bulk aquoso ($\zeta = Z = 0$) até o interior da monocamada lipídica. Moléculas de água em azul claro e o fosfolipídio representado em vermelho (átomos da cabeça polar) e cinza (cadeia carbônica).....	41
Figura 19. Centro de massa do azul de metileno (em amarelo) acoplado em relação ao centro de massa do grupo fosfato (esferas em preto) para realização da integração termodinâmica. a) vista lateral; b) vista superior. Em vermelho é representado a gaiola de pseudopartículas (explicado na sessão 4.2.7.2.1).....	44
Figura 20. Ilustração esquemática da gaiola de pseudopartículas (em vermelho) em formato cúbico centralizado em relação ao azul de metileno (em amarelo).....	45
Figura 21. Ciclo termodinâmico para transferência do AM a partir da região n até a região m	46
Figura 22. Evolução temporal da área média por lipídio para as monocamadas de DOPC, DOPC-OOH e DOPC-2OOH.....	48
Figura 23. Evolução temporal da área média por lipídio para as monocamadas de CLP, CLP-OOH e CLP-2OOH.....	49
Figura 24. Possíveis produtos de oxidação do fosfolipídio DOPC proposto por Jurkiewicz et al. <i>Adaptado de [134]</i>	50
Figura 25. Parâmetros de ordem para a cadeia carbônica do DOPC, DOPC-OOH e DOPC-2OOH.....	51

Figura 26. Parâmetros de ordem para a cadeia carbônica do CLP, CLP-OOH e CLP-2OOH.....	51
Figura 27. Perfil de densidade de massas para todas as monocamadas simuladas. A curva referente às moléculas de águas teve seus valores divididos por 6, para melhor visualização conjunta das distribuições.....	53
Figura 28. Ilustração esquemática da diferença estrutural lipídica devido à hidroperoxidação. <i>Retirado e adaptado de [141]</i>	53
Figura 29. Distribuição angular para o grupo hidroperóxido em relação à normal para monocamadas de a) DOPC-OOH e DOPC-2OOH b) CLP-OOH e CLP-2OOH.....	54
Figura 30. a) e b) Funções de distribuição radial entre o carbono 9 e as moléculas de água TIP3P para as monocamadas zwitteriônicas e iônicas, respectivamente; c) e d) Funções de distribuição radial entre o grupo hidroperóxido e as moléculas de água TIP3P para as monocamadas zwitteriônicas e iônicas, respectivamente.....	56
Figura 31. Perfil do potencial eletrostático para as monocamadas a) zwitteriônicas e b) iônicas.....	57
Figura 32. Perfis de densidade entre os constituintes da monocamada de DOPC e o azul de metileno, para pressão superficial de 20 mN.m^{-1} . A curva referente a densidade de água teve seus valores divididos por 6, para melhor visualização.....	60
Figura 33. Perfis de densidade para as monocamadas de DOPC, DOPC-OOH, CLP e CLP-OOH. A curva referente a densidade de água teve seus valores divididos por 6 para as monocamadas zwitteriônicas e por 12 para as iônicas, para melhor visualização.....	61
Figura 34. Perfil de orientação angular obtido do vetor entre os nitrogênios terminais do azul de metileno.....	64
Figura 35. Perfil de orientação angular obtido do vetor entre átomo de enxofre e nitrogênio do anel central.....	65
Figura 36. Ilustração esquemática do comportamento angular do azul do metileno. Vetor N-N representado em rosa e o vetor S-N em marrom. Águas em azul, fosfolipídios em cinza e o AM em preto com os átomos de nitrogênio destacados em vermelho e o de fósforo em amarelo. a) Situação onde ambos os vetores são próximos de 90 graus; b) Situação onde o vetor N-N permanece por volta de 90° enquanto que o vetor S-N pode adquirir outras orientações, no caso, algum ângulo obtuso; c) Situação onde o corante tenta permear na monocamada de forma vertical (vetor N-N próximo de 0 ou 180 graus).....	66
Figura 37. Perfil de energia livre para translocação do $\text{AM}^{(0)}$ a partir do centro do bulk aquoso ($\zeta = Z = 0$) em direção as monocamadas fosfolipídicas de a) DOPC e b) DOPC-OOH, ambas em $\pi = 20 \text{ mN.m}^{-1}$	67
Figura 38. Regressões lineares para a variação de energia livre (ΔA) em função de $1/L$ para o AM em modelo a) MP2/TZVPP e b) B3LYP/TZVPP.....	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Tempo simulado em cada ensemble para as monocamadas puras na ausência do azul de metileno ($\pi = 20 \text{ mN.m}^{-1}$).....	34
TABELA 2. Tempo simulado em cada ensemble para as monocamadas puras na presença do azul de metileno ($\pi = 20 \text{ mN.m}^{-1}$).....	35
TABELA 3. Tempo simulado apenas no ensemble NVT para monocamada pura de DOPC-UA em área por lipídio pré-determinada e ajustada em $88 \text{ \AA}^2/\text{lipídio}$	35
TABELA 4. Área média por lipídio teórica e experimental (em $\text{\AA}^2/\text{lipídio}$) em $\pi = 20 \text{ mN.m}^{-1}$. Aumento percentual da área média teórica também é apresentado (%).....	47
TABELA 5. Estimativa (em kcal/mol) dos termos eletrostáticos e de LJ entre AM-fosfolipídio e AM-água em raio de corte de 10 \AA	62
TABELA 6. Média dos termos $\langle V \rangle_\lambda$ para os diferentes estados de carga λ para os três tamanhos da gaiola cúbica (de aresta L) de pseudopartículas utilizadas.....	69
TABELA 7. Cálculo do ΔA fazendo-se uso das quadraturas numéricas para o processo $\text{AM}_{\text{LJ}}^{(0)} \rightarrow \text{AM}^{+1}$ para os três tamanhos de gaiolas cúbicas (de aresta L) de pseudopartículas utilizadas.....	69
TABELA 8. Média dos termos $\langle V \rangle_\lambda$ para os diferentes estados de carga λ nas diferentes regiões da monocamada de DOPC.....	71
TABELA 9. Média dos termos $\langle V \rangle_\lambda$ para os diferentes estados de carga λ nas diferentes regiões da monocamada de DOPC-OOH.....	71
TABELA 10. Cálculo do ΔA fazendo-se uso das quadraturas numéricas para o processo $\text{AM}_{\text{LJ}}^{(0)} \rightarrow \text{AM}^{+1}$ nas diferentes regiões da monocamada de DOPC.....	72
TABELA 11. Cálculo do ΔA fazendo-se uso das quadraturas numéricas para o processo $\text{AM}_{\text{LJ}}^{(0)} \rightarrow \text{AM}^{+1}$ nas diferentes regiões da monocamada de DOPC-OOH.....	72
TABELA 12. Variação de energia livre de transferência total do AM a partir do <i>bulk</i> em direção a regiões específicas da monocamada de DOPC.....	73
TABELA 13. Variação de energia livre de transferência total do AM a partir do <i>bulk</i> em direção a regiões específicas da monocamada de DOPC-OOH.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

PC – Fosfatidilcolina

DOPC - 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina

CLP - 1,1',2,2'-tetraoleoil-cardiolipina

-OOH – Um grupo hidroperóxido

-2OOH – Dois grupos hidroperóxidos

FS - Fotossensibilizador

AM – Azul de Metileno

AM^M – Azul de Metileno em distribuição de carga MP2/TZVPP

AM^B – Azul de Metileno em distribuição de carga B3LYP/TZVPP

TFD – Terapia Fotodinâmica

ROS – *Reactive Oxygen Species*

¹O₂ – Oxigênio Singlete

DM – Dinâmica Molecular

AA – *All-atom*

UA – *United-Atom*

CG – *Coarse-Grained*

LJ – *Lennard-Jones*

ABF – *Adaptative Biasing Force*

TI – *Thermodynamic Integration*

π – Pressão de superfície

γ – Tensão superficial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Biomembranas Lipídicas e Sistemas Modelos Miméticos.....	1
1.1.1 Monocamadas Fosfolipídicas de Langmuir.....	5
1.2 Simulações de Biomembranas.....	9
1.2.1 Simulações de Monocamadas Fosfolipídicas na Interface ar-água.....	11
1.3 Terapia Fotodinâmica e Fotossensibilização.....	12
1.3.1 Alvo Fotodinâmico: Mitocôndria.....	15
1.3.2 Fotossensibilizador: Azul de Metileno.....	17
1.3.3 Hidroperoxidação Lipídica.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
3.1 Dinâmica Molecular (DM).....	21
3.1.1 Função de Energia Potencial (ou Campo de Força).....	23
3.1.2 Atribuição das Posições e Momentos Iniciais.....	25
3.1.3 Condições Periódicas de Contorno.....	27
3.1.4 Tratamento das Interações de Curto e Longo Alcance.....	28
3.1.5 Ensembles.....	29
4. METODOLOGIA COMPUTACIONAL.....	30
4.1 Simulações Computacionais.....	30
4.1.1 Monocamadas Fosfolipídicas.....	30
4.1.2 Campo de Força.....	31
4.1.2.1 Fosfolipídios.....	31
4.1.2.2 Azul de Metileno.....	32
4.1.3 Detalhes das Dinâmicas Moleculares.....	33
4.2 Análises.....	35
4.2.1 Área Média por Lipídio.....	36
4.2.2 Parâmetro de Ordem da Cadeia Lipídica	36

4.2.3	Função de Distribuição de Densidade.....	37
4.2.4	Potencial Eletrostático Médio.....	37
4.2.5	Função de Distribuição Radial.....	37
4.2.6	Função de Distribuição Orientacional.....	39
4.2.7	Perfis de Energia Livre.....	40
4.2.7.1	Força Média Adaptativa.....	40
4.2.7.2	Integração Termodinâmica.....	42
4.2.7.2.1	Otimização do Processo de Carga no Bulk Aquoso.....	45
4.2.7.3	Ciclo Termodinâmico.....	46
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1	Efeitos da Hidroperoxidação Lipídica.....	47
5.1.1	Conclusões.....	58
5.2	Estudo do Azul de Metileno nas Monocamadas.....	59
5.2.1	Dinâmicas Livres.....	59
5.2.2	Cálculos de Energia Livre.....	67
5.2.2.1	Força Média Adaptativa: Perfil de Energia Livre Para AM ⁽⁰⁾	67
5.2.2.2	Integração Termodinâmica: Extrapolação do Trabalho Eletrostático Reversível para o Processo AM ⁽⁰⁾ → AM ⁽¹⁺⁾ no Bulk Aquoso.....	68
5.2.2.3	Integração Termodinâmica: Trabalho Eletrostático Reversível para o Processo AM ⁽⁰⁾ → AM ⁽¹⁺⁾ em Regiões Específicas das Monocamadas.....	71
5.2.2.4	Ciclo Termodinâmico.....	73
5.2.3	Conclusões.....	75
	REFERÊNCIAS.....	76
	APÊNDICE 1.....	91
	APÊNDICE 2.....	95

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biomembranas Lipídicas e Sistemas Modelos Miméticos

Membranas biológicas são estruturas de matéria condensada que atuam como barreiras que cercam e separam o meio intracelular do extracelular de células e organelas. É seletiva quanto a passagem de solutos, pois regulam o fluxo e quais moléculas e íons podem atravessá-las, mantendo, portanto, gradientes de concentrações, muitas vezes necessários a funcionalidade de algum fenômeno bioquímico, devido a regulação do potencial elétrico.

O primeiro modelo proposto na descrição estrutural de biomembranas foi em 1925, por Gorter e Grendal¹. Com base em seus experimentos, propuseram que a biomembrana é uma estrutura bastante fina composta por duas camadas de moléculas lipídicas, a chamada bicamada lipídica. Esse modelo simples foi sendo modificado no decorrer dos anos, com o aparecimento de novas informações relevantes que precisavam ser incluídas dentro de um modelo de descrição proposto. Em 1935, Danielli e Davson² sugeriram o primeiro modelo que incorporava a presença de proteínas nas membranas. Porém, a visão atual de membranas só foi proposta em 1972 por Singer e Nicolson³ que formularam o “Modelo do Mosaico Fluido”, que descreve a biomembrana como um fluido fosfolipídico viscoso orientado bidimensionalmente, composta por muitas classes de lipídios e proteínas embebidas, distribuídas aleatoriamente de forma similar a um mosaico (daí o termo), onde as moléculas estão livres para se movimentarem no plano da bicamada.

Posteriormente, com base em resultados experimentais e teóricos, refinamentos foram sendo propostos, como por exemplo a incorporação da função do citoesqueleto⁴ e do papel regulatório conjunto entre lipídios e proteínas⁵. Consequentemente a membrana é cada vez mais vista como um sistema heterogêneo, cooperativo e altamente complexo, com propriedades dinâmicas e estruturais acessíveis em diversas escalas espaço-temporal⁷. A figura 1 ilustra de forma simplificada a complexidade de uma membrana biológica.

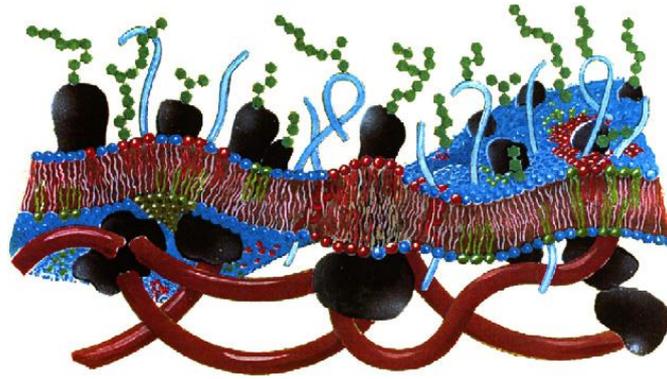


Figura 1. Ilustração esquemática de uma membrana biológica exibindo a dupla camada fosfolipídica, citoesqueleto, glicoproteínas e glicolipídios. *Retirado de [6].*

A forma com que as membranas biológicas se organizam é, portanto, vital a diversos processos biológicos, como processos de difusão e transporte de solutos, ativação de cascatas enzimáticas, regulação da atividade proteica e até como capacitores elétricos. A funcionalidade desses e de outros eventos biológicos podem ser afetados por fatores químicos, físicos e mecânicos. Decorrente disto, esforços vem sendo efetuados no sentido de estabelecer de forma inequívoca a relação entre estrutura e organização das membranas com seu papel no funcionamento dos processos biológicos.^{4, 7-14}

Outro aspecto fundamental é a composição lipídica das biomembranas, que é dependente do tipo celular e das diferentes organelas intracelulares¹⁵. Essa não uniformidade de composições se reflete em diferenças nas propriedades mecânico-físicas das membranas, podendo afetar os fenômenos biológicos na qual ela está presente¹⁶. São três os principais tipos de lipídios estruturais de membranas: fosfolipídios, glicolipídios e esteroides. Dentre eles, os fosfolipídios são os mais abundantes, correspondendo a cerca de 70% da membrana celular de mamíferos¹⁵. Os fosfolipídios são anfifílicos compreendendo um grupo glicerol no qual se ligam duas caudas hidrocarbônicas derivadas de ácidos graxos e o grupo fosfato, pertencente a cabeça hidrofílica do lipídio — esquematicamente ilustrado na figura 2. Nessa região hidrofílica, conecta-se algum grupo químico, como as serinas, etanolaminas, cardiolipinas e colinas, esta última sendo responsável por 45-55% desse tipo fosfolipídico¹⁵. As caudas hidrocarbônicas podem variar em comprimento e na quantidade de insaturações, sendo as principais responsáveis pelo grau de fluidez das membranas.

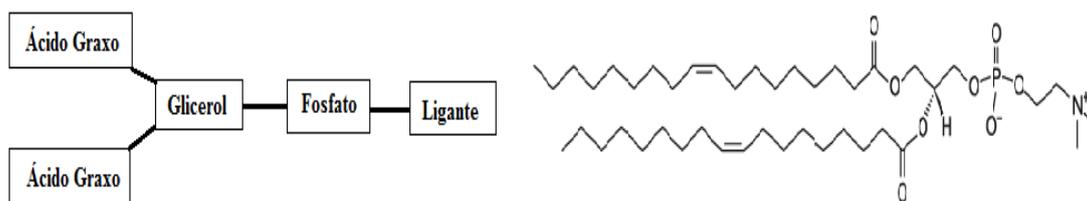


Figura 2. Representação esquemática da constituição de um fosfolípido (esquerda) e estrutura química de um fosfolípido do tipo fosfatidilcolina (direita).

Devido à complexidade das biomembranas e da dificuldade associada para estudá-la, é frequentemente necessário fazer uso de sistemas modelos simplificados que mimetizem a membrana biológica, seja do ponto de vista experimental ou computacional. Geralmente, reduz-se o problema a uma ou duas espécies lipídicas, mais os outros constituintes necessários, como proteínas, colesterol e compostos de interesse medicinal.

Uma vasta gama de abordagens e sistemas modelos tem sido usado desde o começo da era de pesquisas em biomembranas abrangendo diferentes tamanhos, geometrias e composições. Destacam-se as bicamadas suportadas^{17,18}, vesículas lipossômicas uni ou multilamelares^{19,20}, monocamadas de Langmuir^{21,22} e as modelagens computacionais^{6,23} — como esquematizado na figura 3. Aplica-se então um ou mais destes modelos simplificados na obtenção de informações relevantes que possam ajudar a elucidar as funções biológicas, entender causas de doenças e até no desenvolvimento de drogas terapêuticas.

Uma bicamada suportada é uma estrutura planar ancorada em um substrato sólido. Esse substrato sólido possibilita uma maior estabilidade a choques mecânicos e permite de forma mais eficiente técnicas de caracterizações que necessitam uma interação física direta com a amostra, como as microscopias. Por outro lado, ocorre perda de mobilidade lipídica, e há ainda possibilidades de interação do substrato com a membrana e suas proteínas, especialmente as transmembranas, desnaturando-as.

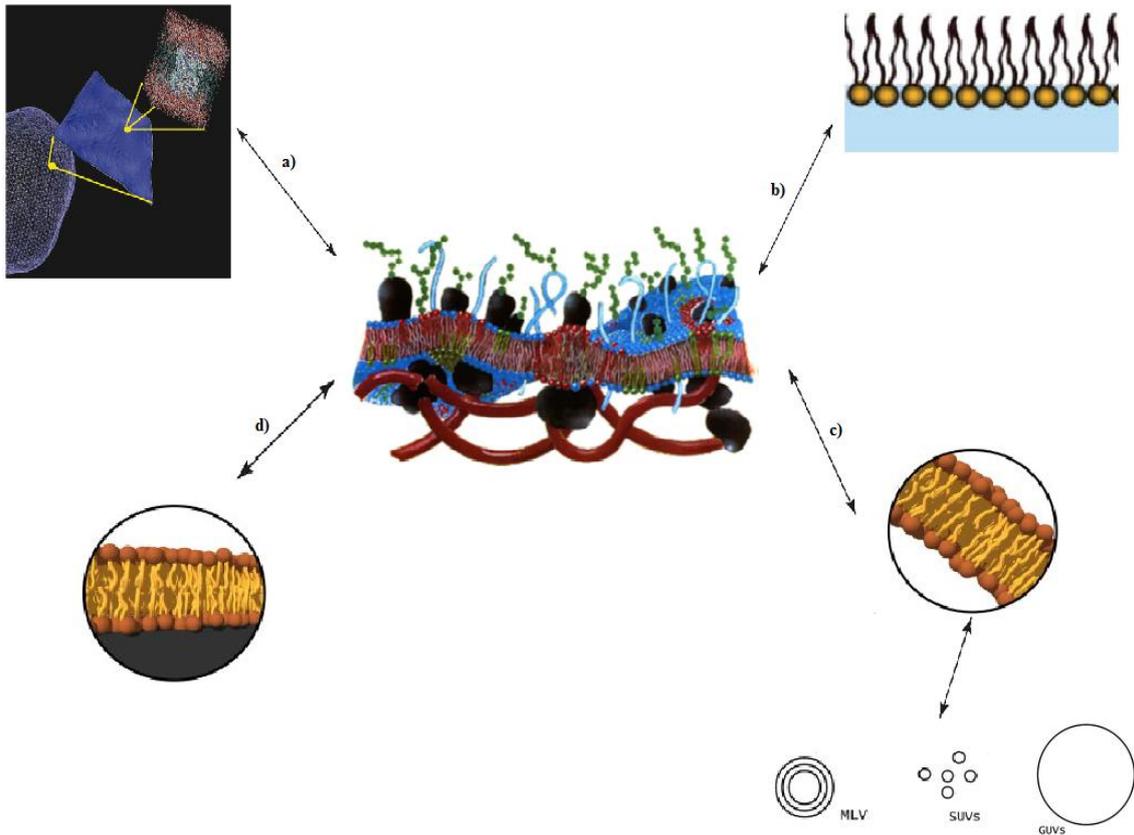


Figura 3. Sistemas modelos de membranas: **a)** representação visual de uma membrana lipídica via simulação computacional; **b)** monocamada de Langmuir; **c)** bicamada fosfolipídica de vesículas — MLV, SUV, GUV; **d)** bicamada fosfolipídica em substrato sólido. *Adaptado de [6 e 24].*

Vesículas lipossômicas são bicamadas em formato curvo ou esférico que separam o meio interno do externo e podem apresentar diferentes tamanhos e organizações. Após preparadas²⁵ formam-se as vesículas multi-lamelares (do inglês, *multilamellar vesicles*, ou MLVs), ou seja, com várias camadas lipídicas sobrepostas. Podem ser quebradas em vesículas menores e unilamelares sendo classificadas de acordo com seu diâmetro. As principais são as vesículas unilamelares pequenas e gigantes (do inglês, *small/giant unilamellar vesicles*, ou SUVs/GUVs) com tamanho entre 25-100 nm e maiores que 500 nm, respectivamente. Essas vesículas lipossômicas são adequadas para estudos em *bulk*, como por exemplo, difração de raios-X e calorimetria diferencial de varredura para determinação de transições de fase, e via técnicas de fluorescências possibilitando estudos dos *rafts* lipídicos e caracterizações de proteínas. Comparadas às bicamadas suportadas,

essas vesículas apresentam um ambiente mais “natural” devido à ausência de interações induzidas pelo suporte sólido

As monocamadas fosfolipídicas de Langmuir serão apresentadas detalhadamente na sessão 1.1.1, pois tratam-se do sistema modelo utilizado nas simulações computacionais desse trabalho. Em seguida, na sessão 1.2, será discutido as simulações biomoleculares, apresentando as formas pelas quais as monocamadas são simuladas.

1.1.1 Monocamadas Fosfolipídicas de Langmuir

Em uma interface ar-água ou líquido-líquido moléculas anfifílicas se orientam de tal forma que minimizem sua energia livre^{26,27} resultando em um filme interfacial de espessura molecular — denominado de “camada monomolecular” ou apenas “monocamada”. Em homenagem a Irving Langmuir, cientista com trabalhos pioneiros nesta área²⁸⁻³¹, popularizou-se o termo “monocamada de Langmuir” para designá-las. Como os fosfolipídios constituintes das biomembranas são anfifílicos (figura 2), as monocamadas dessas moléculas também são chamadas de monocamadas fosfolipídicas.

Monocamadas de fosfolipídios^{21,22,32-34} na interface ar-água são sistemas modelos quase-bidimensionais simplificados de membranas biológicas (figura 3b). O interesse nelas advém de limitações nas manipulações das bicamadas monolamelares e multilamelares³⁵ a saber: i-) dificuldade em mudar a composição lipídica mantendo fixa a curvatura do sistema; ii-) impossibilidade de regular, de forma independente, a composição lipídica e o empacotamento do sistema; iii-) impossibilidade de determinar a área total interfacial em função da composição lipídica sem conhecimento da curvatura/geometria da bicamada. Estas vantagens surgem da facilidade de se manipular experimentalmente algumas variáveis que não são prontamente controladas em *bulk* como a pressão lateral (pressão de superfície) e a área superficial.

A monocamada fosfolipídica é geralmente preparada por meio da dissolução do lipídio de interesse em solvente apolar e volátil, seguido do seu espalhamento sobre a superfície aquosa e posterior evaporação do solvente que ocorre em poucos minutos. É

utilizado as cubas de Langmuir para esse procedimento, que apresentam barreiras móveis responsáveis por comprimir ou expandir as monocamadas, possibilitando conseqüentemente o controle da área superficial ou da pressão de superfície (figura 4a).

A pressão de superfície (π) é a principal forma de caracterização das monocamadas de Langmuir e é definida como a diferença de tensão superficial da subfase aquosa na ausência do material (γ_o) e da subfase na presença da monocamada (γ), conforme equação 1:

$$\pi = \gamma_o - \gamma \quad (1)$$

O valor da pressão de superfície é determinado via métodos^{26,27} que meçam as tensões superficiais das monocamadas. Ao comprimir uma monocamada, a área disponível por fosfolípido é diminuída, correspondendo a um decréscimo na tensão superficial e conseqüentemente a um aumento da pressão de superfície. O oposto também é verdadeiro. Assim, é possível obter as isotermas (figura 4b) de pressão superficial por área (isotermas π -A) — que são a forma análoga bidimensional da isoterma de pressão-volume 3D — durante compressão ou expansão das monocamadas pelas barreiras móveis.

A pressão de superfície também pode ser entendida via definição termodinâmica^{36,37}: é o negativo da primeira derivada da energia livre da monocamada em relação a área superficial, que inclui a área ocupada pelos lipídios e a área interfacial restante ocupada pelas moléculas de água. A energia livre do sistema, F_{SIST} , é igual a energia livre superficial na presença da monocamada, F_M , menos a energia livre superficial da interface ar-água disponível, F_O :

$$F_{SIST} = F_M - F_O \quad (2)$$

A derivada parcial da equação 2 em relação a área total, mantendo-se a temperatura, T, e o número de constituintes constante, N, fornece:

$$\left(\frac{\partial F_{SIST}}{\partial A}\right)_{N,T} = \left(\frac{\partial F_M}{\partial A}\right)_{N,T} - \left(\frac{\partial F_O}{\partial A}\right)_{N,T} \quad (3)$$

O primeiro termo do lado direito corresponde a tensão superficial da monocamada, γ , e o segundo termo é a tensão da interface ar-água, γ_0 . Comparando a equação 3 com a equação 1:

$$\pi = - \left(\frac{\partial F_{SIST}}{\partial A} \right)_{N,T} \quad (4)$$

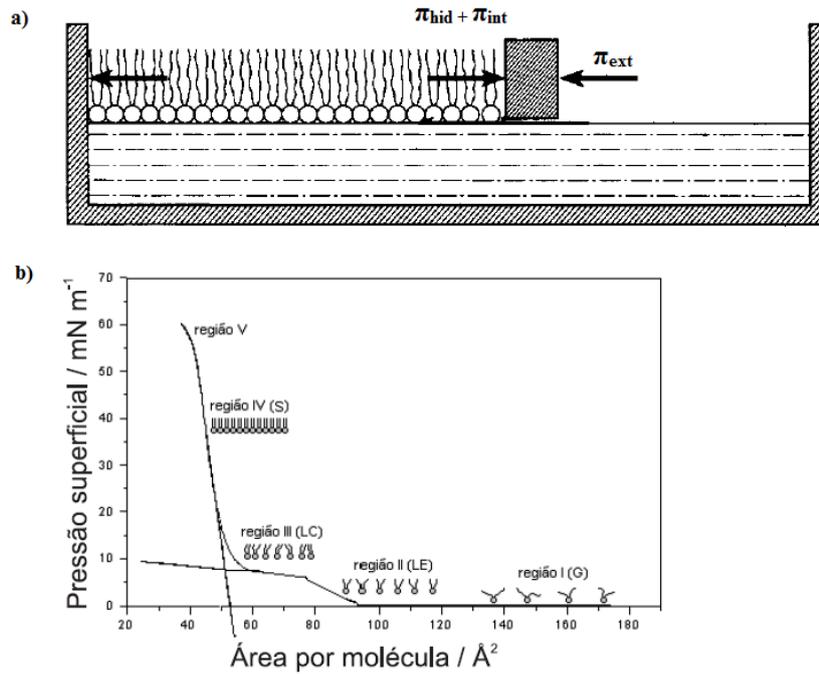


Figura 4. a) Pressão superficial da monocamada na interface ar-água em uma representação simplificada da cuba de Langmuir. As forças repulsivas entre as moléculas lipídicas (π_{hid} e π_{int}) dá origem a pressão lateral interna que é equilibrada mecanicamente pela barreira móvel b) Ilustração de uma isoterma π -A, mostrando as várias regiões de estruturação da monocamada associada as diferentes inclinações da curva. [Retirado e adaptado de 22 e 36].

A definição termodinâmica é relevante, pois mesmo a monocamada mimetizando apenas metade de uma bicamada, é a partir dela que se relaciona a pressão superficial da monocamada fosfolipídica com as propriedades mecânico-químicas de uma bicamada formadora de vesícula – é o chamado problema da correspondência monocamada-bicamada^{36,37}.

Em nível molecular, a origem da pressão de superfície na monocamada é oriunda das diferentes interações moleculares que estão ocorrendo. A pressão de superfície é decomposta nas pressões laterais internas presente na monocamada. As duas principais contribuições são a interação hidrofílica entre a cabeça lipídica e água (π_{hid}) e a interação entre os próprios lipídios (π_{int}). Ambas são interações repulsivas que tendem a aumentar área superficial da monocamada. De fato, na ausência das barreiras móveis que fornecem o equilíbrio mecânico para a monocamada, as moléculas ocupariam toda a área disponível. A figura 4a ilustra a monocamada disposta na cuba de Langmuir com suas pressões laterais internas equilibradas pela barreira móvel.

As monocamadas fosfolipídicas na interface ar-água exibem um comportamento físico diferenciado^{32-34,38,39}, dependente da compressão da monocamada, ou seja, da área disponível para as moléculas, e da temperatura. Dependendo o grau de compressão e a temperatura, as interações (π_{hid} e π_{int}) apresentam diferentes comportamentos que influenciarão a forma no qual a monocamada está disposta e empacotada, se refletindo na forma da isoterma π -A (figura 4b), onde as diferentes inclinações pertencentes a mesma curva representam diferentes fases da monocamada, como a fase gasosa (G), líquido-expandida (LE), líquido-condensada (LC) e até sólida (S), em analogia aos estados comuns da matéria.

Estudos com monocamadas de Langmuir aumentaram consideravelmente apenas nos últimos 30 anos devido à recente aplicabilidade de técnicas de resolução micrométrica e molecular, como espalhamento de nêutron e raios-X^{40,41}, microscopia no ângulo de Brewster⁴², dentre outras, além de técnicas computacionais que se potencializaram desde o avanço dos computadores^{6,23,43}.

Esse sistema modelo vem sendo usado em aplicações com diferentes propósitos. Destaca-se estudos de monocamadas com nanopartículas⁴⁴, formação e interação de domínios^{45,46}, interações de lipídios com biomoléculas^{47,48}, bem como estudos de moléculas fotoativas⁴⁹⁻⁵².

1.2 Simulações de Biomembranas

Simulações computacionais tornaram-se uma importante ferramenta no entendimento da relação função-estrutura de sistemas e moléculas biológicas, fornecendo interpretações a dados experimentais, como também servindo de inspiração direcionada para novos experimentos. Para revelar os mecanismos que governam os processos biomoleculares, técnicas de simulação como Monte Carlo (MC) e Dinâmica Molecular (DM) são extensamente empregadas, podendo fornecer detalhes em relação ao movimento e comportamento de cada biomolécula em função do tempo. Neste trabalho foi usado a técnica de DM e sua fundamentação teórica é apresentada na sessão 3.

A primeira simulação por dinâmica molecular de uma biomolécula foi publicada⁵³ a quase 40 anos. Foi simulada uma pequena proteína em vácuo e com duração de apenas 9,2 ps. Desde então com o avanço dos computadores e com o desenvolvimento de novas metodologias, a técnica foi potencializada abrangendo estudos em escala temporal muito maior. A escala espacial (número de partículas simuladas) também foi elevada possibilitando simulações de membranas fosfolipídicas e proteínas, juntamente com toda a quantidade de água associada ao ambiente em torno destas bioestruturas.

