



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Rafaela Magalhães Tavares

Estudos da interação de peptídeos antimicrobianos com modelo de
membrana por simulações de dinâmica molecular

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2016

RAFAELA MAGALHÃES TAVARES

Estudos da interação de peptídeos antimicrobianos com modelo de membrana por simulações de dinâmica molecular

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Suman de Araujo

São José do Rio Preto

2016

Tavares, Rafaela Magalhães.

Estudos da interação de peptídeos antimicrobianos com modelo de membrana por simulações de dinâmica molecular / Rafaela Magalhães Tavares. -- São José do Rio Preto, 2016
48 f. : il., tabs.

Orientador: Alexandre Suman de Araujo

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Biofísica. 3. Dinâmica molecular.
4. Antibióticos peptídicos. 5. Energia livre. I. Araujo, Alexandre Suman de. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.
CDU – 539.2

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

RAFAELA MAGALHÃES TAVARES

Estudos da interação de peptídeos antimicrobianos com modelo de membrana por simulação de Dinâmica Molecular

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Alexandre Suman de Araujo

UNESP – São José do Rio Preto

Orientador

Prof. Dr. José Roberto Ruggiero

UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dra. Natália Bueno Leite Slade

Unilago – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 01 de março de 2016

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me dar a chance de viver a cada novo dia.

Ao Professor Doutor Alexandre Suman de Araujo pela orientação e acima de tudo, por todo conhecimento transmitido, sem o qual este trabalho não seria realizado. Por toda paciência e companheirismo.

À UNESP-IBILCE e ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, que por meio dos professores e funcionários possibilitaram a realização deste trabalho.

À Capes por todo apoio financeiro ao longo do mestrado.

Aos meus familiares, em especial meu pai Antônio Claudio, minha mãe Laura e minhas irmãs Juliana e Polyanna, por todo apoio e carinho dado por todos esses anos.

Ao Paulo pelos conselhos, incentivo e por enfrentar comigo cada momento deste trabalho.

Aos companheiros de grupo Tabata, Luís Fernando, Carolina, Ingrid e Gabriela, por todo conhecimento compartilhado.

Aos colegas e amigos de departamento, que tornaram todos esses anos muito melhores.

A todos que participaram desses anos de crescimento e amadurecimento em minha vida.

“É preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer as borboletas”
Antoine de Saint-Exupéry

Resumo

Nos últimos anos, o interesse por estudar peptídeos com atividade antimicrobiana e anticâncer tem aumentado consideravelmente. Neste trabalho, direcionamos nossos estudos para os peptídeos antimicrobianos da classe dos matoparanos extraídos do veneno da vespa social *Polybia paulista*: o *Polybia*-MP III (MP-III), *Polybia*-MP I (MP-I) e seu sintético análogo, o Asn2-*Polybia*-MP I (NMP-I). Com o objetivo de estudar a interação desses peptídeos com um modelo de membrana composta por lipídeos do tipo POPC (Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Colina) em solução aquosa, realizamos dois tipos de simulações de Dinâmica Molecular (DM). Primeiramente, foram realizadas simulações no equilíbrio com a finalidade de amostrar o comportamento geral do sistema. Em seguida, para investigarmos especificamente o processo de adsorção do peptídeo à bicamada, realizamos simulações de DM com a utilização do método Adaptive Biasing Force (ABF), o que nos permitiu calcular o perfil de energia livre desse processo. Dentre os três peptídeos estudados, o que mais se destacou com relação a sua interação com o modelo de membrana, na simulação no equilíbrio, foi o peptídeo MP-I, por ser o único a se adsorver na bicamada com 200ns de simulação. Com a utilização do método ABF, verificamos que a posição mais estável para cada peptídeo é a posição na qual estes estão paralelos à face da bicamada, com a face hidrofóbica de cada peptídeo voltada para o interior da membrana, e a face hidrofílica voltada para o meio aquoso. Além disso, os resíduos hidrofílicos estão em contato com o grupo polar dos fosfolipídeos e com a água, e o resíduo de triptofano encontra-se posicionado na interface hidrofóbica/hidrofílica. Os resultados obtidos na simulação no equilíbrio para o peptídeo MP-I, que foi o único a se adsorver na bicamada, estão de acordo com os resultados obtidos pelo método ABF, e ambos concordam com resultados experimentais da literatura.

Palavras-Chaves: Peptídeos Antimicrobianos, Dinâmica Molecular, Modelo de Membrana, Energia livre, Método Adaptive Biasing Force.

Abstract

In recent years, interest in studying peptides with antimicrobial and anti-cancer activity has increased considerably. In this study, we focus our studies on antimicrobial peptides of the mastoparans class extracted from the venom of the social wasp *Polybia paulista*: the *Polybia*-MP III (MP III), *Polybia*-MP I (MP-I) and its synthetic analogue, the Asn2-*Polybia*-MP I (NMP-I). In order to study the interaction of these peptides with a model of membrane composed of POPC (Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidyl-Choline) lipids type in aqueous solution, we conducted two types of molecular dynamics simulations (MD). At first, a balance system simulation was performed in order to get a sampling of the general behavior of the system. Then, to investigate the adsorption of the peptide to the bilayer, MD simulations using Adaptive Biasing Force (ABF) method was performed, which allowed us to calculate the free energy profile of this process. Among the three studied peptides, the MP-I peptide was the one that stood out related to its interaction with the membrane model, in the simulation on balance, for being the one to adsorb the bilayer with simulation of 200ns. Using the ABF method, we verified that the most stable position for each peptide is the position in which they are parallel to the surface of the bilayer with the hydrophobic side of each peptide facing into the membrane, and the hydrophilic side facing the aqueous solution. In addition, the hydrophilic residues are in contact with the polar group of the phospholipid and water, and the tryptophan residue is positioned on the hydrophobic/hydrophilic interface. The results of the simulation in balance for the MP-I peptide, which was the only adsorbed in the bilayer, are in agreement with the results obtained by the method ABF, and both agree with experimental results in the literature.

Keywords: Antimicrobial Peptides, Molecular Dynamics, Model membrane, Free Energy, Adaptive Biasing Force Method

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura geral dos aminoácidos.	12
Figura 2: Mecanismo teórico de inserção de peptídeos antimicrobianos em bicamadas lipídicas...	13
Figura 3: Sequência primária dos peptídeos <i>Polybia</i> -MPI, <i>Polybia</i> -MPIII e <i>Asn2-Polybia</i> -MPI. ..	15
Figura 4: <i>Helical Wheel</i> da sequência de aminoácidos do (A) peptídeo <i>Polybia</i> -MP I, (B) <i>Polybia</i> -MP III e (C) <i>Asn2-Polybia</i> -MP I.	15
Figura 5: Representação bidimensional da caixa de simulação em condições periódicas de contorno.....	22
Figura 6: Representação do raio de corte em um sistema bidimensional.	23
Figura 7: Definição do eixo molecular \mathbf{i} e da Normal da bicamada.....	26
Figura 8: Estrutura do lipídeo POPC (Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Colina).	27
Figura 9: Esquema representativo da caixa de simulação.....	29
Figura 10: Ilustração da coordenada de reação utilizada para a simulação dos sistemas utilizando o método ABF.....	31
Figura 11: Simulação de um sistema em regime NPT.....	32
Figura 12: Área por lipídeo em relação ao tempo.	33
Figura 13: Perfil de Densidade de Massa da bicamada de POPC em relação ao eixo z.	34
Figura 14: Parâmetro de Ordem das cadeias acílicas da membrana pura.	34
Figura 15: Gráfico do cálculo da distância entre o centro de massa da membrana ao centro de massa do resíduo de triptofano. (A) MP-I, (B)MP-III e (C) NMP-I.	36
Figura 16: Perfil de Densidade de Massa do sistema Peptídeo-Membrana de POPC em relação ao eixo z. (A) MP-I, (B)MP-III e (C) NMP-I.	37
Figura 17: Parâmetro de ordem para as cadeias acílicas dos lipídeos no processo de interação com o peptídeo. (A) MP-I, (B)MP-III e (C) NMP-I.	38
Figura 18: Estrutura secundária por resíduo em função do tempo de simulação. (A) MP-I, (B)MP-III e (C) NMP-I.	39
Figura 19: Visualização da posição do peptídeo MP-I após 200ns de simulação.....	40
Figura 20: Perfil de Energia Livre para o processo de inserção do peptídeo em bicamada lipídica	43
Figura 21: Perfil de Energia Livre após a convergência e amostragem do sistema ao longo da coordenada de reação.	44

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição e parâmetros de simulação do modelo de membrana.	28
Tabela 2: Composição dos sistemas compostos pelos peptídeos e membrana.....	30
Tabela 3: Parâmetros de simulação para os sistemas compostos pelos peptídeos e membrana	30

Lista de Siglas, Símbolos e Abreviaturas

Å	Angstrom ($10^{-10}m$)
ABF	<i>Adaptive Biasing Force</i>
Ala	Alanina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido Aspártico
CHARMM	<i>Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics</i>
CPC	Condições Periódicas de Contorno
DM	Dinâmica Molecular
Cl ⁻	Cloro
fs	Femtosegundo ($10^{-15}s$)
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
Ile	Isoleucina
K	Graus Kelvin
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
MP-I	<i>Mastoparan Polybia-MP I</i>
MP-III	<i>Mastoparan Polybia-MP III</i>
Na ⁺	Sódio
NAMD	<i>NAnoscale Molecular Dynamics</i>
NMP-I	<i>Mastoparan Asn2-Polybia-MP I</i>
ns	Nanosegundo ($10^{-9}s$)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PDM	Perfil Densidade de Massa
POPC	Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Colina
PSF	<i>Protein Structure File</i>
S	Parâmetro de Ordem
Trp	Triptofano
Val	Valina

VMD	<i>Visual Molecular Dynamics</i>
μs	Microsegundo (10^{-6}s)
ξ	Coordenada de Reação

Sumário

1. Introdução	12
2. Objetivo.....	17
3. Metodologia	18
3.1. Campo de Força.....	18
3.1.1. Potenciais ligados.....	18
3.1.2. Potenciais não-ligados.....	19
3.2. Dinâmica Molecular	20
3.3. Condições Periódicas de Contorno.....	22
3.4. Adaptive Biasing Force	23
3.5. Análises aplicadas	25
3.5.1. Perfil de densidade de massa	25
3.5.2. Área por lipídeo	25
3.5.3. Parâmetro de ordem	25
3.5.4. Estrutura Secundária	26
4. Detalhes Computacionais.....	27
4.1. Construção e equilibração da bicamada lipídica	27
4.2. Inclusão dos peptídeos e simulação dos sistemas em equilíbrio	29
4.3. Simulação dos sistemas com o Método ABF.....	31
5. Resultados e discussão	32
5.1. Equilibração da membrana de POPC	32
5.2. Simulação dos peptídeos em membrana de POPC no equilíbrio	35
5.3. Simulação dos peptídeos em membrana de POPC com a utilização do Método Adaptive Biasing Force (ABF).....	41
6. Conclusões	45
7. Referências.....	46

1. Introdução

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células vivas e participam de praticamente todos os processos celulares [1]. São constituídas por uma ou mais cadeias de aminoácidos. Os aminoácidos, por sua vez, são moléculas orgânicas compostas por um grupo carboxila (COO^-), um grupo amino (NH_3^+), um átomo de hidrogênio e uma cadeia lateral (grupo R), ligados covalentemente ao mesmo átomo de carbono (o carbono α), como pode ser visto na Figura 1. O que difere os 20 distintos aminoácidos encontrados na natureza são suas cadeias laterais, as quais variam em tamanho e estrutura [1, 2]. Os aminoácidos podem ser classificados por sua afinidade por água, pois o grupo R pode ser polar (hidrofílico) ou apolar (hidrofóbico). Além disso, os aminoácidos podem ser classificados de acordo com a carga que adquirem dependendo do pH do meio, podendo ser positivos, negativos ou neutros [1, 3].

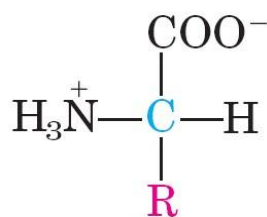


Figura 1: Estrutura geral dos aminoácidos. A cadeia lateral (grupo R) colorida em vermelho, ligada ao carbono α , em azul, é o que difere os aminoácidos existentes. O grupo carboxila, o grupo amino e o átomo de hidrogênio estão coloridos em preto [1].

Há um grande interesse em estudos relacionados à interação de peptídeos (nome dado para ligação de dois ou mais aminoácidos) com bicamadas lipídicas, especialmente nas áreas farmacológica e médica. Estima-se que mais de 70% dos fármacos disponíveis atuem por meio de proteínas de membrana [4]. A indústria farmacêutica possui urgência na descoberta de novas classes de antibióticos devido ao aumento na resistência dos microorganismos e nos últimos 40 anos apenas três novos antibióticos foram desenvolvidos. Por isso, muitas pesquisas estão sendo realizadas com o intuito de investigar a ação de peptídeos com atividade antimicrobiana para utilizá-los como novos antibióticos ou até mesmo em combinação com os antibióticos comerciais já conhecidos [5]. Além do interesse farmacológico, há também estudos realizados para a elucidação do mecanismo de

ação da interação de peptídeos com membranas.

Um antibiótico eficiente deve ter maior afinidade por células procariontes (bactérias) que por células eucariontes (animais e vegetais). Células bacterianas são mais simples que as células de eucariotos, uma vez que o seu conteúdo é menos complexo e não há um núcleo celular. O isolamento efetivo de células de bactérias se deve essencialmente a membrana, de modo que seu núcleo é mais facilmente transposto que de células animais [2]. Outro fator importante na diferenciação é a composição da membrana celular, em que as de bactérias são compostas por fosfolipídios aniônicos enquanto que as bicamadas de eritrócitos são zwitteriônicas.

Os peptídeos antimicrobianos possuem grande importância no mecanismo de defesa de organismos e formam um grupo diversificado de moléculas produzidas de uma variedade de espécies de seres vivos [6]. Eles são divididos em famílias com base na sua estrutura e sequência de resíduos de aminoácidos.

