

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" Campus de São José do Rio Preto

INGRID BERNARDES SANTANA MARTINS

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA COMPUTACIONAL PARA SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR A PH CONSTANTE

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO 2016

INGRID BERNARDES SANTANA MARTINS

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA COMPUTACIONAL PARA SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR A PH CONSTANTE

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, área de 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" - UNESP, campus de São José do Rio preto.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Suman de Araujo

São José do Rio Preto, 2016

Martins, Ingrid Bernardes Santana.

Desenvolvimento de sistema computacional para simulações de dinâmica molecular a pH constante / Ingrid Bernardes Santana Martins. --São José do Rio Preto, 2016 50 f. - il. taba

59 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. Íon hidrogênio - Concentração. 5. Algoritmos de computador. 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

INGRID BERNARDES SANTANA MARTINS

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA COMPUTACIONAL PARA SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR A PH CONSTANTE

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, área de 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" - UNESP, campus de São José do Rio preto.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Suman de Araujo

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Alexandre Suman de Araujo Unesp/Ibilce - São José do Rio Preto - Orientador

Prof. Dr. Pedro Geraldo Pascutti UFRJ - Rio de Janeiro

Prof. Dr. Gabriel Gouvea Slade Unilago - São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 17 de Agosto de 2016.

Aos meus pais, Ana Luiza e Alessandro, pela paciência e incentivo de terem criado uma cientista curiosa.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, que abençoa e ilumina todos os dias e que me fez chegar até aqui.

Ao meu orientador, professor Alexandre Suman de Araujo, pela orientação, dedicação, paciência e confiança em meu trabalho. Ao professor Sidney Jurado de Carvalho que também foi peça importante no desenvolvimento desse trabalho.

À toda minha família, em especial à minha mãe Ana Luiza que está sempre ao meu lado, ao meu pai Alessandro que sempre me aconselha na carreira científica, à minha irmã Emily que é a minha estrela, ao meu namorado Gabriel, que está comigo desde o início, pelo amor, companheirismo e apoio em todos os momentos.

Aos meus primos Victor, Evertton e Izadora e amigos desde sempre Jamielli, Lucas, Paulo Henrique, Arthur, Gustavo, Nayara e Thielle pela amizade e compreensão durante o Mestrado, à Camila pelo apoio e por ter dividido casa comigo.

Aos meus amigos de turma Carolina, Fernando, Janine e Alex por passarem por tudo comigo e estarmos sempre juntos. Ao Guilherme, pela amizade, ajuda e apoio sempre apesar da distância. E a todos os outros amigos do Departamento de Física que tornaram a jornada muito mais prazerosa.

À CAPES, pelo apoio financeiro que possibilitou o densenvolvimento desse trabalho.

"Com grandes poderes vem grandes responsabilidades."

Tio Ben

Resumo

Diversos processos biológicos envolvendo proteínas são mediados por alterações de pH. Infecção de células por vírus, catálise enzimática, associação de ligantes e a solubilidade de compostos são exemplos de tais processos. Assim, investigar o comportamento das cargas dos grupos ionizáveis de proteínas em função de mudanças no pH é de grande interesse. Simulações de Dinâmica Molecular são amplamente utilizadas para estudo dos mais diversos sistemas biológicos devido à confiabilidade de seus resultados. No entanto, elas não se mostram eficientes para a descrição de sistemas sensíveis a variações de pH pois os graus de ionização precisariam variar ao longo da simulação. Esse estado é definido na modelagem do sistema com base no pK_a desses grupos isolados e no pH da solução. Isso representa uma limitação severa, pois processos que são modulados pela mudança na protonação não podem ser observados, de modo que uma abordagem mais realista é executar simulações em que o estado de protonação dos componentes do sistema possam variar com o tempo. Neste trabalho é desenvolvido um sistema computacional que acopla Dinâmica Molecular comum, executada com o pacote GROMACS, a um algoritmo que modifica o estado de protonação dos resíduos ionizáveis do sistema em intervalos de tempo regulares utilizando o método Monte Carlo com o critério de Metrópolis. Objetivando-se testar o método desenvolvido, foram realizadas Simulações de Dinâmica Molecular a pH Constante de um pepídeo composto majoritariamente de alaninas e cujo único grupo ionizável é um ácido glutâmico em diferentes pHs, com a finalidade de obter a curva de titulação desse peptídeo e então compará-la com a curva de titulação do ácido glutâmico isolado.

Palavras-chave: Dinâmica Molecular. pH constante. pKa

Abstract

Several biological processes involving proteins are mediated by pH changes. Virus infection of cells, enzymatic catalysis, association of ligands and compounds solubility are examples of such processes. Therefore, invetigation of the titration residues charges in proteins in function of pH changes is very concernment. Molecular Dynamics simulations are widely used to study the most diverse biological systems due to the reliability of its results. However, they are not efficient to describe systems that are sensitive to pH changes because the protonation state needs to vary throughout the simulation. This state is defined in the system modeling based on the pKa of these isolated groups and solution pH. This is a severe limitation as processes that are modulated by the change in the protonation can not be observed, so that a more realistic approach is to run simulations where the protonation state of the system components may vary with time. In this work a computer system that couples common Molecular Dynamics, performed with GROMACS, and an algorithm that changes the protonation state of titratable residues of the system at regular time intervals by using Monte Carlo - Metropolis is developed. In order to test the developed method, Molecular Dynamics Simulations by Constant pH of a peptide consisting of mostly alanines whose only titratable group is a glutamic acid was made in different pHs in order to obtain the titration curve of this peptide and then compare it with the titration curve of isolated glutamic acid.