Simulações por DM de biomoléculas⁵⁴⁻⁵⁶ combinam um modelo de representação dos átomos e moléculas e um algoritmo de propagação espaço-temporal dependente de suas interações mútuas. Em simulações com resolução atomística (do inglês, *all-atom* ou AA), todos os átomos de todas as moléculas são explicitamente representados. Outra categoria são as simulações *coarse-grained* (CG), onde um conjunto de partículas são condensadas a um único sítio de interação. A figura 5 ilustra estes casos.

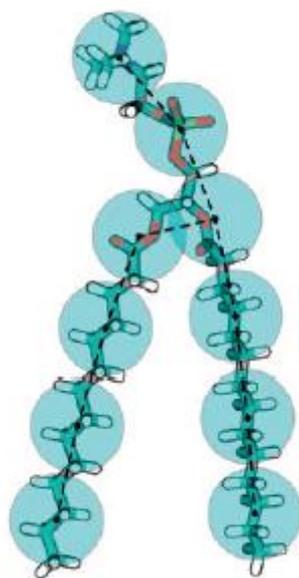


Figura 5. Ilustração de uma molécula lipídica em representação *all-atom* e, em círculos azuis, a mesma molécula em representação *coarse-grained* via *beads*.. Retirado de [57].

São inerentes às simulações AA que uma maior quantidade de interações precisem ser calculadas e propagadas, o que aumenta o custo computacional. Por outro lado, ganha-se detalhamento em nível molecular dos processos que serão estudados. Para aliviar o custo computacional, algumas estruturas podem ser representadas em um campo de força de átomos unidos (do inglês, *united-atom* ou UA). Por exemplo, grupos CH₂ presentes em caudas lipídicas podem ser descritos como uma partícula única, enquanto que outras regiões, como as cabeças polares dos lipídios, mantêm-se completamente explícitas.

Alternativamente às simulações estritamente atomísticas ou *coarse-grained*, existem as simulações em multi-resolução⁵⁸, onde a mudança é baseada no tipo de espécie ou região do espaço. No primeiro caso, a simulação combina representações AA com CG para estudos biomoleculares. Por exemplo⁵⁹, uma proteína ou composto pode ser simulada em resolução AA com uma descrição em nível *coarse* para a biomembrana e moléculas de água. No segundo caso, podem-se trocar as resoluções das moléculas em função da região espacial onde as interações precisam ser calculadas com precisão.

A escolha das resoluções e abordagens depende, portanto, da disponibilidade e capacidade de máquinas para efetuação dos cálculos e também da escala espaço-temporal do problema que será estudado. Aliado a isto, o desenvolvimento e refinamento de

campos de forças impulsionam novos estudos em problemas que envolvam biomembranas. Finalmente, é necessário ainda entender as formas de construção de simulações de biomembranas – no caso, de monocamadas fosfolipídicas na interface ar-água – compreendendo seus aspectos importantes e suas limitações.

1.2.1 Simulação de Monocamadas Fosfolipídicas na Interface ar-água

Simulações para monocamadas na interface ar-água surgiram na década de 1990⁶⁰⁻⁶³. O trabalho de Feller et al.⁶⁰⁻⁶¹ foi uma notável contribuição na simulação de monocamadas em pressão superficial constante, permitindo comparação direta entre isotermas teóricas e experimentais.

Intrínseco a essa abordagem é a escolha da geometria das monocamadas lipídicas que serão simuladas. Comumente há dois arranjos diferentes. Uma das possibilidades simula uma única monocamada em contato com a fase aquosa, e confina esta fase por meio de uma parede potencial rígida localizada abaixo dela que previne moléculas de água de escaparem (figura 6a). Como consequência, é necessária uma grande quantidade de moléculas de água, de tal forma que artefatos são evitados devido a estruturação da água propiciada pela parede, em outras palavras, a camada de água deve ser espessa o suficiente para permitir recuperação das suas propriedades em *bulk*. A segunda opção é ilustrada na figura 6b, onde duas monocamadas simétricas são separadas por uma camada de água suficientemente espessa com a finalidade de não permitir interações entre essas monocamadas opostas, bem como recuperação das propriedades *bulk* das moléculas de água. Esta segunda forma de montagem é denominada de arranjo do tipo *slab*. Em ambas as configurações, a fase ar não é verdadeiramente simulada, trocando-a por vácuo. A região reservada ao vácuo na caixa de simulação é grande suficiente para prevenir interações entre as monocamadas nas imagens periódicas.

O arranjo do tipo *slab* é geralmente preferido devido às limitações do primeiro. Em simulações em grandes pressões de superfície ou situações que originem curvas e dobras nas monocamadas (figura 6c), esta mudança de geometria pode ocasionar artefatos nas simulações devido à aproximação das monocamadas dobradas em direção a região de potencial da parede. Um segundo problema é a possibilidade de um grande dipolo oriundo

da distribuição assimétrica gerada na simulação de uma única monocamada. Este dipolo é propagado nas imagens periódicas e a interação entre imagens acabam influenciando a distribuição espacial das espécies. Tal problema não ocorre no arranjo *slab*, mas por outro lado, seu custo computacional é maior, já que o número de moléculas lipídicas precisa ser dobrado, bem como um maior número de moléculas de água é necessário para separar as duas interfaces.

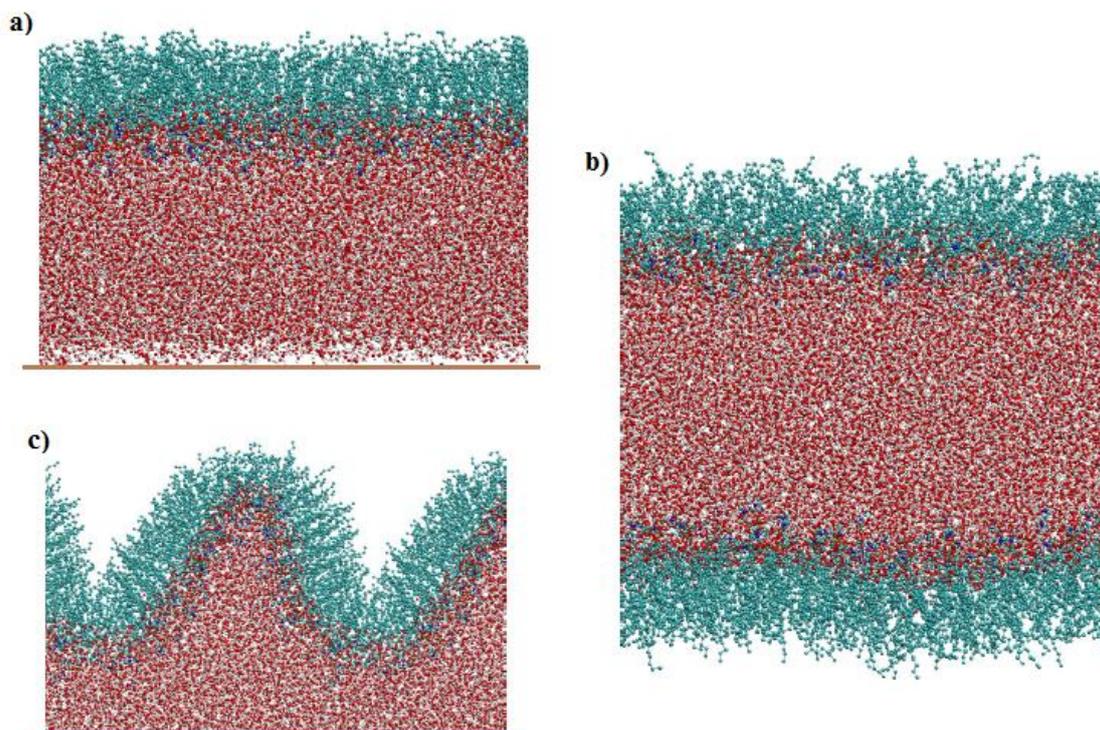


Figura 6. Tipos de arranjos em simulações de monocamadas na interface ar-água a) uma única monocamada com uma parede de potencial; b) arranjo do tipo *slab*, duas monocamadas simetricamente opostas; c) Representação de curvaturas na monocamada mostrando aproximação à parede de potencial. *Retirado e adaptado de [64].*

1.3 Terapia Fotodinâmica e Fotossensibilização

O crescimento anormal de tecidos é designado⁶⁵ como neoplasma ou blastoma, ou simplesmente, tumor. É a característica em comum de diversas doenças, como a

degeneração macular da retina, psoríase, artrite reumatoide sistêmica, arteriosclerose e principalmente os diversos tipos de cânceres.

As terapias tradicionais (cirurgia, quimioterapia e radioterapia) podem apresentar graves efeitos colaterais, bem como eficiência limitada. Assim, outras alternativas são constantemente propostas. Destaca-se a terapia fotodinâmica (TFD)⁶⁵⁻⁷¹, uma modalidade clínica relativamente recente que vem sendo usada e investigada no tratamento dessas e outras doenças em nível mundial.

A terapia fotodinâmica é uma modalidade de tratamento baseada na fotooxidação de matéria biológica, que envolve dois componentes individuais não tóxicos que são combinados para induzir efeitos em tecidos e células de forma dependente de oxigênio. Um dos componentes é o fotossensibilizador (FS), uma molécula fotoativa que se localizará na célula e/ou tecido. O segundo componente é a radiação administrada de forma controlada na região tumoral e em determinados comprimentos de onda cujo objetivo é ativar o FS para geração das espécies reativas de oxigênio (do inglês, *reactive oxygen species*, ou *ROS*), como o oxigênio singlete, que ocasionarão a morte celular no tecido tumoral (figura 7).

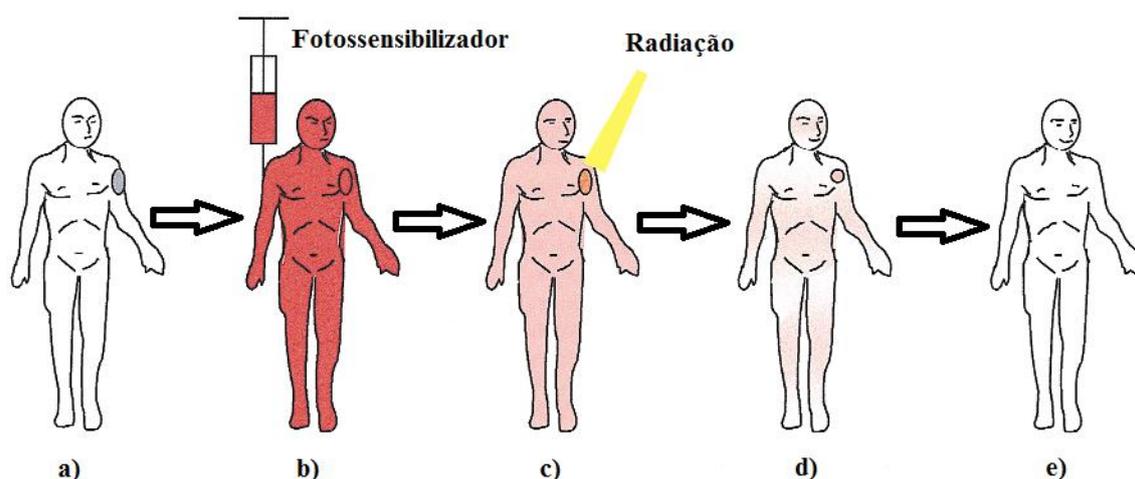


Figura 7. Ilustração simplificada de um tratamento de TFD. **a)** Paciente inicialmente com o tumor. **b)** FS absorvido pelos tecidos e pelo tumor. **c)** Administração de radiação na região do tumor. **d)** Remoção gradativa do FS dos tecidos e começo de eliminação do tumor como resultado da destruição celular provocado pelos efeitos da fotooxidação. **e)** Indivíduo novamente saudável. *Adaptado de [67].*

O fenômeno da fotossensibilização⁷² ocorre quando o FS no estado fundamental absorve um fóton da luz irradiada, de frequência característica de cada FS. Assim, é eletronicamente excitado ao estado singlete ($^1\text{FS}^*$), e por meio do cruzamento intersistema ocorre transição para o estado excitado triplete ($^3\text{FS}^*$), de tempo de vida relativamente longo (entre μs - ms). Por sua vez, esse estado triplete pode estar sujeito a dois tipos de reações com as moléculas vizinhas:

Reações do tipo I: Reações de transferência eletrônica ou de átomos de hidrogênio produzindo formas radiculares do FS ou do substrato biológico alvo. Esses intermediários podem reagir com o oxigênio presente no tecido formando peróxidos, íons superóxidos e radicais hidroxilas, que iniciarão reações em cadeias de radicais livres.

Reações do tipo II: Processo de transferência de energia ao oxigênio molecular no estado fundamental, formando o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e consequente retorno do fotossensibilizador ao estado fundamental. O oxigênio singlete é altamente reativo proporcionando danos oxidativos em diversas biomoléculas, principalmente os lipídios de membranas, que resultarão em morte celular.⁷²⁻⁷⁴

Ambos os tipos de reações ocorrem simultaneamente, e a proporção entre esses processos depende do tipo de fotossensibilizador usado, da concentração de substrato e de oxigênio, bem como a afinidade de ligação do FS ao substrato. Devido à alta reatividade e ao curto tempo de vida dos ROS, apenas células próximas as áreas de produção dessas espécies (ou seja, regiões radiadas que contenham o FS) são diretamente afetadas pela terapia fotodinâmica.

O dano fotoinduzido às biomoléculas pode levar a morte celular por necrose ou apoptose. A necrose é a morte celular associada com a perda do controle homeostático, causando inchamento e rompimento da membrana celular, resultando na liberação das organelas presentes no interior das células, ocorrendo assim uma inflamação do tecido. Já na apoptose, ocorre degradação celular regulada e organizada, contração e fragmentação sem afetar o resto do tecido⁷¹. Claramente, morte celular por apoptose é mais desejável em um tratamento controlado. Relacionado a este fato, estudos^{75,76} mostraram que o $^1\text{O}_2$ (reação tipo 2) induz apoptose, enquanto que os radicais (tipo 1) induzem necrose.

A erradicação dos tumores via TFD ocorre então via efeitos combinados de ambos os processos apresentados acima. As espécies reativas de oxigênio podem matar diretamente as células tumorais, bem como afetar a vasculatura associada ao tumor, limitando o fornecimento de oxigênio e nutrientes para manutenção dessas células. Pode ainda ocorrer uma imuno resposta contra as células tumorais (reação inflamatória), devido a desregulação do fluxo de linfócitos e leucócitos, bem como alteração de cascatas de sinalização e de outras substâncias reguladoras⁶⁶.

1.3.1. Alvo fotodinâmico: Mitocôndria

Na busca por aplicação de forma mais eficaz e segura da terapia fotodinâmica, o tratamento foi direcionado para organelas intracelulares. Como visto, dano a qualquer biomolécula pode potencialmente levar a necrose, porém, promover uma morte celular por apoptose requer alterações localizadas que ativem a sinalização apoptótica e que não comprometam a estrutura e nem o *status* energético da célula. As mitocôndrias são apontadas^{70,77} como um dos alvos ideais da TFD porque contém uma variedade de proteínas de membrana, como o citocromo C e o fator de indução-apoptótico, o qual quando solto no citosol desencadeia a apoptose⁷⁸. Como resultado, dano as membranas mitocondriais engatilha a apoptose. Outro motivo do direcionamento às organelas intracelulares é que o tratamento da TFD diminuía sua própria eficácia, pois proporcionava corte de suprimento de oxigênio ao tumor, devido a destruição parcial da vasculatura tumoral⁶⁶.

Mitocôndrias são estruturas altamente complexas e parcialmente autônomas. Possuem suas próprias espécies de DNA e RNA, porém não sintetizam todas suas proteínas, bem como parte de seus lipídios, que são produzidos pelo retículo endoplasmático. Apresentam duas membranas, a membrana mitocondrial externa e interna, que são próximas uma da outra e diferem em composição lipídica. A diferença na composição lipídica se reflete na estrutura e estabilidade dessas membranas, bem como nas interações com proteínas e enzimas.

Em relação a composição lipídica^{15,79}, as mitocôndrias se destacam das demais organelas devido a presença de grandes quantidades (15-20%) de cardiolipinas, um fosfolípido aniônico, de carga -2^{146} , com 90% delas apresentando insaturações. O

principal fosfolipídio de mitocôndrias, assim como de outras organelas, são as fosfatidilcolinas (PC) que compreendem entre 45-55% da composição. Apesar da relevância biológica de sistemas carregados, muitos dos estudos^{124,131,134,135,142} em sistemas lipídicos modelo ainda tem sido feito com lipídios *zwiteriônicos*, principalmente com PCs, já que mais da metade das membranas são constituídas por elas.

No presente estudo, foi simulado o lipídio DOPC (1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina) da classe das PC e a cardiolipina (1,1',2,2' – tetraoleoil-cardiolipina ou apenas CLP) com as caudas derivadas do mesmo ácido graxo, o ácido oleico. A figura 8 mostra a estrutura molecular de cada uma dessas moléculas.

Como as mitocôndrias apresentam um potencial eletroquímico negativo, oriundo principalmente da presença de cardiolipinas, a mudança do alvo fotodinâmico para essa organela se mostra possível e acessível fazendo-se uso de fotossensibilizadores catiônicos.

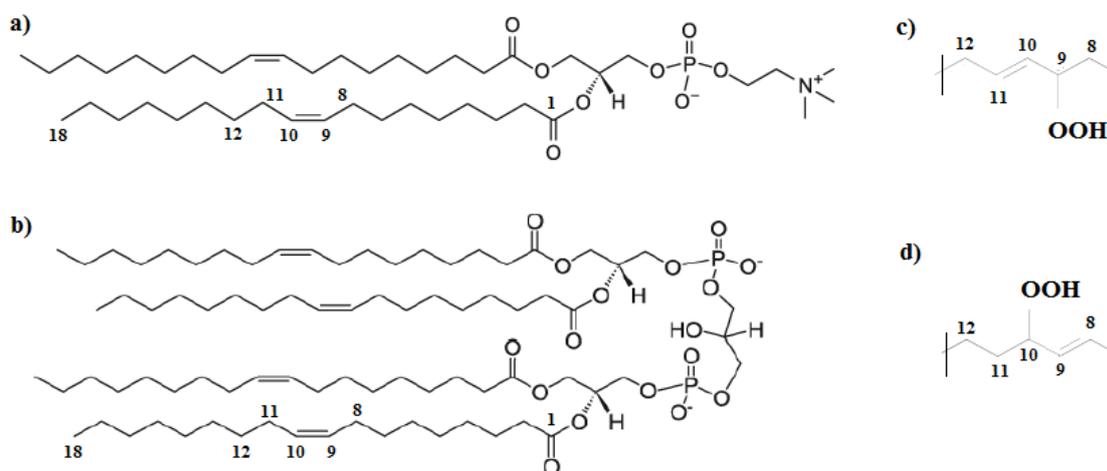


Figura 8. a) e b) estruturas planares dos fosfolipídios DOPC e CLP, respectivamente. c) e d) Representação planar da inserção do grupo hidróperóxido (-OOH) após o efeito de hidroperoxidação lipídica. Formam-se tanto derivados hidroperoxidados na posição de carbono 9 quanto na 10. Neste trabalho foram simulados os derivados hidroperoxidados de DOPC e CLP apenas na posição 9.

1.3.2 Fotossensibilizador: Azul de Metileno

Dentre os principais corantes catiônicos destaca-se o tetrametil-diamino-difeniltiazina (figura 9), popularmente conhecido como azul de metileno (AM) – e trata-se do fotossensibilizador simulado nesta dissertação. O azul de metileno⁷¹ é da classe das fenotiazinas e em pH fisiológico encontra-se positivamente carregado. Apresenta características importantes e necessárias em compostos potenciais para a TFD:^{66,71,80,81} i) forte absorção (550-700 nm) de luz dentro da chamada “janela terapêutica” (550-900 nm), possibilitando maior penetração de luz nos tecidos; ii) baixa citotoxicidade na ausência de radiação; iii) rápida eliminação do corpo; iv) facilidade de ser obtido; v) possibilidade de manuseio sintético, o que permite efetuar modificações para otimizar as propriedades desejáveis; vi) baixo rendimento quântico de fluorescência e alto rendimento quântico do estado triplete; vii) alto rendimento quântico de geração de oxigênio singlete.

O azul de metileno já vem sendo utilizado *in vivo* contra alguns tipos de tumor⁸²⁻⁸⁴. Modernamente tornou-se uma alternativa aos fármacos comumente aplicados em TFD, principalmente as misturas de compostos porfirínicos, sendo investigado pela sua interação com o meio celular, como o núcleo e DNA⁸⁵, lisossomos⁸⁶ e mitocôndrias⁸⁷.

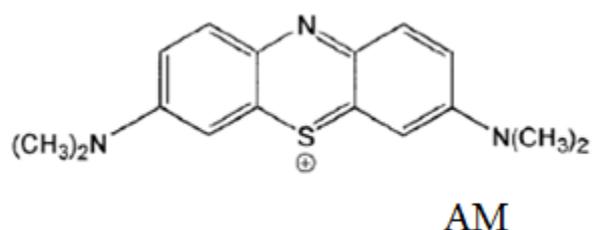


Figura 9. Estrutura planar do Azul de Metileno.

Assim, o entendimento de que maneira agentes fotossensibilizantes interagem e adsorvem nas membranas é importante para que o processo de foto-oxidação seja melhor compreendido. Conseqüentemente um dos focos de atenção deste trabalho foi investigar como o FS azul de metileno interage com os lipídios DOPC e CLP, constituintes básicos da membrana mitocondrial.

1.3.3 Hidroperoxidação Lipídica

A formação das espécies reativas de oxigênio é capaz de danificar as moléculas biológicas, como ácidos nucleicos e aminoácidos. Exposição dessas espécies a proteínas provoca desnaturação, perda de função, *cross-linking*, agregação e fragmentação de tecidos conectivos, como o colágeno⁸⁸. Entretanto, o maior dano é a indução da peroxidação lipídica⁷²⁻⁷⁴ provocada pelo oxigênio singlete durante o processo de fotossensibilização.

A peroxidação lipídica desencadeada pelo oxigênio singlete ocorre devido a reação do $^1\text{O}_2$ com as duplas ligações presentes na cadeia carbônica lipídica. São reações do tipo “ene” que resultam na formação dos hidroperóxidos⁸⁹. A figura 10 mostra um esquema de peroxidação lipídica. Os produtos primários dessa peroxidação são os hidroperóxidos de lipídios (LOOH). Após a formação dos LOOH, a oxidação pode continuar com a produção de uma grande variedade de fosfolipídios cetônados e aldeídos de cadeia curta ou longa, oriundos da cisão da cauda lipídica na insaturação. Quantificação desses produtos indica o grau da peroxidação lipídica no sistema⁹⁰.

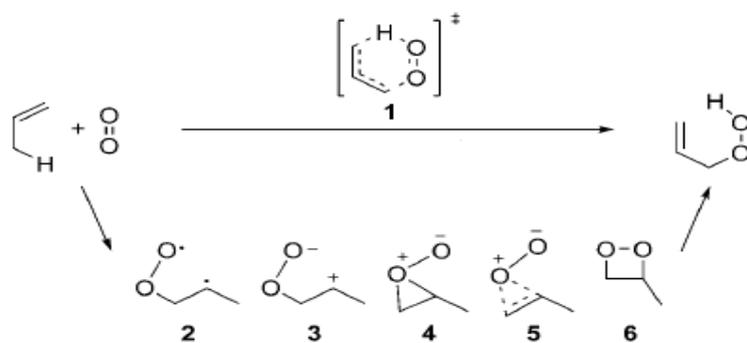


Figura 10. Mecanismo da peroxidação lipídica em apenas uma etapa, via mecanismo concertado (via superior) ou com formação de vários intermediários (via inferior).

Há duas consequências da peroxidação lipídica: dano estrutural as biomembranas devido ao LOOH e formação dos produtos secundários, também afetando propriedades físico-químicas. São responsáveis por causarem mudanças biofísicas^{52,91} nas membranas, como alterações na elasticidade, fluidez, permeabilidade de íons, poração e aumento de área superficial, afetando diversas funções celulares.

Com intuito de melhor estabelecer as mudanças que a formação de hidroperóxidos proporcionam, também foi simulado monocamadas dos derivados hidroperoxidados dos lipídios DOPC e CLP, com o grupo hidroperóxido no carbono 9 da cauda carbônica (figura 8c).

2. OBJETIVOS

O trabalho tem dois objetivos distintos. O primeiro deles é investigar por meio de simulações computacionais o efeito que o grau de hidroperoxidação lipídica proporciona nas diferentes monocamadas dos lipídios DOPC e CLP. O segundo, também via simulação computacional, é entender o comportamento do fotossensibilizador azul de metileno (AM) nas monocamadas puras desses fosfolipídios, bem como nas dos seus derivados com apenas um grupo hidroperóxido. Mais especificamente, destacam-se as seguintes propostas:

- Simulação por dinâmica molecular em representação *all-atom*:
 - Monocamadas puras de DOPC e CLP.
 - Monocamadas puras hidroperoxidadas de DOPC e CLP, tanto com o grupo hidroperóxido em apenas uma das caudas (DOPC-OOH e CLP-OOH) quanto nas duas (DOPC-2OOH e CLP-2OOH).
- Determinação dos efeitos que as hidroperoxidações proporcionam nas monocamadas simuladas acima via análises de área média por lipídio, parâmetros de ordem das caudas lipídicas, funções de distribuição radial e orientacional, perfis de densidade e do potencial eletrostático médio.
- Simulação por dinâmica molecular do AM em duas distribuições de cargas diferentes (MP2/TZVPP e B3LYP/TZVPP) em cada uma das monocamadas puras de DOPC, DOPC-OOH, CLP e CLP-OOH, analisando o comportamento dinâmico e estrutural do AM em cada uma dessas monocamadas, e as diferenças oriundas dos diferentes modelos utilizados.
- Estimativa do perfil de energia livre para o processo de transferência do AM do *bulk* aquoso para regiões específicas das monocamadas de DOPC e DOPC-OOH, dissecando os perfis em termos eletrostáticos e não-eletrostáticos, considerando tanto o modelo de carga proveniente de cálculos em nível MP2/TZVPP quanto em nível B3LYP/TZVPP.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Dinâmica Molecular (DM)

O método computacional de simulação por dinâmica molecular⁹²⁻⁹⁵ descreve o comportamento dinâmico microscópico de todos os átomos pertencentes ao sistema a ser simulado, de forma dependente do tempo.

É inerente ao ramo da mecânica quântica a descrição de qualquer entidade química via resolução da equação tempo dependente de Schrödinger. Porém, devido à complexidade das equações a serem resolvidas, a demanda computacional é alta. Mesmo assumindo várias aproximações, a escala temporal sondada seria das frequências características dos movimentos eletrônicos, muito aquém da escala de interesse dos processos que estamos interessados neste trabalho. Assim, recorre-se ao uso da mecânica clássica com campos de força empíricos.

O estado de um sistema clássico pode ser completamente descrito especificando-se as posições e os momentos de todas as partículas. Assim sendo, cada partícula tem associada a si 6 coordenadas, três relacionadas ao espaço de posições tridimensional (x, y, z) e três relacionadas aos momentos lineares (p_x , p_y , p_z). Em um sistema de N partículas o espaço 6N-dimensional é chamado de “espaço de fase”. Portanto em qualquer instante temporal, o sistema ocupa um ponto no espaço de fase, denominado de Q.

$$\mathbf{Q} = (\mathbf{r}, \mathbf{p}) \quad (5)$$

Por simplicidade de notação, as coordenadas de posição (\mathbf{r}) e momento (\mathbf{p}) foram definidas da forma que se segue:

$$\mathbf{r} = (x_1, y_1, z_1, x_2, y_2, z_2, \dots, x_N, y_N, z_N) \quad (6)$$

$$\mathbf{p} = (p_{x_1}, p_{y_1}, p_{z_1}, p_{x_2}, p_{y_2}, p_{z_2}, \dots, p_{x_N}, p_{y_N}, p_{z_N}) \quad (7)$$

Então, ao longo do tempo o método de dinâmica molecular mapeia uma trajetória no espaço de fase. O mapeamento da trajetória é decorrente fazendo-se uso das equações newtonianas de movimento:

$$\mathbf{r}(t_2) = \mathbf{r}(t_1) + \int_{t_1}^{t_2} \frac{\mathbf{p}(t)dt}{m} \quad (8)$$

$$\mathbf{p}(t_2) = \mathbf{p}(t_1) + m_i \int_{t_1}^{t_2} \mathbf{a}(t) dt \quad (9)$$

Onde t_1 refere-se ao tempo inicial, t_2 a um intervalo de tempo posterior, m_i é a massa da partícula i e \mathbf{a} é a aceleração. O mapeamento se torna possível em posse do conjunto de dados iniciais das posições e dos momentos de cada partícula, estabelecidos anteriormente ao início de cada DM (sessão 3.1.2). O cálculo da aceleração que a partícula estará sofrendo surge da segunda lei de Newton:

$$\mathbf{F}_i = m_i \mathbf{a}_i, \text{ onde: } \mathbf{a}_i = \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} \quad (10)$$

Finalmente, a força atuante sobre cada partícula do sistema é o negativo do gradiente de potencial, dada pela equação 11:

$$\mathbf{F}_i = - \frac{\partial U(r_1, r_2, \dots, r_N)}{\partial (r_i)} \quad (11)$$

Dessa forma, determinando a força resultante em cada partícula, é possível obter a aceleração. A partir desta, as equações de movimento são integradas, obtendo-se as velocidades (ou os momentos), que por sua vez proporcionam a obtenção das novas posições dessas partículas. Esses valores atualizados de velocidade e posição são utilizados para obtenção das energias cinéticas e potenciais de cada constituinte do sistema, que quando aliado a mecânica estatística possibilita a determinação de observáveis macroscópicas de interesse. O conjunto de equações que resultam na função potencial da equação 11 é o chamado campo de força e será abordado mais detalhadamente na sessão 3.1.1.

O cálculo das equações de movimento pelos programas de DM é realizado via algum esquema de integração que possibilite a propagação das trajetórias. A maioria destes esquemas são baseados em expansões de Taylor truncadas em segunda ordem, sendo o algoritmo de *Verlet*⁹⁶ um dos mais difundidos, e que foi usado neste trabalho. Este algoritmo faz uso das posições e acelerações dos átomos no tempo t e das posições em um passo de tempo anterior, $r(t-\Delta t)$, para determinação das novas posições no tempo $t+\Delta t$, de acordo com a Equação 12:

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = 2\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t - \Delta t) + \mathbf{a}(t)\Delta t^2 \quad (12)$$

Esse algoritmo é baseado no método das diferenças finitas, onde a integração é dividida em pequenos intervalos de tempo (passos de integração ou *timestep*, Δt).

3.1.1 Função de Energia Potencial (Campo de Força)

A descrição de moléculas via física clássica é denominado de mecânica molecular (MM). Nela, as moléculas são tratadas como uma coleção de átomos unidos por forças newtonianas. O conjunto de equações de potenciais de interação intramolecular e intermolecular é chamado de campo de força, que é a função de energia potencial que aparece na equação 11. Essa energia potencial é a soma de diferentes contribuições:

$$U(r_1, r_2, \dots, r_N) = \sum U_{BOND} + \sum U_{ANG} + \sum U_{DIE} + \sum U_{LJ} + \sum U_{COUL} \quad (13)$$

Os três primeiros termos do lado direito da equação 13 correspondem aos potenciais intramoleculares: U_{BOND} é o potencial de estiramento de uma ligação química; U_{ANG} é o potencial de deformação angular; U_{DIE} é o potencial diedral (figura 11). Os últimos dois termos são aplicados entre átomos da mesma molécula não diretamente ligados quanto aos átomos de moléculas vizinhas. O termo U_{LJ} é o potencial de Lennard-Jones (LJ) que considera as interações atrativas e repulsivas de curto alcance entre partículas; U_{COUL} é o potencial de interação eletrostático coulômbico.