Vários mecanismos de inserção de peptídeos antimicrobianos em bicamadas lipídicas estudados com diferentes peptídeos foram propostos e conduziram a elaboração de três modelos principais: o modelo Barril, o modelo Carpete e o modelo Poro Toroidal. No primeiro, modelo Barril (Figura 2 (A)), os peptídeos agregados e estruturados em α -hélice anfipática formam um canal transmembrânico, de modo que a face hidrofóbica dos peptídeos se alinha com as caudas apolares dos fosfolipídios e a face hidrofílica dos peptídeos forma a região interior do poro, onde a entrada de água e outras moléculas podem ocorrer. Neste modelo, as cabeças polares dos

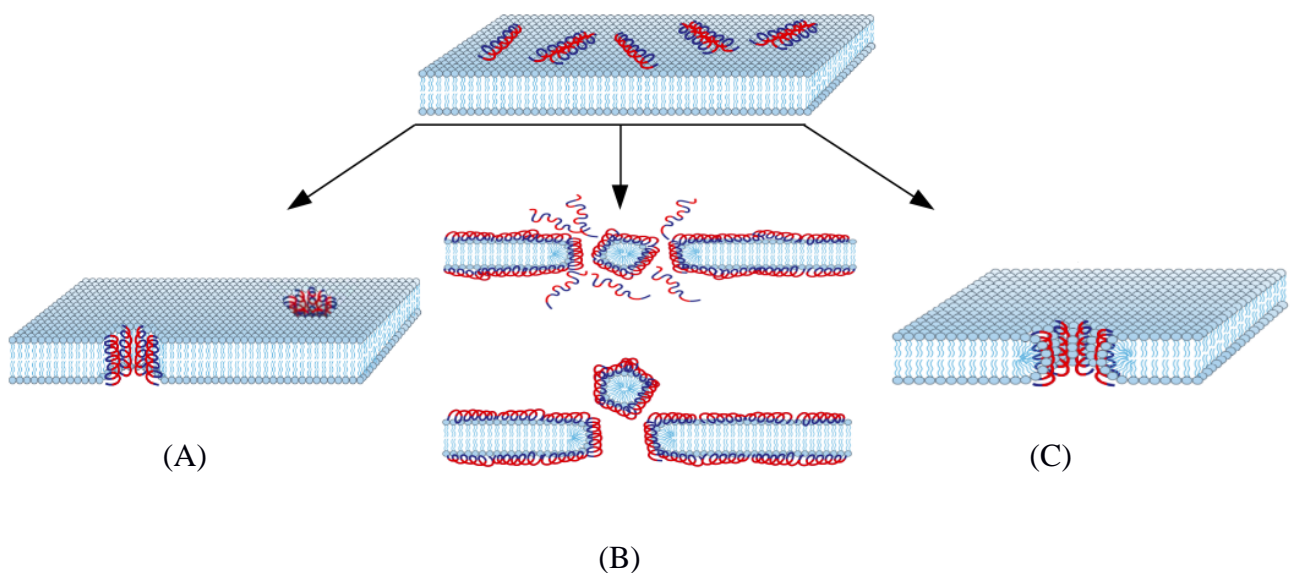


Figura 2: Mecanismo teórico de inserção de peptídeos antimicrobianos em bicamadas lipídicas. A face hidrofílica dos peptídeos está colorida em vermelho. A face hidrofóbica dos peptídeos está colorida em azul. Em (A) está a representação do Modelo Barril. Em (B) está a representação do Modelo Carpete. Em (C) está a representação do Modelo Poro Toroidal.

fosfolipídios permanecem localizadas na interface água-membrana [7, 8]. No segundo, modelo Carpete (Figura 2 (B)), os peptídeos se orientam primeiramente de forma paralela à superfície da bicamada lipídica, formando uma camada extensiva como um carpete. Em altas concentrações locais de peptídeos ocorre um aumento na permeabilidade da membrana podendo resultar numa eventual ruptura da mesma [7]. Por fim, no modelo Poro Toroidal (Figura 2 (C)), os peptídeos estruturados em α -hélice anfipática se agregam à bicamada e interagem com as cabeças polares dos fosfolipídios da membrana, induzindo um encurvamento nas monocamadas lipídicas, de modo que a água no núcleo do poro possa interagir com os peptídeos inseridos e as cabeças lipídicas [7, 8].

Neste trabalho focaremos nossos estudos nos peptídeos antimicrobianos da classe dos mastoparanos, extraídos do veneno da vespa social *Polybia paulista* [9]. Os mastoparanos são os componentes mais abundantes no veneno de vespas. São peptídeos helicoidais, anfipáticos e catiônicos que, entre diversas funções biológicas, possui a ação antimicrobiana [5]. Normalmente possuem o resíduo C-terminal amidado, com sequência primária composta por resíduos de aminoácidos básicos e hidrofóbicos, como Alanina (A), Isoleucina (I) e Leucina (L) [10].

O fato dos mastoparanos serem peptídeos catiônicos aumenta sua afinidade por membranas compostas por fosfolipídios aniônicos, como as de bactérias. Entretanto, alguns apresentam ação hemolítica, o que indica que os mastoparanos também agem sobre membranas compostas em sua maior parte por fosfolipídios eletricamente neutros, o que torna importante o melhor entendimento da interação de tais peptídeos com essas membranas.

O peptídeo *Polybia*-MP I, *Polybia*-MP III e Asn2-*Polybia*-MP I são mastoparanos constituídos por 14 resíduos de aminoácidos (Figura 3). Estes peptídeos possuem estrutura α -helicoidal em meio aquoso, C-terminal amidado e são anfipáticos, isto é, quando estruturados possuem uma face hidrofílica e uma face hidrofóbica [9], como podemos ver na projeção *Helical Wheel* (Figura 4) da sequência de cada peptídeo. O peptídeo MP-I tem carga líquida +2 e hidrofobicidade média por resíduo igual a -0,11; o MP-III +1 e 0,6; e o NMP-I +3 e -0,10 [11]. Outra característica desses peptídeos é a existência de alguns aminoácidos básicos, no caso a Lisina (K), que são responsáveis pela presença de cargas positivas, e os aminoácidos de ácido aspártico (D) que possuem carga negativa. Além disso, apresentam o triptofano (W) na terceira posição na cadeia de aminoácidos. O triptofano funciona como um fluoróforo que torna possível a utilização de técnicas capazes de investigar o posicionamento do peptídeo em relação à água/bicamada lipídica. Estudos recentes mostraram que o MP-I pode apresentar significativa eficiência contra alguns tipos de células tumorais [12, 13].

A tendência atual é combinar métodos experimentais e computacionais para investigar as propriedades do sistema em questão. O estudo computacional das interações de peptídeos antimicrobianos com membranas modelos pode ajudar a entender as causas da atividade

bactericida, fornecendo informações como as que dizem respeito ao comportamento do sistema em escala atômica, que são raramente atingíveis por métodos experimentais.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
MP-I	Ile	Asp	Trp	Lys	Lys	Leu	Leu	Asp	Ala	Ala	Lys	Gln	Ile	Leu	NH ₂
MP-III	Ile	Asp	Trp	Leu	Lys	Leu	Gly	Lys	Met	Val	Met	Asp	Val	Leu	NH ₂
NMP-I	Ile	Asn	Trp	Lys	Lys	Leu	Leu	Asp	Ala	Ala	Lys	Gln	Ile	Leu	NH ₂

Figura 3: Sequência primária dos peptídeos *Polybia*-MP I, *Polybia*-MP III e *Asn2-Polybia*-MP I. Resíduos carregados positivamente estão coloridos em azul. Resíduos carregados negativamente estão coloridos em vermelho. Resíduo polar está colorido em verde e resíduos hidrofóbicos, em preto. Em cinza está a numeração correspondente a cada aminoácido.

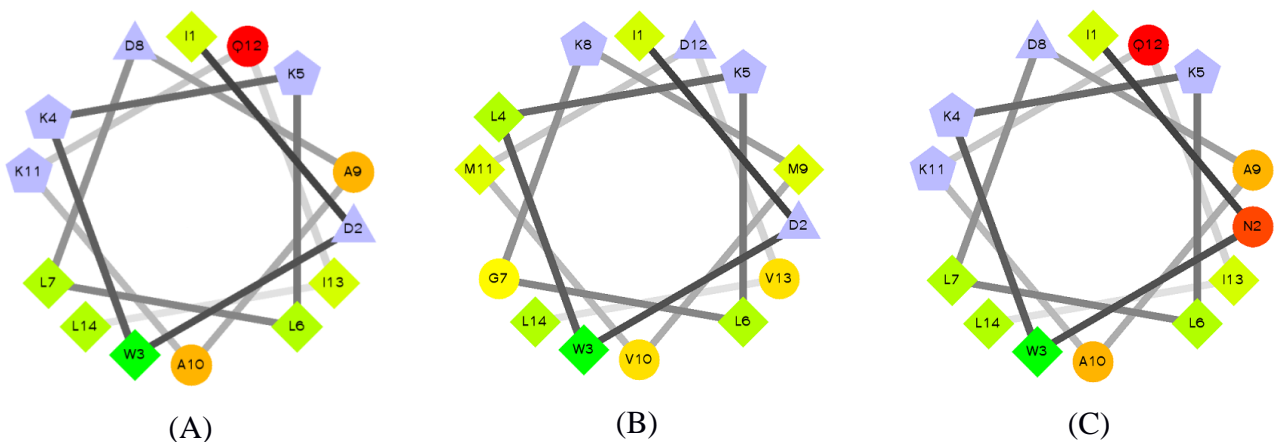


Figura 4: Helical Wheel da sequência de aminoácidos do (A) peptídeo *Polybia*-MP I, (B) *Polybia*-MP III e (C) *Asn2-Polybia*-MP I. Os resíduos hidrofílicos são representados em círculos e coloridos em vermelho para alta e em amarelo para baixa hidrofilicidade. Os resíduos hidrofóbicos são representados em losangos e são coloridos em verde, a intensidade do verde diminui proporcionalmente a hidrofobicidade. Carregados negativamente e carregados positivamente, estão representados em triângulos e pentágonos, respectivamente, coloridos em azul. [14].

Sistemas biológicos envolvem um elevado número de átomos e a realização de simulações utilizando Mecânica Quântica seria inviável. Uma alternativa é tratar o sistema com uma representação fundamentada nos princípios da Mecânica Clássica, que descreve por meio de aproximações em termos de posições e momento dos átomos e moléculas que constituem o sistema.

Simulações por Dinâmica Molecular (DM) tem sido uma ferramenta essencial para o entendimento da interação de peptídeos antimicrobianos com membranas modelo. Essas simulações associadas aos dados experimentais têm proporcionado compreensão em nível molecular da estrutura dos peptídeos, dos sistemas modelos de membranas e o modo como ambos interagem quando são colocados em contato.

Vendo a importância de realizar estudos por Dinâmica Molecular da interação de peptídeos antimicrobianos com membranas, nosso objetivo foi investigar interações dos peptídeos MP-I, MP-III e NMP-I com um modelo de membrana composta por Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Colina (POPC).

2. Objetivo

O presente trabalho teve como principais objetivos:

- Criar, estabilizar e validar um modelo mimético de membrana composto por POPC.
- Inserir os peptídeos MP-I, MP-III e NMP-I no sistema bicamada e investigar por meio de dinâmica molecular no equilíbrio, o comportamento de cada peptídeo na presença do modelo de membrana.
- Verificar, a conformação de mínima energia para cada sistema por meio do método Adaptive Biasing Force (ABF).
- Avaliar os resultados obtidos comparando os três peptídeos entre si.

3. Metodologia

3.1. Campo de Força

Simulações por dinâmica molecular tem sido uma ferramenta essencial para o estudo dos mais diversos sistemas. Essas simulações associadas a dados experimentais possibilitam a observação do comportamento em escala atômica de sistemas moleculares.

A função que descreve a energia potencial deve ser complexa o suficiente para uma análise realística da dinâmica do sistema e capaz de reproduzir as interações inter e intramoleculares, e ao mesmo tempo, deve ser simples para uma maior eficiência computacional dos cálculos. Um conjunto de funções potenciais de interação entre as partículas e parâmetros moleculares, ajustados a partir de cálculos quânticos e experimentais, é referido como Campo de Força [15].

De modo geral, a energia potencial total pode ser dividida em duas categorias: potenciais ligados e potenciais não-ligados. Os potenciais ligados, harmônico e torcional, descrevem ligações covalentes entre pares de átomos e ângulos de ligações próximas. Os potenciais não-ligados são compostos por termos de curto e longo alcance, como o de Van der Waals e eletrostático, e levam em conta repulsões e atrações eletrostáticas. Este potencial descreve interações entre átomos de duas moléculas separadas ou até mesmo em uma molécula individual, com exceção dos dois primeiros vizinhos quimicamente ligados, cujas interações destes são tratadas pelos potenciais ligados.

3.1.1. Potenciais ligados

Os comprimentos das ligações químicas entre dois átomos, em temperatura ambiente, oscilam em torno de um valor de equilíbrio, deste modo, sua função potencial aproximada tem a forma similar ao potencial de Hooke para um sistema massa-mola, como pode ser visto na Equação 1:

$$V_b = \sum_{\text{ligação}} K_b (r - r_0)^2 \quad (1)$$

onde K_b é a constante de Hooke, r_{ij} é o comprimento da ligação entre dois átomos em um instante

qualquer e r_0 o parâmetro que define o comprimento de equilíbrio da ligação.

O custo energético para produzir uma distorção do ângulo formado pela ligação covalente entre três átomos (equação 2) também pode ser descrita por um potencial harmônico:

$$V_{\theta} = \sum_{\text{ângulos}} K_{\theta} (\theta - \theta_0)^2 \quad (2)$$

onde K_{θ} é a constante elástica, θ é o ângulo entre duas ligações químicas consecutivas e θ_0 é o ângulo de equilíbrio entre as duas ligações químicas.

A rotação em torno de ligações químicas é descrita por um termo torcional e é feito por expansão em funções periódicas, desta forma, a torção do ângulo diedral formado pela ligação covalente de quatro átomos consecutivos é dado pelo potencial torcional (equação 3), na forma:

$$V_{\varphi} = \sum_{\text{dihedros}} K_{\varphi} [1 + \cos(n\varphi - \delta)] \quad (3)$$

onde K_{φ} é a constante que define a altura da barreira de torção, n é o número de mínimos para a torção de uma ligação química específica, φ é o ângulo diedral e δ é a diferença de fase, podendo esta ser igual a 0° ou 180° .

3.1.2. Potenciais não-ligados

Os potenciais que remetem à interação entre dois átomos não-ligados quimicamente, são compostos por termos de curtíssimo, curto e longo alcance. Tais termos incluem a repulsão e atração de Lennard-Jones e o termo eletrostático de Coulomb. Quando não há reações químicas, duas moléculas interagem entre si obedecendo aos potenciais desse tipo, ou até mesmo em uma molécula individual, com exceção dos vizinhos separados por até duas.

Pequenas flutuações na distribuição de cargas de um átomo na presença de outro, fazem com que estes dois passem a ter uma interação atrativa dipolo-dipolo, que é conhecida como interação de van der Waals. A medida que a distância entre estes dois átomos diminui quase ao ponto das nuvens eletrônicas se interpenetrarem, ocorre uma interação fortemente repulsiva, que é a manifestação do princípio de exclusão de Pauli.

Uma das funções potencial a qual obedece as características do comportamento de ser atrativa a curto alcance e repulsiva a curtíssimo alcance foi proposta por Lennard-Jones (equação 4) na forma:

$$V_{LJ} = \sum_{\text{n\~{a}o-ligantes}} 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (4)$$

onde i e j são os dois átomos interagentes, ε_{ij} é a profundidade do poço entre a barreira atrativa e a repulsiva, σ_{ij} é o diâmetro de Lennard-Jones e r_{ij} é a distância entre os núcleos atômicos.

A energia potencial eletrostática de longo alcance é dada pela lei de Coulomb (equação 5):

$$V_{el} = \sum_{\text{n\~{a}o-ligantes} } \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r r_{ij}} \quad (5)$$

onde q_i e q_j são as cargas dos átomos i e j , separados pela distância r_{ij} . A permissividade do espaço livre é ε_0 e a constante dielétrica do meio é ε_r . Esse potencial é dito de longo alcance, pois varia com o inverso da distância de separação entre os átomos.

Após a descrição de cada termo, é possível agora a construção da função energia potencial total do sistema, $V(\mathbf{r})$, que é dada pela equação 6:

$$V(\mathbf{r}) = V_b + V_\theta + V_\varphi + V_{LJ} + V_{el} \quad (6)$$

3.2. Dinâmica Molecular

O elevado número de átomos de um sistema biológico torna inviável computacionalmente o uso da descrição das interações por Mecânica Quântica de modo que optamos por uma representação fundamentada nos princípios da Mecânica Clássica. A Dinâmica Molecular trata as moléculas como uma coleção de átomos unidos por forças, ignorando seus elétrons e é descrita por meio de aproximações em termos das posições e momento das partículas constituintes no sistema: os átomos e moléculas. Sendo assim, é possível escrever a Hamiltoniana (equação 7) do sistema, que é a soma das energias cinética e potencial [15]:

$$H = \sum_{i=1}^N \frac{(\mathbf{p}_i)^2}{2m_i} + V(\mathbf{r}_i) \quad (7)$$

onde N é o número total de átomos do sistema e m_i a massa de cada átomo.

A partir de H é possível construir as equações de movimento de Newton que governam a

evolução temporal do sistema e suas propriedades dinâmicas:

$$\dot{\mathbf{r}}_i = \frac{\mathbf{p}_i}{m_i} = \mathbf{v}_i \quad (8)$$

$$\dot{\mathbf{p}}_i = m_i \ddot{\mathbf{r}}_i = -\nabla_i V(\mathbf{r}_i) = \mathbf{F}_i \quad (9)$$

onde $\dot{\mathbf{r}}_i$ e $\ddot{\mathbf{r}}_i$ são a velocidades e a aceleração do átomo i , respectivamente, e \mathbf{F}_i a força sobre o átomo i .