Keywords: Molecular Dynamics. Constant pH. pKa

Lista de Figuras

1.1	Forma geral de um aminoácido	16
1.2	Sequência de aminoácidos do peptídeo utilizado.	20
1.3	Representação construída no software VMD do peptídeo utilizado com todos os átomos e estrutura secundária nas conformações (a) hélice, (b) hélice-coil, (c) coil-hélice e (d) coil	21
1.4	Gráfico de fração de hélice <i>versus</i> pH do peptídeo E2 adaptado do artigo Scholtz et. al., 1993	21
2.1	Fluxograma detalhado do algoritmo utilizado no trabalho	24
2.2	Ciclo termodinâmico completo da protonação do resíduo ionizável	28
2.3	Fluxograma do critério de Metropolis	31
3.1	Configuração do peptídeo protonado e desprotonado mostrando a mudança na protonação durante a simulação computacional	35
3.2	Gráficos de carga versus passo para os pHs (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4, (e) 4,4, (f) 5, (g) 6, (h) 7, da simulação de 10 ns do peptídeo em configuração hélice.	37
3.3	Curva de titulação do peptídeo obtida a partir dos resultados das simulações.	38
3.4	Curva de titulação do ácido glutâmico adaptado de Goh et. al	39
3.5	Gráficos de energia eletrostática calculada pelo GROMACS <i>versus</i> tempo para as simulações de 10 ns nos pHs (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4, (e) 4,4, (f) 5, (f) 6 e (h) 7.	41

3.6	Gráficos de energia total calculada pelo GROMACS <i>versus</i> tempo para as si- mulações de 10 ns nos pHs (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4, (e) 4,4, (f) 5, (g) 6 e (h) 7	42
3.7	Gráficos de energia eletrostática e total calculadas pelo GROMACS <i>versus</i> tempo para a simulação de 50 ns nos pHs (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4, (e) 4,4, (f) 5, (g) 6 e (h) 7	43
3.8	Gráficos de energia livre calculada pelo APBS versus tempo para todas as simulações nos pHs (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4, (e) 4,4, (f) 5, (g) 6 e (h) 7. \ldots	44
3.9	Gráfico de fração de hélice versus pH para todas as simulações	45
3.10	Gráfico de estrutura secundária por resíduo resultado da simulação de 10 ns do peptídeo em configuração coil	46

Lista de Tabelas

- 2.1 Parâmetros utilizados nos cálculos de energia livre no software APBS 33

Lista de Símbolos

pH	Potencial hidrogeniônico;		
K_a	Constante de dissociação ácida;		
pK_a	$-\log_{10} K_a;$		
DM	Dinâmica Molecular;		
MM	M Mecânica Molecular;		
DpHMD	Dinâmica Molecular a pH Constante com protonação discreta;		
CpHMD	Dinâmica Molecular a pH Constante com protonação contínua;		
APBS	Adaptive Poisson-Boltzmann Solver;		
GROMACS	ACS Groningen Machine for Chemical Simulations;		
Ac	Acetilação;		
Α	Alanina;		
Q	Glutamina;		
Y	Tirosina;		
Ε	Ácido Glutâmico;		
NH_2	Amidação;		
VMD	Visual Molecular Dynamics;		
Bash	Bourne-again Shell;		

PBE	Equação de Poisson-Boltzmann;
LPBE	Equação de Poisson-Boltzmann Linearizada;
Å	Angstrom;
k_B	Constante de Boltzmann;
Na^+	Íon de sódio;
Cl^{-}	Íon de cloro;
PME	Particle Mesh Ewald.

Sumário

1	Intr	rodução	16
	1.1	A atividade das Proteínas	16
	1.2	A influência do pH	17
	1.3	Dinâmica Molecular em Sistemas Biológicos	18
	1.4	Dinâmica Molecular a pH constante	19
	1.5	Motivação e Objetivos	20
2	Met	codologia	23
	2.1	Algoritmo	23
	2.2	Dinâmica Molecular	25
	2.3	APBS	26
	2.4	Monte Carlo	29
	2.5	Detalhes Computacionais	32
3	Res	ultados e Discussões	34
	3.1	Curva de titulação	36
	3.2	Energias	40
	3.3	Análise de Estrutura Secundária	45

4	Conclusões	47
5	Perspectivas Futuras	48
Re	eferências	49
A	A Equação de Poisson-Boltzmann	55
	A.1 Resolução da Equação de Poisson Boltzmann Linearizada	58

Capítulo 1

Introdução

1.1 A atividade das Proteínas

As proteínas são macromoléculas complexas que desempenham diversas atividades na célula e sua função é dependente dos elementos que compõe sua estrutura: os aminoácidos. Elas estão envolvidas em praticamente todas as cadeias metabólicas da célula. Exercem também funções regulatórias, controlando as condições intra e extracelulares além de serem componentes estruturais fundamentais da célula. Também existem proteínas que geram forças eletroquímicas, forças mecânicas e proteínas que são transportadoras de outras moléculas. Ademais, há proteínas cuja função é parcial ou totalmente desconhecida[1].

Para determinar a função de uma proteína é necessário, dentre outras coisas, determinar sua estrutura. Diferentemente dos carboidratos e dos ácidos nucleicos, as proteínas não possuem uma estrutura regular, pois suas subunidades (os aminoácidos) apresentam propriedades físico-químicas das mais variadas.