A forma mais comum para representar os potenciais U_{BOND} e U_{ANG} é baseada na lei de Hooke, conforme equação 14 e 15:

$$U_{BOND} = \frac{1}{2} \sum K_b (b - b_0)^2 \quad (14)$$

$$U_{ANG} = \frac{1}{2} \sum K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (15)$$

Onde b e θ são os comprimentos e ângulos de ligação, respectivamente, b_0 e θ_0 são os correspondentes valores de equilíbrio e k_b e k_θ as constantes de força para a restituição aos respectivos valores de equilíbrio.

A forma funcional do potencial diedral é apresentada na equação 16 e abrange o denominado potencial diedral próprio (U_{PRO}) e o potencial diedral impróprio (U_{IMP}):

$$U_{DIE} = U_{PRO} + U_{IMP} = \frac{1}{2} \sum V_n [1 + \cos(n\phi - \delta)] + \frac{1}{2} \sum K_w (w - w_0)^2 \quad (16)$$

Onde: V_n é a barreira de energia para a torção, n é o número de máximos (ou mínimos) de energia em uma torção completa, ϕ é o ângulo diedro, δ é o ângulo de fase (defasagem no ângulo diedro que pode gerar um ponto de mínimo ou de máximo na posição $\phi = 0$),

k_w é a constante de força para o termo de energia e w_0 é o valor de equilíbrio do ângulo diedral impróprio.

Esses termos diedrais referem-se a energia associada à torção de ângulos diedrais em moléculas poliatômicas (figura 11c e 11d). O termo diedral próprio é a energia referente a torção de algum grupo químico, enquanto que o termo diedral impróprio é um potencial geralmente harmônico cuja função é manter a geometria planar de grupos reconhecidamente planares (p.e., carbonos sp^2 em anel aromáticos).

As interações entre pares de átomos não ligados covalentemente (i, j) são oriundos dos potenciais de LJ e coulômbico, mostrados nas equações 17 e 18, respectivamente.

$$U_{LJ} = \sum_{ij} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \quad (17)$$

$$U_{COUL} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (18)$$

Na equação 17, A_{ij} e B_{ij} são constantes, com o primeiro termo entre parênteses responsável pela repulsão entre partículas e o segundo pela atração. No caso das interações eletrostáticas dada pela equação 18, q_i e q_j correspondem à magnitude das cargas parciais de cada átomo, ϵ_0 é a permissividade no vácuo, ϵ_r é a constante dielétrica relativa ao meio e em ambas as equações r_{ij} é a distância entre as partículas.

Todos os campos de forças com base na mecânica molecular assumem transferabilidade das constantes de forças e parâmetros presentes nas equações de potenciais. Assim, por exemplo, o mesmo conjunto de dados que descrevem uma ligação simples carbono-carbono é utilizado para moléculas diferentes. É importante ressaltar que a maioria dos campos de forças atuais apresentam diversos tipos de constantes e parâmetros para essa mesma ligação carbono-carbono caso algum ligante diferente de hidrogênio esteja presente no carbono (como oxigênios e nitrogênios).

Alguns campos de forças apresentam termos extras no potencial da equação 13, como o acoplamento de ângulos e comprimentos de ligações, visando uma melhor concordância com espectros vibracionais. Há campos de forças desenvolvidos especificamente para descrição de moléculas orgânicas, outros para compostos inorgânicos, bem como para biomoléculas como proteínas, nucleotídeos e lipídios. Portanto, a escolha do campo de força depende, em grande parte, do sistema a ser estudado e das propriedades que serão investigadas. No caso de sistemas biomoleculares

– como as monocamadas fosfolipídicas simuladas neste estudo – os campos de forças recomendáveis são o CHARMM⁹⁸, GROMOS⁹⁹ e AMBER¹⁰⁰. No presente trabalho foram utilizados campos de forças baseados na parametrização CHARMM.

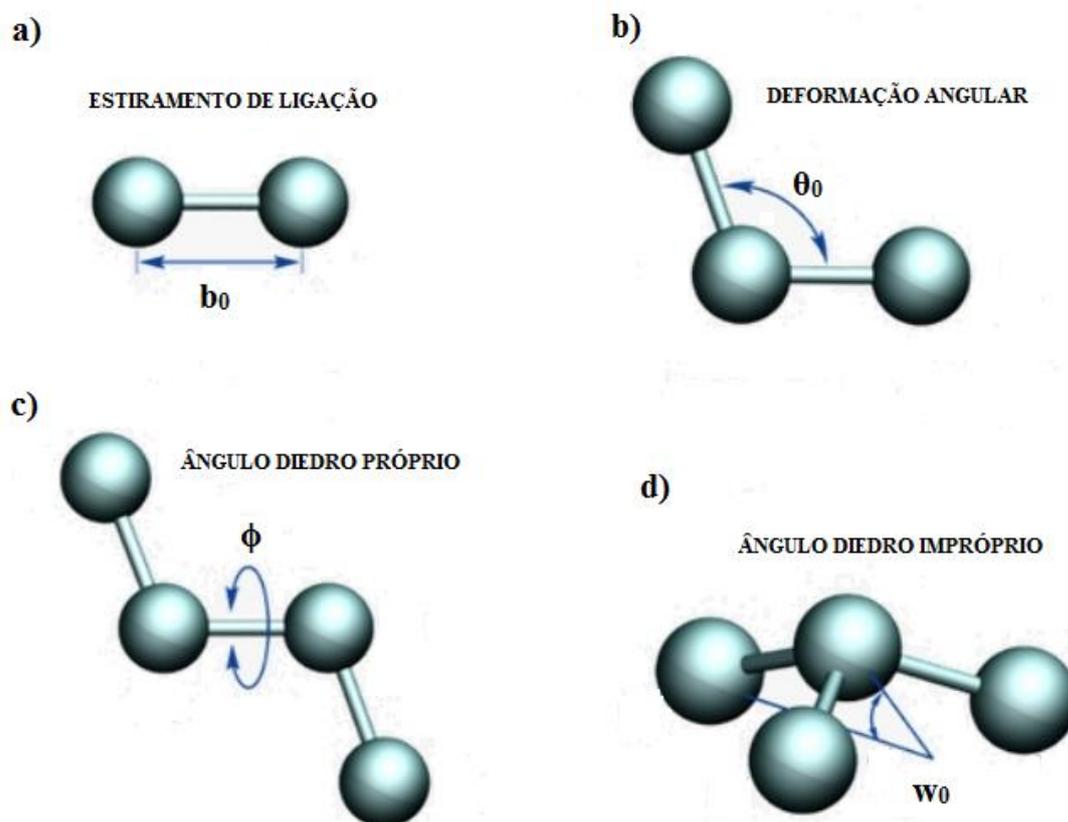


Figura 11. Representação dos termos da energia potencial: **a)** estiramento da ligação química; **b)** deformação angular; **c)** ângulo diedro próprio; **d)** ângulo diedro impróprio. *Retirado e adaptado de [97].*

3.1.2 Atribuição das Posições e Momentos Iniciais

Na obtenção das trajetórias de dinâmica molecular pela amostragem do espaço de fase, o pontapé inicial durante a primeira integração das equações de movimento necessita das posições e momentos (ou velocidades) iniciais de cada átomo presente no sistema. Assim, as posições iniciais são atribuídas a partir da montagem pré-determinada do sistema de interesse, ou seja, as moléculas são empacotadas em regiões definidas do

espaço criando um ponto de partida inicial para as dinâmicas moleculares. A figura 12 ilustra esta disposição inicial dos sistemas de monocamadas simulados neste trabalho.

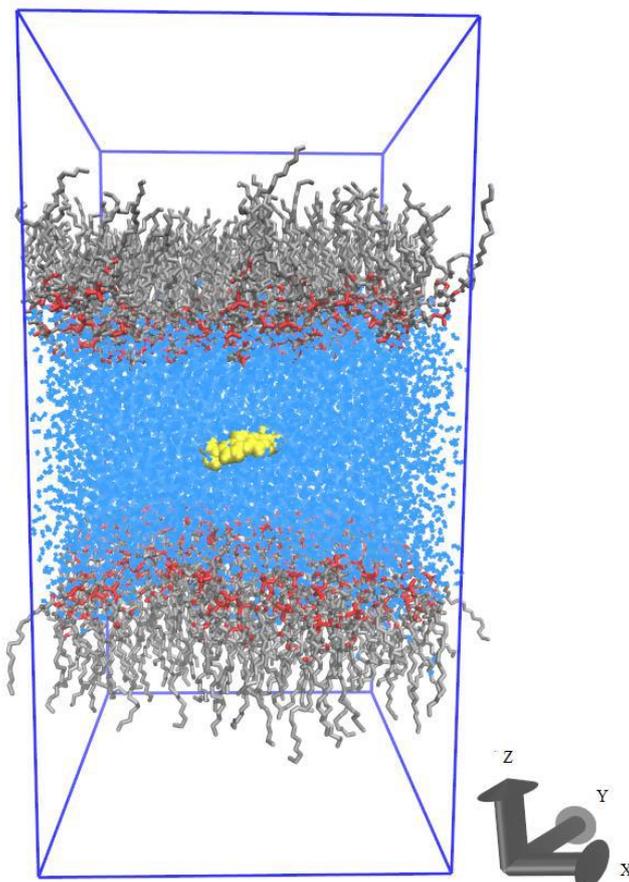


Figura 12. Representação das posições iniciais de todos os constituintes presentes nos sistemas simulados. Moléculas de água estão representadas em azul, azul de metileno em amarelo e o fosfolípido em cinza (esqueleto carbônico) e vermelho (átomos de fósforo e oxigênio das cabeças polares).

Em conjunto com a definição das posições iniciais dos átomos do sistema resta ainda a atribuição dos seus momentos iniciais, que é realizado pelo *software* de dinâmica molecular. Isso é possível por meio de uma distribuição de Maxwell-Boltzmann, relacionando a temperatura desejada nas simulações com os valores de velocidade dos átomos (ou seja, dos momentos), por meio da equação 19:

$$T = \frac{1}{(3N-n)k_B} \sum_{i=1}^N \frac{|p_i|^2}{m_i} \quad (19)$$

Onde T é a temperatura, N o número total de átomos, n é o número de graus de liberdade restringidos, k_B é a constante de Boltzmann, p_i e m_i são o momento e a massa do átomo i .

3.1.3 Condições Periódicas de Contorno

As simulações atuais utilizam entre 10^2 - 10^6 partículas, o que é uma fração mínima quando comparado à quantidade de partículas dos sistemas macroscópicos (da ordem do número de Avogadro). Dessa forma, escolhendo uma forma geométrica para a simulação das partículas, por exemplo, a de um cubo, uma significativa fração das partículas estará nas bordas da caixa, originando efeitos de superfícies indesejáveis. Isso é particularmente relevante em simulações de sistemas condensados, pois as moléculas de borda estariam sujeitas apenas às interações com as moléculas do interior, influenciando a descrição do *bulk*.

Uma das formas de aliviar o efeito de borda é via *condições periódicas de contorno* (figura 13). Nesta técnica, a caixa de simulação que contém os átomos é replicada tridimensionalmente com periodicidade infinita. Durante as simulações, as trajetórias dos átomos na caixa original são reproduzidas da mesma maneira nas imagens periódicas e, logo, se um átomo cruza o contorno da caixa original, sua imagem entra pela face oposta, com a mesma velocidade.

Como a DM avalia as forças exercidas em cada átomo pelos demais átomos via potencial de LJ e o potencial coulômbico, estas interações também devem ser consideradas com os átomos das caixas imagens. Considerando esse aspecto, surge um problema da aplicação de condições periódicas de contorno em potenciais de longo alcance.

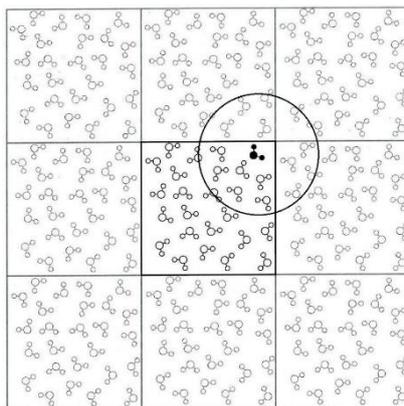


Figura 13. Condição periódica de contorno em duas dimensões. O sistema, destacado pelo quadrado preto, foi replicado em todas as direções. O círculo centralizado em uma das moléculas de borda (destacada) ilustra um raio de corte esférico para o tratamento de interações. *Retirado e adaptado de [101].*

3.1.4 Tratamento das Interações de Curto e Longo Alcance

Uma das aproximações é denominada de *convenção da imagem mínima*, sendo indicada para o tratamento das interações de curto alcance, já que a energia é proporcional a r^{-6} . Nela, o potencial é truncado em um raio de corte esférico, como ilustrado na figura 13 e contabiliza-se todas as interações entre as partículas contidas dentro da região truncada. O tamanho da caixa de simulação deve ser pelo menos duas vezes mais extenso que o maior raio de corte considerado em uma dinâmica, pois dessa forma a interação de uma partícula com as suas outras próprias imagens é evitada.

Já para interações de longo alcance, oriundas do potencial de Coulomb, o potencial decai com r^{-1} . Dessa forma, se a truncagem fosse efetuada exatamente como para as interações de curto alcance, grande parte do efeito eletrostático entre partículas seria desprezado, comprometendo os resultados das simulações. Assim, as interações de longo alcance são ajustadas por outros métodos, baseados na soma de Ewald¹⁰². Dentre eles, destaca-se os métodos P3M¹⁰³ (*Particle-Particle-Particle Mesh Ewald*), PME¹⁰⁴ (*Particle Mesh Ewald*) e SPME¹⁰⁵ (*Smooth Particle Mesh Ewald*).

A contabilização de interações eletrostáticas em um sistema com condições de contorno periódica requer a consideração do efeito de todas as cargas dentro da caixa de simulação principal e também nas caixas réplicas. Assim, essa somatória de interações é

essencialmente infinita e condicionalmente convergente. O método de Ewald baseia-se em converter esta soma em duas somatórias absolutamente convergentes: uma somatória no espaço real para curto alcance e uma no espaço recíproco para longo alcance. A parte de curto alcance também faz uso de um raio de corte esférico. O espaço recíproco é calculado via transformadas rápidas de Fourier, originando os métodos P3M, PME e SPME. Nestes métodos, o custo computacional do espaço recíproco é reduzido de $O(N^2)$ para $O(N \log N)$.

3.1.5 Ensembles

O conceito de ensemble faz a conexão entre as quantidades mecânicas microscópicas com propriedades termodinâmicas macroscópicas. A ideia é que o comportamento (estatístico) de alguma propriedade termodinâmica de um sistema de N partículas pode ser previsto acompanhando a evolução temporal de uma combinação das variáveis mecânicas do espaço de fase, mantendo algumas condições macroscópicas constantes. Estas condições definem o ensemble.

Há alguns tipos diferentes de ensembles, cada qual mantendo diferentes variáveis termodinâmicas constantes no decorrer da dinâmica molecular. Dentre eles destaca-se os ensembles NVE, NPT, NVT e o $NP\gamma T$, onde N , V , E , P , T e γ significam que o número de partículas, o volume, a energia total, a pressão, a temperatura e a tensão superficial são mantidos constantes, respectivamente.

4. METODOLOGIA COMPUTACIONAL

4.1 Simulações Computacionais

4.1.1 Monocamadas Fosfolipídicas

Todas as simulações que envolveram monocamadas neste estudo foram pré-montadas em um arranjo do tipo *slab* por meio do *software* Packmol¹⁰⁶, a figura 12 ilustra esse tipo de arranjo e a disposição inicial dos constituintes do sistema.

Neste arranjo, dois folhetos de monocamadas fosfolipídicas são orientados no plano x-y, com as cabeças polares apontando para a fase aquosa confinada entre elas. As caudas hidrofóbicas apontam para a extremidade da caixa de simulação (figura 12, eixo z). Vácuo é deixado na dimensão z para evitar o contato entre os folhetos de fosfolipídios durante replicação periódica. A figura 14 ilustra parte da replicação periódica das monocamadas.

Utilizou-se em todas as simulações 128 moléculas de fosfolipídios, correspondendo a 64 moléculas por folheto, além de 7000 moléculas de água para os sistemas de DOPC e seus derivados hidroperoxidados e 8700 moléculas de água para os sistemas de CLP e seus derivados hidroperoxidados. No caso particular das monocamadas de CLP, 256 cátions sódio foram adicionados para neutralização do sistema, já que esse lipídio aniônico é duplamente carregado. Nas simulações com azul de metileno, uma molécula desse corante foi inserida na fase aquosa, bem como um ânion cloreto para aquisição da eletroneutralidade dos sistemas.

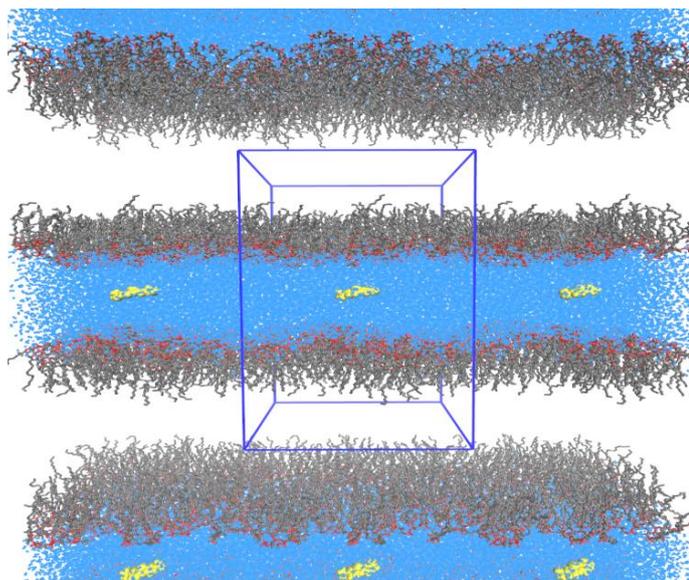


Figura 14. Replicação periódica do sistema em arranjo *slab* das monocamadas (limites da caixa de simulação aparecem destacados em linhas azuis).

4.1.2 Campo de Força

Em todos os sistemas simulados, moléculas de água foram tratadas pelo modelo TIP3P¹⁰⁷.

4.1.2.1 Fosfolipídios

Os fosfolipídios DOPC e CLP foram simulados tanto em representação *all-atom*, como em representação *united-atom* (UA). Neste último, apenas a cauda carbônica apresenta redução no número de sítios, sendo cada grupo $-CH_n$ ($n = 1, 2$ ou 3) condensado a um sítio de interação.

O campo de força CHARMM36 foi o responsável pela descrição de todos os parâmetros do DOPC em versão *all-atom*. Para a versão *united-atom*, os parâmetros foram retirados do trabalho de Hénin et al¹⁰⁸, que usou uma combinação entre os parâmetros existentes do CHARMM36 para a cabeça polar e desenvolveu um conjunto de parâmetros para as caudas em UA.

Para a CLP em resolução UA, foi utilizado os parâmetros desenvolvido por Aguayo et al.¹⁰⁹, que consistem em uma derivação oriunda da parametrização CHARMM36 para as cabeças polares e do trabalho de Hénin et al¹¹⁰ para as caudas unidas. Na representação AA para CLP, os parâmetros para a cabeça polar são

provenientes de Aguayo et al.¹⁰⁹ e os parâmetros de caudas explícitas são da descrição da cadeia oleoil presente no campo de força CHARMM36.

Para os sistemas hidroperoxidados há pouca literatura em termos de campo de força^{111,139} Para ser compatível com o campo de força CHARMM36, foram utilizados os parâmetros do trabalho de Tarek et al¹¹¹.

4.1.2.2 Azul de Metileno

O campo de força CHARMM foi inicialmente desenvolvido para a descrição de proteínas e fosfolipídios.

Recentemente, um protocolo geral denominado CGENff¹¹² (*Charmm General Force Field*) foi desenvolvido para obtenção de parâmetros intra e intermoleculares para qualquer molécula. O protocolo faz uso de uma série de cálculos de estrutura eletrônica e na transferibilidade de parâmetros Lennard-Jones (quando possível).

Para o azul de metileno, seguimos parcialmente o protocolo CGENff. As constantes harmônicas de estiramento de ligação e angular, como parâmetros dos termos diedrais próprio e impróprio, foram retirados de CHARMM36. Parâmetros σ e ϵ do termo Lennard-Jones também são extraídos de CHARMM36. A construção das topologias foram auxiliadas pelo *software* VMD¹¹³.

Geometria de equilíbrio foi obtida por cálculo de estrutura eletrônica em nível B3LYP/def2-TZVPP. Os valores das cargas puntiformes foram obtidos por duas formas diferentes: via protocolo CHELPG¹¹⁴ (do inglês, *Charge Electrostatic Potential Grid*) em nível MP2/TZVPP e também por meio do modelo COSMO¹¹⁵ (*Conductor-like Screening Model*) em nível B3LYP/TZVPP. Todos os cálculos de estrutura eletrônica foram realizados com ORCA v.3.0.118¹¹⁶.

A distribuição de carga CHELPG em nível MP2/TZVPP no vácuo gera um momento de dipolo de aproximadamente 1,30 D. Por outro lado, B3LYP/TZVPP no COSMO (mimetizando o *bulk* aquoso) produz um momento de dipolo de 3,32 D. Sabendo que o ambiente afeta a distribuição eletrônica, é hipotizado que estas duas distribuições de cargas fornecem um limite inferior e superior para a repolarização dependente do meio do AM. Assim, o dipolo correspondente ao cálculo em nível MP2/TZVPP seria o mais adequado para representar a distribuição de carga do AM em ambiente mais hidrofóbico

(região das caudas dos fosfolipídios) enquanto que o dipolo correspondente ao cálculo em nível B3LYP/TZVPP a um ambiente mais hidrofílico. A figura 15 mostra a estrutura do AM com alguns valores de carga, ilustrando as diferenças oriundas de cada modelo, bem como a orientação e magnitude do dipolo da molécula.

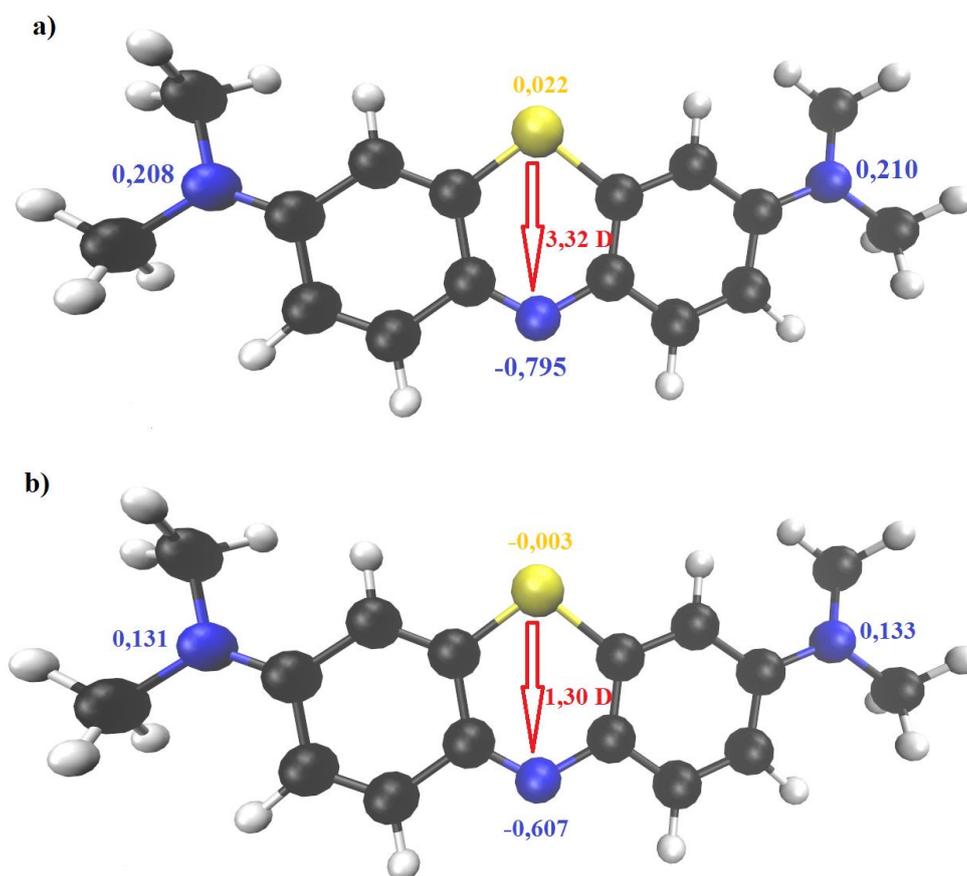


Figura 15. Representação em *ball-stick* do azul de metileno. Cargas parciais destacadas nos átomos de nitrogênio (azul) e enxofre (amarelo). Magnitude e orientação do momento dipolar da molécula em vermelho para as distribuições **a)** B3LYP/TZVPP **b)** MP2/TZVPP.

4.1.3 Detalhes das Dinâmicas Moleculares

Todos os sistemas foram simulados usando o pacote NAMD 2.8¹¹⁷. Foram utilizados dois ensembles distintos durante as dinâmicas moleculares: NPT e NVT. Inicialmente, as monocamadas foram sujeitas ao ensemble NPT atribuindo o valor de 32.3 mN.m⁻¹ para a tensão superficial, correspondendo a uma pressão de superfície de 20 mN.m⁻¹, já que a tensão superficial do modelo de água TIP3P é reportado¹¹⁸ como sendo

52.3 mN.m⁻¹. As monocamadas foram deixadas equilibrando neste ensemble, até obtenção de uma área média por lipídio convergida. Posteriormente, trocou-se o ensemble para o NVT, de tal forma que as monocamadas ocupassem as áreas médias convergidas.

Foi utilizado passos de integração de 2 fs em conjunto de um raio de corte esférico de 10Å para interações de Lennard-Jones (incluindo função de interpolação cúbica iniciada em 8Å). Para o tratamento das interações eletrostáticas de longo alcance foi usado o método de *particle-mesh Ewald* (PME). A temperatura de todas as simulações foi configurada como sendo de 293,15K e seu controle foi alcançado por termostato de Langevin com taxa de relaxamento de 1 ps⁻¹, enquanto que o controle de pressão através do barostato de Nosé-Hoover¹¹⁹.

As tabelas 1 e 2 resumem o tempo total de cada simulação, em ambos os ensembles. Para as análises foram retirados os últimos 40ns de dinâmica do ensemble NVT. Em $\pi = 20$ mN.m⁻¹, o AM não foi capaz de adsorver na monocamada de DOPC-UA (vide sessão de resultados). Assim, foram feitas novas simulações deste sistema fixando a área média por lipídio em 88 Å²/lipídio para que fosse possível ocorrer a penetração do corante e, portanto, analisar seu comportamento nesta monocamada. A tabela 3 exhibe o tempo simulado para este caso.

No decorrer do texto, resultados referentes ao cálculo em nível B3LYP/TZVPP e MP2/TZVPP serão representados pelo sobrescrito AM^B e AM^M, respectivamente.

Tabela 1. Tempo simulado em cada ensemble para as monocamadas puras na ausência do azul de metileno ($\pi = 20$ mN.m⁻¹).

Sistema	Tempo (ns)	
	Ensemble NP γ T	Ensemble NVT
DOPC-AA	50	60
DOPC-OOH	50	60
DOPC-OOH2	50	60
CLP-AA	50	60
CLP-OOH	60	60
CLP-OOH2	60	60

Tabela 2. Tempo simulado em cada ensemble para as monocamadas puras na presença do azul de metileno ($\pi = 20 \text{ mN.m}^{-1}$).

Sistema + Azul de Metileno	Tempo (ns)	
	Ensemble NP γ T	Ensemble NVT
DOPC-UA ^B	30	80
DOPC-OOH ^B	30	80
DOPC-UA ^M	30	80
DOPC-OOH ^M	30	80
CLP-UA ^B	30	80
CLP-OOH ^B	30	70
CLP-UA ^M	30	80
CLP-OOH ^M	30	70

Tabela 3. Tempo simulado apenas no ensemble NVT para monocamada pura de DOPC-UA em área por lipídio pré-determinada e ajustada em $88 \text{ \AA}^2/\text{lipídio}$.

Sistema + Azul de Metileno	Tempo (ns) – Ensemble NVT
DOPC-UA ^B	80
DOPC-UA ^M	80

4.2 Análises

O conjunto de resultados avaliado pelas dinâmicas moleculares consiste na determinação de área média por lipídio, comparação de parâmetros de ordem das caudas carbônicas após efeito da hidroxidação, funções de distribuição de densidade e orientacional, determinação do perfil de potencial eletrostático médio dos sistemas e obtenção de funções de distribuição radial visando avaliar mudanças de hidratação nas monocamadas.

Na presença de azul de metileno, também efetuando as análises acima, obteve-se informações a respeito de sua localização e comportamento em monocamada. Por meio de métodos de amostragem de energia livre, como o força média adaptativa e integração

termodinâmica, foram estimadas diferenças associadas com a translocação do AM do *bulk* aquoso para regiões específicas das monocamadas de DOPC e DOPC-OOH.

O conjunto de análises foi realizado pelos softwares VMD¹¹³ e LOOS v.2.2.5¹²⁰, com exceção das análises de distribuição orientacional que foram efetuadas por meio de um *script* em *python* desenvolvido no laboratório.

4.2.1 Área Média por Lipídio

Posteriormente a obtenção das trajetórias de dinâmica molecular, a primeira análise consiste na determinação da área média por lipídio de cada monocamada simulada. Este resultado é indicativo da qualidade dos campos de forças utilizados na descrição dos constituintes presentes na simulação. Assim, torna-se necessário sua obtenção e comparação com valores obtidos experimentalmente, indicando o grau de confiabilidade das simulações e também da extensão do uso desses parâmetros em uma interpretação segura do conjunto de resultados restantes.

Os dados foram obtidos pelo LOOS v.2.2.5 que faz uso das dimensões da caixa de simulação no plano x-y, que por sua vez é um reflexo da extensão da disposição lipídica neste plano. Assim, como cada folheto do sistema compreende 64 moléculas fosfolipídicas, os valores de área por lipídio são obtidos pelo quociente entre a área obtida das dimensões x-y pelo número de lipídios no folheto, conforme equação 20:

$$A = \frac{x.y}{\text{Número de Lipídios}} = \frac{x.y}{64} \quad (20)$$

4.2.2 Parâmetros de Ordem da Cadeia Lipídica

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de cadeias lipídicas deuteradas fornece informações acerca da organização molecular e do empacotamento das cadeias lipídicas¹²¹. Dessa forma, os dados experimentais obtidos por essa técnica poderiam ser comparados análogos teóricos, chamado parâmetro de ordem da cadeia lipídica (S_{CD}).

Os parâmetros de ordem (S_{CD}) foram computados via equação 21 pelo programa LOOS v.2.2.5, onde θ é o ângulo formado entre o vetor de uma ligação carbono-

hidrogênio com a normal ao plano da monocamada, enquanto que os colchetes denotam tanto uma média temporal no ensemble escolhido. Os valores possíveis de serem obtidos situam-se no intervalo de [-0.5, 1]. S_{CD} tendendo à 1 indica uma orientação da cauda perfeitamente perpendicular ao plano da monocamada. Para S_{CD} tendendo à 0, uma completa aleatoriedade enquanto um valor limite de -0.5 indica que as caudas estão orientadas paralelamente a esse plano.

$$S_{CD} = \frac{1}{2}(3 \langle \cos^2(\theta) \rangle - 1) \quad (21)$$

4.2.3 Função de Distribuição de Densidade

Com intuito de avaliar a distribuição espacial dos constituintes dos sistemas hidroperoxidados e também do corante azul de metileno, a função de distribuição de densidade (em z) é uma das ferramentas que pode ser utilizada. O perfil é obtido a partir da média temporal das massas atômicas de determinados átomos ou grupo de átomos em relação ao eixo z (sendo simétrico ao centro do *bulk* aquoso). Os perfis de densidade foram gerados pelo LOOS v.2.2.5 e podem ser comparados aos dados de espalhamento de nêutrons.