Deste modo, a dinâmica molecular consiste, portanto na resolução das equações 8 e 9, obtendo o comportamento de um sistema ao longo do tempo.

Uma simulação por dinâmica molecular segue alguns passos básicos. O primeiro passo é a inicialização do sistema, com a definição da posição, velocidade e aceleração de cada átomo. Em seguida é determinado um intervalo de tempo δt de acordo com o detalhamento desejado a ser observado do sistema. Então é feito um incremento ao tempo de modo que $t = t + \delta t$.

Os termos que compõem a energia potencial total na equação 6 caracterizam-na como uma função contínua das posições atômicas. Devido a esta complexidade, não há solução analítica para sistemas de muitas partículas. Para isso é necessário utilizar algoritmos que considerem que as posições variem suavemente com o tempo e o algoritmo *Velocity-Verlet* [16] é um método de integração das equações de movimentos que vem sendo muito utilizado para esta finalidade.

O algoritmo *Velocity-Verlet* consiste que dado um conjunto definido de coordenadas, velocidades e acelerações iniciais para cada partícula, é possível determinar as configurações no instante seguinte, $t + \delta t$:

$$\mathbf{r}_i(t + \delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \dot{\mathbf{r}}_i(t) \delta t + \frac{\ddot{\mathbf{r}}_i(t) \delta t^2}{2} \quad (10)$$

A partir das novas coordenadas, novas acelerações podem ser obtidas pela equação (9). Das novas coordenadas e acelerações, é possível obter novas velocidades:

$$\dot{\mathbf{r}}_i(t + \delta t) = \dot{\mathbf{r}}_i(t) + \frac{[\ddot{\mathbf{r}}_i(t) + \ddot{\mathbf{r}}_i(t + \delta t)] \delta t}{2} \quad (11)$$

Obtidas as novas coordenadas, velocidades e acelerações, é possível reiniciar o ciclo e a repetição deste procedimento nos fornece a obtenção da trajetória de todas as partículas do sistema ao longo do tempo, que posteriormente são utilizadas para análises do sistema.

3.3. Condições Periódicas de Contorno

Simulações de dinâmica molecular são realizadas com o objetivo de mimetizar um sistema real, onde o número de moléculas envolvidas em um processo é da ordem do número de Avogadro, de modo que é inviável simular um sistema com tal tamanho, Neste caso, para simular um sistema real é necessária a utilização de condições periódicas de contorno [15].

Sistemas moleculares são modelados como um conjunto finito de partículas confinadas em uma caixa de simulação, entretanto os efeitos de contorno do sistema devem ser eliminados. Condições periódicas de contorno são aplicadas com a finalidade de minimizar esses efeitos. Para isso, a caixa de simulação é replicada por todo o espaço, formando uma grade infinita. Dessa forma, durante a simulação, quando uma partícula i sai da caixa central, sua imagem i' entra pelo lado oposto da caixa, e o mesmo ocorre com as caixas replicadas. Assim, o número total de partículas dentro da caixa central e de suas réplicas se mantém constante (Figura 5).

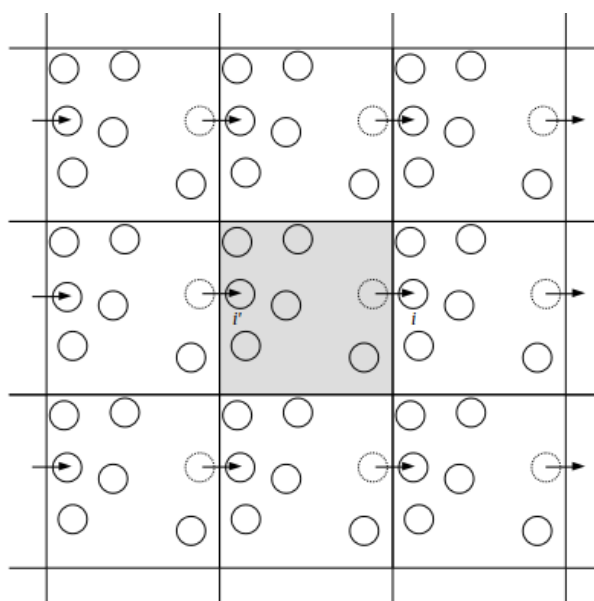


Figura 5: Representação bidimensional da caixa de simulação em condições periódicas de contorno. Quando uma molécula i ultrapassa o limite da caixa central suas imagens i' se movimentam de maneira similar. Em cinza se encontra a caixa central de simulação. Em tracejado está a representação das partículas em suas respectivas posições anteriores, e a seta indica a nova posição dessas partículas.

Para impedir que uma partícula i interaja com sua própria imagem i' ou com outra partícula j e a imagem desta j' , é definida uma aproximação denominada de “mínima imagem” (Figura 6) que consiste na suposição de que cada partícula i da caixa central interage com a partícula ou

imagem mais próxima. É definida também uma esfera chamada de raio de corte, R_c (sigla em inglês cut-off), a qual determina a região em que estão as partículas com as quais a partícula i pode interagir, e apenas as partículas que possuem seu centro de massa a uma distância menor ou igual a R_c é que vão interagir com esta, de modo que as interações de curto alcance além do raio de corte são ignoradas, isto é, a energia potencial para $r \geq R_c$ vai para 0. O tamanho $2R_c$ não deve ser maior que L (Figura 6) por consistência da aproximação de mínima imagem [15].

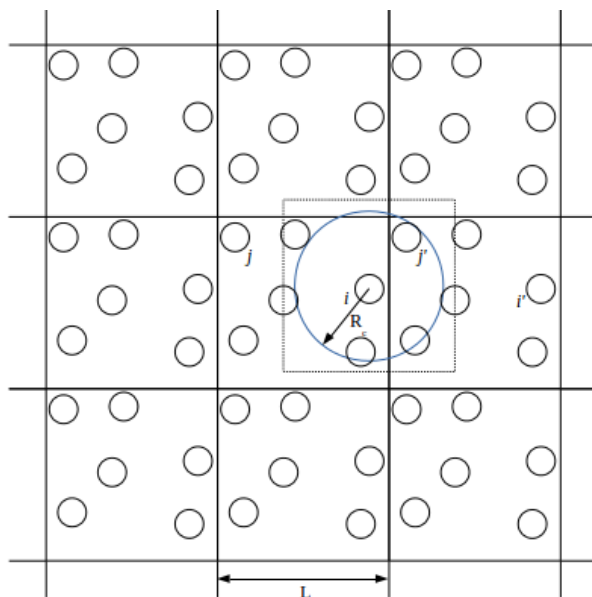


Figura 6: Representação do raio de corte em um sistema bidimensional. O raio de corte é traçado a partir de um átomo de interesse i , onde este não interage com o átomo j e com sua imagem j' ao mesmo instante, muito menos com sua própria imagem i' . O quadrado tracejado representa a aproximação de mínima imagem e o círculo o raio de corte.

Para o tratamento de interações de longo alcance a imposição de um raio de corte é problemática. Uma opção para solucionar esse problema é a substituição das forças de interação entre pares por uma força efetiva, segundo o método de soma de Ewald, o método PME [15, 17] Neste método é calculado as interações de cada partícula com todas as outras da caixa de simulação e com todas as imagens em um sistema periódico infinito.

3.4. Adaptive Biasing Force

O método Adaptive Biasing Force (ABF) é um método de integração termodinâmica, no

qual a diferença de energia de Gibbs (ΔG) é obtida pela integração da derivada de G em função de uma coordenada de reação ξ [18].

$$\Delta G = G(\xi_1) - G(\xi_0) = \int_{\xi_0}^{\xi_1} \frac{\delta G}{\delta \xi} d\xi \quad (12)$$

onde $\delta G/\delta \xi$ resulta em [18]:

$$\frac{\delta G}{\delta \xi} = \left\langle \frac{\delta H}{\delta \xi} \right\rangle_{\xi} \quad (13)$$

onde H é a hamiltoniana do sistema. O subscrito ξ ao lado direito da equação (13) é colocado para destacar que a derivada de H em função de ξ é calculada para cada valor fixo de ξ e não entre todos os valores da coordenada de reação. Para processos isotérmicos sem mudança de massa, a média $\langle \delta H/\delta \xi \rangle_{\xi}$ é equivalente a média da derivada da energia potencial V em função de ξ , dado que a média da derivada da energia cinética é zero. A média da derivada da energia potencial V em função de ξ é expressa aproximadamente pela força média exercida pelo meio $\langle \vec{F}_{sistema} \rangle_{\xi}$ em cada ponto ξ da coordenada de reação.

$$\left\langle \frac{\delta H}{\delta \xi} \right\rangle_{\xi} = \left\langle \frac{\delta V}{\delta \xi} \right\rangle_{\xi} \cong \langle \vec{F}_{sistema} \rangle_{\xi} \quad (14)$$

Como mostrado na equação 15, a força aplicada pelo método ABF (\vec{F}_{ABF}) para levar o sistema de ξ_0 a ξ_1 e que permite o sistema sobrepor barreiras de energia livre, é definida em termos da própria força média amostrada sob pequenos intervalos $\Delta \xi$ finitos.

$$\vec{F}_{ABF} = -\langle \vec{F}_{sistema} \rangle_{\xi} \nabla_{\xi} \xi \quad (15)$$

A força \vec{F}_{ABF} garante que a força que atua ao longo da coordenada de reação tenda a zero, já que ela é contrária à força que atua no meio ($-\langle \vec{F}_{sistema} \rangle$), mas na direção da coordenada de reação ($\nabla_{\xi} \xi$). Sendo assim, a evolução do sistema ao longo de ξ é regida principalmente via difusão em uma superfície de energia plana [19].

3.5. Análises aplicadas

3.5.1. Perfil de densidade de massa

Por meio de uma varredura ao longo do eixo z (normal à membrana), é detectada a quantidade de massa referente às moléculas em cada ponto do sistema, esse mapeamento fornece um perfil de densidade de massa (PDM) para cada tipo de molécula do sistema. Depois de realizado o mapeamento de toda a simulação, é então feito uma média sobre todos os dados, obtendo um PDM médio para toda a simulação.

Com o PDM é possível determinar a região ocupada por cada constituinte do sistema, como por exemplo, lipídeos, água e proteínas. De modo que a sobreposição desses perfis fornece a região de interface solvente-membrana, a espessura e a posição de cada molécula em relação à membrana. O *plugin Density Profile* do *software VMD (Visual Molecular Dynamics)* [20] foi utilizado para tal mapeamento.

3.5.2. Área por lipídeo

A área superficial da bicamada, no plano xy , é determinada pela área de cada fosfolipídeo multiplicada pela quantidade em que estão presentes em cada monocamada. Em simulação de membranas na qual o sistema está equilibrado, o número de lipídeos por unidade de área tende a permanecer constante e por isso pode ser considerada um parâmetro de equilíbrio.

Um *script* foi escrito e executado no *software VMD* para realização do cálculo de área por lipídeo.

3.5.3. Parâmetro de ordem

O Parâmetro de ordem (S) é um parâmetro normalizado que indica o grau de ordenamento de um sistema. No sistema bicamada, quanto mais próximo de $-0,5$, menor o ordenamento das cadeias acílicas, enquanto que para o estado de ordem absoluta S corresponde a 1 . A expressão usada para este cálculo é dada na equação 20 [21].

$$P.O. = \left\langle \frac{3\cos^2\theta_i - 1}{2} \right\rangle \quad (16)$$

sendo θ_i o ângulo entre o eixo molecular i e a direção normal à bicamada. O eixo molecular para uma unidade i de CH_2 é definido pelo vetor que une os carbonos $(i - 1)$ e $(i + 1)$, conforme a

Figura 7. O parâmetro de ordem é dado pela média dos estados.

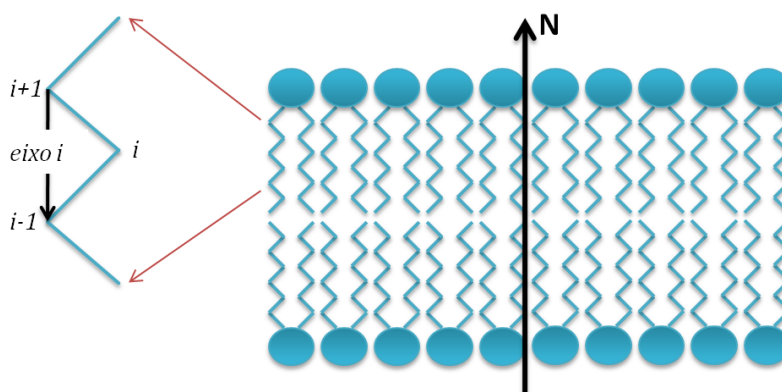


Figura 7: Definição do eixo molecular i e da Normal da bicamada. Em azul está um desenho representativo de uma bicamada lipídica. O eixo N é o eixo normal à bicamada. Ao lado direito está ilustrada em azul uma cadeia acíclica onde a seta preta é o eixo molecular i .

No presente trabalho, o parâmetro de ordem foi utilizado para verificar o alinhamento das cadeias acíclicas com caráter hidrofóbico (Oleil e Palmitoil) das moléculas de POPC considerando do segundo ao último carbono, para isso, um *script* foi executado no *software* VMD.

3.5.4. Estrutura Secundária

As proteínas são classificadas em quatro níveis estruturais, sendo eles: a estrutura primária, secundária, terciária e quaternária. A estrutura primária de uma proteína consiste na sequência de aminoácidos que a compõe. A estrutura secundária inclui os padrões de dobramentos da cadeia polipeptídica, como α -hélices, folhas- β e *coils*. O arranjo tridimensional das estruturas secundárias é conhecido como estrutura terciária e a estrutura quaternária é constituída por mais de uma cadeia polipeptídica.

A análise de estrutura secundária nos fornece a estrutura assumida do primeiro ao último resíduo da cadeia de aminoácidos, para cada passo da dinâmica molecular.

Os peptídeos estudados são majoritariamente estruturados em α -hélice. Em uma α -hélice ideal as ligações de hidrogênio ocorrem entre o resíduo n e $n+4$. Quando o peptídeo apresentar essa estrutura o gráfico da estrutura secundária em relação ao tempo de simulação será colorido em magenta. Caso ocorra *coil* ou folha- β , será colorido em azul claro ou amarelo, respectivamente.

Um *script* foi executado em paralelo com o *software* VMD para gerar os gráficos de estrutura secundária em função do tempo de simulação.

4. Detalhes Computacionais

As simulações foram realizadas basicamente em três etapas. Na primeira etapa a bicamada lipídica solvatada foi construída e equilibrada, posteriormente, na segunda etapa, o peptídeo foi inserido no sistema e realizamos simulações de DM no equilíbrio de cada novo sistema, e por fim, na terceira etapa, foi realizada a dinâmica molecular utilizando o método ABF. O modo como o trabalho foi realizado pode ser visto com mais detalhes nas próximas seções.

4.1. Construção e equilíbrio da bicamada lipídica

O modelo de membrana utilizado neste trabalho foi uma bicamada lipídica composta por 60 moléculas de Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Colina (POPC) (Figura 8), com 30 moléculas em cada monocamada, inseridas em uma caixa com uma fina camada de solvatação com 6609 moléculas de água e arestas de 57 Å no eixo x, 55 Å no eixo y e 70 Å no eixo z, sendo este eixo normal ao plano da bicamada. Por se tratar de moléculas zwitteriônicas, ou seja, carga resultante nula, não há a necessidade do acréscimo de íons no sistema para realizar a equilíbrio.