Os aminoácidos possuem uma forma apresentada na figura 1.1:



Figura 1.1: Forma geral de um aminoácido.

onde há um carbono α ligado a um grupo amino, um grupo carboxílico, à um hidrogênio

e uma cadeia lateral R que é diferente para cada um, podendo ser ácida, neutra ou básica, dependendo dos grupos químicos de sua composição, o que determina as propriedades físico químicas do aminoácido em questão[2].

Então, em suma, diferentes características físico-químicas dos aminoácidos, tais como carga elétrica e hidrofobicidade, são diretamente responsáveis pela estrutura final que uma proteína assume[3] e atividade que esta desenvolve[4].

1.2 A influência do pH

O pH (potencial hidrogeniônico) é uma propriedade físico-química que mede o grau de acidez ou alcalinidade de uma solução, sendo importante no equilíbrio de um sistema pois determina a protonação dos grupos ionizáveis (amino e ácido carboxílico) dos próprios aminoácidos. Nas proteínas, esses efeitos de mudança de pH afetam a estabilidade, catálise e acoplamento de ligantes[5–9], o que implica na existência de uma faixa de pH onde as funções biológicas são desempenhadas eficientemente. Geralmente tal faixa é estreita e está relacionada a presença de grupos ionizáveis em sítios ativos[10]. Consequentemente, medir precisamente o pK_a desses resíduos é crucial para entender o mecanismo catalítico[11–15].

Esses diversos processos que ocorrem em proteínas, como por exemplo enovelamento de proteína[16–19], interações proteína-proteína[20], ligação proteína-substrato[21, 22] são sensíveis à variações no pH porque, para que um determinado processo ocorra, é necessário que algum grupo químico esteja apto a doar ou receber prótons[23–25], processo este diretamente regulado pelo pH.

Peptídeos que possuem resíduos de aminoácidos de cadeia lateral ácida ou básica têm uma carga diferente dependendo do pH em que ele se encontra, a dificuldade em protonar ou desprotonar um determinado aminoácido é medida pela constante de dissociação ácida daquele aminoácido.

A constante de dissociação ácida, K_a , é uma constante que quantifica o grau de dissociação de um ácido no equilíbrio químico. Essa constante define um ácido como sendo forte ou fraco. Ela é dada pelo quociente entre a concentração dos íons dissociados e do eletrólito. O pK_a é o negativo do logaritmo da constante de dissociação ácida de determinado resíduo $(pK_a = -\log_{10} K_a)$. Ele é importante na estabilidade e funções biológicas de proteínas pois ele, em conjunto com o pH da solução, determina o estado de protonação desse resíduo no dado pH.

Deteminar os valores de pK_a dos aminoácidos é algo amplamente estudado tanto utilizando técnicas experimentais[26, 27] como teóricas[28–31]. Valores de pK_a para aminoácidos isolados com cadeia lateral carregada em solução encontram-se na tabela 1.1[32].

Aminoácido	pK_a
Arginina	13.0
Ácido aspártico	4.0
Cisteína	8.7
Ácido Glutâmico	4.4
Histidina	6.3
Lisina	10.4
Tirosina	9.6

Valores de pK_a para os aminoácidos

Tabela 1.1: Valores de pK_a para os aminoácidos de cadeia lateral carregada.

1.3 Dinâmica Molecular em Sistemas Biológicos

A Dinâmica Molecular é um método que simula a evolução temporal de um sistema utilizando potenciais clássicos para descrever as interações moleculares, de modo que é possível obter informações sobre a dinâmica do sistema em nível atômico/molecular, o que, em muitos casos, pode ser inviável experimentalmente.

A primeira simulação por Dinâmica Molecular foi realizada em 1957 por Alden e Wainwright utilizando modelo de esferas rígidas [33]. Com o tempo, a técnica evoluiu até ser possível a simulação de um líquido, a primeira simulação desse tipo foi uma simulação de água líquida realizada por Stillinger em 1974[34]. Avanços na área computacional e desenvolvimento de novos modelos tornaram possível simular sistemas de maior complexidade e tamanho como as macromoléculas biológicas. A primeira simulação de Dinâmica Molecular de uma proteína foi o estudo da BPTI (inibidor pancreático bovino da tripsina) realizado por McCammon em 1977 [35] e de uma bicamada lipídica por Berendsen e Van Der Ploeg em 1982 [36]. Desde então, as simulações de DM vem sendo aplamente utilizadas no estudo dos mais diversos sistemas biológicos sendo, no caso de proteínas, a principal técnica de simulação.

A confiabilidade dos resultados de DM está diretamente relacionada com a modelagem utilizada. Uma boa modelagem reproduz, de forma satisfatória, o comportamento do sistema real em estudo[37]. A Mecânica Quântica poderia ser utilizada para modelar um sistema muito detalhadamente, mas, para sistemas de muitos átomos essa abordagem se torna inviável devido à complexidade dos cálculos necessários e ao elevado custo computacional. Assim, em simulações de DM, os modelos das moléculas investigadas são construídos a partir de potenciais clássicos efetivos, que incorporam os fenômenos quânticos, de modo a reproduzir, dentro de uma determinada precisão, o comportameto do sistema real. A evolução temporal do sistema é obtida resolvendo as equações de Newton que descrevem o movimento dos átomos. Os átomos são considerados como esferas de Van der Waals que interagem entre si e, porventura com campos externos.