4.2.4 Potencial Eletrostático Médio

O perfil de potencial eletrostático médio foi gerado pelo programa LOOS v.2.2.5 como parte do pacote de ferramentas específicas para tratamento de sistemas de membranas. O algoritmo utilizado é baseado no trabalho de Sachs et al¹²² onde é apresentado um formalismo matemático para obtenção dos valores de potencial a partir de uma nova derivação da equação de integral dupla oriunda da equação de Poisson para sistemas com periodicidade tridimensional.

4.2.5 Funções de Distribuição Radial

Funções de distribuição radiais (do inglês *Radial Distribution Function*, ou RDF) descrevem como a probabilidade de um determinado grupo de partículas varia em função

da distância a partir de uma partícula de referência. Em outras palavras, pode ser convertida em uma medida da densidade local de uma determinada partícula (ou sítio atômico) em um distancia r a partir do centro de referência. A análise foi efetuada pelo programa VMD e o algoritmo envolve a determinação da quantidade de partículas dentro da distância r e $r + dr$, como ilustrado pela figura 16.

Em um dado volume V que contenha N partículas, a densidade homogênea média de partículas (ρ) é dado por:

$$\rho = \frac{N}{V} \quad (22)$$

Por outro lado, considerando as diferentes interações moleculares que estruturam os sistemas, a densidade média local ($\rho_L = \frac{n_L}{V}$), onde n_L é o número de partículas locais em um volume entre r^3 e $(r + dr)^3$ a partir da posição da partícula de referência irá diferir de ρ por algum fator, denominado de $g(r)$.

$$\rho_L = \rho g(r) = \frac{N}{V} g(r) \quad (23)$$

A equação acima pode ser reescrita da seguinte forma:

$$n_L = N g(r) \quad (24)$$

E, fazendo-se uso do volume de uma esfera ($4\pi r^3/3$):

$$N = \rho V = \frac{NV}{V} = \frac{4\pi N}{3V} [(r + dr)^3 - r^3] \quad (25)$$

$$n_L = \rho V g(r) = \frac{4\pi N g(r)}{3V} [(r + dr)^3 - r^3] \quad (26)$$

Dessa forma, para computar RDFs em dinâmicas moleculares estipula-se inicialmente um raio de corte esférico (r) e sua variação (dr). Posteriormente, o algoritmo calcula todas as distâncias entre as partículas de interesse e a partícula de referência, construindo um histograma baseado nos valores de cada *bin* entre dr até r . Assim, é obtido como dado tanto o número médio de partículas locais quanto o $g(r)$ em cada ponto local, oriundo do quociente entre n_L por N .

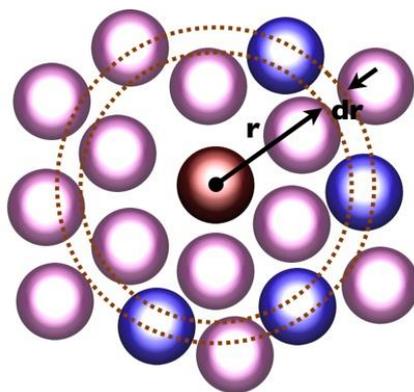


Figura 16. Ilustração do esquema de obtenção das funções de distribuição radial, a partir da determinação da quantidade de partículas dentro da distância r e $r + dr$. Retirado de [123].

4.2.6 Função de Distribuição Orientacional

Similarmente à função de distribuição radial, uma função de distribuição orientacional descreve a probabilidade de um determinado grupo de partículas orientar-se em função de um eixo referencial.

No caso, uma função de distribuição orientacional entre o vetor momento de dipolo da molécula de AM em relação ao eixo z (normal às monocamadas) foi construída via um *script* em *python* que acumula o ângulo ω na forma de um histograma (figura 17). O momento de dipolo é um vetor que parte do átomo de enxofre ao átomo de nitrogênio do anel central.

Fazendo-se uso do mesmo *script*, também foi avaliada a orientação, em relação à normal, do vetor entre o átomo de fósforo do grupo fosfato ao átomo de nitrogênio das colinas das monocamadas zwitteriônicas. Por fim, também foi investigado a orientação do grupo hidroperóxido em todas as monocamadas.

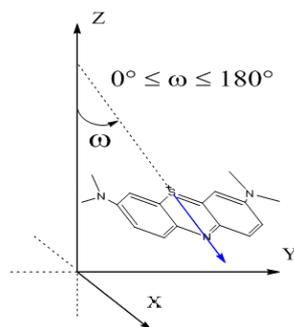


Figura 17. Orientação do momento de dipolo do azul de metileno em relação ao eixo z. O ângulo ω assume valores no intervalo de 0 a 180 graus. Retirado de [124].

4.2.7 Perfis de Energia Livre

Paralelamente às simulações *unbiased* do corante AM nas monocamadas, foram realizadas simulações para amostragem de energia livre.

A partir da conjunção das técnicas de Força Média Adaptativa (do inglês, *Adaptive Biasing Force* ou *ABF*) e Integração Termodinâmica (do inglês, *Thermodynamic Integration* ou *TI*) foi possível determinar diferenças de energias livres associada à transferência do AM do *bulk* para regiões específicas de monocamadas zwitteriônicas. O perfil de energia livre foi dissecado em componentes eletrostático (via *TI*) e cavitação-dispersão (via *ABF*) segundo procedimento descrito por Siani¹²⁴.

4.2.7.1 Força Média Adaptativa

O método *ABF*^{125,126} é baseado na computação da força média sentida por uma partícula ao longo de um vetor multidimensional (coordenada de reação) ζ . A força média amostrada *on-the-fly* será cancelada por uma força igual e oposta, possibilitando que a partícula explore de forma uniforme todo o caminho dessa coordenada, independente das barreiras encontradas.

No caso específico do AM, a coordenada de reação é unidimensional e foi definida como a distância entre o centro de massa do AM *descarregado* (denotado por $AM^{(0)}$) e o centro de massa do *bulk* aquoso, na direção do eixo z.

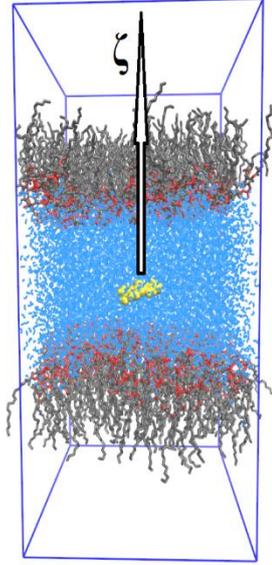


Figura 18. Coordenada de reação unidimensional (ζ) para translocação do $AM^{(0)}$ (em rosa) do centro do bulk aquoso ($\zeta = Z = 0$) até o interior da monocamada lipídica. Moléculas de água em azul claro e o fosfolípido representado em vermelho (átomos da cabeça polar) e cinza (cadeia carbônica).

A equação 27 mostra a relação entre a energia livre na coordenada de reação, $A(\zeta)$, com as forças médias exercidas pelos constituintes do sistema:

$$\frac{dA(\zeta)}{d\zeta} = -\langle F_{\zeta} \rangle_{\zeta} \quad (27)$$

Assim, neste método, F_{ζ} é acumulado em pequenas janelas de tamanho finito, $d\zeta$, fornecendo, portanto, uma estimativa do gradiente de energia livre ao longo da coordenada.

A força adaptativa (F_{ABF}) aplicada ao longo da coordenada de reação é calculada como:

$$F_{ABF} = -\langle F_{\zeta} \rangle_{\zeta}^c \nabla_x \zeta \quad (28)$$

Onde $\langle F_{\zeta} \rangle_{\zeta}^c \nabla_x \zeta$ denota a estimativa atual do gradiente de energia livre em determinado ponto ao longo do subespaço da coordenada ζ , já que a força exercida, F_{ζ} , vai sendo acumulada a cada passo de dinâmica molecular.

Um critério utilizado na determinação da convergência do método ABF baseia-se no acompanhamento da evolução do perfil de energia livre que vai sendo obtido.

Diferenças máximas de até 0.1 kcal.mol⁻¹ nos valores de energia livre já são suficientes para considerar uma amostragem suficiente da coordenada de reação.

A coordenada de reação foi dividida em 5 janelas de simulação consecutivas, cada uma com 9Å e intervalos d ζ de 0,1Å, totalizando uma extensão de 45Å. Foi acumulado 120ns e 80ns para convergência da energia livre do AM⁽⁰⁾ em cada janela das monocamadas de DOPC e DOPC-OOH, respectivamente.

Na aplicação desse método, o AM_{LJ} continuou sendo descrito pelos mesmos conjuntos de parâmetros do campo de força intramolecular e de interação intermolecular do tipo Lennard-Jones, porém com cargas atômicas nulas em todos os seus átomos.

4.2.7.2 Integração Termodinâmica

A integração termodinâmica¹²⁷ é um dos métodos existentes para obtenção de diferenças de energias livres em modelagem *alquímica* (p.e., simulação da conversão de uma molécula em outra).

No presente trabalho, TI é utilizado para mutar reversivelmente a versão sem cargas do AM em sua versão com cargas parciais consistentes com sua carga +1 (AM⁽¹⁺⁾). Nesse método, a conexão entre os dois estados é alcançada por meio de uma série de estados intermediários, fazendo-se uso de uma função paramétrica (linear) de acoplamento. A transformação entre estes estados pode ser equacionada através de uma Hamiltoniana híbrido que conecta os estados inicial e final via o parâmetro λ :

$$H(\mathbf{r}, \mathbf{p}; \lambda) = H_0(\mathbf{r}, \mathbf{p}) + \lambda H_B(\mathbf{r}, \mathbf{p}) + (1 - \lambda)H_A(\mathbf{r}, \mathbf{p}) \quad (29)$$

Onde: H_A é a Hamiltoniana do estado inicial, descrevendo a interação do sistema mutante AM⁽⁰⁾ com as demais espécies da monocamada; H_B caracteriza a Hamiltoniana do estado final contendo AM⁽¹⁺⁾ interagindo com espécies da monocamada; H₀ é a parte da Hamiltoniana que descreve as interações de todos os átomos que não sofrem a mutação, no caso, o sistema inteiro exceto o azul de metileno.

Dentro da abordagem TI, a diferença de energia livre (ΔA) entre os estados A e B é dada exatamente por:

$$\Delta A = \int_0^1 \left\langle \frac{\partial H(\mathbf{r}, \mathbf{p}; \lambda)}{\partial \lambda} \right\rangle_\lambda d\lambda = \int_0^1 \langle V \rangle_\lambda d\lambda \quad (30)$$

No caso do processo de carga estudado, $\langle V \rangle_\lambda$ denota o potencial eletrostático médio acumulado nas posições dos centros atômicos de AM.

Na prática, a integral é calculada usando uma regra de quadratura que usa n valores de λ entre $\lambda=0$ e $\lambda=1$. Para um processo de carga (um trabalho eletrostático reversível), estima-se que apresente dependência polinomial em λ . No caso do trabalho reversível de Born para uma carga em dielétrico contínuo, o resultado é proporcional à λ^2 .

Hummer e Szabo¹²⁸ propõe expressões (equações 31 à 34) para cálculo do processo de integração lançando mão de, no máximo, apenas um estado intermediário, localizado em $\lambda=0,5$.

$$\Delta A(0 \rightarrow 1) \approx \frac{1}{2} (\langle V \rangle_0 + \langle V \rangle_1) \quad (31)$$

$$\Delta A(0 \rightarrow 1) \approx \frac{1}{2} (\langle V \rangle_0 + \langle V \rangle_1) - \frac{\beta}{12} (\langle \sigma^2 \rangle_0 - \langle \sigma^2 \rangle_1) \quad (32)$$

$$\Delta A(0 \rightarrow 1) \approx \frac{1}{6} (\langle V \rangle_0 + \langle V \rangle_1) + \frac{2}{3} \langle V \rangle_{\frac{1}{2}} \quad (33)$$

$$\Delta A(0 \rightarrow 1) \approx \frac{7}{30} (\langle V \rangle_0 + \langle V \rangle_1) + \frac{8}{15} \langle V \rangle_{\frac{1}{2}} - \frac{\beta}{60} (\langle \sigma^2 \rangle_0 - \langle \sigma^2 \rangle_1) \quad (34)$$

Onde $\beta = 1/k_B T$, sendo k_B a constante de Boltzmann e T a temperatura das simulações (293,15K). As equações acima são aproximações para quadratura de Gauss-Lobatto¹²⁹, que incluem derivadas superiores do integrando. A equação 31 é a forma mais simples de incluir apenas os estados inicial e final, sendo equivalente a um polinômio quadrático em λ e a resposta linear, como obtida pelo trabalho de Born. A equação 32 inclui uso das variâncias (σ^2) nestes pontos extremos, sendo equivalente a um polinômio de quarta ordem. As equações 33 e 34 fazem uso do termo intermediário em $\lambda=0,5$, sendo a primeira equivalente à regra de Simpson e a segunda exata para um polinômio de sexta ordem ao incluir as variâncias.

Na aplicação da técnica de TI, o azul de metileno teve seu centro de massa acoplado ao centro de massa do *bulk* aquoso e dos grupos colina, fosfato, glicerol e das insaturações das caudas para as monocamadas de DOPC e DOPC-OOH e também em relação ao centro de massa do grupo hidroperóxido do lipídio zwitteriônico

hidroperoxidado. Assim, foi obtido diferenças de energias livres devido ao processo de carregar positivamente o corante em cada uma dessas regiões específicas. Depois, unindo esses valores com os dados do cálculo ABF, foi obtida a diferença de energia total nestes pontos, usando o ciclo termodinâmico exibido na seção 4.2.7.3. A figura 19 exemplifica a localização do centro de massa do AM quando acoplado ao grupo fosfato.

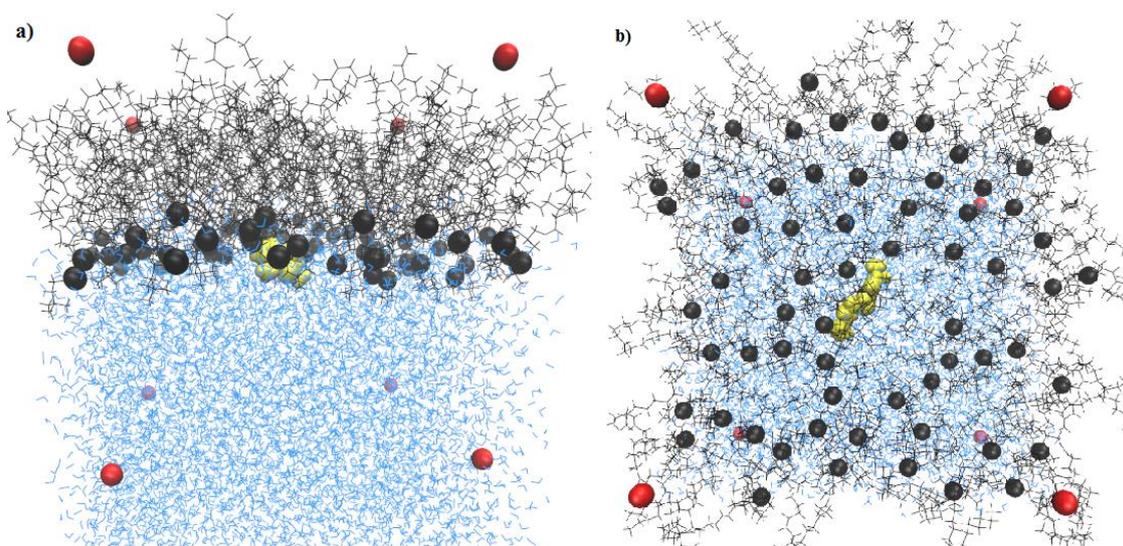


Figura 19. Centro de massa do azul de metileno (em amarelo) acoplado em relação ao centro de massa do grupo fosfato (esferas em preto) para realização da integração termodinâmica. **a)** vista lateral; **b)** vista superior. Em vermelho é representado a gaiola de pseudopartículas (explicado na sessão 4.2.7.2.1).

O cálculo do trabalho eletrostático $AM^{(0)} \rightarrow AM^{(1+)}$ necessita que seja mantida a eletroneutralidade do sistema para sistemas periódicos. Portanto, foi utilizada uma metodologia alternativa que visa correção deste problema, bem como a neutralização de carga do sistema. Essa metodologia é apresentada no item a seguir.

4.2.7.2.1 Processo de Carga (trabalho eletrostático reversível) no Bulk Aquoso: caso exemplo do AM

Para realização do método TI com o centro de massa do AM fixado em relação ao centro de massa da fase aquosa, utilizou-se os mesmos protocolo e abordagem descritos no item anterior, porém não no sistema *slab* padrão de monocamadas, mas sim em uma caixa de simulação cúbica composta apenas por moléculas de água, sendo o AM centralizado nesta.

Foram montadas três caixas cúbicas de simulação, cada uma com arestas de 50, 60 e 70Å preenchidas por 4160, 7188, 11415 moléculas de água, respectivamente. Durante o processo $AM^{(0)} \rightarrow AM^{(1+)}$, como a adição de contra-íon se faz necessária, utilizou-se uma metodologia¹²⁴ onde o contra-íon com carga formal -1 (no presente trabalho, cloretos) é substituído por oito pseudopartículas, cada uma com carga de -1/8, fixadas nos vértices de um cubo centrado no azul de metileno (figura 20). Assim, garante-se a eletroneutralidade do sistema, bem como uma amostragem dos valores de energia livre não tendenciados pelo contra-íon. Portanto, nos cubos de arestas de 50,60 e 70Å, a disposição dos cloretos nos vértices foi escolhido de tal forma que formassem cubos com dimensões de 40, 50 e 60Å, respectivamente.

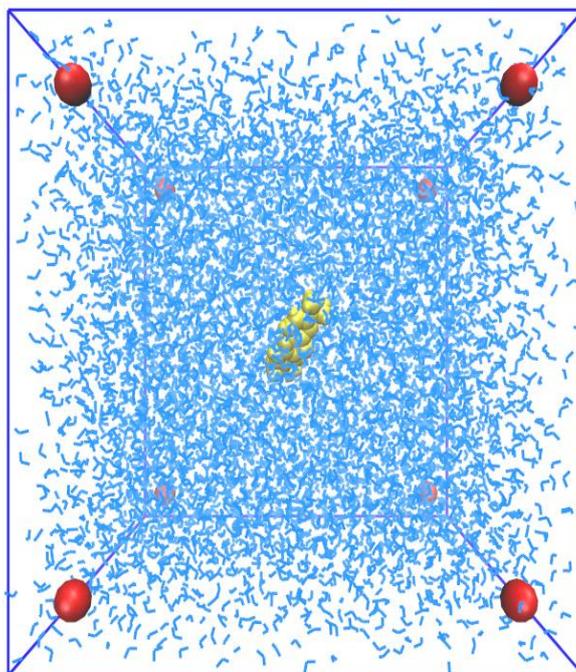


Figura 20. Ilustração esquemática da gaiola de pseudopartículas (em vermelho) em formato cúbico centralizado em relação ao azul de metileno (em amarelo).

4.2.7.3 Ciclo Termodinâmico

Finalmente, a energia livre de transferência total (ΔA_T) do corante a partir do *bulk* em direção às monocamadas é obtida através do ciclo termodinâmico da figura 21.

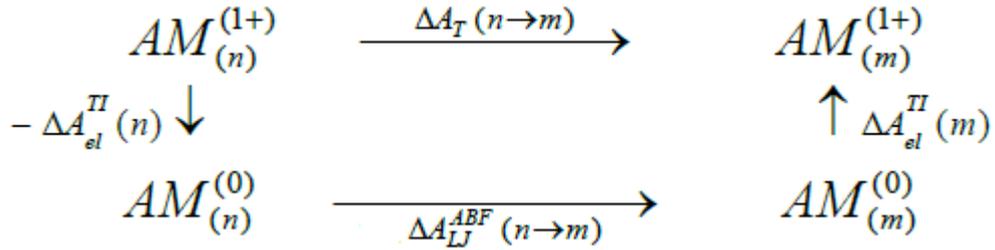


Figura 21. Ciclo termodinâmico para transferência do AM a partir da região n até a região m .

Assim, os valores de ΔA_{el}^{TI} e ΔA_{LJ}^{ABF} são aqueles obtidos pelos métodos TI e ABF, respectivamente. E $\Delta A_T(n \rightarrow m)$ é dado por:

$$\Delta A_T(n \rightarrow m) = -\Delta A_{el}^{TI}(n) + \Delta A_{LJ}^{ABF}(n \rightarrow m) + \Delta A_{el}^{TI}(m) \quad (35)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Efeitos da Hidroperoxidação Lipídica

A primeira etapa de caracterização das monocamadas simuladas, antes e após a hidroperoxidação, consiste na determinação da área média por molécula lipídica. Por meio desta, torna-se possível estabelecer mudanças no empacotamento lipídico dos sistemas, indicando ocorrência de um efeito expansivo ou contrativo. É também, um dos parâmetros que possibilita comparação direta com dados de isothermas experimentais, servindo como meio de validação das simulações. As figuras 22 e 23 exibem o comportamento desse parâmetro durante os 50ns iniciais em ensemble NP γ T, na pressão superficial de 20 mN.m⁻¹, enquanto que a tabela 4 apresenta os resultados extraídos dos 40ns finais.

Tabela 4. Área média por lipídio teórica e experimental (em Å²/lipídio) em $\pi = 20$ mN.m⁻¹. Aumento percentual da área média teórica também é apresentado (%).

Sistema	Área Teórica	Aumento Percentual	Área Experimental ^{52,130}
DOPC	64.8 ± 1.1	-	~ 65
DOPC-OOH	76.2 ± 1.2	17.7	-
DOPC-2OOH	82.5 ± 1.4	27.4	-
CLP	109 ± 0.8	-	~ 110
CLP-OOH	125.7 ± 1.3	15.3	-
CLP-2OOH	135.9 ± 1.4	25.6	-

Observando os valores obtidos para as monocamadas de DOPC e CLP, nota-se valores bem próximos aos experimentais reportado por Schmidt et al.^{52,130}, indicando que as simulações reproduzem adequadamente o empacotamento lipídico. Assim, é possível estender a confiabilidade para os sistemas hidroperoxidados. Analisando os gráficos e a tabela, é possível notar que a hidroperoxidação lipídica proporciona uma expansão superficial das monocamadas, ou seja, a área média por fosfolipídio é aumentada.

Como a cardiolipina apresenta uma cabeça polar de maior tamanho que o DOPC e, além disso, quatro caudas lipídicas, é natural que valores maiores de área por lipídio ocorra. Por outro lado, o aumento percentual de área pode ser considerado equivalente, tanto para a primeira quanto para a segunda hidroxidação das monocamadas zwitteriônicas e aniônicas, mesmo com os derivados de cardiolipina correspondendo a 25% (CLP-OOH) e 50% (CLP-2OOH) de todas as caudas hidroxidadas em relação ao DOPC-OOH e DOPC-2OOH que apresentam 50% e 100% de suas caudas hidroxidadas, respectivamente. Esta magnitude similar pode ser entendida levando-se em conta dois fatores: (i) as caudas são a mesma em todos os lipídios simulados, derivada do ácido oleico e (ii) a cauda de DOPC tem uma área seccional média de 32.4\AA^2 enquanto que a cauda de CLP apresenta um valor médio de 27.3\AA^2 . Então, a magnitude do efeito expansivo resultante, ou seja, a expansão de volume para acomodação dos novos grupos hidroxidados é bastante similar. Pode-se notar ainda, em ambos os casos, que da primeira para a segunda hidroxidação ocorreu um aumento percentual de área de aproximadamente 10%. Assim, é possível acreditar que este aumento seja aproximadamente o mesmo para qualquer grupo cabeça que contenha esse tipo de cauda lipídica.

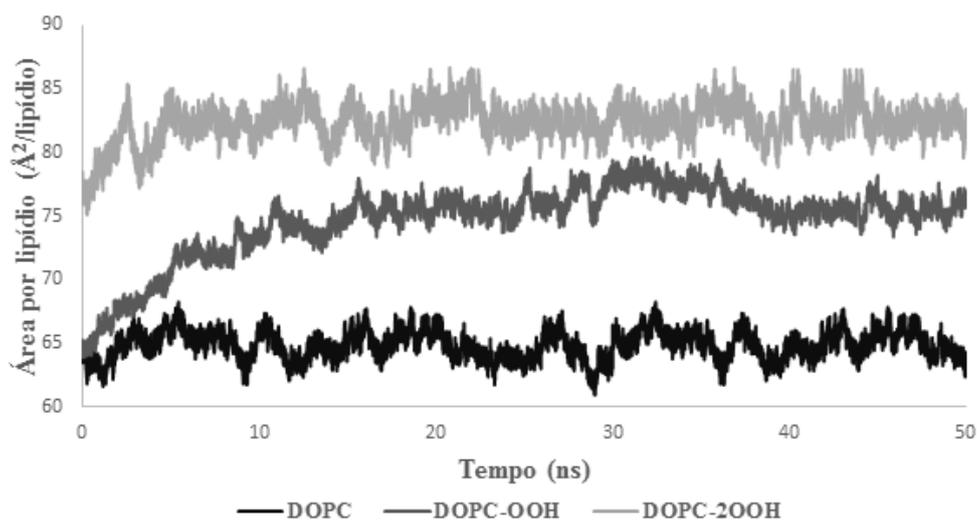


Figura 22. Evolução temporal da área média por lipídio para as monocamadas de DOPC, DOPC-OOH e DOPC-2OOH.

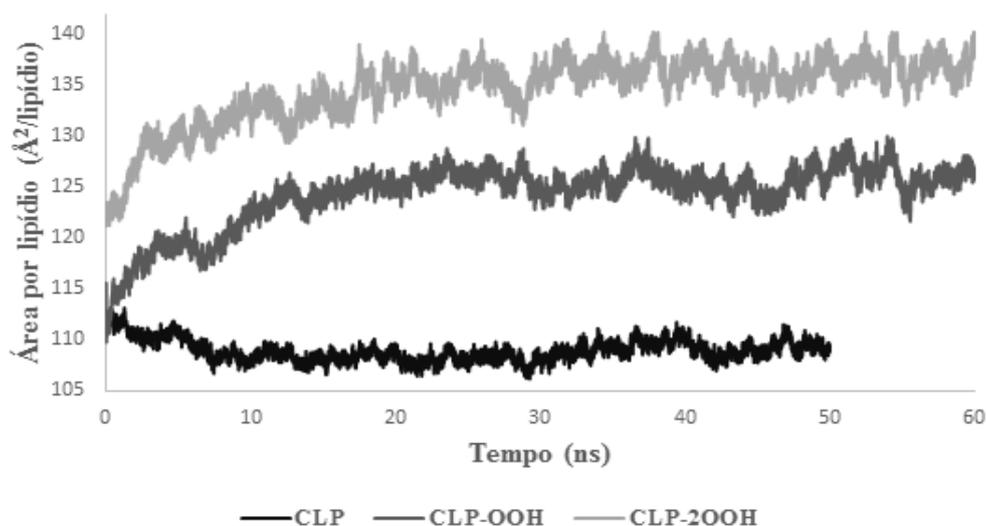


Figura 23. Evolução temporal da área média por lipídio para as monocamadas de CLP, CLP-OOH e CLP-2OOH.

No trabalho de Schmidt et al.⁵², monocamadas de DOPC e CLP foram irradiadas na presença do fotossensibilizador azul de metileno, possibilitando que ocorresse o processo de foto-oxidação dos fosfolípidos. Foi também reportado expansão de área para a monocamada de cardiolipina. Por outro lado, observaram condensação de áreas para a monocamada de DOPC. Foi sugerido que o processo de oxidação lipídica continuava ocorrendo mesmo após a hidroperoxidação, resultando em diversos subprodutos lipídicos oxidados de cadeias curtas que migravam da interface para a fase aquosa, resultando no condensamento de áreas. Um dos estudos que dão suporte a esta sugestão foi realizado por Khabiri et al.¹³¹, onde por dinâmica molecular simularam monocamadas de um derivado oxidado de DOPC clivado na insaturação, formando um derivado lipídico de aldeído e nonanal (figura 24, produto 1). Inicialmente, relataram expansão superficial de áreas. Com o decorrer da dinâmica foi sendo observado que as moléculas de nonanal deixavam a interface, desencadeando, conseqüentemente, o condensamento de área. Outros trabalhos na literatura^{132,133} também observaram esse mesmo comportamento para outros tipos de lipídios de fosfatidilcolinas oxidados. De fato, foi ainda proposto por Jurkiewicz et al.¹³⁴, uma série de produtos oxidados para o fosfolípido DOPC, como ilustrado na figura 24 abaixo, mostrando a complexa quantidade de subprodutos possíveis e a dificuldade associada ao controle do processo de oxidação fosfolipídica.

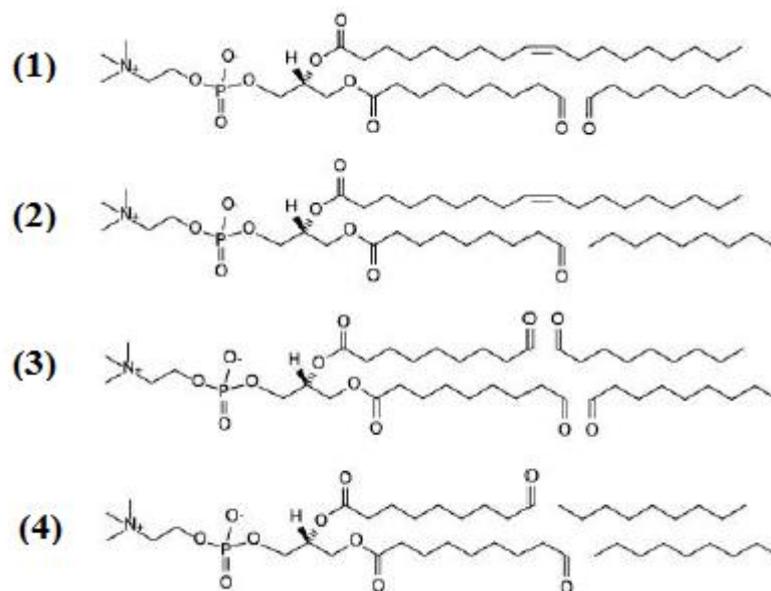


Figura 24. Possíveis produtos de oxidação do fosfolípido DOPC proposto por Jurkiewicz et al. *Adaptado de [134].*

Lipídios hidroperoxidados são mais bem estudados em miméticos de bicamadas. Em dois estudos^{91,135} foram reportados valores de expansão superficial devido a hidroperoxidação em bicamadas de DOPC de 19.1% e 19.5%. Um ponto em comum nesses estudos foi que não observaram qualquer tipo de desestruturação das bicamadas. Nossas monocamadas, dentro do tempo simulado, também não foram desestruturadas. Por outro lado, a literatura reporta para espécies de lipídios oxidados mudanças estruturais nos sistemas, incluindo formação de poros em bicamadas¹³⁴ e uma estruturação semelhante a micelas que migram à subfase aquosa¹³¹. Assim, acredita-se que derivados hidroperoxidados mantem a integridade de membranas, enquanto que derivados oxidados propiciam uma maior mudança estrutural.

A literatura para cardiolipinas é mais escassa, porém, dois trabalhos^{136,137} estudaram peroxidação de membranas mitocondriais e mostraram que as cardiolipinas também são sujeitas a formação de hidroperóxidos e outros produtos oxidados. É provável que os mesmos eventos e suas consequências também ocorram neste tipo fosfolipídico.

Com a inserção do grupo hidroperóxido na cadeia carbônica é intuitivo esperar alguma mudança de comportamento das caudas lipídicas, como também buscar entender

o comportamento desse novo grupo. Parâmetros de ordem para os carbonos das caudas dos fosfolipídios simulados foram obtidos e são apresentados nas figuras 25 e 26.