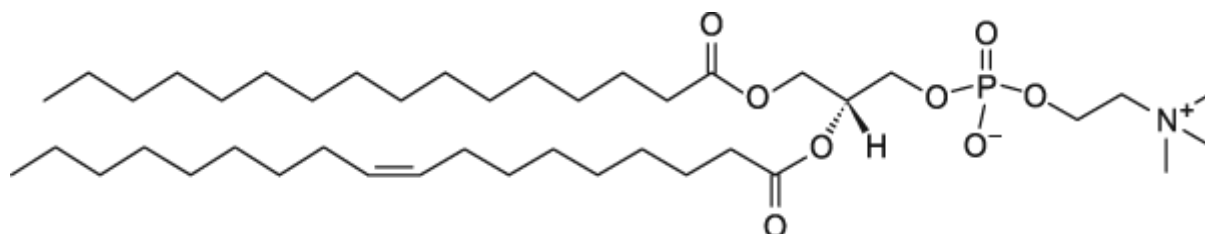


Figura 8: Estrutura do lipídeo POPC (Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Colina). Imagem retirada de [22].

A caixa de simulação foi criada utilizando o programa CHARMM-GUI [23, 24, 25] com a ferramenta *Membrane Builder* [26, 27, 28]. O CHARMM-GUI é um programa versátil utilizado para gerar sistemas de simulação em nível atômico e de muitas partículas. Este programa possui compatibilidade com o NAMD (*NAnoscale Molecular Dynamics*) [28, 29,] que é um pacote de simulação de dinâmica molecular. Ambos, o NAMD e o CHARMM-GUI, utilizam o campo de força CHARMM (*Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics*) [30]. O NAMD também é compatível com o programa de visualização molecular VMD para configuração de simulação e análises de trajetórias; além de outros programas e algoritmos tal como o algoritmo Adaptive

Biasing Force (ABF) [19] que é um método utilizado para a realização do cálculo da energia livre de um sistema.

O programa CHARMM-GUI é utilizado para gerar o arquivo pdb (*Protein Data Bank*) que contém as coordenadas de cada átomo do sistema. Após o arquivo pdb ser criado, é possível utilizar a ferramenta *Automatic psf builder* para gerar o arquivo psf (*Protein Structure File*). O psf é um arquivo de estrutura e contém todas as informações do sistema necessárias para aplicar o campo de força.

Após a montagem do sistema e de seus arquivos de entrada (pdb e psf), uma minimização de energia de 10000 passos foi realizada para o rearranjo das moléculas e posteriormente, uma simulação de dinâmica molecular de 36 ns foi realizada. O passo de integração para as equações de movimento foi de 2 fs. A simulação do sistema foi realizada no *ensemble* NPT (298 K e 1 atm). A temperatura e pressão foram controladas por dinâmica de Langevin, adotando um coeficiente de fricção de 1 ps^{-1} , o período de oscilação e o tempo de decaimento do pistão foram de 200 fs e 100 fs, respectivamente. Condições Periódicas de Contorno foram impostas nas simulações com raio de corte igual a 12 Å e as interações de longo alcance foram tratadas com somas de Ewald por meio do método PME. As simulações foram realizadas utilizando o programa NAMD2 versão 2.8b2 [32]. Os parâmetros de energia potencial, como comprimento e ângulos das ligações covalentes, ângulos diedrais, interações não-ligadas, foram computados segundo o campo de força para lipídeos CHARMM36 [31]. O modelo que descreve as águas é o TIP3P [33] que define a molécula de água por três cargas pontuais, dois comprimentos de ligação O-H, e um ângulo H-O-H.

Todos esses dados estão exibidos resumidamente na Tabela 1.

Tabela 1: Composição e parâmetros de simulação do modelo de membrana.

POPC	60	Pressão (atm)	1
Moléculas de água	6609	Controle de Temperatura e Pressão	Langevin
X, Y, Z (Å)	57, 55, 70	Coeficiente de fricção (ps^{-1})	1
Íons	0	Período de Oscilação (fs)	200
PDB	CHARMM-GUI	Tempo de amortecimento (fs)	100
Minimização	10000	Raio de Corte (Å)	12
Dinâmica (ns)	36	Interações eletrostáticas	PME
Passos de Integração (fs)	2	Campo de Força	CHARMM36
Ensemble	NPT	Modelo de água	TIP3P
Temperatura (K)	298	Integrador	Velocity-Verlet

4.2. Inclusão dos peptídeos e simulação dos sistemas em equilíbrio

Após a equilibração da bicamada lipídica, a fina camada de água que solvatava a membrana equilibrada de POPC foi retirada. A bicamada foi centralizada na caixa de simulação e os oito átomos de fósforos, presentes na cabeça de cada lipídeo que se localizava nas extremidades do cubo formado pela membrana, foram restringidos por um potencial com valor $k = 1.0 \text{ kcal}/\text{Å}^2$ com o intuito de mantê-la centralizada na caixa de simulação e não se mover em relação ao eixo z durante a simulação com o peptídeo. Posteriormente o sistema foi novamente solvatado com uma faixa mais extensa de água, passando a medir 128 Å no eixo z.

Após todo o procedimento realizado somente com a bicamada, pode-se então inserir cada peptídeo em uma caixa de simulação. Os peptídeos foram posicionados de modo a ficarem centralizados no plano xy em relação à membrana, e a distância de 30 Å em relação às posições médias dos fósforos das cabeças lipídicas no eixo z, como exibido na Figura 9. As moléculas de água em torno dos peptídeos foram removidas para não haver sobreposições.

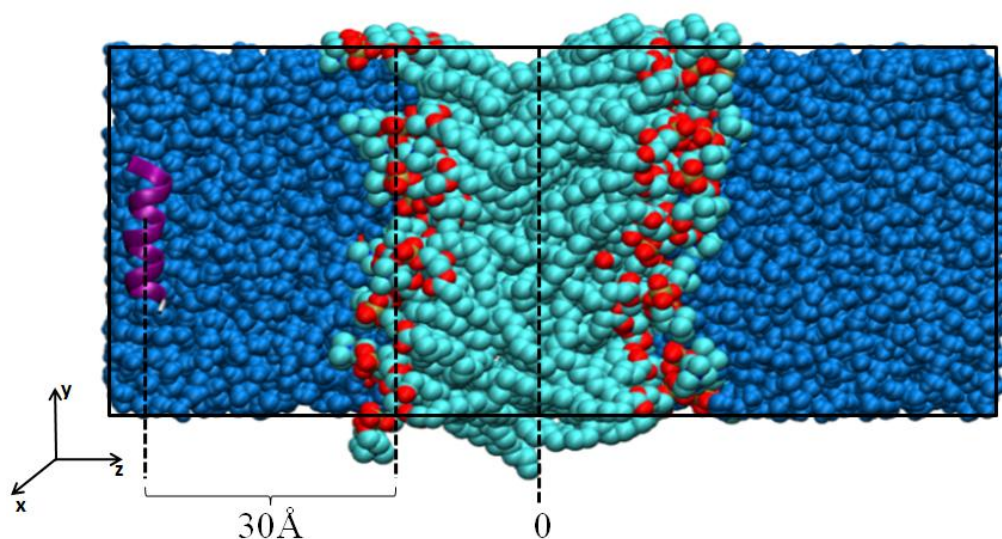


Figura 9: Esquema representativo da caixa de simulação. Imagem ilustrando a distância do peptídeo, em roxo, até a posição média dos fósforos das cabeças lipídicas, em amarelo.

Os peptídeos são carregados positivamente de modo que foi necessário adicionar íons para neutralizar o sistema. A inserção dos íons foi realizada utilizando a ferramenta do VMD *Autoionize*, neutralizando para concentração de 0.15 mols/L. Para o sistema com o peptídeo MP-I foram adicionados 15 átomos de Na e 17 de Cl. Para o sistema com o peptídeo MP-III foram 15 Na e 16 Cl. Enquanto que para o sistema com o peptídeo NMP-I foram adicionados 16 Na e 19 Cl. Esses dados estão exibidos resumidamente na Tabela 2.

Tabela 2: Composição dos sistemas compostos pelos peptídeos e membrana.

	MP-I	MP-III	NMP-I
POPC	60	60	60
Moléculas de água	15972	16404	16779
X, Y, Z (Å)	57, 55, 128	57, 55, 128	57, 55, 128
Íons	15Na ⁺	15Na ⁺	16Na ⁺
	17Cl ⁻	16Cl ⁻	19Cl ⁻

Após a montagem dos sistemas, uma minimização de energia de 10000 passos foi realizada para o rearranjo das moléculas. Posteriormente, uma simulação de 200ns foi realizada para cada sistema. O passo de integração para as equações de movimento foi de 2 fs. A simulação do sistema foi realizada no *ensemble* NPT (298 K e 1 atm). A temperatura e pressão foram controladas por dinâmica de Langevin, adotando um coeficiente de fricção de 1 ps⁻¹, o período de oscilação e o tempo de decaimento do pistão foram de 200 fs e 100 fs, respectivamente. Condições Periódicas de Contorno foram impostas nas simulações com raio de corte igual a 12 Å e as interações de longo alcance foram tratadas com somas de Ewald por meio do método PME. As simulações foram realizadas utilizando o programa NAMD2 versão 2.9 [32]. Os parâmetros de energia potencial foram computados segundo o campo de força para lipídeos CHARMM36 [31]. O modelo que descreve as águas é o TIP3P [33]. Esses dados estão exibidos resumidamente na Tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros de simulação para os sistemas compostos pelos peptídeos e membrana.

Minimização	10000	Período de Oscilação (fs)	200
Dinâmica (ns)	200	Tempo de amortecimento (fs)	100
Passos de Integração (fs)	2	Raio de Corte (Å)	12
Ensemble	NPT	Interações eletrostáticas	PME
Temperatura (K)	298	Campo de Força	CHARMM36
Pressão (atm)	1	Modelo de água	TIP3P
Controle de Temperatura e Pressão	Langevin	Integrador	Velocity-Verlet
Coeficiente de fricção (ps ⁻¹)	1		

4.3. Simulação dos sistemas com o Método ABF

O método ABF nos permite varrer toda uma coordenada de reação, levando o sistema a regiões que raramente seriam visitadas em uma dinâmica comum, realizando uma amostragem uniforme, tornando possível a avaliação do perfil de energia livre.

Para realizar o método ABF utilizamos como coordenada de reação a distância que separava o centro de massa da cadeia peptídica ao centro de massa da bicamada lipídica, tomando como referência o átomo de fósforo de cada lipídeo da bicamada (Figura 10). Para acelerar a convergência do cálculo do perfil de energia livre, o caminho de reação foi dividido em janelas de 2Å e cada uma delas foi simulada em paralelo. Por fim, o perfil de energia livre foi obtido a partir da junção dos resultados de cada janela. A técnica de múltiplas janelas é extremamente eficiente quando se possui uma estrutura computacional composta de muitos computadores de baixo poder computacional, o que é o nosso caso.

Para cada sistema estudado, a convergência e a análise do perfil de energia livre determinaram o tempo de simulação. Para o sistema com peptídeo MP-I foram necessários 35ns em cada janela para que houvesse a convergência do perfil de energia livre, enquanto que para os sistemas com o peptídeo MP-III e NMP-I foram necessários 30 ns. De modo que o tempo amostrado em toda a simulação foi de 875ns (0,875μs) para o peptídeo MP-I e 750ns (0,75μs) para os peptídeos MP-III e NMP-I.

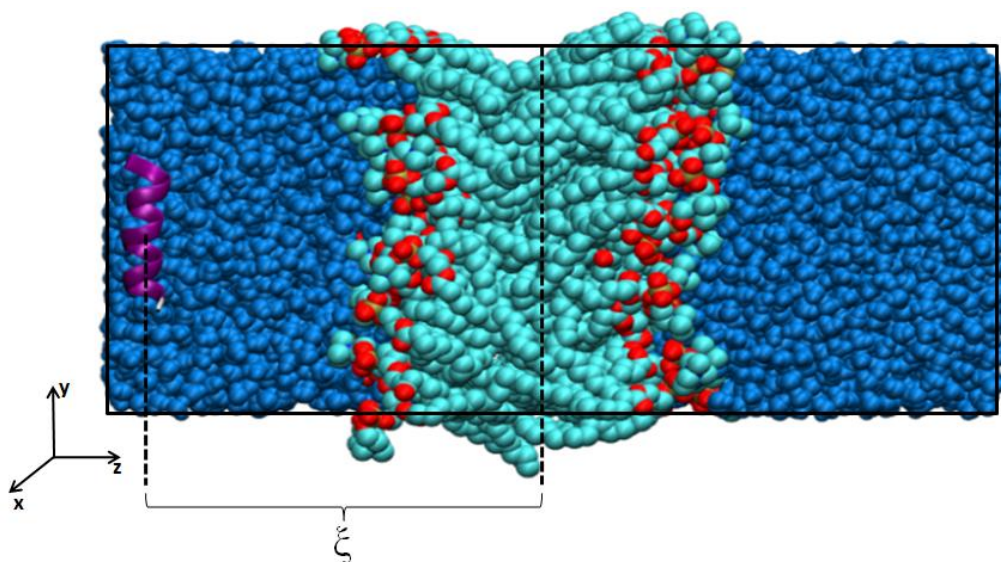


Figura 10: Ilustração da coordenada de reação utilizada para a simulação dos sistemas utilizando o método ABF. Imagem ilustrando a coordenada de reação ξ que se dá pela distância de separação do centro de massa da cadeia principal peptídica, em roxo, ao centro de massa da bicamada lipídica, tomando como referência o átomo de fósforo, em amarelo, de cada lipídeo na bicamada.

5. Resultados e discussão

5.1. Equilibração da membrana de POPC

O sistema composto por uma bicamada de POPC hidratada, com 30 moléculas em cada monocamada, foi simulado por 36ns. Esse sistema foi inicialmente simulado para a validação do modelo mimético de membrana utilizado neste trabalho.

A Figura 11 é referente à etapa de equilibração da bicamada lipídica em um *ensemble* canônico NPT [34] com condições periódicas de contorno, onde é apresentada a energia total, a pressão e a temperatura do sistema. Podemos notar que as médias da pressão e da temperatura do sistema se mantêm em torno do valor determinado, 1atm e 298K, respectivamente. Outra característica é a flutuação da energia total do sistema que é decorrente do acoplamento energético com o controle de pressão e temperatura.

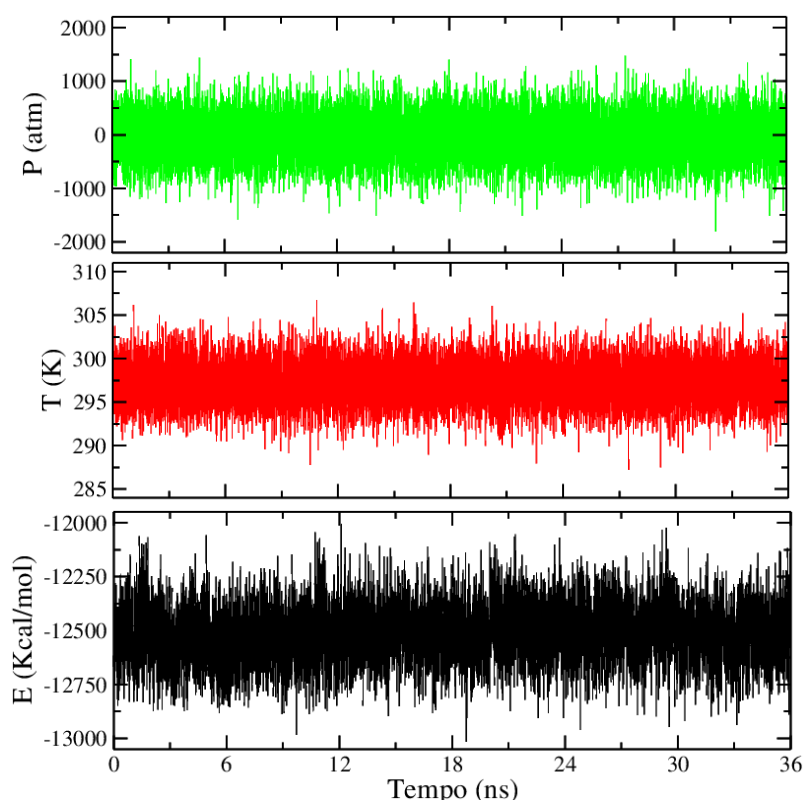


Figura 11: Simulação de um sistema em regime NPT. A figura exibe a pressão (verde), temperatura (vermelho) e a variação total da energia (preto) para a simulação total de validação da bicamada lipídica.