Simulações de Dinâmica Molecular tradicionais utilizam um estado fixo de protonação durante todo tempo de simulação, dessa forma, o pH em que se deseja realizar a simulação é comparado com o pK_a dos resíduos ionizáveis isolados da molécula e, dessa comparação, utiliza-se a protonação apropriada. Essa forma não é a mais eficiente quando se trata de simulações a pH constante, pois o pK_a de um resíduo na proteína pode diferir muito do valor intrínseco e, também, com a protonação sendo mantida fixa, diversos aspectos que envolvem mudanças de protonação não podem ser observados. Dessa forma, o ideal é se fazer uma simulação onde os estados de protonação possam se alterar no decorrer da simulação, respeitando a diferença entre pH e pK_a do resíduo ionizável, por exemplo, se mantendo maior porcentagem de protonação em pH ácido e menor em pH básico.

1.4 Dinâmica Molecular a pH constante

Até o momento diversos métodos de Dinâmica Molecular a pH constante já foram reportados na literatura[29, 38–43]. Esses métodos podem ser divididos em dois grandes grupos, os de protonação discreta (DpHMD)[44, 45] onde a carga muda em valores inteiros, e contínua (CpHMD)[46–50] onde a carga no resíduo é variada continuamente até atingir o valor desejado. Neste trabalho é desenvolvido um método de protonação discreta implementado no *software* GROMACS.

O DpHMD consiste em interromper periodicamente as simulações para realizar passos de Monte Carlo Metrópolis para escolher o novo estado de protonação (mudando ou não do antigo). O cálculo da energia eletrostática do sistema é realizado resolvendo a equação de Poisson-Boltzmann completa, tarefa aqui realizada pelo software APBS[51] e, dessas energias, é calculada a energia livre do sistema. Esse software foi utilizado por considerar um modelo de solvente implícito com soluto não polar representando bem as interações atrativas e repulsivas soluto-solvente.

A primeira ideia para esse tipo de método foi proposto por Baptista et. al.[38] onde é aplicado Poisson-Boltzmann para calcular as energias eletrostáticas durante a simulação de DM.

Um método muito similar é proposto nesse trabalho usando solvente explícito nas simulações de DM[52] com o pacote GROMACS, o software APBS para cálculo das energias e o critério de Metropolis para as decisões de mudança de protonação baseadas na energia.

Foram realizadas simulações em diversos pHs do meio, com água explícita e todos os átomos.

1.5 Motivação e Objetivos

Devido ao fato de as simulações de Dinâmica Molecular convencionais não serem a melhor opção quando se quer observar fenômenos que estão relacionados com mudança de protonação, esse trabalho tem por objetivo desenvolver um sistema para realizar simulações de DM a pH constante. O método utilizado foi interromper periodicamene simulações de DM convencional para alterar o estado de protonação, utilizando, para isso, o método de Monte Carlo.

A proteína escolhida para testar o sistema desenvolvido nesse trabalho foi o peptídeo E2 de Scholtz et. al., 1993 [53]. No trabalho citado, foi sintetizado um peptídeo base $Ac \cdot (AAQAA)_3Y(NH_2)$ [54] escolhido por ser a base de alanina, que é facilmente solúvel, e também por dados conhecidos de estudos de calorimetria[55], apontarem que o próprio backbone desse tipo de peptídeo é responsável pela estabilidade da estrutura em hélice- α em solução aquosa. O peptídeo E2 possui resíduos neutros (alanina, glutamina e tirosina) como o peptídeo inicial de referência e um resíduo ácido, que é o ácido glutâmico, e nas extremidades N-terminal e C-terminal deste peptídeo estão, respectivamente, uma acetilação (Ac) e uma amidação (NH_2) que também vêm do peptídeo inicial, a sequência desse peptídeo se encontra na figura 1.2.

E2 Ac-A-E-Q-A-A-A-Q-A-A-A-Q-A-A-Y(NH₂)

Figura 1.2: Sequência de aminoácidos do peptídeo utilizado.

As simulações de DM a pH constante foram realizadas com esse peptídeo a fim de observar como o estado de protonação varia com o pH. Ele foi construído com a ferramenta *Molefacture* do *software* VMD[56] em quatro conformações diferentes: inteiramente hélice, inteiramente random coil e metade coil metade hélice com a hélice na metade do N-terminal e coil na do C-terminal (hélice-coil) e o contrário (coil-hélice) como mostrado na figura 1.4.



Figura 1.3: Representação construída no software VMD do peptídeo utilizado com todos os átomos e estrutura secundária nas conformações (a) hélice, (b) hélice-coil, (c) coil-hélice e (d) coil.

Segundo o artigo [53], dependendo do posicionamento do ácido glutâmico o pH influencia na fração de hélice, então, como uma validação adicional do método tentamos reproduzir a curva de fração de hélice do peptídeo E2. Os dados retirados do artigo experimental que tentaremos reproduzir teoricamente com simulações de Dinâmica Molecular a pH constante estão na figura 1.4.



Figura 1.4: Gráfico de fração de hélice *versus* pH do peptídeo E2 adaptado do artigo Scholtz et. al., 1993.

Essa análise é difícil de ser reproduzida devido ao fato de que a variação de hélice observada é de apenas 10%, o que corresponde à pouco mais de um resíduo de aminoácido no peptídeo, e também, não se sabe se a porcentagem de hélice nos resultados de CD reportados no trabalho, de 40 a 50%, significa que todos os peptídeos da solução apresentam essa porcentagem de hélice ou se temos essa porcentagem de peptídeos em hélice perfeita e o restante em random coil.