É possível notar comportamentos semelhantes para as monocamadas zwitteriônicas e iônicas. Com a hidroxidação, os carbonos de início de cadeia adquirem menores valores para o parâmetro de ordem, ou seja, tendem a adquirir uma orientação mais aleatória em relação aos carbonos das monocamadas não-hidroxidadas. Para os carbonos do final da cadeia, o comportamento observado é o mesmo, porém, em menor magnitude, principalmente para as monocamadas zwitteriônicas.

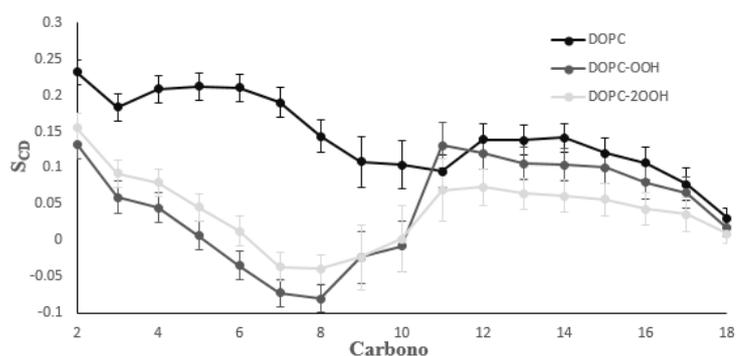


Figura 25. Parâmetros de ordem para a cadeia carbônica do DOPC, DOPC-OOH e DOPC-2OOH.

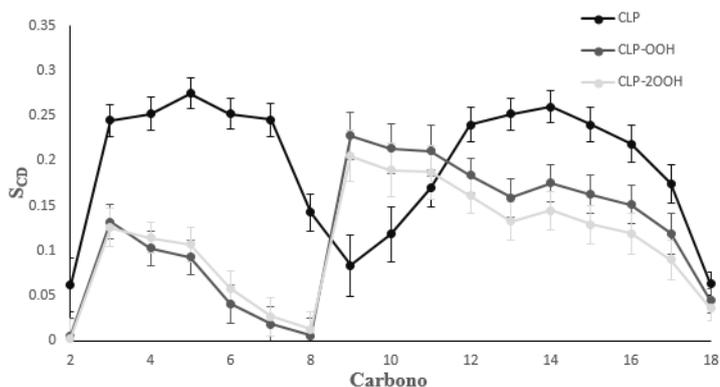


Figura 26. Parâmetros de ordem para a cadeia carbônica do CLP, CLP-OOH e CLP-2OOH.

Segundo o trabalho de Liu et al.¹³⁸, onde realizaram simulações computacionais de membranas de DOPC variando parâmetros LJ das caudas lipídicas a partir do campo de força CHARMM27, concluíram que os parâmetros de ordem dos carbonos de início de cadeia estão diretamente relacionados com a área por lipídio, enquanto que os de final de cadeia, com a sua extensão. Assim, devido à inserção do grupo hidroperóxido, os

parâmetros de ordem dos primeiros carbonos são diminuídos, proporcionando uma orientação menos perpendicular da cadeia e, conseqüentemente, uma maior área seccional é ocupada por esta mesma cadeia.

A mudança estrutural na disposição da cauda lipídica está relacionada com a localização do grupo hidroperóxido nas monocamadas, como exibido nos perfis de densidade da figura 27. É possível perceber que a densidade do grupo hidroperóxido sobrepõe-se parcialmente às densidades dos constituintes da cabeça polar e do modelo de água TIP3P. A curva de densidade das insaturações das monocamadas não-hidroperoxidadas, que inclui o mesmo carbono onde o grupo hidroperóxido se liga, apresenta nenhuma ou pouca sobreposição com os mesmos constituintes da cabeça e a água. Assim, é possível afirmar que o grupo hidroperóxido tende a se localizar mais próximo da fase aquosa. De fato, esta observação foi recentemente relatada em diversos estudos^{122,139,140} e explica a origem dos efeitos discutidos anteriormente, ou seja, devido ao grupo hidroperóxido experimentar regiões interfacial, a cadeia carbônica acompanha seu movimento, necessitando mais espaço nessa região para acomodação desse novo conjunto de átomos. A figura 28 esquematiza esta situação.

É interessante notar também o alargamento da distribuição de densidade do grupo hidroperóxido em todas as monocamadas hidroperoxidadas, permitindo inferir que eles exploram uma maior região da interface. Simulação¹³⁹ de bicamada fosfolipídica hidroperoxidada também relata esta observação, possibilitando concluir que este fenômeno é encontrado em qualquer mimético de membranas. Tal efeito provém de mudanças nas propriedades elásticas (compressibilidade e deformação) dos miméticos de membranas com a hidroperoxidação.

Aliado a determinação da localização do grupo hidroperóxido, foi definido um vetor entre o oxigênio do grupo hidroperóxido ligado ao carbono e o hidrogênio terminal em relação à normal as monocamadas, com intuito de verificar possíveis orientações preferenciais. A figura 29 apresenta as curvas de distribuição angular para este vetor nas monocamadas de DOPC-OOH, DOPC-2OOH, CLP-OOH e CLP-2OOH. As curvas obtidas exibem comportamento semelhante: todas unimodais com máximos entre 40 e 50 graus para as monocamadas zwitteriônicas e entre 60 e 70 graus para as monocamadas iônicas. A segunda hidroperoxidação provocou um leve deslocamento no máximo das distribuições, sugerindo que suas caudas se comportam praticamente de forma independente em relação ao grau de hidroperoxidação dos lipídios.

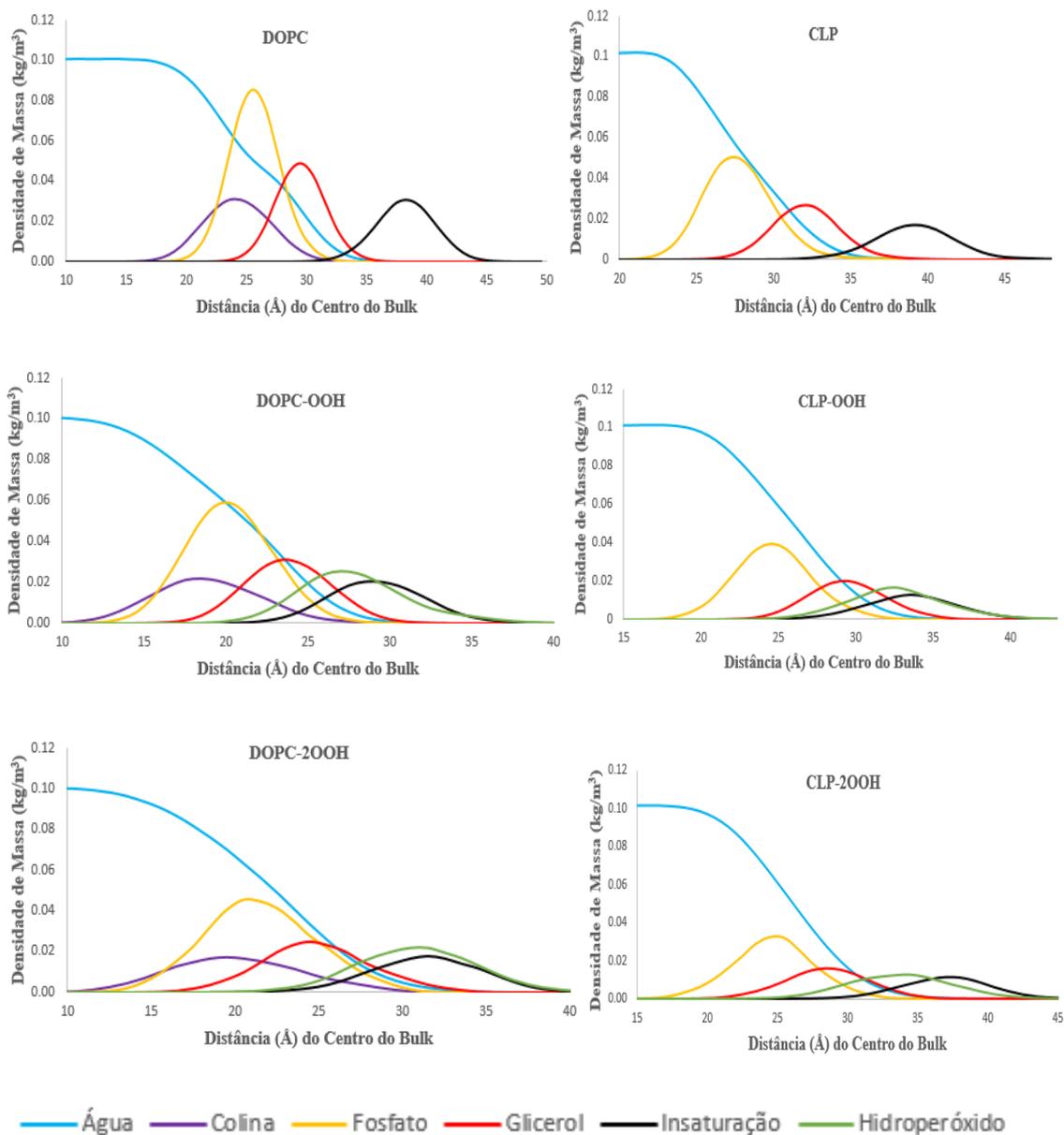


Figura 27. Perfil de densidade de massas para todas as monocamadas simuladas. A curva referente às moléculas de águas teve seus valores divididos por 6, para melhor visualização conjunta das distribuições.

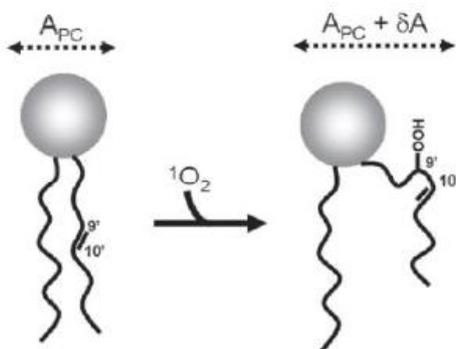


Figura 28. Ilustração esquemática da diferença estrutural lipídica devido à hidroperoxidação. Retirado e adaptado de [141].

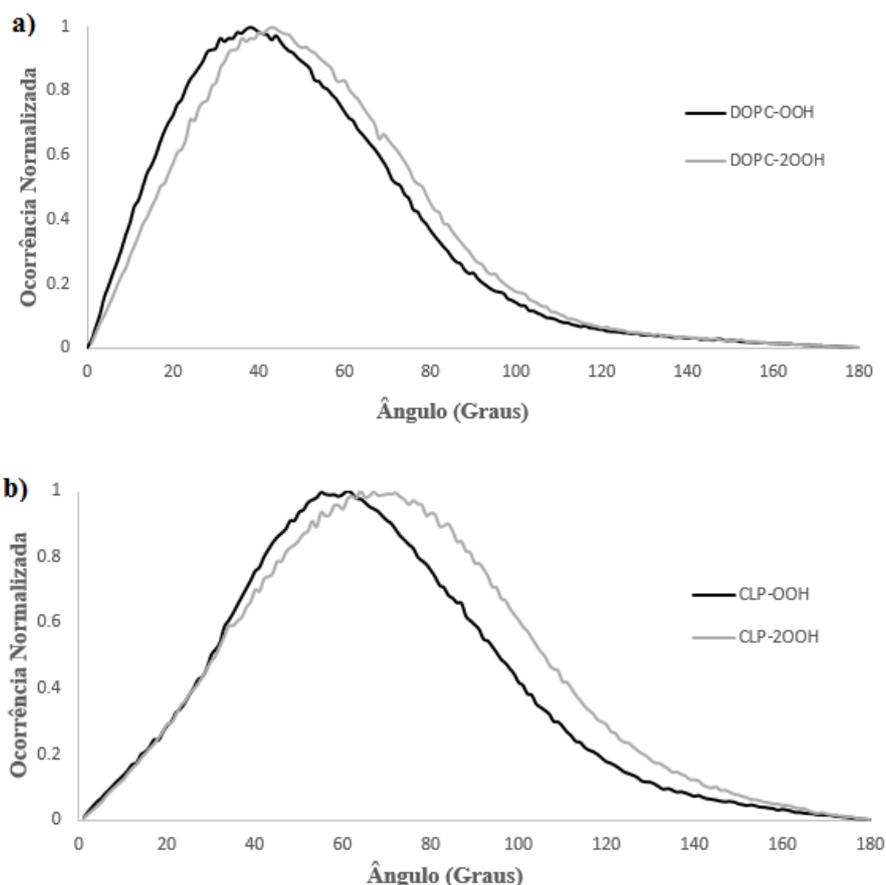


Figura 29. Distribuição angular para o grupo hidroperóxido em relação à normal para monocamadas de **a)** DOPC-OOH e DOPC-2OOH **b)** CLP-OOH e CLP-2OOH.

Com a finalidade de avaliar o comportamento do grupo hidroperóxido em relação às moléculas de água com o aumento do grau de hidroxidação, foram obtidas funções de distribuições radiais exibidas na figura 30. As figuras 30a e 30b apresenta os perfis obtidos entre o carbono 9 (ligado ao grupo $-OOH$) de cada molécula fosfolipídica e as moléculas de água para as monocamadas zwitteriônicas e iônicas, respectivamente. É possível notar que as monocamadas hidroxidadas adquirem algum grau de hidratação comparativamente as não hidroxidadas. Os perfis de densidade da figura 27 referentes às insaturações e presença de moléculas de água já também sugeriam esta observação.

As figuras 30c e 30d apresentam funções de distribuição radial entre o grupo hidroperóxido e as moléculas de água. Já as figuras 30e e 30f exibem as curvas do número de coordenação médio das moléculas de água em torno destes grupos. Este conjunto de resultados permitem avaliar de forma mais direta a coordenação de água em torno dos

grupos hidroperóxidos. É possível notar uma estruturação consistente com uma interação direta entre uma molécula de água e o grupo hidroperóxido com a presença adicional de outras moléculas de água para todas as monocamadas simuladas. De fato, o número de coordenação não apresenta mudanças consideráveis devido à presença de um grupo hidroperóxido adicional (DOPC-2OOH e CLP-2OOH).

De forma geral, como visto anteriormente, as caudas que contém os grupos hidroperóxidos tendem a experimentar uma maior localização interfacial, portanto, é natural que as monocamadas hidroperoxidadas estejam sujeitas a uma maior circunvizinhança de água, premissa corroborada pelos gráficos da figura 30. A segunda hidroperoxidação, por outro lado, não proporcionou uma maior hidratação dos grupos hidroperóxidos em nenhuma das monocamadas estudadas.

Em um trabalho com GUVs de DOPC-OOH e também de POPC-OOH, Weber et al.⁹¹ não observaram mudanças aparentes na permeabilidade de água durante o processo de fotooxidação controlada. No estudo de Booney et al.¹⁴², bicamadas de PLPC foram simuladas com seu análogo hidroperoxidado e também não foi observado grandes mudanças de hidratações. Assim, os nossos resultados apresentados anteriormente corroboram a visão de ausência de mudanças drásticas na permeabilidade de água em sistemas hidroperoxidados.

Por fim, a última análise realizada consiste na obtenção das curvas dos potenciais eletrostáticos médios para todas as monocamadas simuladas, permitindo avaliar de que forma as hidroperoxidações afetam o potencial. As curvas obtidas são apresentadas na figura 31. Da monocamada de DOPC para a DOPC-OOH, houve uma mudança de diferença de potencial de -150 mV, e de -300 mV comparando DOPC com DOPC-2OOH. Para as cardiolipinas, o comportamento foi semelhante. Uma diferença de potencial de -300 mV e de -420 mV ocorreu para as monocamadas CLP-OOH e CLP-2OOH tendo a CLP como referência, respectivamente. Daí, tanto para as monocamadas zwitteriônicas quanto para as iônicas, a diferença de potencial tornou-se mais negativa conforme o aumento do grau de hidroperoxidação.

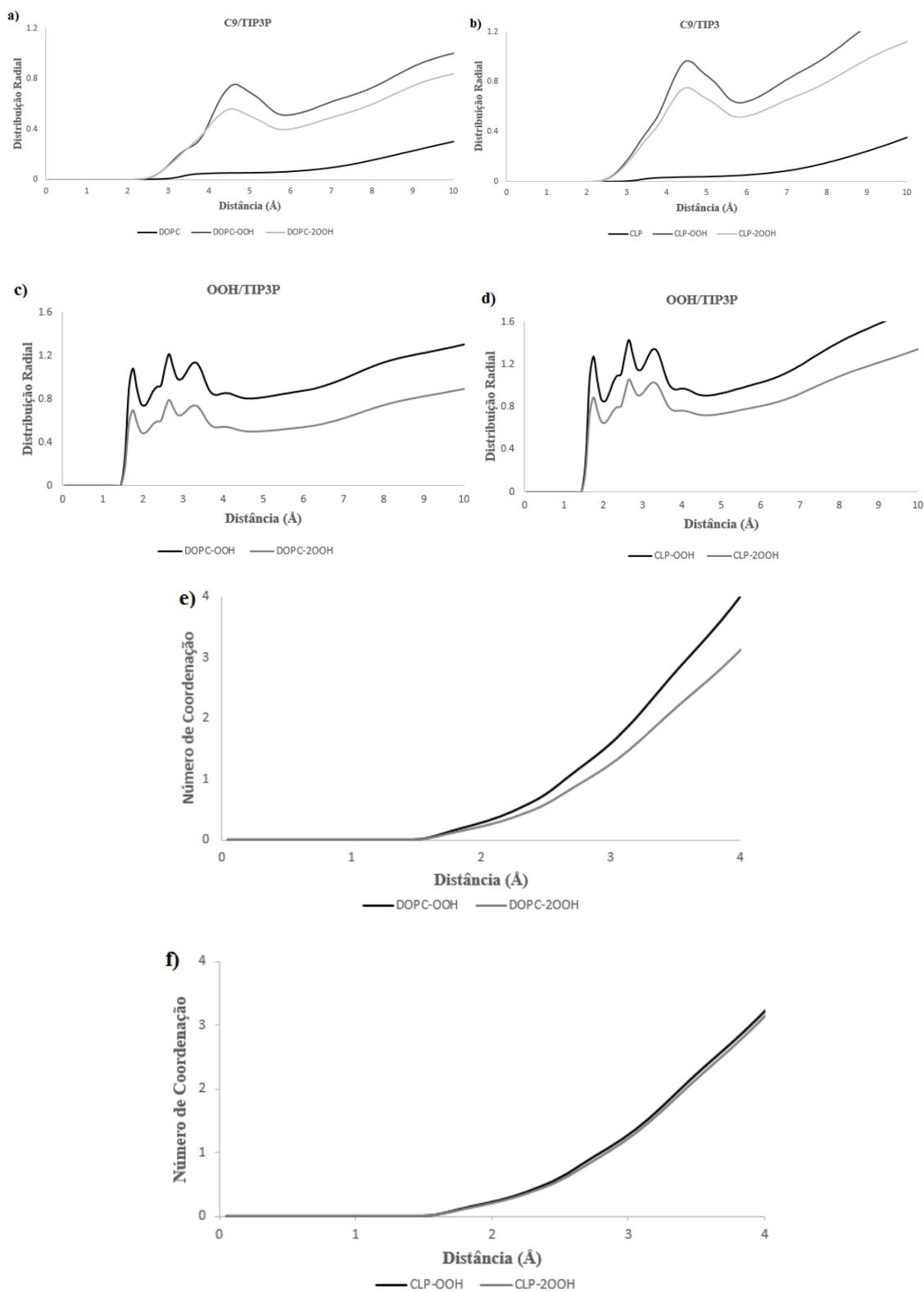


Figura 30. a) e b) Funções de distribuição radial entre o carbono 9 e as moléculas de água TIP3P para as monocamadas zwitteriônicas e iônicas, respectivamente; c) e d) Funções de distribuição radial entre o grupo hidroperóxido e as moléculas de água TIP3P para as monocamadas zwitteriônicas e iônicas, respectivamente. e) e f) Perfis de número de coordenação resultante da integração das curvas c) e d).

Apesar da ausência na literatura de medidas de diferenças de potenciais em sistemas hidroperoxidados, o trabalho de Khandelia e Mouritsen¹⁴³ envolveu simulações computacionais de bicamadas de POPC pura e de bicamadas com 25% de dois produtos oxidados deste lipídio (um derivado funcional de aldeído e outro carboxílico). Observaram que esses produtos também proporcionaram diminuição do potencial eletrostático, principalmente para o POPC oxidado a aldeído.

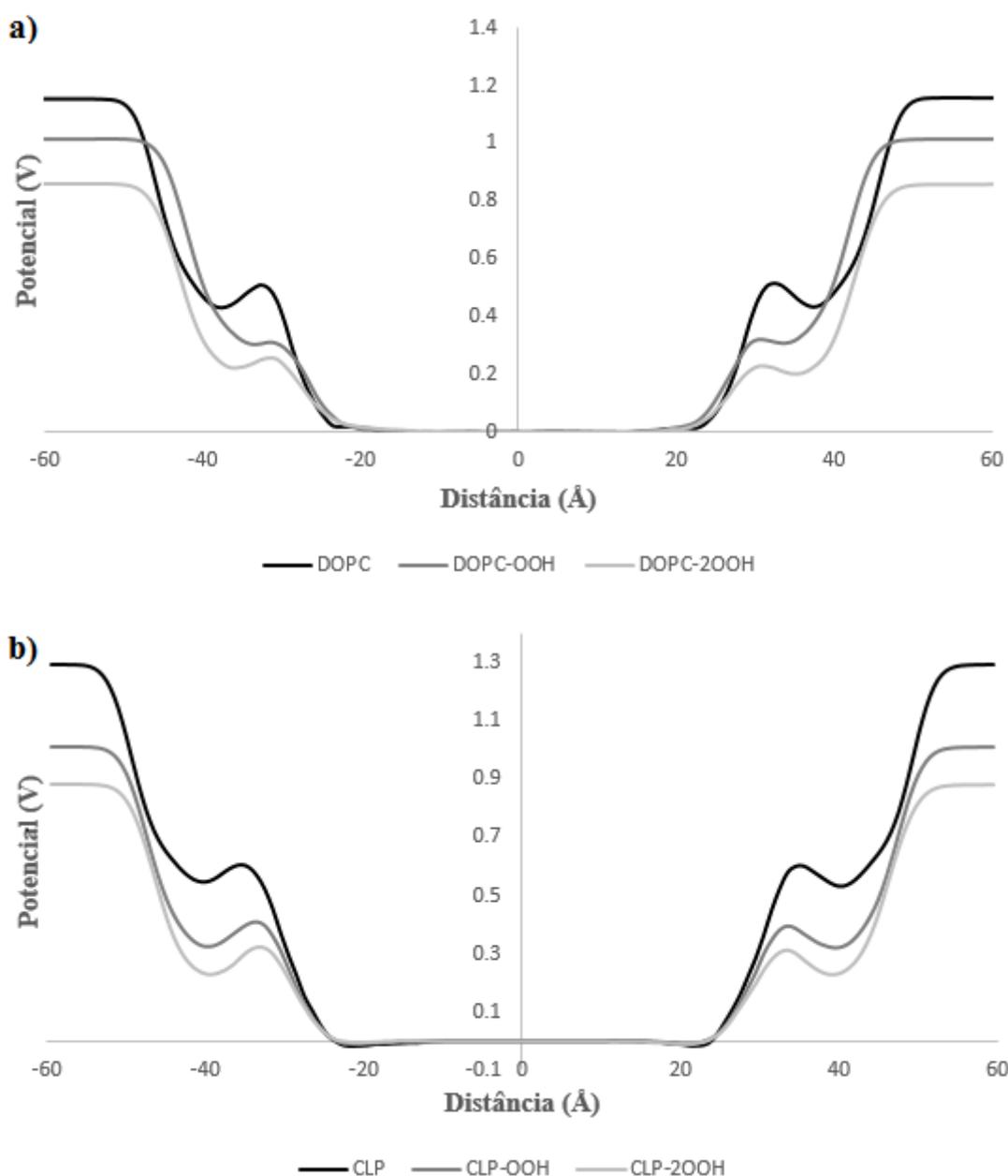


Figura 31. Perfil do potencial eletrostático para as monocamadas **a)** zwitteriônicas e **b)** iônicas.

5.1.1 Conclusões

As simulações realizadas foram as primeiras a mostrar expansão de áreas em monocamadas hidroperoxidadas. Tanto a primeira como a segunda hidroperoxidação proporcionaram um aumento percentual aproximado de 10% na área média por lipídio, resultado que parece independente do grupo cabeça polar lipídico.

O comportamento do grupo hidroperóxido em todas as monocamadas reforçam os relatados para os miméticos de bicamadas. Foi visto que este grupo explora uma ampla região das monocamadas.

Em relação aos efeitos provenientes de um aumento do grau de hidroperoxidação, foi concluído que uma maior hidroperoxidação não proporciona uma vizinhança mais rica de moléculas de água em torno dos grupos hidroperóxidos.

Já o potencial eletrostático foi dependente da quantidade de hidroperóxidos. Foi visto que as diferenças de potencial tornam-se mais negativas (com relação às monocamadas não-oxidadas) com aumento da hidroperoxidação.

5.2 Estudo do Azul de Metileno nas Monocamadas

5.2.1 Dinâmicas Livres

Na presença do azul de metileno, as monocamadas com os fosfolipídios DOPC e CLP foram estudadas em versão *united-atom*. Foi monitorado o comportamento da área média por lipídio destas monocamadas e também das hidroperoxidadas, DOPC-OOH e CLP-OOH. Os resultados obtidos não mostraram nenhuma mudança significativa nas propriedades das monocamadas com a presença do AM.

No trabalho de Schmidt et al.^{52,130}, foi adicionado AM na subfase aquosa das monocamadas de DOPC e CLP em concentração de 0.2 μM durante 20 minutos de adsorção. Nas isotermas experimentais obtidas (em todas as pressões superficiais) foram relatadas expansão superficial devido à adsorção do AM nas monocamadas de CLP e condensação de áreas nas monocamadas de DOPC. Apesar da aparente contradição entre os resultados experimentais e simulados, a ausência de expansão/contração de áreas nas monocamadas simuladas pode ser explicada levando em conta que os estudos foram realizados em diluição infinita de AM.

Schmidt et al. mediram a pressão superficial de exclusão do AM nas monocamadas de DOPC como sendo de $\sim 12 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, ou seja, acima deste valor de pressão não ocorreria adsorção do corante. Nossas simulações em $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, também mostram que o AM não penetra na monocamada de DOPC, como pode ser visto no perfil de densidade da figura 32. Porém, uma redução da área média por molécula lipídica ocorre nos dados experimentais, atribuídas a uma mudança de orientação das cabeças dos fosfolipídios.

Aqui especulamos que um possível efeito para tal redução de área média por DOPC pode ser devida à oxidação completa dos lipídios insaturados na presença do ar. A possibilidade foi relatada no trabalho de Liljeblad et al.¹⁴⁴ que estudaram monocamadas de DOPC e DPLC em contato com ar. A redução da área por lipídio, a partir de alguns minutos, foi atribuída à oxidação dos lipídios pelas espécies de oxigênio presentes no ar.

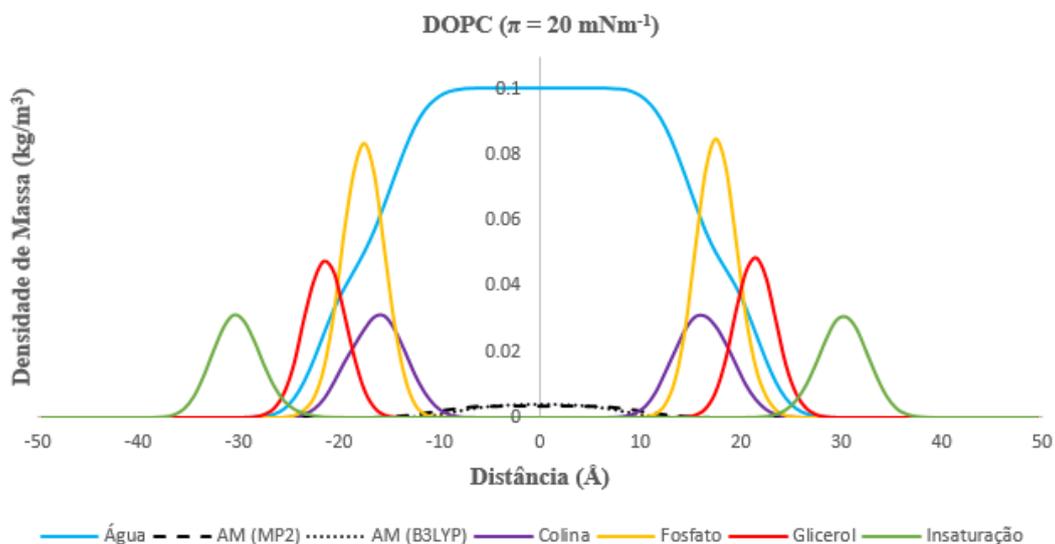


Figura 32. Perfis de densidade entre os constituintes da monocamada de DOPC e o azul de metileno, para pressão superficial de 20 mN.m^{-1} . A curva referente a densidade de água teve seus valores divididos por 6, para melhor visualização.

Adicionalmente foram feitas novas simulações para o sistema de DOPC, com área média por lipídio fixada em $88 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ (π próximo a 5 mN.m^{-1})⁵², ou seja, abaixo da pressão de exclusão, com o intuito de analisar o comportamento do corante na monocamada. A figura 33 mostra os perfis de densidade obtidos na presença do azul de metileno nas monocamadas de DOPC, DOPC-OOH, CLP e CLP-OOH.

Na figura 33, nota-se que o corante penetra na monocamada de DOPC e tende a se localizar aproximadamente entre os grupos fosfato e glicerol, independentemente do modelo de carga. Para o DOPC-OOH, o comportamento observado é o mesmo, indicando que nas monocamadas zwitteriônicas é esta a região de acomodação do AM. Simulações¹²⁴ do AM em bicamadas de POPC também apontam essa região de residência, indício que o azul de metileno se aloja nesta região em miméticos de membranas do tipo fosfatidilcolinas. No caso das cardiolipinas, um efeito dependente do dipolo do AM é evidente no que tange a localização do corante. Para a monocamada de CLP, o corante com modelo de carga em nível B3LYP/TZVPP (maior dipolo) penetra mais, enquanto que no caso da monocamada de CLP-OOH, o AM com modelo de carga em nível MP2/TZVPP tem uma distribuição espacial bem localizada.