Para verificar se o modelo de membrana está equilibrado e em condições de ser usado, algumas análises devem ser realizadas e a área por lipídeo é um dos critérios para avaliar isto. A Figura 12 (A) mostra a área por lipídeo em toda a simulação. É possível notar que no período de equilíbrio ocorre a queda dos valores da área do sistema, desta forma os valores iniciais são desconsiderados para a análise. Tomando, portanto, os resultados a partir de 12ns (Figura 12 (B)), o valor médio da área por lipídeo é de $66,9 \pm 4,2 \text{ \AA}^2$. Resultados experimentais realizados com a mesma composição de bicamada lipídica fornecem resultado igual a $68,3 \pm 1,2 \text{ \AA}^2$ [35], enquanto que resultados teóricos fornecem o valor de $64,7 \pm 0,2 \text{ \AA}^2$ [31]. Sendo assim, o resultado encontrado para a área por lipídeo é satisfatória, pois se mostra coerente com os resultados já publicados.

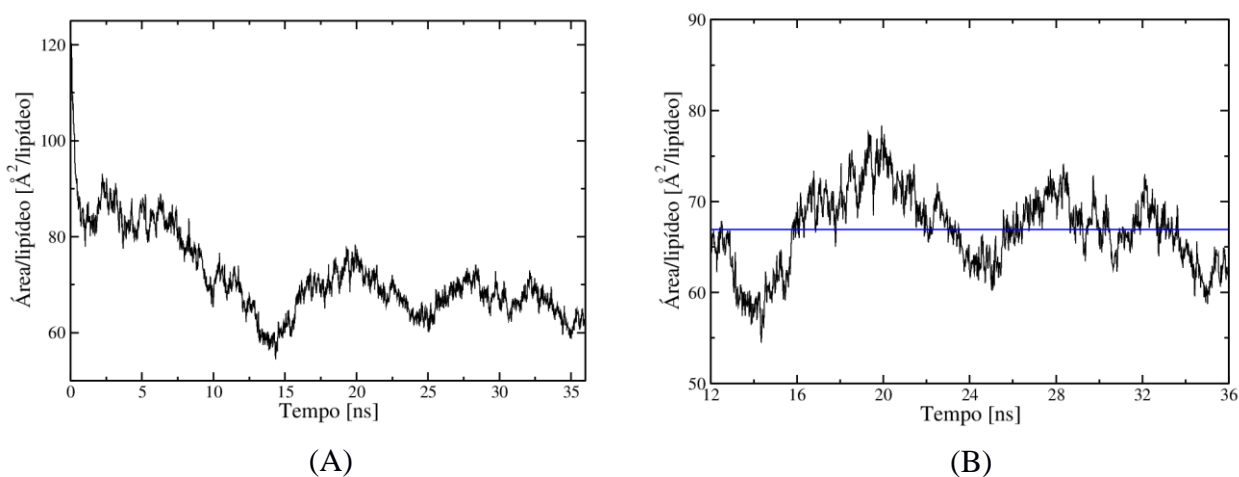


Figura 12: Área por lipídeo em relação ao tempo. (A) Área por lipídeo da simulação total com tempo de 36ns. (B) Área por lipídeo a partir de 12ns de simulação. A linha em azul é o valor médio dos resultados de área por lipídeo.

Analisando o gráfico do Perfil de Densidade de Massa (PDM) na Figura 13, podemos detectar a média da quantidade de massa de cada molécula ao longo do eixo z da caixa de simulação.

A densidade de massa da membrana pode ser considerada a partir dos picos do grupo fosfato, isto é, em $-20,2 \text{ \AA}$ e $18,9 \text{ \AA}$ de modo que a espessura média da bicamada lipídica é de $39,1 \text{ \AA}$ (Figura 13). Resultados experimentais determinaram o valor da espessura de uma bicamada de POPC em 20°C igual a $39,8 \pm 0,8 \text{ \AA}$ e em 30°C igual a $39,1 \pm 0,78 \text{ \AA}$ [36]. Comparando o resultado obtido com os resultados experimentais podemos afirmar que este valor médio para a espessura da bicamada é satisfatório.

O PDM foi realizado considerando as moléculas de POPC centralizadas na caixa de simulação, porém, durante o processo de simulação houve o deslocamento dessa membrana, saindo

do centro da caixa e se aproximando, por certas vezes, da borda. Deste modo podemos observar na Figura 13 o não decaimento direto do PDM nas bordas. Esse deslocamento não altera os resultados devido às condições periódicas de contorno aplicadas.

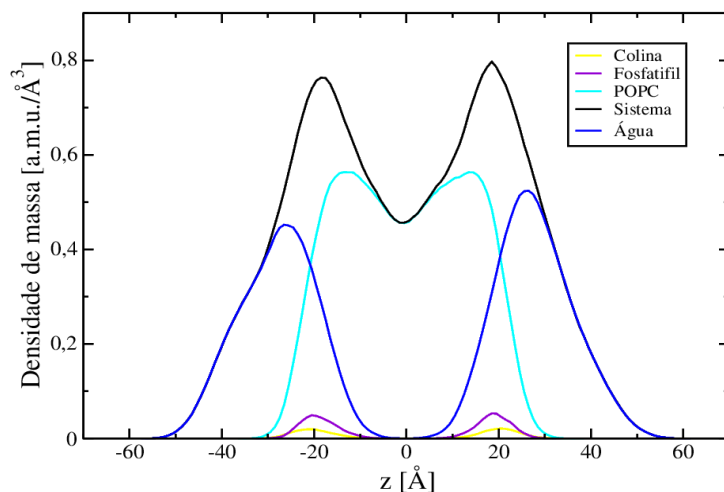


Figura 13: Perfil de Densidade de Massa da bicamada de POPC em relação ao eixo z. Os grupos colina e fosfato dos fosfolipídios estão coloridos em amarelo e roxo, respectivamente. O solvente está colorido em azul, enquanto que os fosfolipídios estão em azul claro. Em preto está o PDM de todos os componentes do sistema.

Para a verificação do ordenamento das cadeias acílicas de POPC, oleil com 18 carbonos e insaturada no carbono 9, e palmitoil com 16 carbonos, foi realizado o cálculo do Parâmetro de Ordem e é mostrado na Figura 14(A).

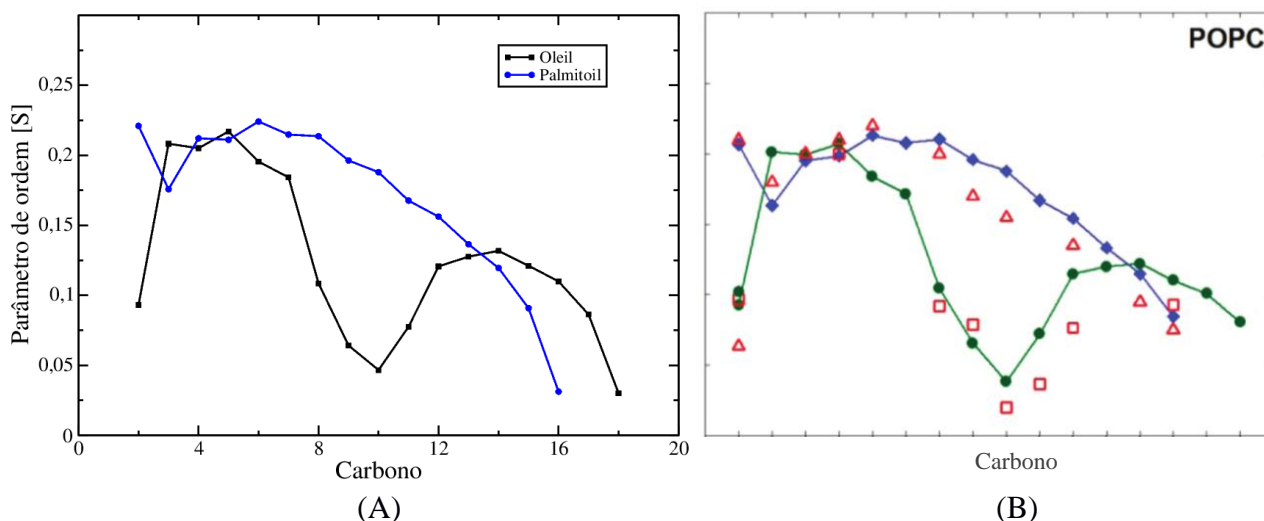


Figura 14: Parâmetro de Ordem das cadeias acílicas da membrana pura. (A) O gráfico mostra o ordenamento das cadeias acílicas, palmitoil (saturada) colorida em azul e oleil (insaturada) colorida em preto. (B) Gráfico retirado de [31] com resultados obtidos com uma bicamada lipídica de POPC e campo de força CHARMM36. Com linhas preenchidas em azul está a cadeia palmitoil e em verde a oleil.

De acordo com a definição, quanto maior o alinhamento dos átomos de carbono nas cadeias, maior o valor de S . Observando o gráfico da Figura 14(A) notamos um maior alinhamento da cadeia saturada quando comparada com a cadeia insaturada, já que a insaturação dificulta o ordenamento dessas cadeias. Quando comparado com resultados teóricos [31] obtidos com a mesma composição lipídica e mesmo campo de força (Figura 14 (B)), observamos grande semelhança entre os resultados.

Assim, considerando os resultados apresentados acima, chegamos a conclusão de que nossa bicamada de POPC estava equilibrada e, portanto, adequada para o uso nas simulações subsequentes.

5.2. Simulação dos peptídeos em membrana de POPC no equilíbrio

Para análise da interação dos peptídeos antimicrobianos com a membrana de POPC, o sistema foi simulado por 200ns. A simulação foi iniciada a partir do arquivo de entrada como descrito na subseção 4.2.

Com o propósito de investigar a adsorção dos peptídeos estudados em bicamada de POPC, verificamos a distância entre o centro da bicamada ao triptofano de cada peptídeo. A técnica de fluorescência utiliza o triptofano como uma sonda para o estudo do ambiente no qual está inserido. Estudos experimentais [37] mostraram que o triptofano presente na cadeia peptídica dos peptídeos estudados na presença de vesículas, tanto aniônica como zwitteriônicas, localiza-se preferencialmente na região da interface hidrofóbica/hidrofílica. Na Figura 15 (AI), observamos que a distância de separação entre o centro de massa do triptofano do peptídeo MP-I e a bicamada decai com o tempo e ocorre certa estabilidade após 75ns de simulação. Este decaimento é devido à aproximação do peptídeo à bicamada e após a estabilização, a distância média do centro de massa da membrana ao centro de massa do triptofano é de $12,6 \pm 1,5\text{\AA}$, como podemos observar mais detalhadamente na Figura 15 (AII).

Os peptídeos realizam uma trajetória durante todo o processo de simulação e para quantificar essa trajetória para os sistemas com os peptídeos MP-III e NMP-I, realizamos o cálculo da distância tomando como referência o centro de massa da bicamada. O cálculo foi realizado tomando a posição de referência ao centro de massa do triptofano, posteriormente ao centro de massa da cadeia principal peptídica e ao centro de massa dos grupos fosfato, como exibido na Figura 15 (B) e (C). A distância entre os centros de massa dos grupos fosfato nos fornece basicamente a região ocupada pela membrana. Isso foi realizado com o intuito de verificar o comportamento da aproximação do peptídeo à bicamada. Observamos que em alguns momentos, tais como em 113 e 167ns para o peptídeo MP-III, e em 188ns para o peptídeo NMP-I, o triptofano

se aproxima das cabeças polares, porém a adsorção na bicamada não ocorre, de modo que o peptídeo se afasta da bicamada novamente.

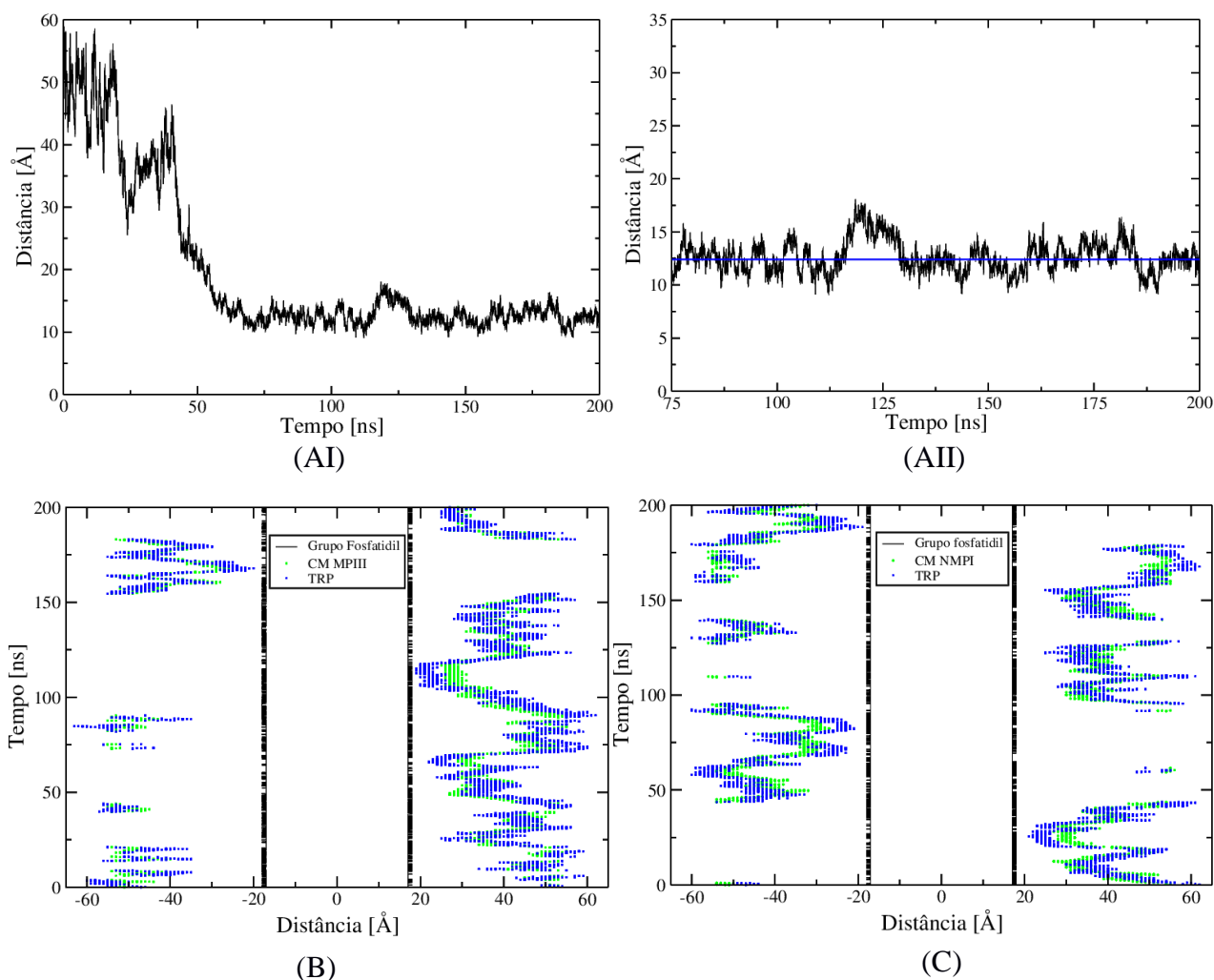


Figura 15: Gráfico do cálculo da distância entre o centro de massa da membrana ao centro de massa do resíduo de triptofano. (A) MP-I, (B)MP-III e (C) NMP-I. O cálculo foi realizado para todos os 200 ns das simulações. Em (AI) e (AII) no eixo x temos o tempo em ns e no eixo y a distância em Å. Em (AII) o período de aproximação do peptídeo à membrana foi descartado, realizando a média, em azul, somente para a região em que o peptídeo já se apresentava enterrado. Em (B) e (C) no eixo x temos a distância em Å e no eixo y temos o tempo em ns. Os traços em preto são para o grupo fosfato (com posições negativas e positivas). O centro de massa do peptídeo está colorido em verde e o centro de massa do triptofano está colorido em azul.