Capítulo 2

Metodologia

2.1 Algoritmo

Neste trabalho é desenvolvido um método para implementar simulações de DM a pH constante utilizando um *script* que mescla simulações de Dinâmica Molecular com o método Monte Carlo para a decisão da protonação (ou não) do resíduo ionizável da proteína em questão. Também foi necessário o desenvolvimento de alguns programas auxiliares ao script para tratar das variáveis reais e cálculos. Um fluxograma do método utilizado no desenvolvimento do trabalho encontra-se na figura 2.1.

Para iniciar o script criado é necessário o arquivo de coordenadas da proteína desprotonada com águas e íons e os arquivos de topologia para uma situação de a proteína estar protonada e uma para quando ela estiver desprotonada. O arquivo de topologia é o arquivo onde são especificados os parâmetros de interação ligados e não-ligados dos átomos que compõe o sistema. É necessário também um arquivo com os parâmetros da simulação como número de passos, temperatura, etc. (.mdp) de minimização de energia onde é feita uma leve equilibração do sistema, dinâmica de restrição para relaxar o solvente em volta da proteína e dinâmica molecular propriamente dita.



Figura 2.1: Fluxograma detalhado do algoritmo utilizado no trabalho.

O script desenvolvido foi testado na simulação do peptídeo E2[53] em solução aquosa de NaCl a 0,15 M. Utilizando quatro estruturas iniciais para o peptídeo. Variamos também o tempo dos passos de DM entre as etapas de alteração do estado de protonação. Realizamos quatro simulações de 10 ns divididas em 100 passos de 100 ps cada um, iniciando em cada uma das configurações iniciais e, na conformação coil-hélice, foi realizada uma simulação de 50 ns, dividida em 100 passos de 500 ps.

2.2 Dinâmica Molecular

Em simulações de DM é utilizado o Método das Diferenças Finitas[37] para a resolução numérica das equações de movimento, uma vez que potenciais contínuos acoplam o movimento de todas as partículas não podendo ser resolvidas analiticamente. Uma partícula de massa m_i , sujeita à uma força F_i e se movendo ao longo de uma trajetória na coordenada x_i possui a seguinte equação de movimento:

$$F_i = m_i \frac{d^2 x_i}{dt^2} \tag{2.1}$$

O Método de Verlet diz que a partir da posição da partícula em um tempo t pode-se escrever a posição da partícula em tempos $t \pm \delta t$ de acordo com uma expansão de Taylor, da forma:

$$x(t+\delta t) = x(t) + \delta t \frac{dx(t)}{dt} + \frac{1}{2} \delta t^2 \frac{d^2 x(t)}{dt^2} \dots$$
(2.2)

$$x(t - \delta t) = x(t) - \delta t \frac{dx(t)}{dt} + \frac{1}{2} \delta t^2 \frac{d^2 x(t)}{dt^2} \dots$$
(2.3)

Somando as duas expressões temos:

$$x(t+\delta t) = 2x(t) - x(t-\delta t) + \delta t^2 a(t)$$
(2.4)

Assim, a posição pode ser calculada a partir de dois instantes de tempo anteriores, sem a aparição explícita da velocidade que, se necessária, pode ser calculada como:

$$v(t) = \frac{x(t+\delta t) - x(t-\delta t)}{2\delta t}$$
(2.5)

Dessa forma, as equações de movimento podem ser resolvidas para um sistema de muitos corpos, nesse caso, sistemas atômicos.

No GROMACS utiliza-se uma modificação do Método de Verlet chamado Leap-frog.

Os potenciais clássicos utilizados para modelar um determinado sistema e os parâmetros necessários formam o Campo de Força. Os sistemas são descritos utilizando a aproximação

de Born-Oppenheimer (apenas os movimentos dos núcleos atômicos são considerados) e as interações entre eles são modeladas por um potencial clássico que, geralmente, assume a seguinte forma:

$$V = \sum_{lig} K_r (r - r_0)^2 + \sum_{angulos} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_{n, diedros} C_n [1 - (-1)^n \cos(n\phi - \gamma_n)] + \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} + \sum_{i,j} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r}\right)^6 \right]$$
(2.6)

onde cada termo descreve mudanças na energia potencial em função de cinco diferentes parâmetros do sistema. O primeiro termo é devido ao estiramento e contração da ligação entre os átomos, o segundo termo à variação do ângulo entre os átomos, o terceiro à variação do ângulo diedral, o quarto à interação coulombiana devido à interação eletrostática entre os átomos e o último descreve as interações de Van der Waals.

Então, com a Dinâmica Molecular é possível obter a trajetória do sistema ao longo do tempo, sendo possível analisar diversas de suas propriedades físico-químicas a partir de médias sobre esse *ensemble*.

2.3 APBS

O software utilizado para calcular as energias livres de cada estado de protonação foi o Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS). O APBS é aplicado para cálculos com biomoléculas solvatadas resolvendo a equação de Poisson-Boltzmann (PBE). Essa equação descreve interações eletrostáticas envolvendo a molécula de interesse e seu meio aquoso e salino. Uma descrição mais elaborada da equação de Poisson-Boltzmann e um exemplo de resolução da equação de Poisson-Boltzmann linearizada (LPBE) na simetria esférica encontramse no Apêndice A.