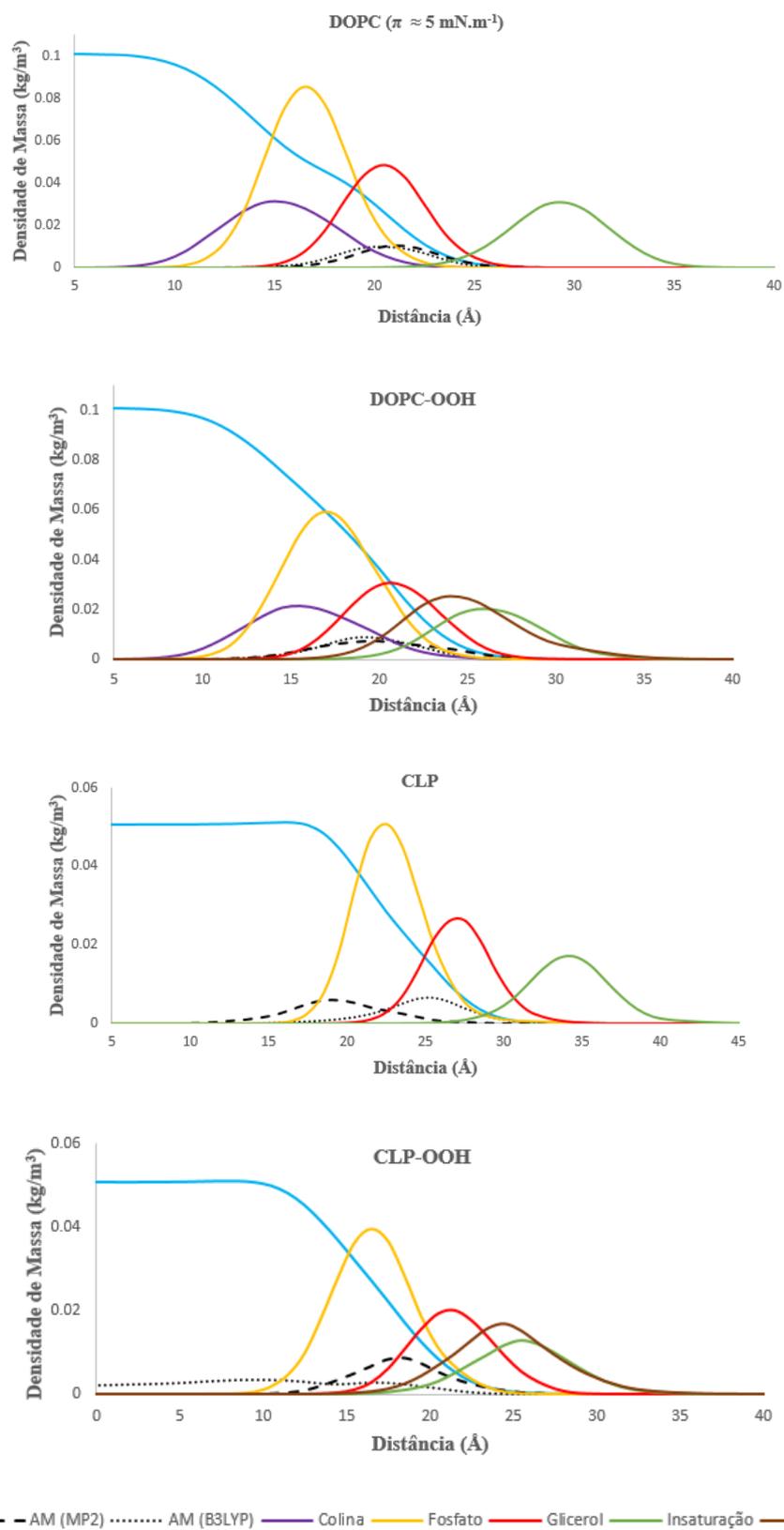


Figura 33. Perfis de densidade para as monocamadas de DOPC, DOPC-OOH, CLP e CLP-OOH. A curva referente a densidade de água teve seus valores divididos por 6 para as monocamadas zwitteriônicas e por 12 para as iônicas, para melhor visualização.

No intuito de entender o ambiente vivenciado pelo AM, é apresentado na tabela 5 estimativas das contribuições eletrostáticas e de Lennard-Jones entre o AM e as moléculas lipídicas e moléculas de água. Para o cálculo do termo eletrostático foi escrito uma rotina em FORTRAN que usa as ideias de truncagem de potencial como apresentadas no trabalho de Wolf e colaboradores¹⁴⁵. Para o termo de LJ foi utilizado o *plugin NAMD Energy* do *software* VMD que se baseia no cálculo da equação 17.

Tabela 5. Estimativa (em kcal.mol⁻¹) dos termos eletrostáticos e de LJ entre AM-fosfolipídio e AM-água em raio de corte de 10 Å.

Monocamada (DOPC)	Termo Eletrostático	Termo de LJ
AM ^B -DOPC	-17.4 ± 11.9	-23.6 ± 5.9
AM ^B -Água	-12.9 ± 11.2	-11.5 ± 2.8
AM ^M -DOPC	-16.8 ± 11.0	-26.6 ± 4.6
AM ^M -Água	-12.1 ± 10.8	-11.8 ± 2.6
Monocamada (DOPC-OOH)		
AM ^B -DOPC-OOH	-18.9 ± 12.2	-21.1 ± 7.5
AM ^B -Água	-3.6 ± 9.5	-9.2 ± 3.6
AM ^M -DOPC-OOH	-19.2 ± 11.7	-22.2 ± 5.2
AM ^M -Água	-5.6 ± 11.2	-11.9 ± 3.4
Monocamada (CLP)		
AM ^B -CLP	-47.9 ± 16.0	-21.3 ± 7.0
AM ^B -Água	-1.8 ± 12.1	-11.6 ± 3.6
AM ^M -CLP	-37.0 ± 16.5	-17.3 ± 8.5
AM ^M -Água	-1.3 ± 11.5	-12.7 ± 4.9
Monocamada (CLP-OOH)		
AM ^B -CLP-OOH	-29.1 ± 22.2	-7.80 ± 8.7
AM ^B -Água	-21.5 ± 17.9	-23.4 ± 6.3
AM ^M -CLP-OOH	-35.6 ± 19.8	-19.8 ± 8.3
AM ^M -Água	5.19 ± 10.0	-8.7 ± 2.9

Nota-se que o AM nas monocamadas iônicas é estabilizado principalmente por interações eletrostáticas, como esperado, já que o corante é catiônico e as cardiolipinas

carregadas negativamente. Os termos eletrostáticos apresentam grandes desvios padrões, inerente ao cálculo, pois a computação deste termo é sensível a qualquer pequena mudança de ambiente químico em volta do corante. Para a monocamada de CLP, os perfis de densidade apontaram que o AM em distribuição B3LYP/TZVPP tem uma maior penetração, confirmado pelo menor valor de energia eletrostática, já que os termos de LJ podem ser considerados equivalentes. Para a CLP-OOH foi observado que o azul de metileno em MP2/TZVPP se ancora mais. Analisando a tabela 5, é difícil afirmar uma maior estabilização eletrostática, devido aos grandes desvios associados. Porém, nota-se uma maior estabilização devido a contribuição de LJ. Mais ainda, pode ser observado que o AM em B3LYP/TZVPP é muito mais estabilizado em água do que o modelo MP2/TZVPP, contribuindo também para a diferença qualitativa observada nos perfis de densidade. Esses resultados evidenciam a importância de um modelo de distribuição de carga adequado para solutos em sistemas micro-heterogêneo.

Para as monocamadas de DOPC e DOPC-OOH, a contribuição eletrostática na estabilização não é tão acentuada quanto para as cardiolipinas, já que são fosfolipídios zwitteriônicos. Podem ser notados valores bem semelhantes em todos os tipos de interações em ambos os modelos de cargas, corroborando a mesma localização apontada pelos perfis de densidade.

Além da determinação da localização e das interações do corante, também é possível avaliar a sua orientação angular nas monocamadas. As figuras 34 e 35 apresentam os perfis orientacionais do vetor que liga os nitrogênios terminais do AM (vetor N-N) e do vetor entre o enxofre e nitrogênio do anel central (vetor S-N), respectivamente, em relação a normal as monocamadas.

Analisando a figura 34 é possível perceber que o ângulo médio preferencial dos vetores N-N nos dois modelos de azul de metileno é por volta de 90 graus nas monocamadas de DOPC e DOPC-OOH, bem como para o AM^B na monocamada de CLP e para o AM^M na monocamada de CLP-OOH. Para as outras duas distribuições nestas monocamadas iônicas, o comportamento angular é muito mais amplo, porém com alguma tendência de comportamento próximo aos 90°. Lembrando que são justamente os modelos de azul de metileno que não se ancoraram tanto nas monocamadas (vide perfis de densidade) esse comportamento angular mais difuso é consequência de uma maior amostragem experimentada no ambiente aquoso, região de livre orientação.

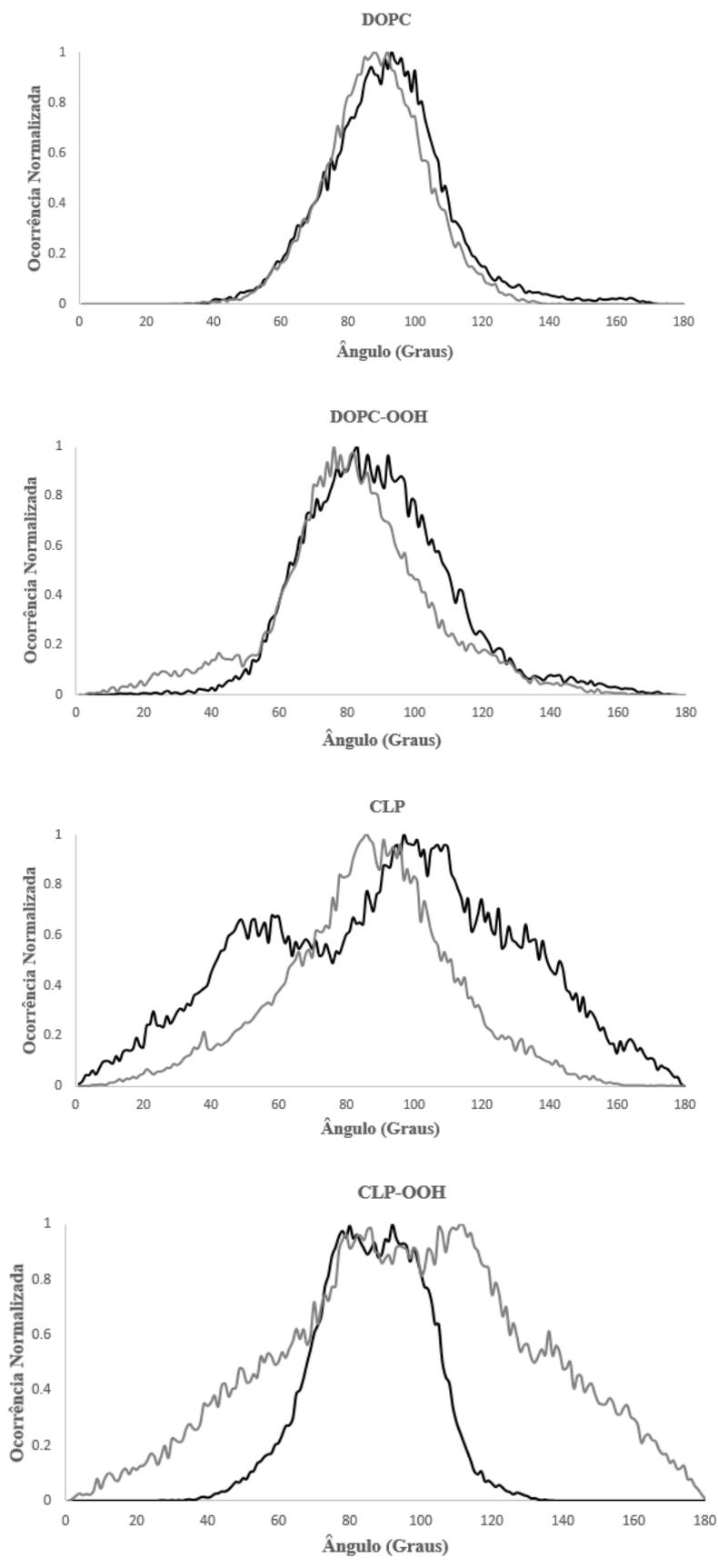


Figura 34. Perfil de orientação angular obtido do vetor entre os nitrogênios terminais do azul de metileno.

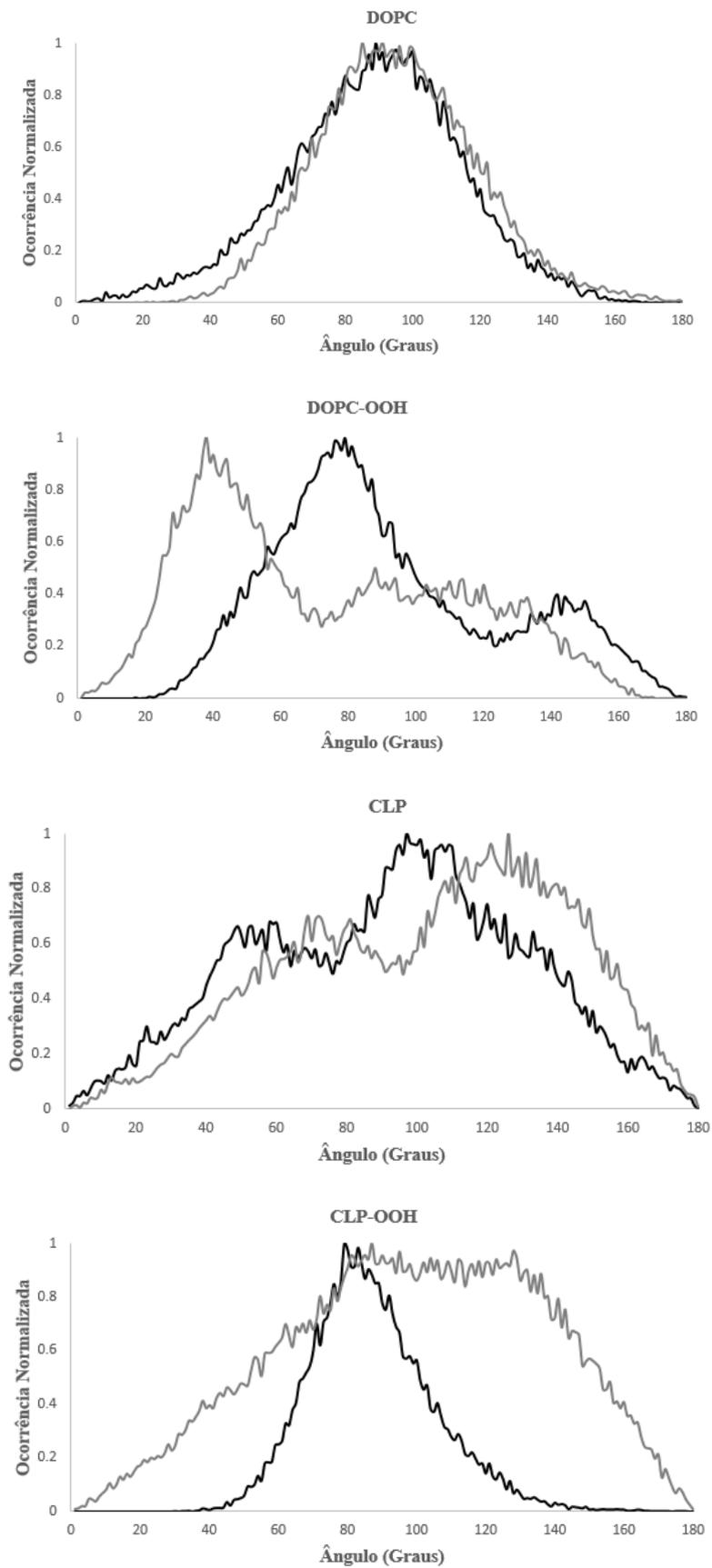


Figura 35. Perfil de orientação angular obtido do vetor entre átomo de enxofre e nitrogênio do anel central.

Pela figura 35, o vetor S-N assume comportamento distinto dependendo a monocamada na qual se encontra o corante. É certo, porém, que este vetor pode se orientar preferencialmente de forma perpendicular à normal aos sistemas (monocamadas de DOPC e AM^M na CLP-OOH), quanto inclinações formando ângulos agudos ou obtusos a este eixo.

A visão geral do comportamento orientacional que se pode sugerir é ilustrado na figura 36. As figuras 36a e 36b são formas de maiores frequências da orientação do corante. Na primeira, o vetor S-N possui ângulo próximo de 90° em relação ao eixo Z, enquanto que na segunda adquire um ângulo obtuso. Em ambas, o vetor N-N é próximo de 90° como relatado na figura 34. Na figura 36c já é esquematizado um evento menos frequente, onde o corante tenta permear na monocamada aproximadamente de forma vertical (vetor N-N próximo de 0° ou 180°).

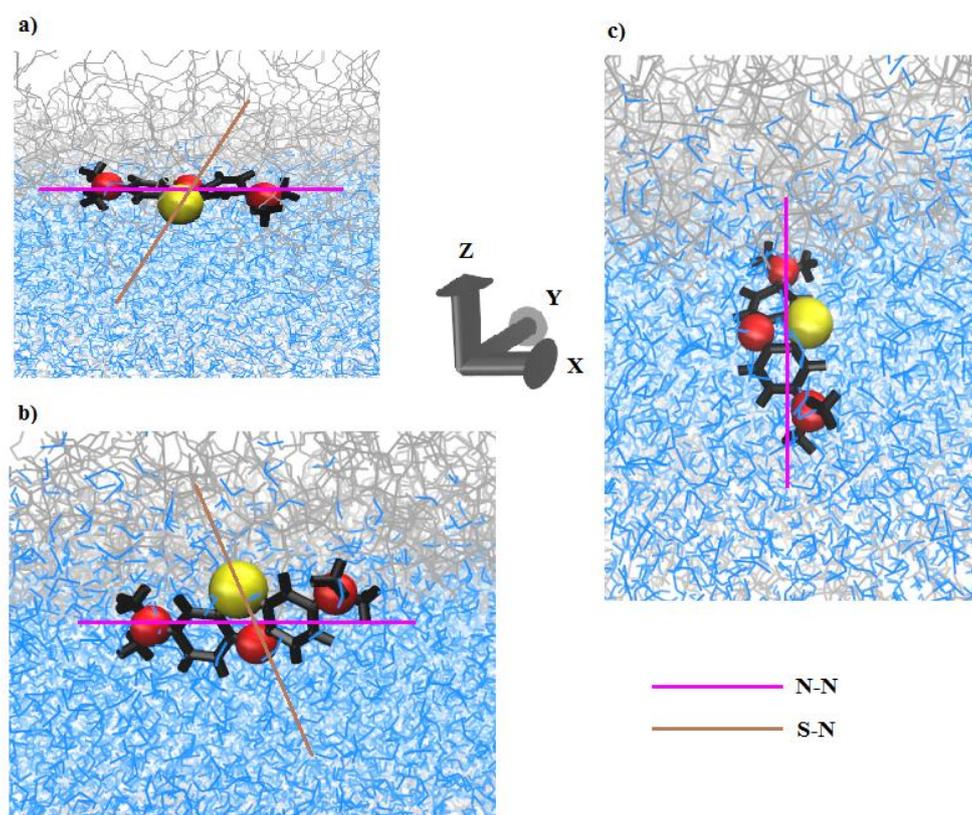


Figura 36. Ilustração esquemática do comportamento angular do azul do metileno. Vetor N-N representado em rosa e o vetor S-N em marrom. Águas em azul, fosfolipídios em cinza e o AM em preto com os átomos de nitrogênio destacados em vermelho e o de fósforo em amarelo. **a)** Situação onde ambos os vetores são próximos de 90 graus; **b)** Situação onde o vetor N-N permanece por volta de 90° enquanto que o vetor S-N pode adquirir outras orientações, no caso, algum ângulo obtuso; **c)** Situação onde o corante tenta permear na monocamada de forma vertical (vetor N-N próximo de 0 ou 180 graus).

5.2.2 Cálculos de Energia Livre

5.2.2.1 Força Média Adaptativa: Perfil de Energia Livre Para AM⁽⁰⁾

Como apresentado e explicado na sessão metodológica 4.2.7.1, foi obtido o perfil de energia livre pelo método ABF para o processo de transferência do AM descarregado a partir do *bulk* aquoso em direção as monocamadas. Os perfis comparativos para AM⁽⁰⁾ em DOPC e DOPC-OOH estão exibidos na figura 37. No apêndice 1 são mostradas as convergências dos perfis ABF de cada janela simulada.

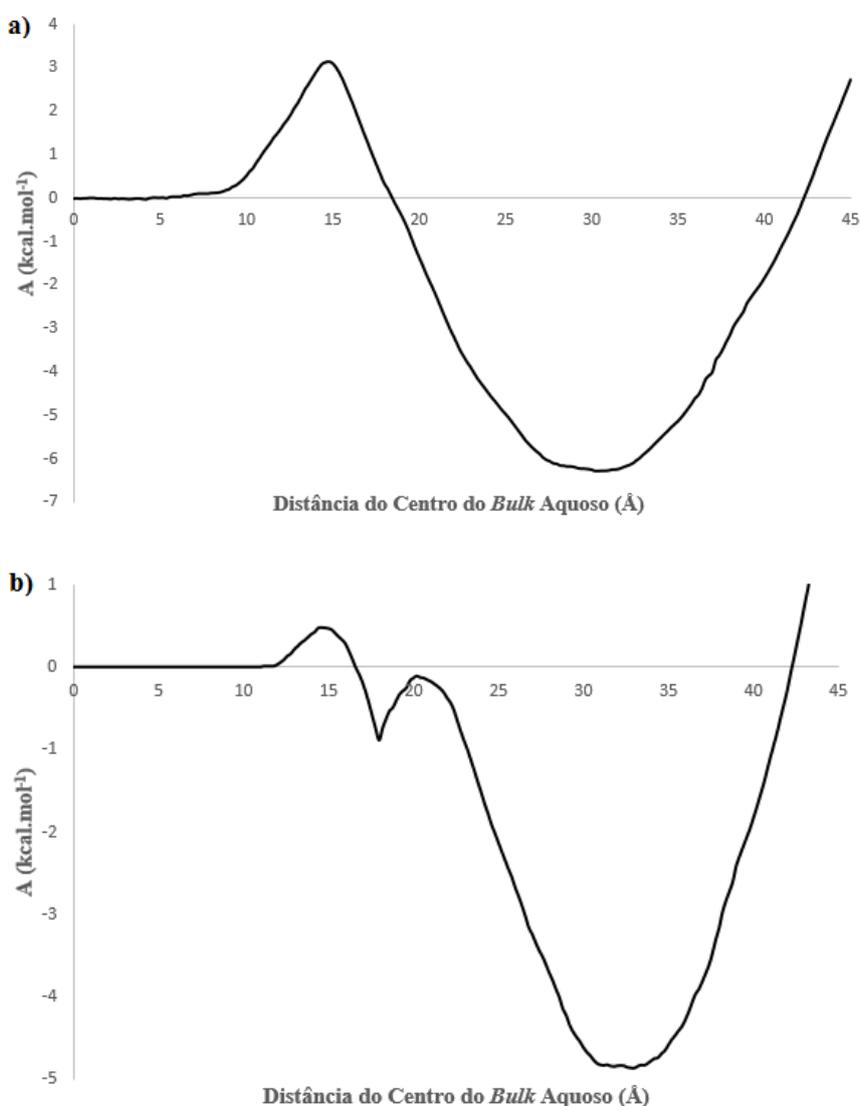


Figura 37. Perfil de energia livre para translocação do AM⁽⁰⁾ a partir do centro do bulk aquoso ($\zeta = Z = 0$) em direção as monocamadas fosfolipídicas de **a)** DOPC e **b)** DOPC-OOH, ambas em $\pi = 20$ mN.m⁻¹.

Para a monocamada de DOPC, o perfil de energia livre do azul de metileno descarregado mostra que o corante precisa superar uma barreira energética de ~ 3 kcal.mol⁻¹ para começar a atravessá-la a partir do *bulk* aquoso. O pico em 15 Å corresponde aproximadamente à região de alta densidade dos grupos colinas e fosfatos dos fosfolipídios (vide perfil de densidade eletrônica). A partir desse máximo, o perfil de energia livre tem seus valores decrescentes até o mínimo em 30 Å, correspondendo a região de maior densidade das insaturações das cadeias carbônicas, com um valor aproximado de -6 kcal.mol⁻¹.

Para a monocamada hidroperoxidada, há também uma pequena barreira na região de densidade dos grupos colinas e fosfatos em 15 Å, contudo, com um valor de ~ 0.5 kcal.mol⁻¹. Esta barreira é facilmente superada já que é da ordem da energia térmica em temperatura ambiente. Nesse perfil, diferentemente da monocamada de DOPC, ocorre um breve decaimento nos valores de energia livre com posterior aumento na região logo após 17 Å, correspondendo a uma maior densidade de grupos químicos nesta região que dificultam a permeação, oriundos da presença de grupos hidroperóxidos, que conforme já visto, tendem a migrar para mais perto da interface. Na região em 30 Å, essa monocamada apresenta uma energia livre levemente maior (-5 kcal.mol⁻¹) comparada à monocamada de DOPC.

5.2.2.2 Integração Termodinâmica: Extrapolação do Trabalho Eletrostático Reversível para o Processo AM⁽⁰⁾ → AM⁽¹⁺⁾ no *Bulk* Aquoso

A técnica de integração termodinâmica foi utilizada inicialmente para extrapolar o processo de carga do azul de metileno na fase aquosa: AM⁽⁰⁾ → AM⁽¹⁺⁾. Na tabela 6, estão apresentados os valores médios dos termos eletrostáticos $\langle V \rangle_\lambda$ para os estados de carga 0, $\frac{1}{2}$ e 1 de λ , em diferentes gaiolas cúbicas.

Tabela 6. Média dos termos $\langle V \rangle_\lambda$ para os diferentes estados de carga λ para os três tamanhos da gaiola cúbica (de aresta L) de pseudopartículas utilizadas.

$\langle V \rangle_\lambda$ (kcal.mol ⁻¹)	L = 40 Å	L = 50 Å	L = 60 Å
<u>MP2/TZVPP</u>			
$\lambda = 0$	-0.09 ± 5.00	-0.09 ± 5.00	-0.09 ± 5.00
$\lambda = \frac{1}{2}$	-39.97 ± 4.79	-42.20 ± 4.92	-43.82 ± 4.91
$\lambda = 1$	-76.27 ± 6.69	-84.57 ± 5.09	-87.75 ± 5.17
<u>B3LYP/TZVPP</u>			
$\lambda = 0$	-0.09 ± 5.00	-0.09 ± 5.00	-0.09 ± 5.00
$\lambda = \frac{1}{2}$	-41.71 ± 5.00	-43.91 ± 5.14	-45.52 ± 5.23
$\lambda = 1$	-86.16 ± 5.45	-90.57 ± 5.60	-93.72 ± 5.67

As variações de energia livre foram determinadas fazendo-se uso das equações 31 à 34 (sessão 4.2.7.2) e são apresentadas na tabela 7.

Tabela 7. Cálculo do ΔA fazendo-se uso das quadraturas numéricas para o processo $AM^{(0)} \rightarrow AM^{(1+)}$ para três diferentes tamanhos de gaiolas cúbicas (de aresta L).

ΔA (kcal.mol ⁻¹)	L = 40 Å	L = 50 Å	L = 60 Å
<u>MP2/TZVPP</u>			
Equação 31	-38.2 ± 4	-42.3 ± 4	-43.9 ± 4
Equação 32	-38.2 ± 4	-42.3 ± 4	-43.9 ± 4
Equação 33	-39.4 ± 3	-42.2 ± 3	-43.9 ± 3
Equação 34	-39.1 ± 3	-42.3 ± 3	-43.9 ± 3
<u>B3LYP/TZVPP</u>			
Equação 31	-43.1 ± 4	-45.3 ± 4	-46.9 ± 4
Equação 32	-43.1 ± 4	-45.3 ± 4	-46.9 ± 4
Equação 33	-42.2 ± 4	-44.4 ± 4	-46.0 ± 4
Equação 34	-42.4 ± 3	-44.6 ± 3	-46.2 ± 3

As quadraturas numéricas fornecem valores bastante semelhantes no cálculo da variação de energia livre. O importante é que a equação 31 descreve um processo de *resposta linear* (dependência quadrática com a carga). Daí, o processo de carga do azul de metileno em água poderia ser muito bem estimado usando um solvente contínuo dielétrico.

Fazendo-se uso dos resultados obtidos da quadratura numérica de sexta ordem (equação 34) e dados em função do tamanho da gaiola de pseudo-partículas, extrapolou-se a variação de energia livre para o caso de diluição infinita de azul metileno em água ($1/L \rightarrow 0$). Os gráficos das regressões lineares são apresentados na figura 38.

Assim, a variação de energia livre obtida para o processo $AM^{(0)} \rightarrow AM^{(1+)}$ em *bulk* aquoso corresponde a $-53.5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para o azul de metileno em distribuição MP2/TZVPP e a $-53.7 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para a distribuição B3LYP/TZVPP. Os valores são praticamente os mesmos. Interessantemente, o valor obtido para o cálculo COSMO em B3LYP/TZVPP foi de $-41.2 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Assim, uma camada de hidratação discreta de água, após extrapolação, estabiliza mais o corante do que um contínuo dielétrico uniforme.

No entanto, para a determinação da energia livre de transferência total (ΔA_T) foi utilizado os valores correspondentes à gaiola cúbica de aresta 50 \AA , já que as integrações termodinâmicas nas monocamadas não foram extrapoladas devido a limitações computacionais.

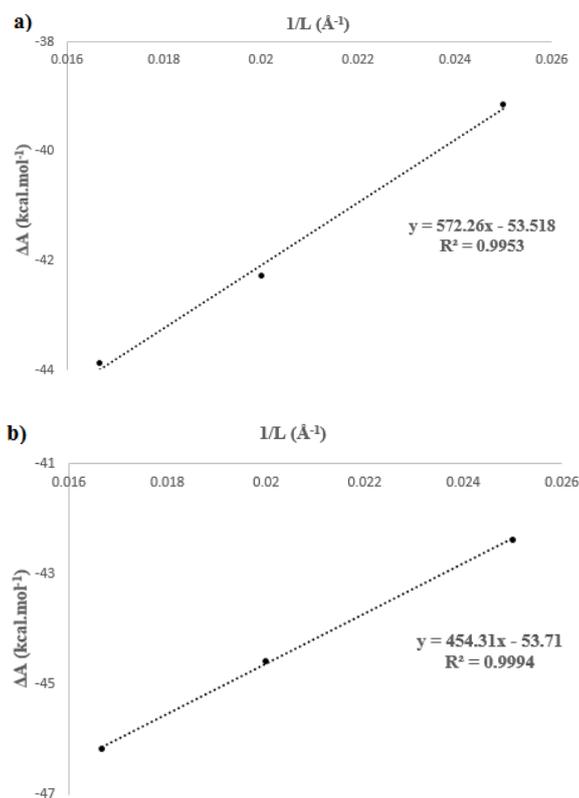


Figura 38. Regressões lineares para a variação de energia livre (ΔA) em função de $1/L$ para o AM em modelo a) MP2/TZVPP e b) B3LYP/TZVPP.

5.2.2.3 Integração Termodinâmica: Trabalho Eletrostático Reversível para o Processo AM⁽⁰⁾ → AM⁽¹⁺⁾ em Regiões Específicas das Monocamadas

Na determinação dos termos eletrostáticos $\langle V \rangle_\lambda$ para λ igual a 0, $\frac{1}{2}$ e 1, o AM teve seu centro de massa acoplado ao centro de massa dos grupos colina, fosfato, glicerol, insaturação e dos hidroperóxidos, como explicado na sessão 4.2.7.2. As tabelas 8 e 9 apresentam os valores obtidos.

Tabela 8. Média dos termos $\langle V \rangle_\lambda$ para os diferentes estados de carga λ nas diferentes regiões da monocamada de DOPC.

$\langle V \rangle_\lambda$ (kcal.mol ⁻¹)	Colinas	Fosfatos	Gliceróis	Insaturações
<u>MP2/TZVPP</u>				
$\lambda = 0$	-3.5 ± 5	-2.9 ± 5	0.6 ± 4	2.9 ± 4
$\lambda = \frac{1}{2}$	-36.2 ± 5	-34.4 ± 6	-28.0 ± 6	-13.6 ± 6
$\lambda = 1$	-71.1 ± 5	-69.6 ± 5	-60.7 ± 6	-48.7 ± 7
<u>B3LYP/TZVPP</u>				
$\lambda = 0$	-3.7 ± 5	-3.5 ± 5	-0.6 ± 5	7 ± 3
$\lambda = \frac{1}{2}$	-37.1 ± 5	-35.8 ± 5	-28.5 ± 6	-20.2 ± 5
$\lambda = 1$	-77.0 ± 6	-74.5 ± 5	-65.6 ± 6	-53.2 ± 5

Tabela 9. Média dos termos $\langle V \rangle_\lambda$ para os diferentes estados de carga λ nas diferentes regiões da monocamada de DOPC-OOH.