Outra análise realizada para verificar os sistemas é o Perfil de Densidade de Massa. O PDM exibido na Figura 16 é a média de toda a simulação. Nesta figura, o PDM do solvente coexiste com a da membrana apenas na região de interface, sobrepostas às densidades dos grupos colina e fosfato. No centro da bicamada, o PDM apresenta uma ligeira depressão, que é devido a uma menor ocupação dos átomos das caudas acílicas nessa região apresentando uma desorganização das

cadeias carbônicas dos lipídeos característico da fase líquida da membrana.

A Figura 16 (AI) foi realizada a partir dos 75 ns de simulação, isto é, quando o peptídeo MP-I já estava adsorvido na bicamada lipídica. Nesta figura podemos verificar a densidade de massa de todos os componentes do sistema, no entanto analisamos o PDM do TRP e não de todos os aminoácidos da proteína, para assim podermos comparar com o resultado anterior que de fato se mostra consistente, já que o pico do PDM para o TRP, exibido com maior detalhe na Figura 16 (AII), ocorre em $12 \pm 0,1\text{\AA}$, estando dentro da margem de erro quando comparado ao resultado anterior e com os resultados experimentais que mostram que o TRP se encontra na região da interface hidrofóbica/hidrofílica [37].

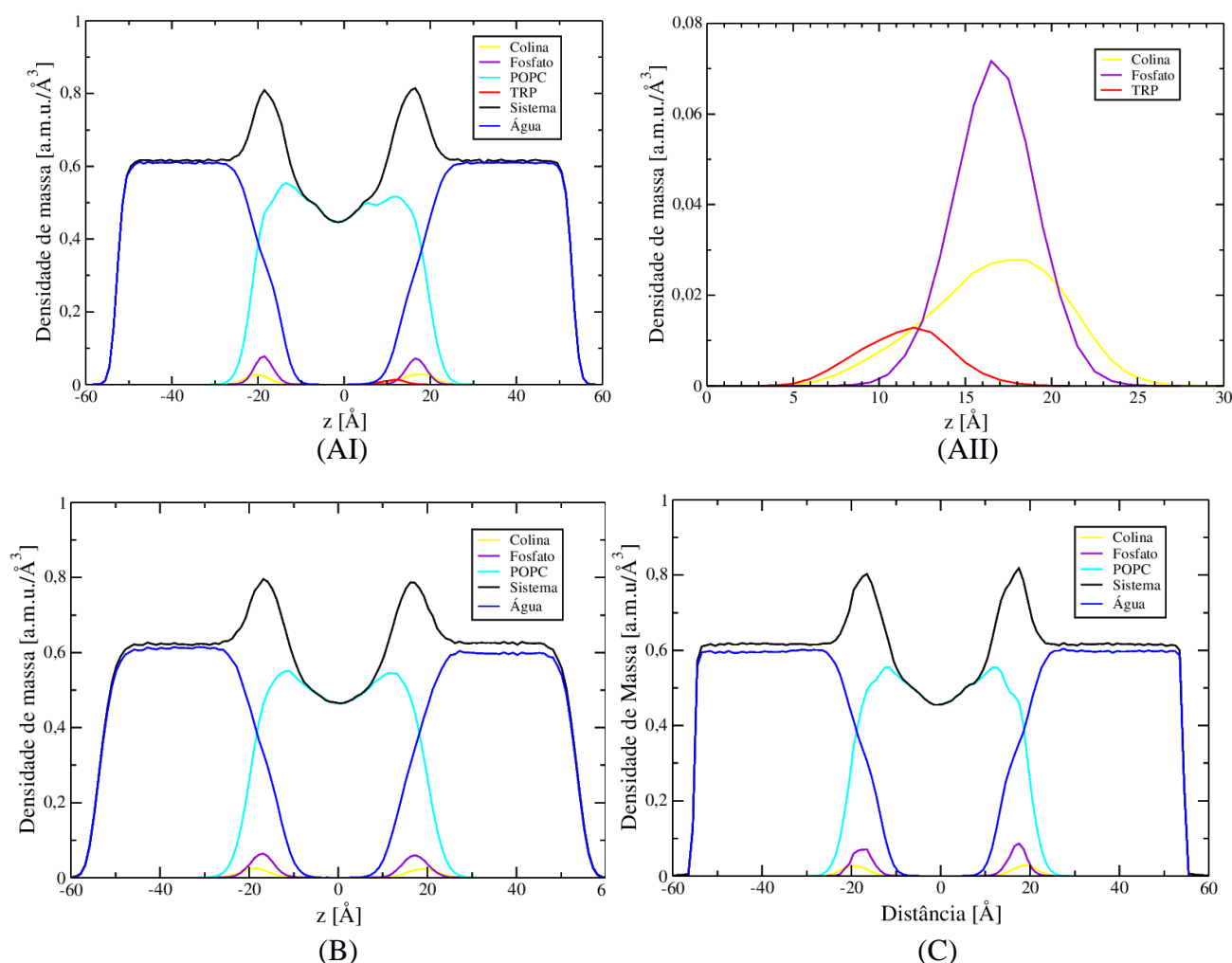


Figura 16: Perfil de Densidade de Massa do sistema Peptídeo-Membrana de POPC em relação ao eixo z. (A) MP-I, (B)MP-III e (C) NMP-I. Os grupos colina e fosfato dos fosfolipídios estão coloridos em amarelo e roxo, respectivamente. O solvente está colorido em azul, enquanto que os fosfolipídios estão em azul claro. Em preto está o PDM de todos os componentes do sistema. Em vermelho, (AI) e (AII), está destacada a presença do triptofano. Em (AII) foi destacado a região onde se encontra o triptofano, mantendo as cores exibidas no restante.

Ainda observando a Figura 16, notamos que o primeiro pico do grupo fosfato para o sistema que contém o peptídeo MP-I está em $-18,7 \pm 0,1\text{\AA}$ e o segundo pico em $16,7 \pm 0,1\text{\AA}$, de modo que agora, após a adsorção do peptídeo à membrana, a espessura média da bicamada é $35,4 \pm 0,1\text{\AA}$. Para o sistema com o peptídeo MP-III o primeiro pico do grupo fosfato está em $-16,9 \pm 0,1\text{\AA}$ e o segundo pico em $17,4 \pm 0,1\text{\AA}$, enquanto que para o sistema com o peptídeo NMP-I está em $-17,7 \pm 0,1\text{\AA}$ e o segundo pico em $17,4 \pm 0,1\text{\AA}$, de modo que a espessura média da bicamada em cada sistema é $34,4 \pm 0,1\text{\AA}$ e $35,1 \pm 0,1\text{\AA}$, respectivamente.

Analisando o Parâmetro de Ordem (Figura 17) notamos que em todos os sistemas ocorreu a diminuição de S , de modo que as cadeias dos fosfolipídeos ficam menos ordenadas quando comparados com S da simulação de validação da bicamada.

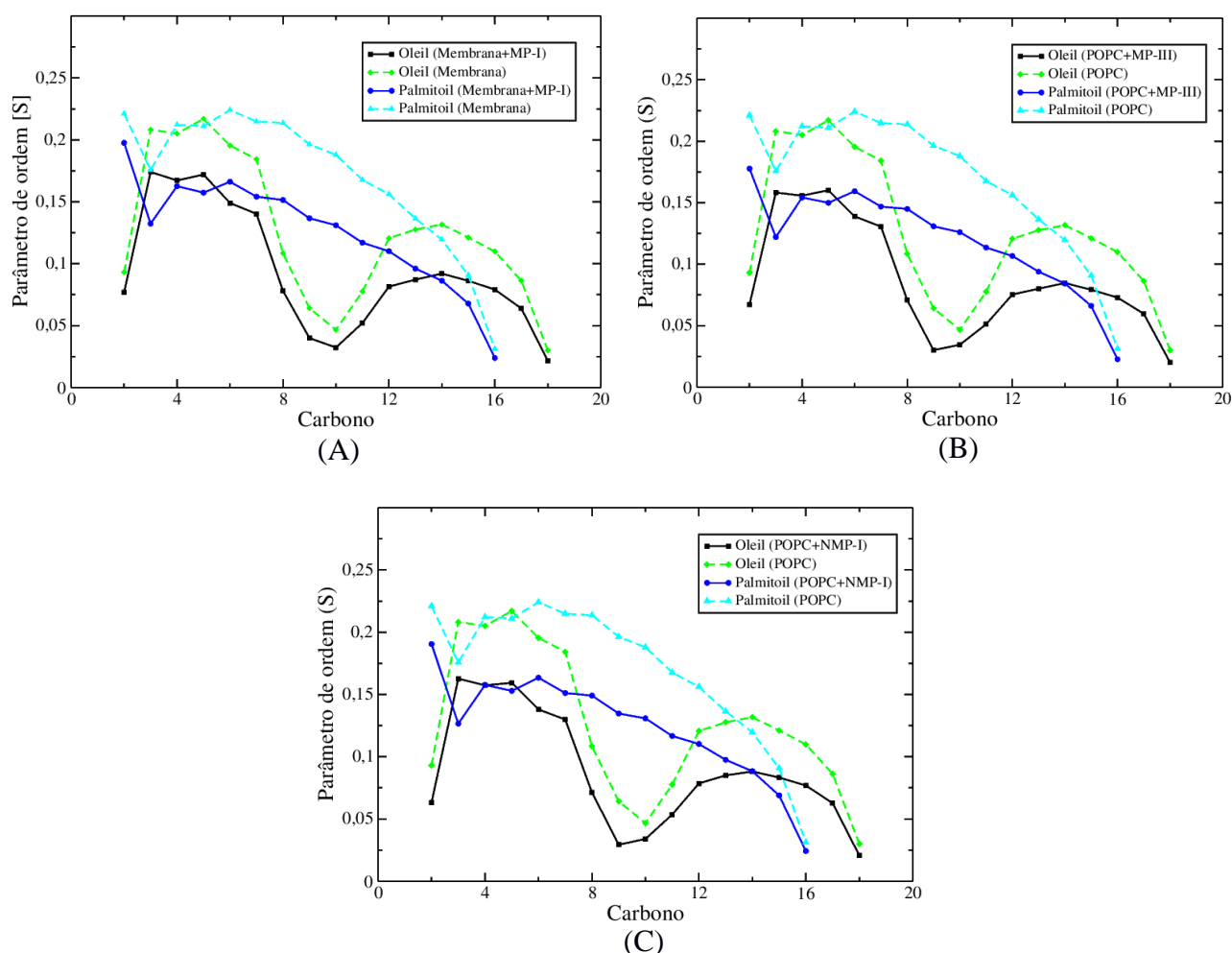


Figura 17: Parâmetro de ordem para as cadeias acílicas dos lipídeos no processo de interação com o peptídeo. (A) MP-I, (B) MP-III e (C) NMP-I. Com a linha tracejada está S antes da inserção do peptídeo ao sistema e com a linha contínua S das cadeias acílicas durante o processo de simulação com o peptídeo. Em preto e verde está representada a cadeia Oleil, e em azul e azul claro a cadeia Palmitoil.

A estrutura em α -hélice foi utilizada como estrutura inicial dos peptídeos. Em sua cadeia, os

peptídeos são formados tanto por resíduos hidrofóbicos como hidrofílicos, de modo que a conformação em α -hélice não é consideravelmente estável em contato com a água. As pontes de hidrogênios, que estabilizam a estrutura em hélice, podem ser quebradas devido a competição entre essas ligações com moléculas de água na vizinhança da cadeia principal do peptídeo, de modo que pode ocorrer a perda de estrutura secundária como é mostrado por dados experimentais.

A Figura 18 mostra os padrões de estrutura secundária para cada resíduo dos peptídeos em função do tempo total da simulação. Em (A) observamos que os resíduos de 1 a 10 permanecem em α -hélice por praticamente toda a simulação. Com aproximadamente 40 ns, notamos que os resíduos do fim da cadeia, dos 11 aos 14, se desestruturam e se mantêm em *coil* até o fim da simulação. Em (B) notamos uma significativa variação de estruturas durante a simulação, indicando que possa estar ocorrendo uma grande competição entre as pontes de hidrogênio que estabilizam a estrutura em hélice com as águas vizinhas, de modo que à partir de aproximadamente 127ns o peptídeo perde a

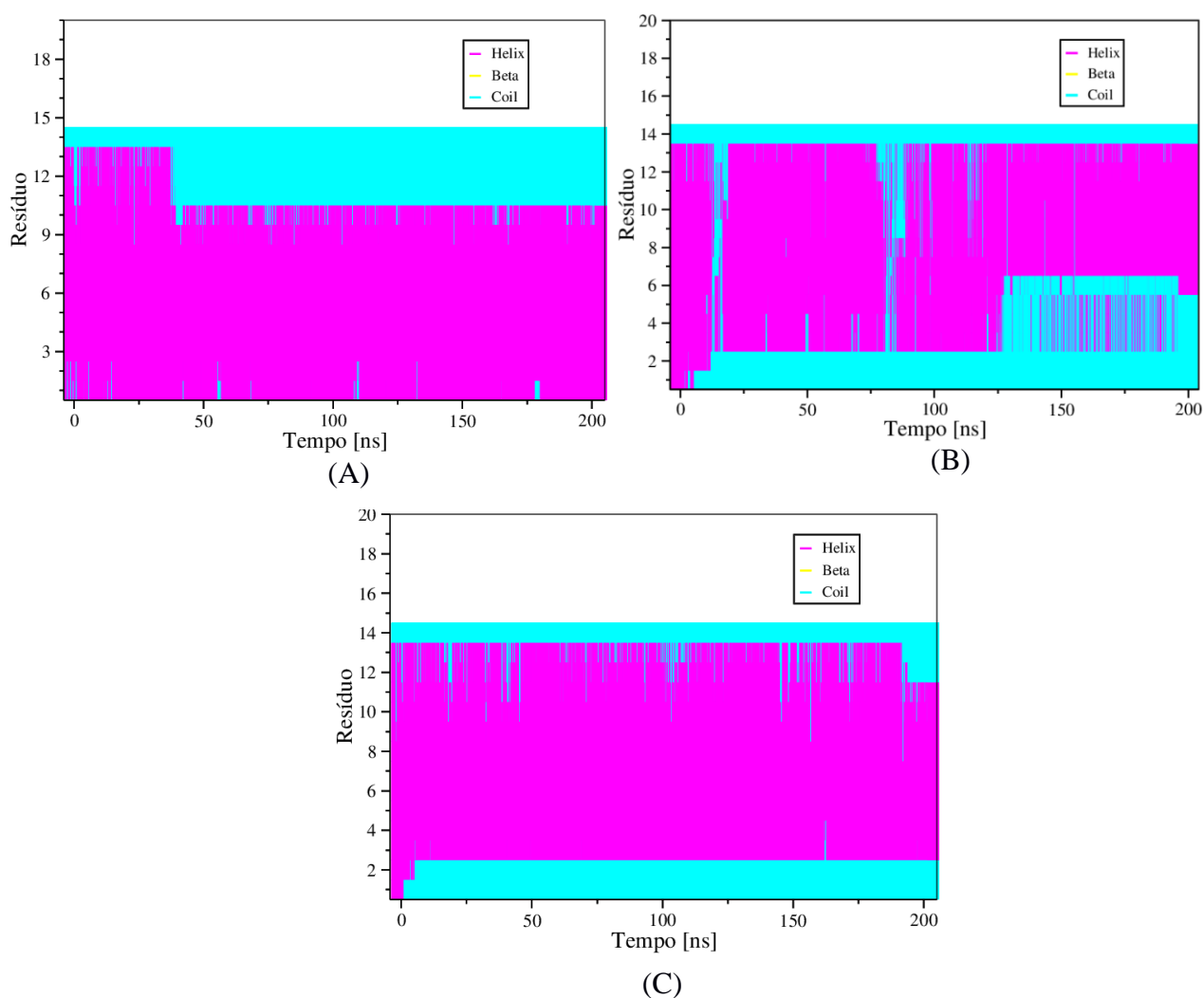


Figura 18: Estrutura secundária por resíduo em função do tempo de simulação. (A) MP-I, (B)MP-III e (C) NMP-I. No eixo x temos o tempo total de simulação com 300 ns. No eixo y está o número de resíduos dos peptídeos – 14 resíduos. A cor rosa é para resíduos estruturados em α -hélice e a cor azul claro é para resíduos estruturados em *coil*. Não houve a presença de estruturas em folhas- β .

estrutura na maior parte do tempo nos resíduos de 1 a 6. Essa alta competição pode estar relacionada ao fato de que o peptídeo MP-III é o mais hidrofóbico entre os outros peptídeos estudados. Em (C) vemos que logo ao início da simulação os dois primeiros aminoácidos da cadeia do peptídeo NMP-I perdem a estrutura em α -hélice e não voltam a ter essa estrutura até o fim da simulação, isso pode ocorrer pelo fato de que a Asparagina é mais hidrofílica que o resíduo de Ácido Aspártico presente no início da cadeia do peptídeo MP-I, que se mantém estruturado.