A constante de dissociação ácida K_a vem da dissociação dos componentes[57]:

$$HA \stackrel{K_a}{\rightleftharpoons} H^+ + A^- \tag{2.7}$$

onde HA é o resíduo ionizável protonado e com carga neutra, H^+ é o próton isolado e

 A^- é o resíduo desprotonado e com carga negativa.

Ela pode ser calculada com base na atividade dos componentes, que em condições ideais, pode ser substituída pelas concentrações dos componentes:

$$K_a \approx \frac{C_{H^+} + C_{A^-}}{C_{HA}} \tag{2.8}$$

onde C_{H^+} é a concentração de prótons na solução, C_{A^-} é a concentração de peptídeos desprotonados e com carga negativa na solução e C_{HA} é a concentração de peptídeos protonados com carga neutra na solução.

A constante de equilíbrio químico está diretamente relacionada com as energias livres por:

$$-RT\ln K_a = \Delta G = G_{HA} - G_{H^+} - G_{A^-} \tag{2.9}$$

onde R é a constante universal dos gases perfeitos, T é a temperatura absoluta, ΔG é a energia livre resultante da dissociação dos compontentes, ou seja, da desprotonação do resíduo, G_{HA} , G_{H^+} e G_{A^-} são as energias do resíduo protonado, do próton livre e do resíduo desprotonado, respectivamente.

Partindo de que:

$$\Delta G = -RT \ln K_a = -2,203RT \log K_a \tag{2.10}$$

Mas como:

$$pK_a = -\log K_a \tag{2.11}$$

Então, o pK_a pode ser dado por[40]:

$$pK_a = \frac{\Delta G}{2,303RT} \tag{2.12}$$

Valores de pK_a em proteínas são calculados de acordo com as expressões abaixo[58]:

$$HA(aq) \xrightarrow{\Delta G_{\text{HA,modelo}}} H^+(aq) + A^-(proteina)$$
(2.13)

$$HA(proteina) \xrightarrow{\Delta G_{HA}} H^+(aq) + A^-(aq)$$
 (2.14)

Para calcular a energia desconhecida ΔG_{HA} do modelo, é necessário calcular as energias livres ΔG_{HA} e ΔG_{A^-} , que correspondem aos estados protonado e desprotonado respectivamente, de acordo com o ciclo da figura 2.2 [59].



Figura 2.2: Ciclo termodinâmico completo da protonação do resíduo ionizável.

Neste ciclo, são representadas as energias livres para a desprotonação do resíduo ionizável na fase gasosa, em solução e na proteína. No caso desse trabalho, é utilizado apenas o ciclo que envolve o resíduo na solução e na proteína. Com base nesse esquema, as energias livres ΔG_{HA} e ΔG_{A^-} podem ser determinadas via equação de Poisson-Boltzmann e são calculadas por:

$$\Delta G_X = \Delta G_{prot,X} - \Delta G_{prot,X=0} - \Delta G_{Xisolado}$$
(2.15)

onde $\Delta G_{prot,X}$ é a energia eletrostática da proteína com o grupo ionizável X ligado com suas cargas nos valores normais, $\Delta G_{prot,X=0}$ é a energia eletrostática da proteína com o grupo ionizável X ligado com suas cargas mudadas para zero e $\Delta G_{Xisolado}$ é a energia eletrostática do grupo X em solução com suas cargas nos valores normais.

Com isso, os valores das energias livres do sistema nos estados protonado e desprotonado serão calculados utilizando a equação 2.15, e as energias individuais necessárias para o cálculo serão realizadas no software APBS.

2.4 Monte Carlo

O método de Monte Carlo utiliza configurações aleatórias geradas computacionalmente formando uma cadeia Markoviana, onde um determinado estado depende apenas do estado anterior para realização de uma simulação computacional[60, 61], baseando-se assim em funções de densidades de probabilidade para descrever o processo físico, já que uma solução analítica é inviável para um problema de muitos corpos devido à sua complexidade, logo, para esses sistemas é necessária uma abordagem numérica. Esse procedimento numérico é amplamente utilizado na análise de propriedades de sistemas que convergem para o equilíbrio químico como as proteínas e outras macromoléculas biológicas.

Uma simulação de Monte Carlo gera configurações do sistema mudando de maneira aleatória as posições, orientações e conformação das moléculas presentes utilizando o princípio do Balanço Detalhado para definir um critério de aceitação das configurações geradas para satisfazer a distribuição de probabilidades e encontrar os estados de menor energia.

Existem diversos algoritmos que são baseados no método de Monte Carlo mas, dentre eles, o algoritmo de Metropolis[62] é, provavelmente, o mais utilizado. O algoritmo de Metropolis amostra o sistema segundo uma distribuição de Boltzmann. Dadas uma configuração i e uma configuração posterior j quaisquer, sendo P_i e P_j as probabilidades de ocorrência das duas configurações, a razão entre elas pode ser descrita como:

$$w = \frac{P_j}{P_i} = \frac{Ae^{-\frac{E_j}{k_BT}}}{Ae^{-\frac{E_i}{k_BT}}} = exp\left[-\frac{E_j - E_i}{k_BT}\right] = exp\left[-\frac{\Delta E}{k_BT}\right]$$
(2.16)

onde w é a razão das probabilidades, A é uma constante de normalização, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura em Kelvin, $E_i \in E_j$ são as energias das configurações $i \in j$, e ΔE é a diferença entre as energias.