$\langle V \rangle_\lambda$ (kcal.mol ⁻¹)	Colinas	Fosfatos	Gliceróis	Hidroperóxidos	Insaturações
<u>MP2/TZVPP</u>					
$\lambda = 0$	-1.8 ± 4	0.8 ± 5	0.3 ± 4	0.7 ± 4	1.4 ± 4
$\lambda = \frac{1}{2}$	-36.0 ± 5	-29.1 ± 5	-32.9 ± 5	-23.4 ± 5	-21.5 ± 5
$\lambda = 1$	-68.9 ± 5	-67.8 ± 50	-65.5 ± 6	-59.0 ± 5	-55.41 ± 6
<u>B3LYP/TZVPP</u>					
$\lambda = 0$	-2.0 ± 5	0.3 ± 5	-0.6 ± 5	-0.1 ± 4	3.1 ± 4
$\lambda = \frac{1}{2}$	-37.1 ± 5	-34.8 ± 5	-30.9 ± 5	-25.4 ± 5	-25.6 ± 6
$\lambda = 1$	-74.0 ± 6	-74.5 ± 6	-69.8 ± 6	-59.6 ± 7	-64.5 ± 6

Novamente, as variações de energia livre foram determinadas fazendo-se uso das equações 31 a 34. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 10 e 11.

Tabela 10. Cálculo do ΔA fazendo-se uso das quadraturas numéricas para o processo $AM^{(0)} \rightarrow AM^{+1}$ nas diferentes regiões da monocamada de DOPC.

ΔA (kcal.mol ⁻¹)	Colinas	Fosfatos	Gliceróis	Insaturações
<u>MP2/TZVPP</u>				
Equação 31	-37.3 ± 3	-36.3 ± 4	-30.1 ± 4	-22.9 ± 4
Equação 32	-37.3 ± 3	-36.3 ± 4	-30.1 ± 4	-22.9 ± 4
Equação 33	-36.6 ± 4	-35.0 ± 4	-28.6 ± 4	-16.7 ± 5
Equação 34	-36.7 ± 3	-35.3 ± 3	-28.9 ± 3	-18.0 ± 4
<u>B3LYP/TZVPP</u>				
Equação 31	-40.4 ± 4	-39.0 ± 4	-33.1 ± 4	-23.1 ± 3
Equação 32	-40.4 ± 4	-39.0 ± 4	-33.1 ± 4	-23.1 ± 3
Equação 33	-38.2 ± 4	-36.9 ± 4	-30.0 ± 4	-21.2 ± 3
Equação 34	-38.6 ± 3	-37.3 ± 3	-30.1 ± 4	-21.6 ± 3

Tabela 11. Cálculo do ΔA fazendo-se uso das quadraturas numéricas para o processo $AM_{LJ}^{(0)} \rightarrow AM^{+1}$ nas diferentes regiões da monocamada de DOPC-OOH.

ΔA (kcal.mol ⁻¹)	Colinas	Fosfatos	Gliceróis	Hidroperóxidos	Insaturações
<u>MP2/TZVPP</u>					
Equação 31	-35.4 ± 3	-33.5 ± 4	-32.6 ± 4	-29.1 ± 3	-27.0 ± 4
Equação 32	-35.4 ± 3	-33.5 ± 4	-32.6 ± 4	-29.1 ± 3	-27.0 ± 4
Equação 33	-35.8 ± 3	-30.6 ± 4	-32.8 ± 4	-25.3 ± 3	-23.3 ± 3
Equação 34	-35.7 ± 3	-31.2 ± 3	-32.8 ± 3	-26.1 ± 3	-24.0 ± 3
<u>B3LYP/TZVPP</u>					
Equação 31	-38.1 ± 4	-37.1 ± 4	-35.2 ± 4	-29.8 ± 4	-30.7 ± 4
Equação 32	-38.1 ± 4	-37.1 ± 4	-35.2 ± 4	-29.8 ± 4	-30.7 ± 4
Equação 33	-37.4 ± 4	-35.6 ± 4	-32.3 ± 4	-26.9 ± 4	-27.3 ± 4
Equação 34	-37.6 ± 3	-35.9 ± 3	-32.9 ± 3	-27.5 ± 4	-28.0 ± 4

A maior variação de energia livre para o processo de carga do AM nas monocamadas de DOPC e DOPC-OOH ocorrem na região das colinas, independentemente do modelo de distribuição de cargas do corante, seguidamente, de um modo geral, da região de alta densidade dos grupos fosfatos, gliceróis, hidroperóxidos (na DOPC-OOH) e, por fim, nas insaturações. O resultado é compatível com a diminuição de polaridade das monocamadas fosfolipídicas em direção ao final das caudas carbônicas. Comparativamente aos modelos do azul de metileno, a distribuição B3LYP/TZVPP apresentou valores de ΔA menores (mais negativos) do que a distribuição MP2/TZVPP.

De forma geral, devido aos valores próximos e aos desvios associados, não se pode afirmar que houve mudanças nos valores de energia livre para a região das colinas,

fosfatos e gliceróis, devido a hidroperoxidação. Por outro lado, a região das insaturações tiverem seus valores de diferenças de energia livre maiores (mais negativos), consequência do grupo hidroperóxido, que como visto, tende a experimentar regiões da interface, possibilitando uma maior aproximação das moléculas de água em relação à densidade dos carbonos que fazem a dupla ligação.

Importante também é ressaltar que não há diferenças significativas entre cálculos com a equação 31 e demais. Estes resultados permitem concluir que na região da interface de DOPC ou DOPC-OOH, ou mesmo em regiões mais internalizadas, o meio responde *linearmente* à presença do azul de metileno.

Durante aplicação da técnica de TI, a média e variâncias dos termos $\langle V \rangle_\lambda$ tendem a valores aproximadamente constantes após alguns nanosegundos. No apêndice 2 pode ser encontrado algumas curvas representativas da média em função do tempo ilustrando a convergência para os termos $\langle V \rangle_\lambda$.

5.2.2.4 Ciclo Termodinâmico

As estimativas das diferenças de energia livre de transferência total (ΔA_T), fazendo-se uso dos valores obtidos pelos métodos ABF e TI (via equação 34) são alcançadas por meio do ciclo termodinâmico exibido na figura 21, através da equação 35. As tabelas 12 e 13 apresentam os valores calculados de transferência entre *bulk* e regiões das monocamadas.

Tabela 12. Variação de energia livre de transferência total do AM a partir do *bulk* em direção a regiões específicas da monocamada de DOPC.

ΔA_T (kcal.mol ⁻¹)	Colinas	Fosfatos	Gliceróis	Insaturações
AM ^M	8.5	9.9	12.0	18.0
AM ^B	8.9	10.2	12.6	16.8

Tabela 13. Variação de energia livre de transferência total do AM a partir do *bulk* em direção a regiões específicas da monocamada de DOPC-OOH.

ΔA_T (kcal.mol ⁻¹)	Colinas	Fosfatos	Gliceróis	Hidroperóxidos	Insaturações
AM ^M	6.9	11.5	9.4	11.4	13.4
AM ^B	7.4	9.1	11.6	12.3	11.7

Os valores para ΔA_T para o azul de metileno na monocamada de DOPC dão suporte ao que foi discutido anteriormente (o corante não penetra na monocamada na pressão de superfície de 20 mN.m^{-1}). Para a monocamada de DOPC-OOH os valores obtidos são ligeiramente menores (exceto para o AM^M na região dos grupos fosfatos), porém, este resultado também indica que o corante não consegue se adsorver na monocamada hidroperoxidada, contrariamente ao sugerido pelos perfis de densidade.

Há dois motivos para diferenças entre as dinâmicas livres e os cálculos de energia livre: i-) não foi possível extrapolar o trabalho eletrostático reversível de carga do corante, como feito para a região do *bulk*, e obter a resposta elétrica do meio para o caso da transferência em diluição infinita; ii-) a metodologia utilizada na integração termodinâmica faz uso de uma gaiola cúbica de pseudopartículas enquanto que nas dinâmicas livres um contra-íon é considerado explicitamente, explorando uma vizinhança muito próxima do azul de metileno, o que influencia os resultados.

5.2.3 Conclusões

A dinâmica molecular livre e as determinações de energia livre mostraram que o azul de metileno não se adsorve na monocamada de DOPC. Por outro lado, resultados opostos foram obtidos para a monocamada de DOPC-OOH, sugerindo pouca amostragem das dinâmicas livres e/ou necessidade de otimização da metodologia utilizada na integração termodinâmica para estas monocamadas.

O efeito do modelo de distribuição de carga foi maior nas dinâmicas livres em monocamadas iônicas. Em CLP, foi visto que o AM em B3LYP/TZVPP se adsorve mais profundamente que em MP2/TZVPP. O oposto foi observado em monocamadas de CLP-OOH.

Interações eletrostáticas são as principais responsáveis pela adsorção do corante nas monocamadas iônicas e também é a principal interação responsável para os valores obtidos de energia livre. No caso de monocamadas zwitteriônicas, a estabilização é dependente da contribuição eletrostática e Lennard-Jones.

Os resultados também sugerem que o AM tende a se orientar perpendicularmente (em relação ao vetor N-N) nas monocamadas e que não afeta a orientação das cabeças polares (com ressalva a ausência de efeitos devido à concentração do corante).

REFERÊNCIAS

- ¹ GORTER, M.D.E., & GREDEL, F. (1924). On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *Journal of Experimental Medicine*, 41, 439-443.
- ² DANIELLI, J.F., & DAVSON, H. (1935). A contribution to the theory of permeability of thin films. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 5, 495-508.
- ³ SINGER, S. J., & NICOLSON, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(23), 720-731.
- ⁴ LIPOWSKY, R., & SACKMANN, E. (1995). Structure and Dynamics of Membranes. Amsterdam: Elsevier, pp. 1-1052, 1995.
- ⁵ ISRAELACHVILI, J.N. (1977). *Biochimica et Biophysica Acta*, 469, 221–225.
- ⁶ VENTUROLI, M., SPEROTTO, M.M., KRANENBURG, M., & SMIT, B. (2006). Mesoscopic models of biological membranes. *Physics Reports*, 437, 1– 54.
- ⁷ STILLWELL, W. (2013) An introduction to biological membranes: from bilayers to rafts. Elsevier, pp. 1-363, 2013.
- ⁸ SONNINO, S., PRINETTI, A., MAURI, L., CHIGORNO, V., & TETTAMANTI, G. (2006). Dynamic and Structural Properties of Sphingolipids as Driving Forces for the Formation of Membrane Domains. *Chemical Reviews*, 106(6), 2111-2125.
- ⁹ YANG, Y., KHOO, W. J., ZHENG, Q., CHUNG, H. J., & YUK, H. G. (2014). *International Journal of Food Microbiology*, 172, 102-109.
- ¹⁰ BEHNIA, R., & MUNRO, S. (2005). Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature*, 438, 597–604.
- ¹¹ SHIN, J. J. H., & LOEWEN, C. J. R. (2011). Putting the pH into phosphatidic acid signaling. *BMC Biology*, 9, 85.
- ¹² NIEMELÄ, P. S., MIETTINEN, M. S., MONTICELLI, L., HAMMAREN, H., BJELKMAR, P., MURTOLA, T., LINDAHL, E., & VATTULAINEN, I. (2010).

Membrane proteins diffuse as dynamics complexes with lipids. *Journal of American Chemical Society*, 132, 7574–7575.

¹³ de PLANQUE, M. R. R., GREATHOUSE, D. V., KOPPE, R. E., SCHAFER, H., MARSH, D., & KILLIAN, J. A. (1998). Influence of Lipid/Peptide Hydrophobic Mismatch on the Thickness of Diacylphosphatidylcholine Bilayers. A ²H NMR and ESR Study Using Designed Transmembrane α -Helical Peptides and Gramicidin A. *Biochemistry*, 37, 9333–9345.

¹⁴ RAMAKRISHNAN, N., KUMAR, P. B.S., & RADHAKRISHNAN, R. (2014). Mesoscale computational studies of membrane bilayer remodeling by curvature-inducing proteins. *Physics Reports*, 543, 1–60.

¹⁵ van MERR, G., VOELKER, D. R., & FEIGENSON, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 112–124.

¹⁶ NELSON, D.L., & COX, M.M. (2011). Princípios de bioquímica de Lehninger. *Artmed*, pp. 1-1273.

¹⁷ RICHTER, R.P., BÉRAT, R., & BRISSON, A.R. (2006). Formation of solid-supported lipid bilayers: An integrated view. *Langmuir*, 22, 3497-3505.

¹⁸ RICHTER, R.P., & BRISSON, A.R. (2005). Following the formation of supported lipid bilayers on mica: A study combining AFM, QCM-D, and ellipsometry. *Biophysical Journal*, 88, 3422-3433.

¹⁹ WESOLOWSKA, O., MICHALAK, K., MANIEWSKA, J., & HENDRICH, A.B. (2009) Giant unilamellar vesicles – a perfect tool to visualize phase separation and lipid rafts in model system. *Acta Biochimica Polonica*, 56, 1, 33-39.

²⁰ ANGELOVA, M.I., & DIMITROV, D.S. (1986) Liposome electroformation. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, 81, 303–311.

²¹ STEFANIU, C., BREZESINSKI, G., & MÖHWALD, H. (2014). Langmuir monolayers as models to study processes at membrane surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 208, 197–213.

- ²² FERREIRA, M., CAETANO, W., TABAK, M., & ITRI, R. (2005). Técnicas de caracterização para investigar interações no nível molecular em filmes de langmuir e langmuir-blodgett (LB). *Química Nova*, 28(3), 502-510.
- ²³ PLUHACKOVA, K., & BOCKMANN, A.R. (2015). Biomembranes in atomistic and coarse-grained simulations. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 27, 323103.
- ²⁴ CHAN, Y-H.M., & BOXER, S.G. (2007). Model membrane systems and their applications, *Current Opinion in Chemical Biology*, 11, 1-7.
- ²⁵ LASIC, D.D. (1988). The mechanism of vesicle formation. *Biochemical Journal*, 256, 1-11.
- ²⁶ BARNES, G.T., & GENTLE, I.R. (2011). Interfacial science: an introduction. *Oxford University Press*, pp. 1-326.
- ²⁷ ADAMSON, A.W., & GAST, A.P. (1997). Physical Chemistry of Surfaces. *John Willey & Sons*, pp. 1-804.
- ²⁸ LANGMUIR, I. (1917). The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. 1848-1906.
- ²⁹ LANGMUIR, I. (1934). Mechanical properties of monomolecular films. 143-171.
- ³⁰ LANGMUIR, I. (1933). Oil lenses on water and the nature of monomolecular expanded films. *The Journal of Chemical Physics*, 72, 756-776.
- ³¹ LANGMUIR, I. (1933). Surface chemistry. 147-191.
- ³² McCONNELL, H.M. (1991). Structures and transitions in lipid monolayers at the air-water interface. *Annual Review of Physical Chemistry*, 42, 171-195.
- ³³ KNOBLER, C.M., & DESAI, R.C. (1992). Phase transitions in monolayers. *Annual Review of Physical Chemistry*, 43, 207-236.
- ³⁴ MÖHWALD, H. (1990). Phospholipid and phospholipid-protein monolayers at the air/water interface. *Annual Review of Physical Chemistry*, 41, 441-476.

³⁵ BROCKMAN, H. (1999). Lipid monolayers: why use a half membrane to characterize protein-membrane interactions?. *Current Opinion in Structural Biology*, 9, 438-443.

³⁶ MARSH, D. (1996). Lateral pressure in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1286, 183-223.

³⁷ FENG, S. (1999). Interpretation of mechanochemical properties of lipid bilayer vesicles from the equation of state or pressure-area measurement of the monolayer at the air-water or oil-water interface. *Langmuir*, 15, 998-1010.

³⁸ DUNCAN, S.L., & LARSON, R.G. (2008). Comparing experimental and simulated pressure-area isotherms for DPPC. *Biophysical Journal*, 94(8), 2965–2986.

³⁹ LIN, W., CLARK, A.J., & PAESANI, F. (2015). Effects of surface pressure on the properties of Langmuir monolayers and interfacial water at the air-water interface. *Langmuir*, 31, 2147–2156.

⁴⁰ KJAER, K., ALS-NIELSEN, J., HELM, C.A., LAXHUBER, L.A., & MÖHWALD H. Ordering in lipid monolayers studied by synchrotron X-ray diffraction and fluorescence microscopy. *Physical Review Letters*, 58, 2224–2227.

⁴¹ PENFOLD, J., & THOMAS, R.K. (1990). The application of the specular reflection of neutrons to the study of surfaces and interfaces. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 1990, 2, 1369–1412.

⁴² HÖNIG, D., & MÖBIUS, D. (1991). Direct visualization of monolayers at the air–water interface by Brewster angle microscopy. *The Journal of Physical Chemistry*, 95, 4590–4592.

⁴³ FIELD, M.J. (2015). Technical Advances in molecular simulation since the 1980s. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Manuscript Number: ABBI-15-56.

⁴⁴ VEGSO, K., SIFFALOVIC, P., MAJKOVA, E., JERGEL, M., BENKOVICOVA, M., KOCSIS, T., WEIS, M., LUBY, S., NYGÄRD, K., & KONOVALOV, O. (2012). Nonequilibrium phases of nanoparticle Langmuir films. *Langmuir*, 28, 10409-10414.

⁴⁵ BENEDINI, L., FANANI, M.L., MAGGIO, B., WILKE, N., MESSINA, P., PALMA, S., & SCHULZ, P. (2011). Surface phase behavior and domain topography of ascorbyl palmitate monolayers. *Langmuir*, 27, 10914-10919.

⁴⁶ CARUSO, B., VILLARREAL, M., REINAUDI, L., & WILKE, N. (2014). Inter-domain interactions in charged lipid monolayers. *Journal of Physical Chemistry B*, 118, 519–529.

⁴⁷ ANTIPINA, M.N., SCHULZE, I., HEINZE, M., DOBNER, B., LANGNER, A., & BREZESINSKI, G. (2009). Physical–chemical properties and transfection activity of cationic lipid/DNA complexes. *ChemPhysChem*, 10, 2471–2479.

⁴⁸ GZYL-MALCHER, B., FILEK, M., & BREZESINSKI, G. (2009). Influence of cadmium and selenate on the interactions between hormones and phospholipids. *Langmuir*, 25, 13071–13076.

⁴⁹ CASARES, J.J.G., CAMACHO, L., MARTÍN-ROMERO, M.T., & CASCALES, J.J.L. (2010). Methylene Blue Adsorption on a DMPA Lipid Langmuir Monolayer. *ChemPhysChem*, 11, 2241-2247.

⁵⁰ CASARES, J.J.G., de MIGUEL, G., PÉREZ-MORALES, M., MARTÍN-ROMERO, M.T., CAMACHO, L., & MUÑOZ, E. (2009). Effect of the Molecular Methylene Blue Aggregation on the Mesoscopic Domain Morphology in Mixed Monolayers with Dimyristoyl-Phosphatidic Acid. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113, 5711-5720.

⁵¹ AOKI, P.H.B, VOLPATI, D., CAETANO, W., & CONSTANTINO, C.J.L. (2010). Study of the interaction between cardiolipin bilayers and methylene blue in Polymer based Layer-by-Layer and Langmuir films applied as membrane mimetic systems. *Vibrational Spectroscopy*, 54, 93–102.

⁵² SCHMIDT, T.F. Monocamadas e bicamadas lipídicas: adsorção do Azul de Metileno e fotossensibilização. 2013. 145 f. Tese (Doutorado em Nanociências e Materiais Avançados) – Universidade Federal do ABC, Santo André, São Paulo.

⁵³ McCAMMON, J.A., GELIN, B.R., & KARPLUS, M. (1977). Dynamics of folded proteins. *Nature*, 267, 585-590.

- ⁵⁴ SANSOM, M.S.P., & BIGGIN, P.C. (2010). Molecular simulations and biomembranes: from biophysics to function. *RSC Publishing*, pp. 331.
- ⁵⁵ PLUHACKOVA, K., & BÖCKMANN, R.A., (2015). Biomembranes in atomistic and coarse-grained simulations. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 27, 323103.
- ⁵⁶ KARPLUS, M., & McCAMMON, A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural Biology*, 9:9, 646-652.
- ⁵⁷ MARRINK, S.J., & TIELEMAN, D.P. (2013). Perspective on the Martini model. *The Royal Society of Chemistry*, 42, 6801-6822.
- ⁵⁸ NIELSEN, S.O., BULO, R.E., MOORE, P.B., & ENSING, B. (2010). Recent progress in adaptive multiscale molecular dynamics simulations of soft matter. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12, 12401-12414.
- ⁵⁹ ORSI, M., NORO, M.G., & ESSEX, J.W. (2011). Dual-resolution molecular dynamics simulation of antimicrobials in biomembranes. *Journal of the Royal Society Interface*, 8, 826-841.
- ⁶⁰ ZHANG, Y., FELLER, S.E., BROOKS, B.R., & PASTOR, R.W. (1995). Computer simulation of liquid/liquid interfaces. I. Theory and application to octane/water. *The Journal of Chemical Physics*, 103, 10252-10266.
- ⁶¹ FELLER, S.E., ZHANG, Y., & PASTOR, R.W. (1995). Computer simulation of liquid/liquid interfaces. II. Surface tension-area dependence of a bilayer and monolayer. *The Journal of Chemical Physics*, 103, 10267-10276.
- ⁶² BÖCKER, J., SCHLENKRICH, M., BOPP, P., & BRICKMANN, J. (1992). Molecular dynamics simulation of a n-hexadecyltrimethylammonium chloride monolayer. *The Journal of Physical Chemistry*, 96:24, 9915-9922.
- ⁶³ TAREK, M., TOBIAS, D.J., & KLEIN, M.L. (1995). Molecular dynamics simulation of Tetradecyltrimethylammonium Bromide Monolayers at the Air/Water Interface. *The Journal of Physical Chemistry*, 99, 1393-1402.
- ⁶⁴ LIU, B., WONG-EKKABUTT, J., & KARTTUNEN, M. (2015). Molecular dynamics simulations of surfactant monolayers. *To appear in "Computational Methods for complex liquid-fluid interfaces"*, pp. 1-25.

⁶⁵ SIMPLICIO, F.I., MAIONCHI, F., & HIOKA, N. (2002). Terapia Fotodinâmica: Aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Química Nova*, 25:5, 801-807.

⁶⁶ DOLMANS, D.E.J.G.J., FUKUMURA, D., & JAIN, R.K. (2003). Photodynamic Therapy for cancer. *Nature*, 3, 380-387.

⁶⁷ KALKA, K., MERK, H., & MUKHTAR, H. (2000). Photodynamic therapy in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 42:3, 389-413.

⁶⁸ BROWN, S.B., BROWN, E.A., & WALKER, I. (2004). The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncology*, 5, 497–508.

⁶⁹ CASTANO, A.P., MROZ, P., & HAMBLIN, M.R. (2006). Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature Reviews*, 6, 535- 545.

⁷⁰ DOUGHERTY, T.J., GOMER, C.J., HENDERSON, B.W., JORI, G., KESSEL, D., KORBELIK, M., MOAN, J., & PENG, Q. (1998). Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 90:12, 889-905.

⁷¹ TARDIVO, J.P., GIGLIO, A.D., de OLIVEIRA, C.S., GABRIELLI, D.S, JUNQUEIRA, H.C., TADA, D.B., SEVERINO, D., TURCHIELLO, R.F., & BAPTISTA, M.S. (2005). Methylene Blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. *Elsevier Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2, 175—191.

⁷² GILBERT, D.L., & COLTON, C.A. (2002). Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach. *Kluwer Academic Publishers*, pp. 1-731.

⁷³ KAMAL-ELDIN, A. (2003). Lipid Oxidation Pathways. *AOCS Press*, pp. 1-315.

⁷⁴ CATALA, A. (2012). Lipid Peroxidation. *InTech*, pp. 1-546.

⁷⁵ KOICHEVAR, I. E., LYNCH, M.C., ZHUANG, S.G., & LAMBERT, C.R. (2000). Singlet oxygen, but not oxidizing radicals, induces apoptosis in HL-60 cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 72, 548-553.

⁷⁶ JORI, G., & C. FABRIS, C. (2000) Relative apoptosis and random necrosis in tumor response to photodynamic therapy: effect of the chemical structure of Zn-phtalocyanines. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 43, 181-185.

⁷⁷ McBRIDE, G. (2002). Studies expand potential uses of photodynamic therapy. *JNCI Cancer Spectrum*, 94, 1740–1742.

⁷⁸ GREEN, D. R., & REED, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309-1312.

⁷⁹ DAUM, G. (1985). Lipids of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 822, 1-42.

⁸⁰ WAINWRIGHT, M. (2009). Photosensitizers in Biomedicine. *United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd*, pp. 1-282.

⁸¹ NYOKONG, T., & AHSEN, V. (2012). Photosensitizers in Medicine Environment and Security. *Springer Dordrech Heidelberg London New York*, pp. 1-671.

⁸² TARDIVO, J.P., GIGLIO, A.D., PASCHOAL, L.H., ITO, A.S., & BAPTISTA, M.S. (2004). Treatment of melanoma lesions using methylene blue and RL50 light source. *Photodiagnostic and Photodynamic Therapy*, 1, 345-346.

⁸³ KONIG, K., BOCKHORN, V., DIETEL, W., & SCHUBERT, H. (1987). Photochemotherapy of animal tumors with photosensitizer methylene blue using a krypton laser. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 113, 301-303.

⁸⁴ ORTH, K., RUSS, D., BECK, G., RUCK, A., & BERGER, H.G. (1998). Photochemotherapy of experimental colonic tumours with intra-tumorally applied methylene blue. *Archives of Surgery*, 383, 276-281.

⁸⁵ VILLANUEVA, A., CANETE, M., TRIGUEROS, C., RODRIGUEZ-BORLADO, L., & JUARRANZ, A. (1993). Photodynamic induction of DNA–protein cross-linking in solution by several sensitizers and visible light. *Biopolymers*, 33:2, 239-244.

⁸⁶ GEZE, M., MORLIERE, P., MAZIERE, J., SMITH, K., & SANTUS, R. (1993). Lysosomes, a key target of hydrophobic photosensitizers proposed for photochemotherapeutic applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 20:1, 23-35.

⁸⁷ GABRIELLI, D., BELISLE, E., SEVERINO, D., KOWALTOWSKI, A.J., & BAPTISTA, M.S. (2004). *Photochemistry and Photobiology*, 79:3, 227-232.

⁸⁸ CHANCE, B., SIES, H., & BOVERIS, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59, 527-605.

⁸⁹ ALBERTI, M.N., & ORFANOPOULOS, M. (2010). Unraveling the mechanism of the singlet oxygen ene reaction: recente computational and experimental approaches. *Chemistry, A European Journal*, 16, 9414-9421.

⁹⁰ SIES, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *American Journal of Medicine*, 91, 31-38.

⁹¹ WEBER, G., CHARITAT, T., BAPTISTA, M.S., UCHOA, A.F., PAVANI, C., JUNQUEIRA, H.C., GUO, Y., BAULIN, V.A., ITRI, R., MARQUES, C.M., & SCHRODER, A.P. Lipid oxidation induces structural changes in biomimetic membranes. *Soft Matter*, 10, 4241–4247.

⁹² LEWARS, E.G. (2011). *Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum mechanics*. Springer, pp. 1-664.

⁹³ CRAMER, C.J. (2004). *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*. John Willey & Sons, pp. 1-596.

⁹⁴ ALLEN, M.P., & TILDESLEY, D.J. (1987). *Computer Simulation of Liquids*. Estados Unidos: Oxford University Press, pp. 1-385.

⁹⁵ FRENKEL, D., & SMIT, B. (2002). *Understanding Molecular Simulations*. Academic Press, pp. 1-638.

⁹⁶ VERLET, L. (1967). Computer "Experiments" on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Physical Review*, 159:1, 98-103.

⁹⁷ SOLOV'YOV, I.A., YAKUBOVICH, A.V., NIKOLAEV, P.V., VOLKOVETS, I., & SOLOV'yYOV, A.V. (2012). Meso Bio Nano Explor – a universal program for multiscale computer simulations of complex molecular structure and dynamics. *Journal of Computational Chemistry*, 33, 2412-2439.

⁹⁸ KLAUDA, J.B., VENABLE, R.M., FREITES, J.A., O'CONNOR, J.W., TOBIAS, D.J., MONDRAGON-RAMIREZ, C., VOROBYOV, I., MACKERELL, A.D., & PASTOR, R.W. (2010). Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: Validation on Six Lipid Types. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114, 7830–7843.

⁹⁹ SCOTT, W.R.P, HÜNENBERGER, P.H., TIRONI, I.G., MARK, A.E., BILLETER, S.R., FENNER, J., TORDA, A.E., HUBER, T., KRÜGER, P., & VAN GUNSTEREN, W.F. (1999) The GROMOS biomolecular simulation program package. *The Journal of Physical Chemistry A*, 103(19), 3596 - 3607.

¹⁰⁰ CASE, D.A., CHEATHAM, T.E, DARDEN, T., GOHLKE, H., LUO, R., MERZ, K.M., ONUFRIEV, A., SIMMERLING, C., WANG, B., & WOODS, R.J. (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *Journal Computational Chemistry*, 26, 1668–1688.

¹⁰¹ YOUNG, D. (2001). Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real World Problems. *John Willey & Sons*, pp 1-381.

¹⁰² DELEEUW, S.W., PERRAM, J.W., S & MITH, E.R. (1980). Simulation of Electrostatic Systems in Periodic Boundary Conditions. I. Lattice Sums and Dielectric Constants. *Royal Society of London*, 373, 27-56.

¹⁰³ HOCKEY, R.W., & EASTWOOD, J.W. (1981). Computer Simulation using Particles, *McGraw-Hill*, New York.

¹⁰⁴ DARDEN, T., YORK, D., & PEDERSEN, L. (1993). Particle Mesh Ewald: An N.log(N) method for ewald sums in large systems. *Journal of Chemical Physics*, 98(12), 10089-10092.

¹⁰⁵ ESSMANN, U., PERERA, L., BERKOWITZ, M.L., DARDEN, T.A., LEE, H.L., & PEDERSEN, L.G. (1995). A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics*, 103 (19), 8577-8593.

¹⁰⁶ MARTÍNEZ, L., ANDRADE, R., BIRGIN, E.G., & MARTÍNEZ, J.M. (2009). Packmol: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 30:13, 2157-2164.

¹⁰⁷ JORGENSEN, W., CHANDRASEKHAR, J.M., MADURA, J.D., IMPERY, R.W., & KLEIN, M.L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, 79, 926–935.

¹⁰⁸ LEE, S., TRAN, A., ALLSOPP, M., LIM, J.B., HÉNIN, J., & KLAUDA, J.B. (2014). CHARMM36 United Atom Chain Model for Lipids and Surfactants. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118, 547–556.

¹⁰⁹ AGUAYO, D., GONZÁLEZ-NILO, F.D., & CHIPOT, C. (2012). Insight into the Properties of Cardiolipin Containing Bilayers from Molecular Dynamics Simulations, Using a Hybrid All-Atom/United-Atom Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8, 1765–1773.

¹¹⁰ HÉNIN, J., SHINODA, W., & KLEIN, M. L. (2008). United-atom acyl chains for CHARMM phospholipids. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112, 7008–7015.

¹¹¹ GARREC, J., MONARI, A., ASSFELD, X., MIR, L.M., & TAREK, M. (2014). Lipid Peroxidation in Membranes: The Peroxyl Radical Does Not “Float”. *The Journal of Physical Chemical Letters*, 5, 1653–1658.

¹¹² VANOMMESLAEGHE, K., HATCHER, E.C ACHARYA, C., KUNDU, S., ZHONG, S., SHIM, J., DARIAN, E., GUVENCH, O., LOPES, P., VOROBYOV, I., & MACKRELL, A.D. (2010). 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*, 31, 671–690.

¹¹³ HUMPHREY, W., DALKE, A., & SCHULTEN, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*, 14(1), 33-38.

¹¹⁴ BRENEMAN, C. M., & WIBERG, K. B. (1990). Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials. The need for high sampling density in formamide conformational analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 11, 361-373.

¹¹⁵ KLAMT, A., & SCHÜÜRMAN, G. (1993). COSMO: A New Approach to Dielectric Screening in Solvents with Explicit Expressions for the Screening Energy and its Gradient. *Journal of Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 799–805.

¹¹⁶ NEESE, F. (2012). "The ORCA program system". *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 2:1, 73–78.