Durante o processo de simulação, o peptídeo MP-I se adsorveu no modelo de membrana de POPC de modo perpendicular à normal da bicamada, como podemos observar na Figura 19 (A) que é a visualização da posição final após uma simulação de 200ns. Na Figura 19 (B) observamos mais detalhadamente que o peptídeo MP-I está com seus resíduos hidrofóbicos voltados para o interior da membrana, seus resíduos hidrofílicos em contato com a região polar da bicamada e com a água, e o resíduo de triptofano posicionado na interface hidrofóbica/hidrofílica. O peptídeo manteve praticamente em toda sua cadeia a estrutura helicoidal anfipática e essa estabilidade pode ser atribuída à inserção num meio hidrofóbico.

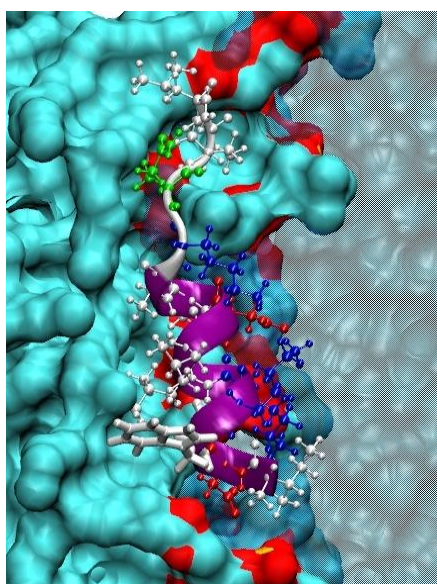
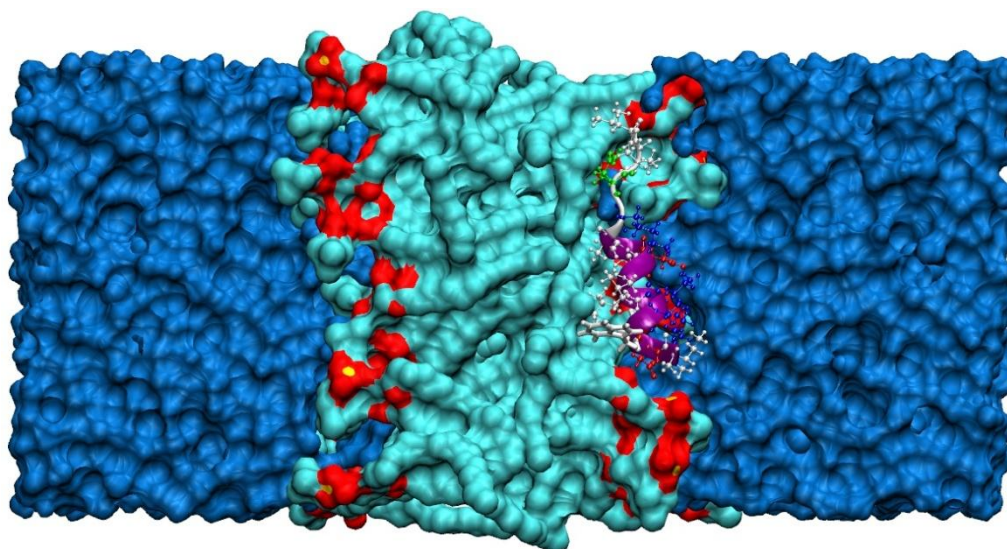


Figura 19: Visualização da posição do peptídeo MP-I após 200ns de simulação. As moléculas de água estão coloridas em azul escuro. Os lipídeos estão com suas caudas acílicas coloridas em azul *cyan*, os átomos de fósforo (P) estão em amarelo e os oxigênios (O), ligados aos P, estão em vermelho. Em roxo temos a apresentação da estrutura secundária do peptídeo, que também está com seus aminoácidos coloridos de acordo com suas propriedades: Resíduos carregados positivamente estão coloridos em azul; carregados negativamente estão em vermelho, polar está em verde e resíduos hidrofóbicos estão em branco. Imagem construída utilizando o VMD [20].

5.3. Simulação dos peptídeos em membrana de POPC com a utilização do Método Adaptive Biasing Force (ABF)

Um dos principais objetivos deste trabalho foi a verificação da posição mais estável da interação dos peptídeos estudados com uma membrana modelo, por meio do cálculo da energia livre pela utilização do método ABF.

Os sistemas foram montados como descrito na subseção 4.3, utilizando como coordenada de reação a distância de separação entre centro de massa da cadeia peptídica ao centro de massa da bicamada lipídica. Na Figura 20 temos o perfil de energia livre caracterizado pela inclusão dos peptídeos estudados em bicamada de POPC. A convergência e a análise do perfil de energia livre determinaram o tempo de simulação, de modo que para cada peptídeo fez-se necessário um tempo específico.

Notamos que o perfil de energia livre para os três peptídeos são semelhantes, se mantendo praticamente constante na região a qual contém o solvente, na região de interface solvente/bicamada vemos um significativo decaimento desse perfil, passando por um estado de mínima energia e voltando a aumentar conforme o peptídeo é direcionado ao centro da bicamada.

Analisando a curva da energia livre após a convergência para cada sistema (Figura 21), encontramos a posição de mínima energia, isto é, a posição mais estável da interação de todos os peptídeos com a bicamada. Observando mais detalhadamente esse perfil podemos verificar que a posição mais estável do sistema para o peptídeo MP-I é em 13,35Å, para o peptídeo MP-III em 13,95Å, e para o NMP-I em 13,45Å.

O perfil para o peptídeo MP-I na posição de 50,00Å tem o valor de energia igual $-16,1\text{kcal/mol}$, posteriormente há um pequeno aumento desse perfil na posição 24,07Å com valor de $-14,9\text{kcal/mol}$. Após esse aumento, há um decaimento contínuo chegando a um mínimo de energia na posição 13,35Å com energia igual a $-24,2\text{kcal/mol}$ e então o valor de energia aumenta novamente na região correspondente ao centro da bicamada.

Para o peptídeo MP-III o perfil é bem semelhante ao do peptídeo MP-I, porém com valores de energia mais elevados. Na posição de 50,00Å o perfil tem o valor igual $-11,1\text{kcal/mol}$, posteriormente em 24,05Å o valor é de $-9,6\text{kcal/mol}$. Na região de mínimo da energia na posição 13,9Å a energia é igual a $-21,6\text{kcal/mol}$ e finalmente o valor de energia aumenta novamente.

Os valores para o perfil do peptídeo NMP-I são semelhantes aos do MP-III, tendo um pequeno mínimo próximo a região de interface. Na posição de 50,00Å o perfil tem o valor igual $-10,3\text{kcal/mol}$, se mantendo praticamente constante até chegar a um pequeno mínimo na posição 25,80Å com energia igual $-10,84\text{kcal/mol}$, e posteriormente tendo um pequeno aumento em 24,10Å com valor de $-10,3\text{kcal/mol}$. Na região de mínimo da energia na posição 13,45Å a

energia é igual a $-21,22\text{kcal/mol}$ e finalmente o valor de energia aumenta novamente.

A profundidade do poço de energia pode determinar o quão mais facilmente um sistema pode acessar um mínimo de energia, de modo que valores mais negativos de profundidade mostram que o sistema pode acessar mais facilmente tal estado. A profundidade do poço para o peptídeo MP-I é de $-9,28\text{kcal/mol}$, enquanto que para os peptídeos MP-III e NMP-I é $-11,9\text{kcal/mol}$ e $-10,9\text{kcal/mol}$, respectivamente.

Na Figura 21 também é possível observar o gráfico que exhibe a amostragem do sistema e verificamos que esta foi homogênea para todos os sistemas, sendo assim, podemos afirmar que o peptídeo visitou toda a coordenada de reação.

Também na Figura 21 vemos a imagem correspondente a posição mais estável para cada sistema. Notamos que a posição mais estável para os três peptídeos são semelhantes, com o peptídeo paralelo à face da membrana com sua cadeia principal adsorvida, seus resíduos hidrofóbicos voltados para o centro da bicamada, seus resíduos hidrofílicos em contato com o grupo polar dos fosfolípidos e com a água, e o resíduo de triptofano posicionado na interface hidrofóbica/hidrofílica.

É importante ressaltar que ainda há dúvidas a respeito do fato de que apesar do perfil de energia livre dos três peptídeos estudados serem equivalentes, o único que observamos a adsorção na bicamada de POPC na simulação no equilíbrio foi o peptídeo MP-I.

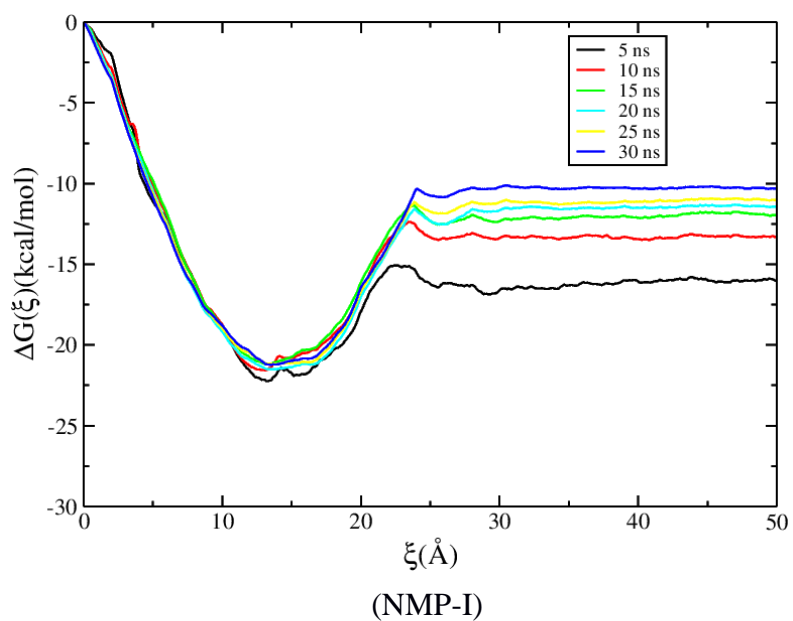
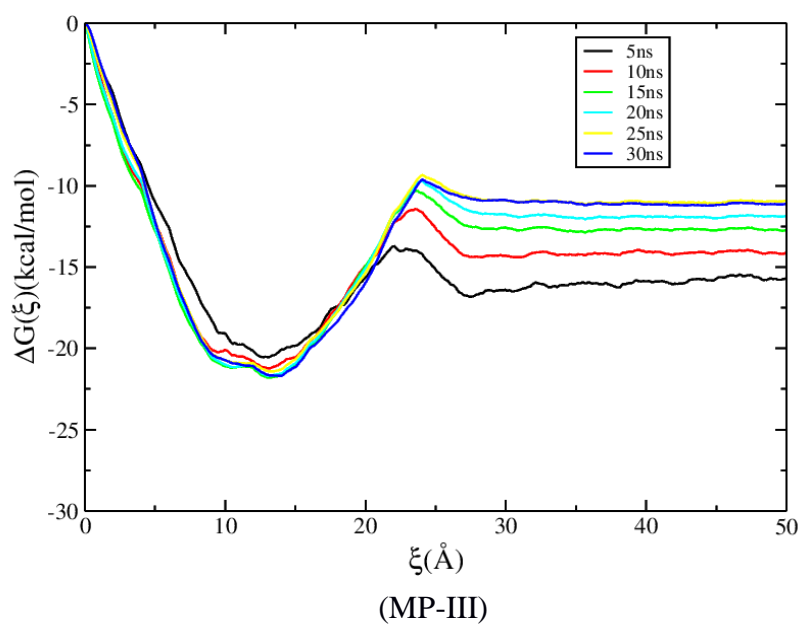
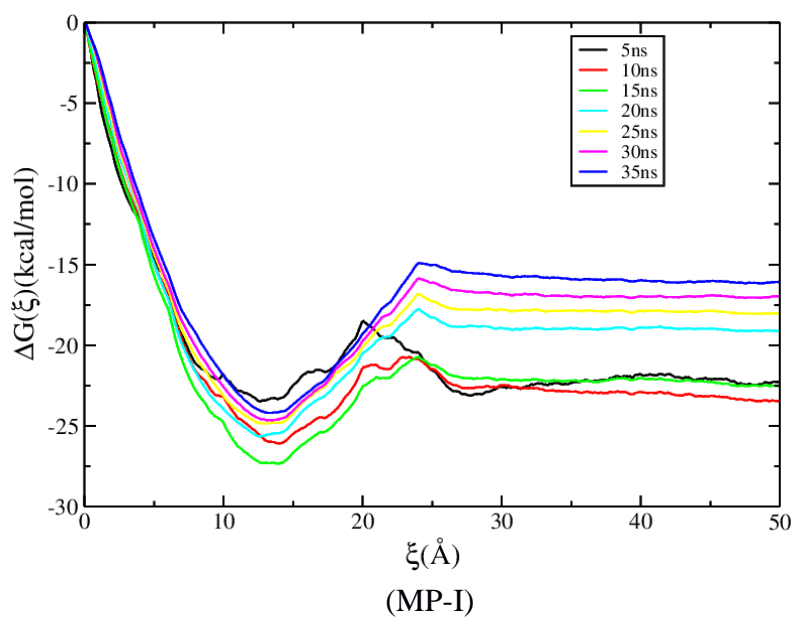


Figura 20: Perfil de Energia Livre para o processo de inserção do peptídeo em bicamada lipídica. No eixo x temos a coordenada de reação que é distância que separa o centro de massa da cadeia peptídica (50Å) ao centro de massa da bicamada lipídica (0Å). No eixo y temos a variação da energia livre. Cada curva é referente a um tempo de simulação para cada intervalo de 2Å, colorida como na legenda do gráfico de cada figura.