Resolvendo esta equação determina-se qual é a configuração aceita, uma das soluções existentes e também a que é utilizada neste trabalho é a proposta por Metropolis[62] onde para:

$$P_j = exp\left[-\frac{\Delta E}{k_B T}\right] \quad , \quad \Delta E > 0, \ R[0,1] \tag{2.17}$$

$$P_j = 1 \quad , \quad \Delta E < 0 \tag{2.18}$$

ou seja, para situações onde a energia diminui, a nova configuração é sempre aceita, quando a energia aumenta, a probabilidade é dada pelo peso de Boltmann comparado com o número aleatório sorteado R. O algoritmo de Metropolis encontra as variáveis macroscópicas de um sistema físico que esteja em equilíbrio termodinâmico, nessas condições a distribuição de probabilidades para o microestado é a distribuição de Boltzmann. Sendo assim, os valores das variávies macroscópicas no equilíbrio podem ser calculados como a média de todos os microestados compatíveis tendo como peso a distribuição de Boltzmann.

No algoritmo de Metropolis são efetuadas médias sobre um ensemble em vez de médias temporais, logo, como condição, o sistema deve ser ergódico. Um sistema é ergódico quando qualquer um dos seus microestados pode ser obtido a partir de qualquer outro por uma série de transições, outra condição é que uma série aleatória de transições leve ao macroestado de equilíbrio.

Como não é relevante o roteiro pelo qual o sistema atinge o equilíbrio, podemos escolher qualquer sequência de transições desde que a distribuição final de microestados seja a situação de equilíbrio termodinâmico, para este propósito que é utilizado o balanço detalhado.

O algoritmo de Metropolis pode ser implementado de acordo com o esquema da figura 2.3.



Figura 2.3: Fluxograma do critério de Metropolis.

. O algoritmo de Metropolis está sendo utilizado para amostrar o sistema segundo uma distribuição de Boltmann de acordo com o pH do meio em relação com o pK_a do resíduo ionizável. Para incluir a influência do pH na escolha do novo estado de protonação foi feita uma modificação na expressão que dá a energia que será considerada no Monte Carlo dada na expressão 2.19

Após calcular as grandezas $\Delta_{xfer}G_{HA}$ e $\Delta_{xfer}G_{A^-}$ pela equação 2.13, a variação da energia eletrostática entre o estados é, no caso da protonação, dada pela equação 2.17, e pela

equação 2.18 no caso da desprotonação.

$$\Delta G^{el} = \Delta_{xfer} G_{HA} - \Delta_{xfer} G_{A^-} \tag{2.19}$$

ou,

$$\Delta G^{el} = \Delta_{xfer} G_{A^-} - \Delta_{xfer} G_{HA} \tag{2.20}$$

A energia livre calculada ΔG^{el} será substituída na expressão abaixo[63–66]:

$$\Delta G = \Delta G^{el} \pm \xi k_B T (pH - pK_a^i) \ln 10 \tag{2.21}$$

onde ΔG será o valor de energia utilizado no critério de Metropolis, pH do meio, pK_a^i é o pK do resíduo ionizável isolado presente no peptídeo, ξ pode ter os valores +1 quando o resíduo é ácido e -1 quando o resíduo é básico e o sinal + será usado no caso de ocorrer uma protonação e o sinal - no caso de uma desprotonação.

Dessa forma, a contribuição da diferença entre o pH do meio e o pK_a do resíduo é levada diretamente em consideração no passo de Monte Carlo.

2.5 Detalhes Computacionais

No APBS foi fornecido um arquivo com os parâmetros de entrada para o programa como na tabela 2.1.

O peptídeo para realizar as simulações foi construído no software VMD[56], solvatado em uma caixa de dimensões 55Å, 55Å, 55Å nas direções x, y e z com cerca de 4900 moléculas de água e íons de Na^+ e Cl^- a uma concentração de 0,15 mM. As simulações foram realizadas com o pacote GROMACS[67] no campo de força CHARMM27[68] com o modelo de água TIP3P[34].

Todas as simulações foram realizadas utilizando-se condições periódicas de contorno no ensemble NPT. A temperatura e pressão foram mantidas constantes, respectivamente, utilizando v-rescale e Berendesen e nos valores de 300K e 1 atm. As interações não ligadas de Van der Waals foram truncadas em 14Å, as interações eletrostáticas de curto alcance foram consideradas até a distância de 14Å e além disso, para o cálculo das interações eletrostáticas de longo alcance, foi utilizado o algoritmo Particle Mesh Ewald (PME).

Parâmetros	para	0	APBS
------------	------	---	------

Parâmetro	Valor	Significado
-	mg-auto	Tipo de cálculo
mol	sistema.pqr	Sistema que se deseja calcular a energia livre
mol	referência.pqr	Sistema de referência para o cálculo da energia
dime	$129 \ 129 \ 129$	Dimensões do grid (valor recomendado para proteínas)
cglen	$52.0\ 66.0\ 79.0$	Espaçamento grosseiro do grid
fglen	$51.0 \ 59.0 \ 67.0$	Espaçamento fino do grid
cgcent e fgcent	$mol \ 2$	Centrar o grid na molécula 2
-	lpbe	Resolver a equação de Poisson-Boltzmann linearizada
bcfl	sdh	Condições de contorno (momento de monopolo)
pdie	20.00	Constante dielétrica do soluto (valor recomendado)
sdie	78.54	Constante dielétrica do solvente
srfm	smol	Definição da superfície da molécula
sdens	40.0	Densidade da esfera
chgm	spl2	Spline-based discretização das funções delta
srad	1.40	Solvent probe radius da superfície molecular
swin	0.30	Janela do solvente
temp	273.15	Temperatura
calcenergy	total	Fazer o cálculo da energia
calcforce	no	Não calcular as forças