¹¹⁷ PHILLIPS, J.C., BRAUN, R., WANG, W., GUMBART, J., TAJKHORSHID, E., VILLA, E., CHIPOT, C., SKELL, R.D., KALE, L., & SCHULTEN, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 26:1781-1802.

¹¹⁸ VEGA, C.; & de MIGUEL, E. (2007). Surface tension of the most popular models of water by using the test-area simulation method. *The Journal of Chemical Physics*, 126, 154707(1)-(10).

¹¹⁹ HOOVER, W. G. (1985). Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Physical Review A*, 31:3, 1695.

¹²⁰ ROMO, T.D., & GROSSFIELD, A. (2009). "LOOS: An extensible platform for the structural analysis of simulations." *31st Annual International Conference of the IEEE EMBS*, 2332-2335.

¹²¹ SEELIG, J., & SEELIG, A. (1974). Deuterium magnetic resonance studies of phospholipid bilayers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 57:2, 406-411.

¹²² SACHS, N.J., CROZIER, P.S., & WOOLF, T.B. (2004). Atomistic simulations of biologically realistic transmembrane potential gradients. *The Journal of Chemical Physics*, 121:22, 10847-10851.

¹²³ Disponível em: <https://en.wikipedia.org/wiki/Radial_distribution_function>. Acessado em 20/12/2015.

¹²⁴ SIANI, P. Estudo via Dinâmica Molecular dos compostos Azul de Metileno e 1,9-Dimetil Azul de Metileno em membrana modelo de POPC. (2013). 99 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Brasil.

¹²⁵ DARVE, E., RODRÍGUEZ-GÓMEZ, D., & POHORILLE, A. (2008). Adaptive biasing force method for scalar and vector free energy calculations, *Journal of Chemical Physics*, 128, 144120.

¹²⁶ HÉNIN, J., FORIN, G., CHIPOT, C., & KLEIN, M. L. (2010). Exploring multidimensional free energy landscapes using time-dependent biases on collective variables, *Journal of Chemical Theory and Computation*, 6, 35–47.

¹²⁷ STRAATSMA, T.P., & McCAMMON, J.A. (1991) Multiconfiguration thermodynamic integration. *Journal of Chemical Physics*, 95, 1175–1118.

¹²⁸ HUMMER, G., & SZABO, A. (1996). Calculation of free-energy differences from computer simulations of initial and final states. *The Journal of Chemical Physics*, 105(5), 2004-2010.

¹²⁹ STANCU, D.D., & STROUD, A.H. (1963). Quadrature formulas with simple Gaussian nodes and multiple fixed nodes. *Mathematics of Computation*, 17, 384-394.

¹³⁰ SCHMIDT, T.F., CASELI, L., OLIVEIRA, O.N., & ITRI, R. (2015). Binding of Methylene Blue onto Langmuir monolayers representing cell membranes may explain its efficiency as photosensitizer in photodynamic therapy. *Langmuir*, 31:14, 4205-4212.

¹³¹ KHABIRI, M., ROESELOVA, M., & CWIKLIK, L. (2012). Properties of oxidized phospholipid monolayers: an atomistic molecular dynamics study. *Chemical Physics Letter*, 519-520, 93-99.

¹³² SABATINI, K., MATTILA, J.P., MEGLI, F.M., & KINNUNEN, P.K. (2006). Characterization of two oxidatively modified phospholipid in mixed monolayers with DPPC. *Biophysical Journal*, 90:12, 4488-4499.

¹³³ THOMPSON, K.C., RENNIE, A.R., KING M.D., HARDMAN, S.J., LUCAS, C.O., PFRANG, C., HUGHES, B.R., & HUGHES, A.V. (2010). Reaction of a phospholipid monolayer with gas-phase ozone at the air-water interface: measurement of surface excess and surface pressure in real time. *Langmuir*, 26:22, 17295-17303.

¹³⁴ CWIKLIK, L., & JUNGWIRTH, P. (2010). Massive oxidation of phospholipid membranes leads to pore creation and bilayer disintegration. *Chemical Physics Letters*, 486, 99-103.

¹³⁵ GUO, Y., BAULIAN, V.A., & THALMANN, F. (2015). Peroxidised phospholipid bilayers: insight from coarse-grained molecular dynamics simulations. *Soft Matter*, DOI: 10.1039/c5sm01350j.

¹³⁶ ANTUNES, F., SALVADOR, A., MARINHO, H.S., ALVES, R., & PINTO, R.E. (1996). Lipid Peroxidation in Mitochondrial Inner Membranes I. An Integrative Kinetic Model. *Free Radical Biology & Medicine*, 21:7, 917-943.

¹³⁷ MUSATOV, A., FABIAN, M., & VARHAC, R. (2013). Elucidating the mechanism of ferrocytochrome c heme disruption by peroxidized cardiolipin. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 18, 137-144.

¹³⁸ LIU, A., & QI, X. (2012). Molecular dynamics simulations of DOPC lipid bilayers: the effect of Lennard-Jones parameters of hydrocarbon chain. *Computational Molecular Bioscience*, 2, 78-82.

¹³⁹ WONG-EKKABUT, J., XU, Z., TRIAMPO, W., TANG, I.-M., TIELEMAN, D. P., & MOTICELLI, L. (2007). Effect of Lipid Peroxidation on the Properties of Bilayers: A Molecular Dynamics Study. *Biophysical Journal*, 93, 4225–4236.

¹⁴⁰ JARERATTANACHAT, V., KARTTUNEN, M., & WONG-EKKABUT, J. (2013). Molecular Dynamics Study of Oxidized Lipid Bilayers in NaCl Solution. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117, 8490–8501.

¹⁴¹ RISKE, K.A., SUDBRACK, T.P., ARCHILHA, N.L., UCHOA, A.F., SCHRODER, A.P., MARQUES, C.M., BAPTISTA, M.S., & ITRI, R. (2009). Giant vesicles under oxidative stress induced by a membrane-anchored photosensitizer. *Biophysical Journal*, 97, 1362-1370.

¹⁴² BOONNOY, P., JARERATTANACHAT, V., KARTTUNEN, M., & M, WONG-EKKABUT, J. (2015). Bilayer deformation, pores, and micellation induced by oxidized lipids. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 6, 4884-4888.

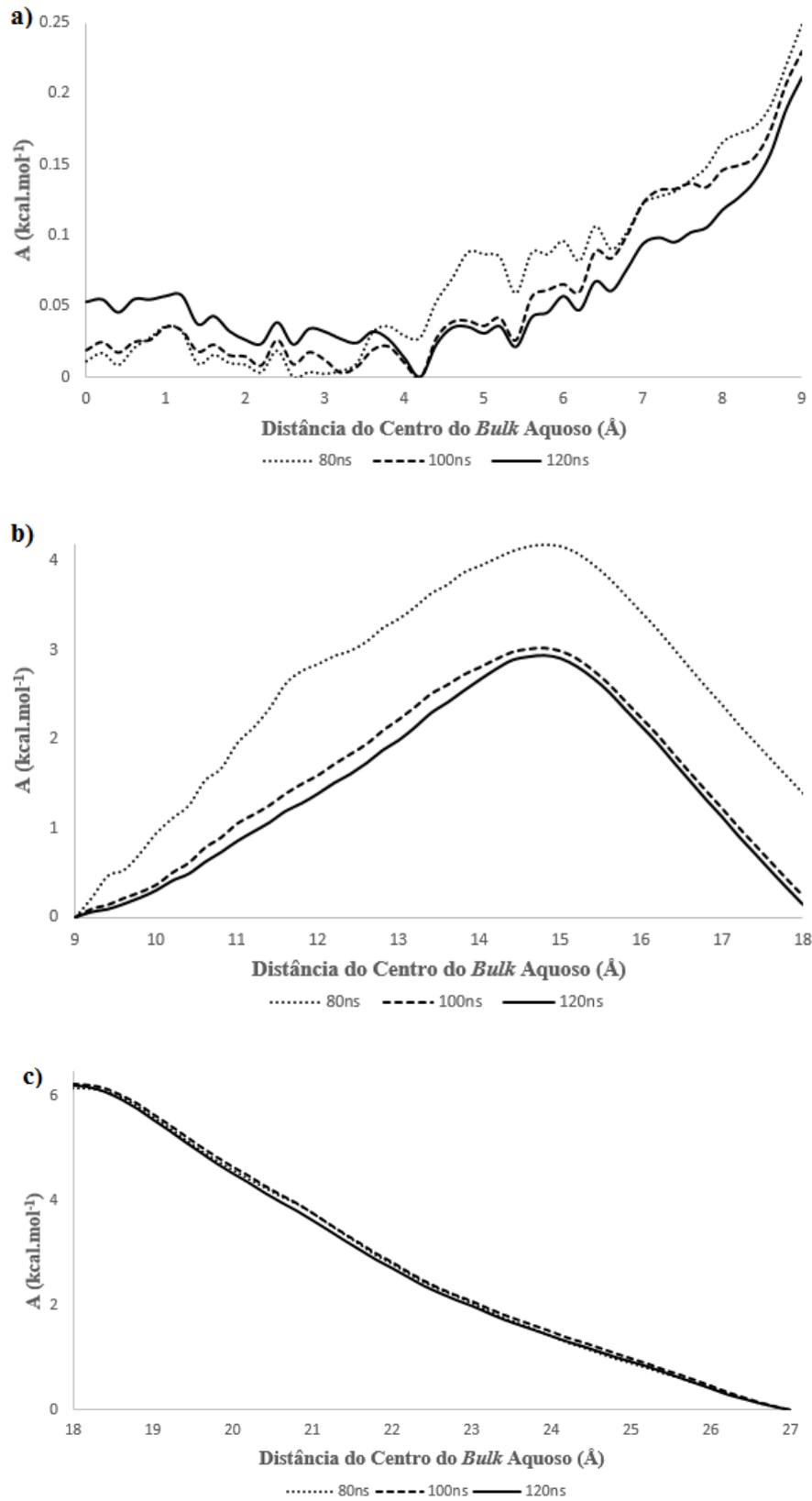
¹⁴³ KHANDELIA, H., & MOURITSEN, O.G. (2009). Lipid Gymnastics: evidence of complete acyl chain reversal in oxidized phospholipid from molecular simulations. *Biophysical Journal*, 96, 2734-2743.

¹⁴⁴ LILJEBLAD, J.F.D., BULONE, V., TYRODE, E., RUTLAND, M.W., & JOHNSON, C.M. (2010). Phospholipid monolayers probed by vibrational sum frequency spectroscopy: instability of unsaturated phospholipids. *Biophysical Journal*, 98:10, L50-L52.

¹⁴⁵ WOLF, D., KEBLINSK, P., PHILLPOT, S.R., & EGGBRECHT, J. (1999). Exact method for the simulation of coulombic systems by spherically truncated, pairwise r^{-1} summation. *Journal of Chemical Physics*, 110:17, 8254-8282.

¹⁴⁶ OLOFSSON, G., & SPARR, E. (2013). Ionization constants pK_a of cardiolipina. *Plos One*, 8:9, 1-6.

APÊNDICE 1 - Convergência das curvas ABF



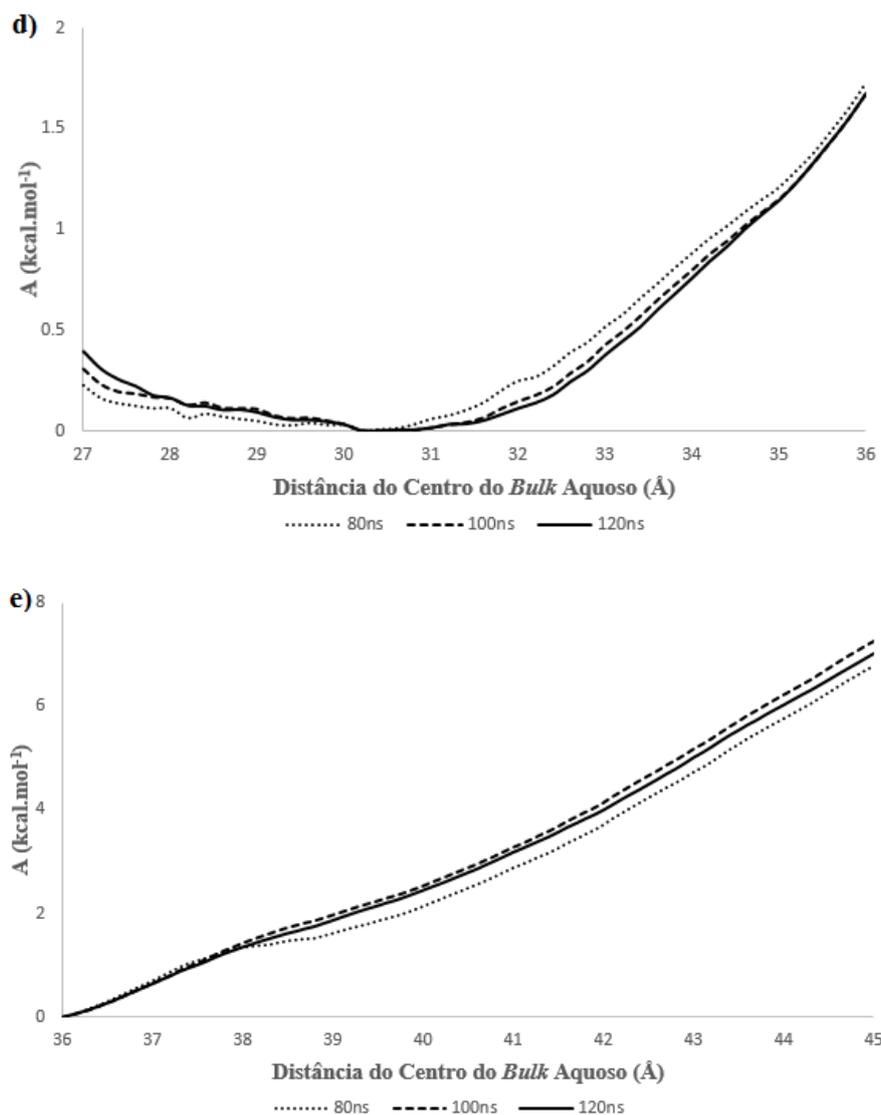
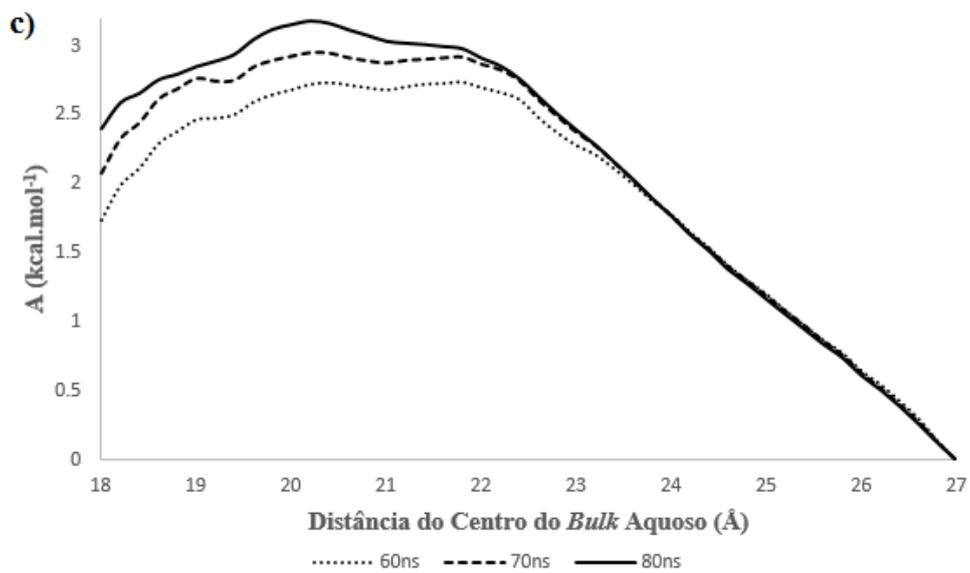
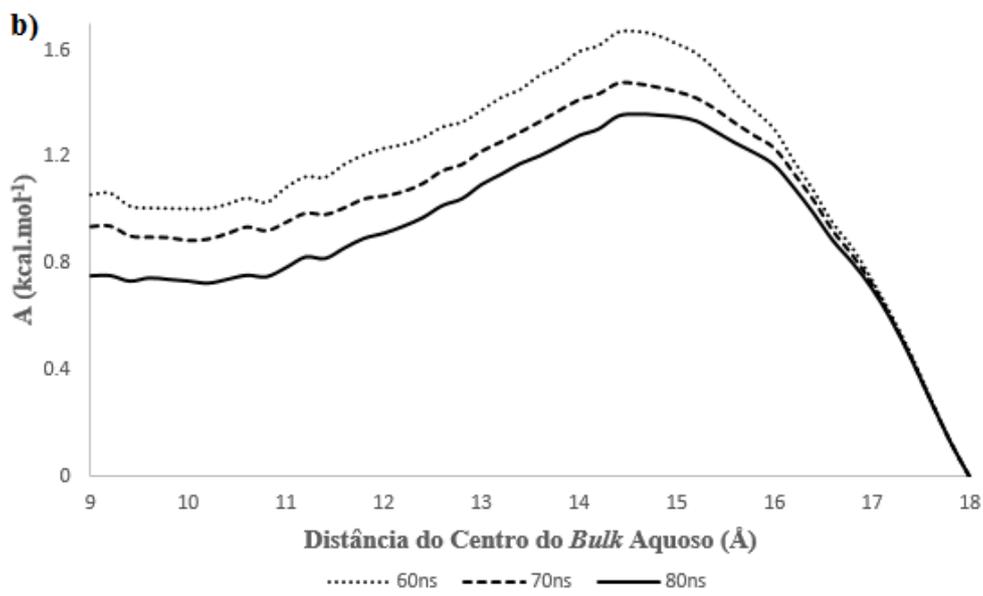
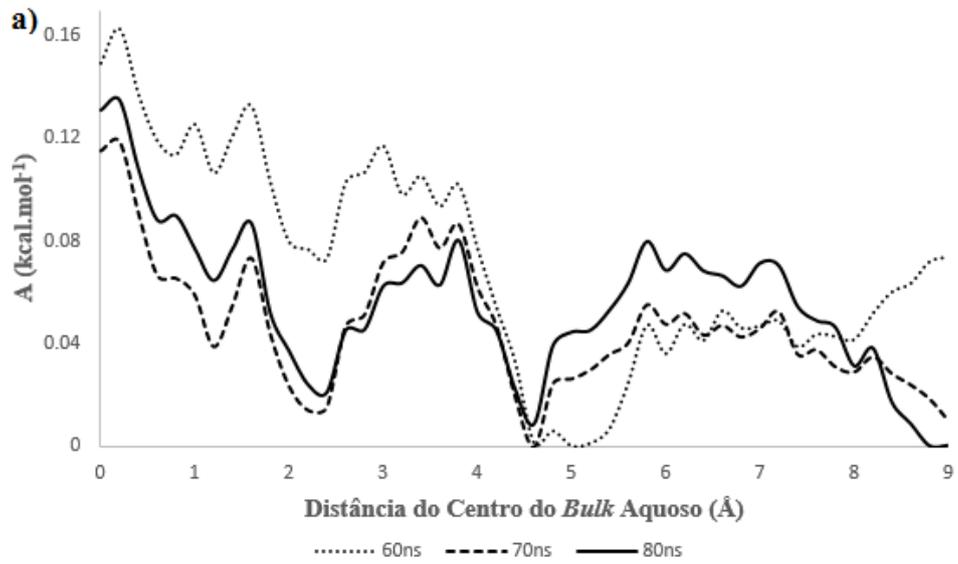


Figura A1.1. Perfis de energia livre do AM descarregado na monocamada de DOPC exibidos após 80ns, 100ns e 120ns de amostragem mostrando a convergência para cada janela simulada pelo método ABF. Janela de **a)** 0 a 9 Å **b)** 9 a 18 Å **c)** 18 a 27 Å **d)** 27 a 36 Å **e)** 36 a 45 Å.



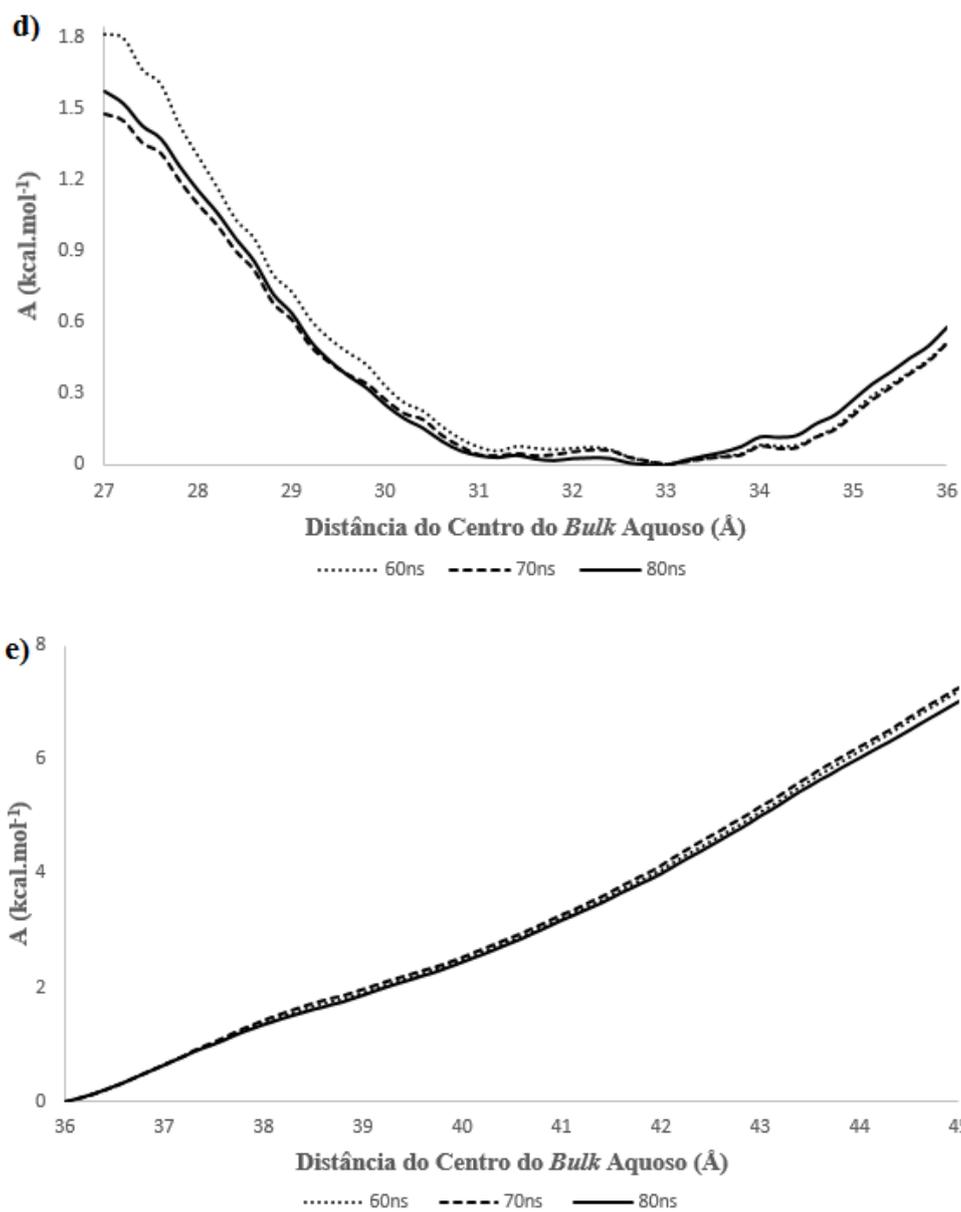
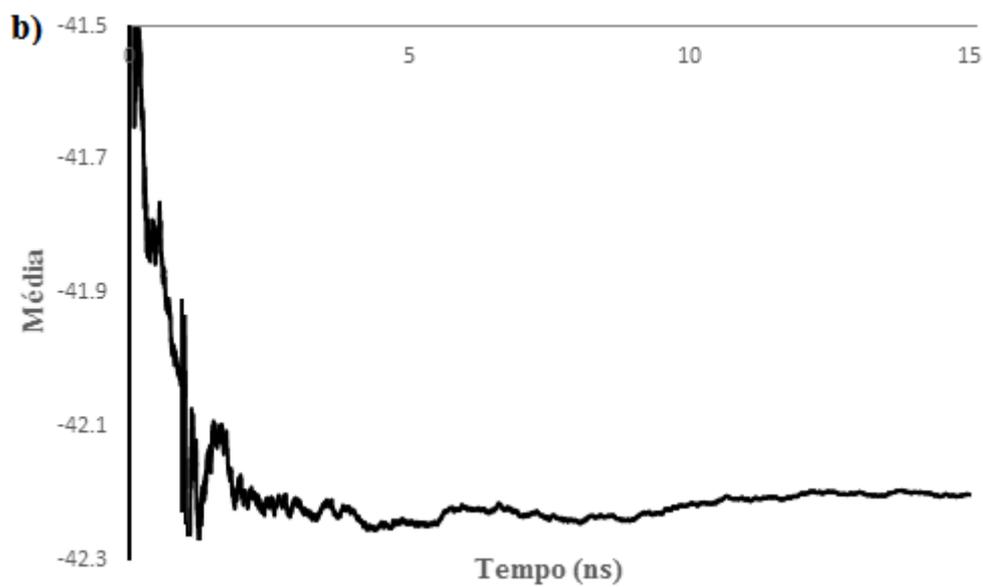
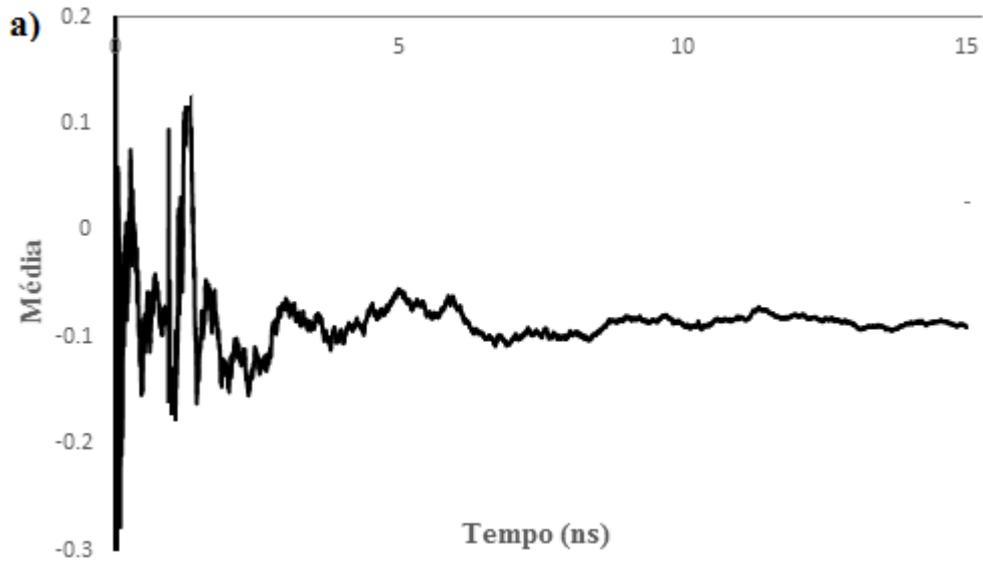


Figura A1.2. Perfis de energia livre do AM descarregado na monocamada de DOPC-OOH exibidos após 60ns, 70ns e 80ns de amostragem mostrando a convergência para cada janela simulada pelo método ABF. Janela de **a)** 0 a 9 Å **b)** 9 a 18 Å **c)** 18 a 27 Å **d)** 27 a 36 Å **e)** 36 a 45 Å.

APÊNDICE 2 - Média em função do tempo para os termos $\langle V \rangle_\lambda$

Trabalho eletrostático reversível para o processo $AM^{(0)} \rightarrow AM^{(1+)}$ ilustrativo apenas para o caso do *bulk* aquoso, em gaiola de pseudo-partículas de arestas 50 \AA .



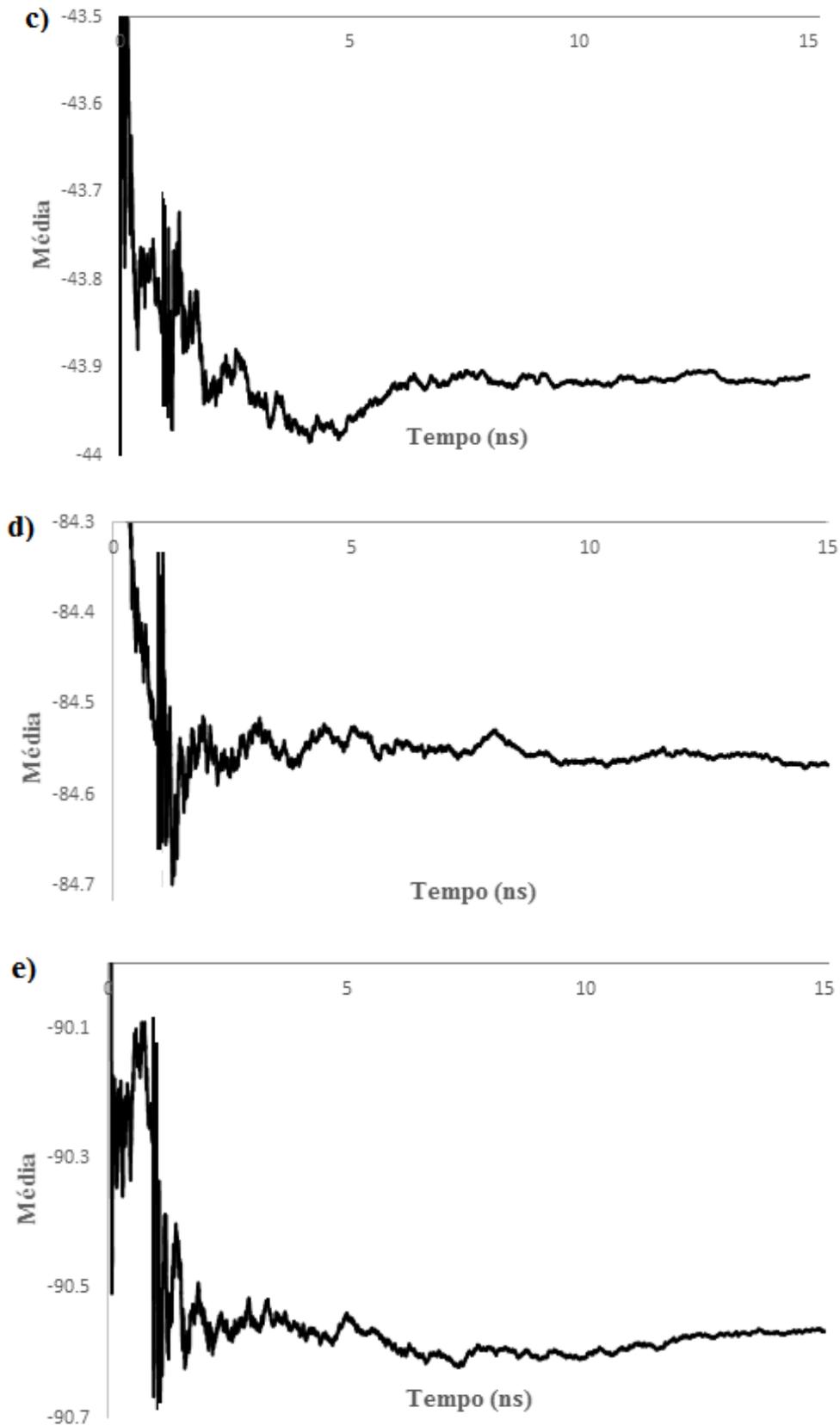


Figura A2.1 Média em função do tempo para os termos $\langle V \rangle_\lambda$ para a gaiola cúbica de pseudo-partículas com arestas de 50 Å; **a)** $\lambda = 0$ para AM^M e AM^B **b)** $\lambda = 0.5$ para AM^M **c)** $\lambda = 0.5$ para AM^B **d)** $\lambda = 1$ para AM^M **e)** $\lambda = 1$ para AM^B