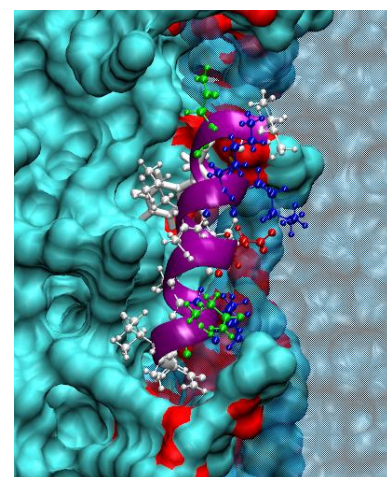
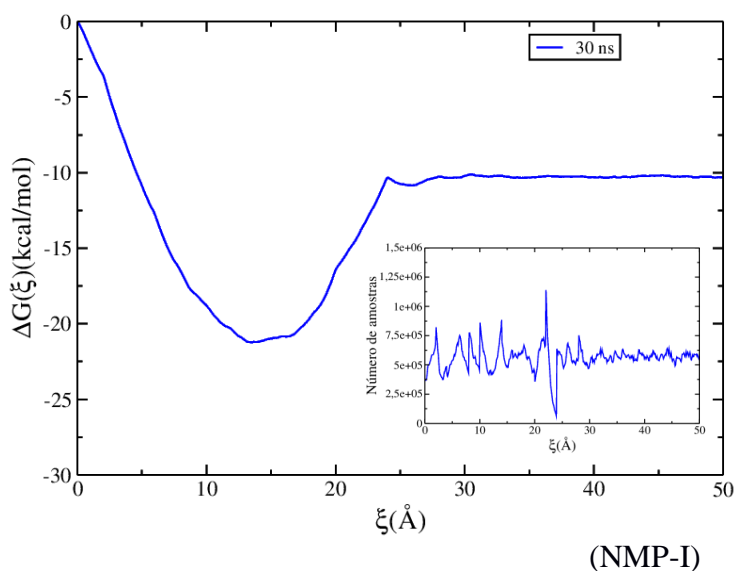
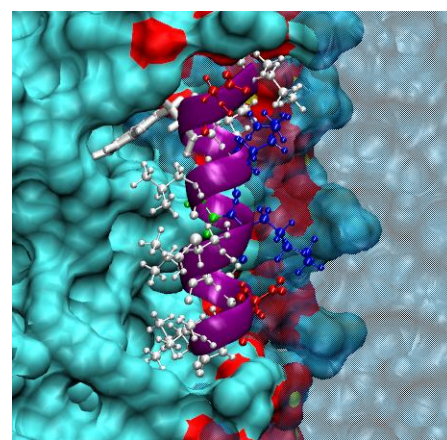
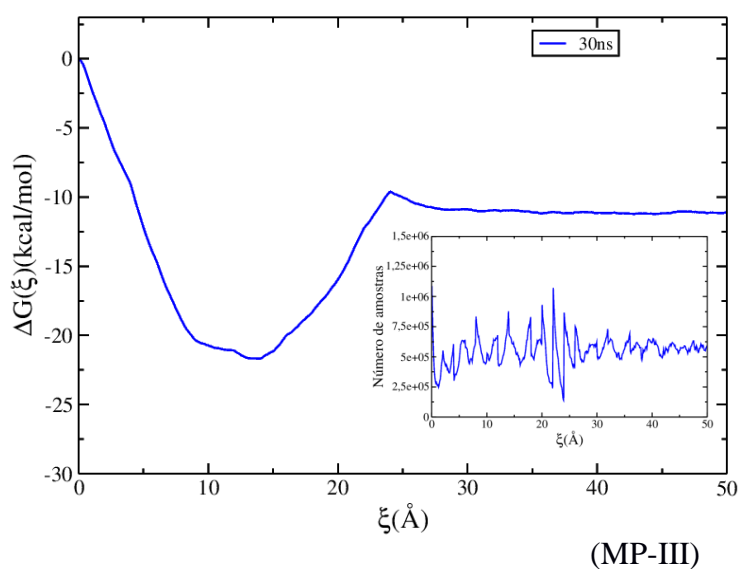
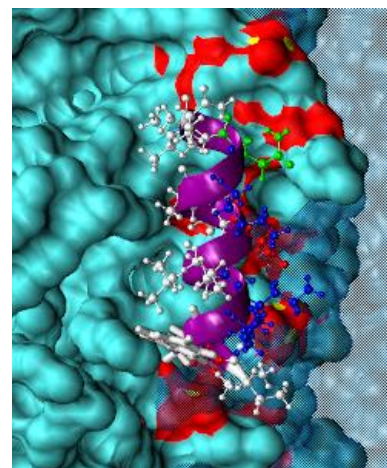
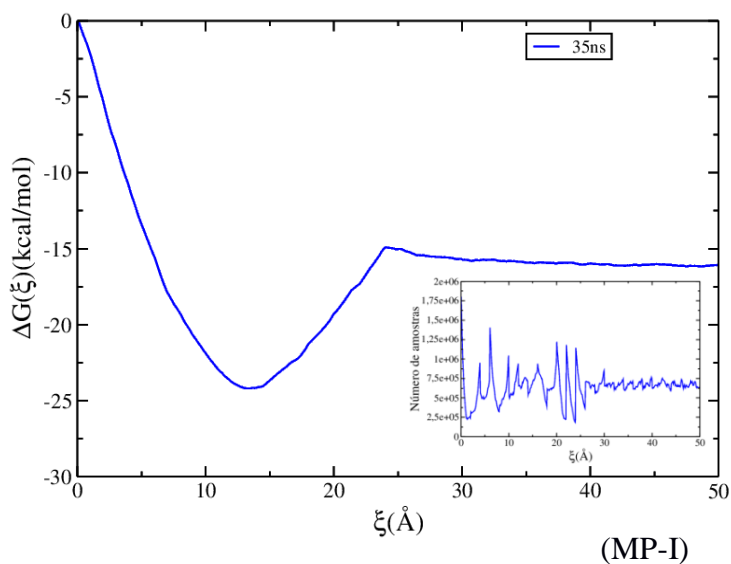


Figura 21: Perfil de Energia Livre após a convergência e amostragem do sistema ao longo da coordenada de reação. No gráfico principal temos o perfil de energia livre e o tempo necessário para a convergência está na legenda. No outro gráfico temos a amostragem do sistema ao longo da coordenada de reação, onde no eixo x temos a coordenada de reação e no eixo y a quantidade de amostras.

6. Conclusões

- O modelo de membrana utilizado se mostrou muito coerente com resultados, tanto teóricos como experimentais, encontrados na literatura, e a utilização do *software* CHARMM-GUI nos poupou significativo tempo computacional para a pré montagem do modelo.
- Quando realizamos a simulação dos peptídeos no equilíbrio observamos que dentre os três peptídeos estudados, apenas o MP-I interage diretamente com a bicamada lipídica numa simulação de 200ns. Essa interação ocorre como descrita na literatura, com o peptídeo paralelo à face da membrana com sua cadeia principal adsorvida, seus resíduos hidrofóbicos voltados para o centro da bicamada, seus resíduos hidrofílicos em contato com o grupo polar dos fosfolipídios e com a água, e o resíduo de triptofano posicionado na interface hidrofóbica/hidrofílica.
- Com os resultados obtidos a partir das simulações com o método ABF, concluímos que o perfil de energia livre dos três peptídeos estudados é equivalente e que esses resultados nos deixaram em dúvida quanto ao fato de o único peptídeo o qual observamos a adsorção na bicamada na simulação no equilíbrio foi o peptídeo MP-I. Um fato interessante é que as posições mais estáveis correspondentes a região de mínima energia no perfil de energia livre, são semelhantes entre si e também com a posição adotada pelo peptídeo MP-I durante a simulação no equilíbrio.
- A posição mais estável em um sistema com membrana de POPC e solvente para o peptídeo MP-I estão coerente tanto para a simulação no equilíbrio tanto com o método ABF, que nos forneceu resultados iguais a 12,6Å e 13,35Å, respectivamente, os quais se mostraram muito semelhantes entre si e de acordo com resultados experimentais [37], os quais mostram que a região preferencial para esses peptídeos é com o resíduo de triptofano localizado na região da interface hidrofóbica/hidrofílica.

7. Referências

- [1] LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- [2] VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W.; **Fundamentos de Bioquímica**; Artmed: Porto Alegre, 2000.
- [3] HOPP, T. P. AND WOODS, K. R., Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 6, p. 3824 – 3828, 1981.
- [4] BYRNE, B.; IWATA, S. Membrane protein complexes. **J. Curr. Opin. Struct. Biol.** v. 12, p. 239-243, 2002.
- [5] SANTOS CABRERA, M. P; COSTA, S. T. B; DE SOUZA, B. M; PALMA, M. S; RUGGIERO, J. R; NETO, J. R; Selectivity in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1 **Eur Biophys J**, v. 37, p. 879-891, 2008.
- [6] JENSSEN, H., HAMIL, P. AND HANCOOK, R. E. W., Peptide Antimicrobial Agents, **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491 – 511, 2006.
- [7] BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology** v. 3, p. 238-250, 2005.
- [8] YANG, L.; HARROUN, T. A.; WEISS, T. M.; DING, L; HUANG, H. W. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. **Biophys. J.** v. 81, p. 1475–1485, 2001.
- [9] SOUZA, B M; MENDES, M A; SANTOS, L D; MARQUES, M R; CESAR, L M; ALMEIDA, R N; PAGNOCCA, F C; KONNO, K; PALMA, M S. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, v. 26, p. 2157–2164, 2005.
- [10] NAKAJIMA, T. et al. Amphiphilic peptides in wasp venom. **Biopolym**, v. 25, p. S115-S121, 1986
- [11] EISENBERG D, SCHWARZ E, KOMAROMY M, WALL R. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. **Journal of Molecular Biology**, v. 179, p. 125–142, 1984
- [12] ZHANG, W; J. Li; LIU, L-W; K-R. W; SONG, J-J; YAN, J-X; LI, Z-Y; ZHANG B-Z; WANG, R. A novel analog of antimicrobial peptide Polybia-MPI, with thioamide bond substitution, exhibits increased therapeutic efficacy against cancer and diminished toxicity in mice. **Peptides**, v. 31, p. 1832-1838, 2010.
- [13] LEITE, N. B.; AUFDERHORST-ROBERTS, A.; PALMA, M. S.; CONNELL, S. D.; NETO, J. R.; BEALES, P. A. PE and PS Lipids Synergistically Enhance Membrane Poration by a Peptide

with Anticancer Properties. **Biophysical Journal**, v. 109, p. 936-947, 2015.

[14] Helical Wheel Projections – RZLab. Disponível em: <http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>. Acessado em 06/08/2014.

[15] ALLEN, M.P; TILDESLEY, D. J; Computer Simulation of Liquids. Oxford: Clarendon Press, 1989

[16] VERLET, L. Computer experiments on classical fluids I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. **Phys. Rev.** v. 159, 98-103, 1967.

[17] LEACH, A. R. Molecular Modelling: Principles and Applications. Pearson Education, Harlow, 2001.

[18] CHIPOT, C.; POHORILLE, A. Free Energy Calculations – Theory and applications in chemistry and biology. **Springer**. 2007.

[19] HENIN, J.; CHIPOT, C. Overcoming free energy barriers using unconstrained molecular dynamics simulation. **Journal of Chemical Physics**. p. 2904-2914. 2004.

[20] HUMPHREY, W; DALKE, A; SCHULTEN, K; VMD - Visual Molecular Dynamics. **J. Molec. Graphics** v. 14.1, p. 33-38, 1996.

[21] RÓG, T; MURZYN, K; PASENKIEWICZ-GIERULA, M. Molecular dynamics simulations of charged and neutral lipid bilayers: treatment of electrostatic interactions. **Acta Biochim. Pol.**, v. 50, p. 789-798, 2003.

[22] Disponível em: http://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=243&Itemid=208&catnumber=850457. Acessado em 15/03/2015.

[23] JO, S; KIM, T; IYER, V. G; IM, W. CHARMM-GUI: A Web-based Graphical User Interface for CHARMM. **J. Comput. Chem**, v. 29, p. 1859-1865, 2008.

[24] BROOKS, B.R; BROOKS, C.L; III, MACKERELL, A. D Jr; NILSSON, L; PETRELLA, R. J; ROUX, B; WON, Y; ARCHONTIS, G; BATELS, C; BORESCH, S; CAFLISCH, A; CAVES, L; CUI, Q; DINNER, A. R; FEIG, M; FISCHER, S; GAO, J; HODOSCEK, M; IM, W; KUCZERA, K; LAZARIDIS, T; MA, J; OVCHINNIKOV, V; PACI, E; PASTOR, R.W; POST, C. B; PU, J.Z; SCHAEFER, M; TIDOR, B; VENABLE, R. M; WOODCOCK, H. L; WU, X; YANG, W; YORK, D. M; KARPLUS, M. CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. **J. Comput. Chem.**, v. 30, p. 1545-1614, 2009.

[25] WU, E L; CHENG, X; JO, S; RUI, H; SONG, K. C; DÁVILA-CONTRERAS, E.M; QI, Y; LEE, J; MONJE-GALVAN, V; VENABLE, R. M; KLAUDA, J. B; IM, W. CHARMM-GUI Membrane Builder Toward Realistic Biological Membrane Simulations. **J. Comput. Chem.**, v. 35, p. 1997-2004, 2014.

[26] JO, S; LIM, J. B; KLAUDA, J.B; IM, W. CHARMM-GUI Membrane Builder for Mixed Bilayers and Its Application to Yeast Membranes. **Biophys. J.** v. 97, p. 50-58, 2009.

[27] JO, S; KIM, T; IM, W. Automated Builder and Database of Protein/Membrane Complexes for Molecular Dynamics Simulations. **PLoS ONE** 2 (9):e880, 2007.

- [28] "NAMD was developed by the Theoretical and Computational Biophysics Group in the Beckman Institute for Advanced Science and Technology at the University of Illinois at Urbana-Champaign."
- [29] PHILLIPS, J. C; BRAUN, R; WANG, W; GUMBART, J; TAJKHORSHID, E; VILLA, E; CHIPOT, C; SKEEL, R D; KALE, L; SHULTEN, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, p. 1781-1802, 2005.
- [30] CHARMM: The Energy Function and Its Parameterization with an Overview of the Program, in The Encyclopedia of Computational Chemistry, 1, 271-277, P. v. R. Schleyer et al., editors (John Wiley & Sons: Chichester, 1998), by A. D. MacKerell, Jr., B. Brooks, C. L. Brooks, III, L. Nilsson, B. Roux, Y. Won, and M. Karplus.
- [31] KLAUDA, J. B; VENABLE, R. M; FREITES, J. A; O'Connor, J. W; TOBIAS, D. J; MONDRAGON-RAMIREZ, C; VOROBYOV, I; MACKERELL, Jr. A. D; PASTOR, R.W. Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: Validation on Six Lipid Types. **Journal of Physical Chemistry B**. v. 114, p. 7830-7843, 2010.
- [32] KALÉ, L; SKEEL, R; BHANDARKAR, M; BRUNNER, R; GURSOY, A; KRAWTEZ, N; PHILLIPS, J; SHINOZAKI, A; VARADARAJAN, K; SCHULTEN, K; NAMD2 - Greater Scalability for Parallel Molecular Dynamics. **Journal of Computational Physics**. v, 151, p. 283-312, 1999.
- [33] JORGENSEN, W L, CHANDRASEKHAR, J; MADURA, J D; IMPEY, R W; KLEIN, M L; Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **Journal of Chemical Physics**. v. 79, p. 926-935, 1983.
- [34] FLIESSBACH, T. Curso de Física Estatística. Traduzido por João da Providência Jr. Lisboa: Av. de Berna. 2000. Cap. 22, p. 183-191
- [35] KUCERKA, N.; TRISTRAN-NAGLE, S.; NAGLE, J. F. Structure of fully hydrated fluid phase lipid bilayers with monounsaturated chains. **J. Membr. Biol.** v. 208, p. 193-202, 2006.
- [36] KUCERKA, N.; NIEH, M.P.; KATSARAS, J. Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. **Biochim. Biophys. Acta** v.1808, p. 2761–2771, 2011.
- [37] LEITE, N. B. et al. The effect of acidic residues and amphipathicity on the lytic activities of mastoporan peptides studied by fluorescence and CD spectroscopy. **Amino Acids**. v. 40, p. 91-100, 2011.