Tabela 2.1: Parâmetros utilizados nos cálculos de energia livre no software APBS

Foi realizada inicialmente uma minimização de energia de 1000 passos, 100 ps de dinâmica de restrição (com passos de integração de 2 fs), e também 10 ns de dinâmica molecular dividida em 100 passos de 100 ps (com 1 fs de passo de integração). Então, para as cinco simulações, ao fim de cada passo de DM, a configuração final é utilizada para cálculo da energia livre via APBS, o estado de protonação é mudado e também é calculada sua energia livre da mesma maneira, essas duas energias são utilizadas no critério de Metrópolis para a decisão do estado de protonação do próximo passo. Para manter a neutralidade do sistema é feito um controle do número de íons Cl^- presentes na solução, quando é realizada uma protonação adiciona-se também um íon Cl^- para que a carga continue neutra, de maneira análoga, quando é realizada uma desprotonação é retirado um íon.

Capítulo 3

Resultados e Discussões

Utilizando o script desenvolvido, foram feitas simulações em quatro configurações diferentes do peptídeo. A primeira, onde o peptídeo estava inteiro em hélice- α (aqui chamada configuração hélice), na segunda o peptídeo estava com oito resíduos (50%) em configuração *random* coil e os outros oito resíduos em hélice- α (configuração coil-hélice), a terceira onde inverteu-se a conformação anterior, ou seja, primeiro os oito resíduos em hélice- α e depois os oito resíduos em coil (configuração hélice-coil) e, por último, todo o peptídeo em conformação *random* coil (configuração coil).

Incialmente, foram realizadas simulações nas quatro conformações de 10 ns divididos em 100 passos de 100 ps, depois, a fim de refinar os resultados foi feita uma simulação de 50 ns divididos em 100 passos de 500 ps em conformação coil-hélice. Todas essas simulações foram feitas a pH constante indo por unidade de 1 até 7 e, depois realizada também uma simulação no pH igual ao pK_a do resíduo ionizável, no caso, 4,4.

Entre cada simulação de DM foi realizado um passo de Monte Carlo para decidir o estado de protonação para o próximo passo, mudando o estado de protonação e calculando as energias necessárias, quando ocorre uma protonação, a carga do peptídeo vai de -1 para 0, sendo necessária a inclusão de um átomo de Cl^- , caso contrário, ou seja, uma despronotação, a carga do peptídeo vai de 0 para -1 e um átomo de CL^- é excluído, com o intuito de manter a carga líquida do sistema igual à zero. Uma ilustração desse processo é apresentada na figura 3.1.

Os resultados obtidos desses 5 tipos de simulações em todos os pHs encontram-se descritos abaixo.



(b) Peptídeo protonado

Figura 3.1: Configuração do peptídeo protonado e desprotonado mostrando a mudança na protonação durante a simulação computacional.

3.1 Curva de titulação

Para analisar os resultados das simulações feitas utilizando o script desenvolvido a primeira etapa foi gerar uma curva de titulação, com base na porcentagem de tempo em que a proteína estava protonada ou desprotonada. Para isso, foram analisados os gráficos de carga para cada pH apresentados abaixo, como o resíduo ionizável da proteína é um ácido glutâmico, a carga varia entre -1, quando o resíduo está desprotonado, e 0, quando está protonado. Os gráficos desse tipo para a conformação hélice estão na figura 3.2.

Em todas as conformações foram realizadas simulações em pHs variando de 1 a 8 em números inteiros para analisar como a carga se comportaria durante tal processo e, também, realizada uma simulação no pK_a do resíduo isolado.

Analisando as figuras nota-se que em pHs baixos o peptídeo se encontra protonado na maior parte do tempo, já em pHs altos ela já está desprotonada na maior parte do tempo, o que era esperado o que já demonstra concordância entre o método e resultados experimentais. O mesmo comportamento foi observado para todas as simulações. A partir dos gráficos anteriores de todas as conformações¹ pôde ser gerada a curva de titulação desse peptídeo:

 $^{^1 \}mathrm{Os}$ gráficos para as outras três conformações estudadas foram omitidas pois apresentam basicamente o mesmo padrão dos gráficos apresentados da Figura 3.2



Figura 3.2: Gráficos de carga *versus* passo para os pHs (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4, (e) 4,4, (f) 5, (g) 6, (h) 7, da simulação de 10 ns do peptídeo em configuração hélice.

Gráfico de Fração Desprotonada versus pH



Figura 3.3: Curva de titulação do peptídeo obtida a partir dos resultados das simulações.

Para obter os valores de pK_a do resíduo no peptídeo pelo sistema computacional utilizado os resultados foram fitados com a equação 3.1, que é a equação de Henderson-Hasselbalch.

$$pH = pK_a + \log_{10}\left\{\frac{[A^-]}{[HA]}\right\}$$
(3.1)

Logo, a curva de titulação obtida concorda com o esperado, tendo a forma muito parecida com a equação de Henderson-Hasselbalch. Fitando os resultados obtidos com a equação, o pH onde a proteína se encontra metade do tempo protonada é, na simulação em hélice de é 4,2, em hélice-coil é 4,4, em coil-hélice é 4,3 tanto para a simulação de 10 ns quanto para a de 50 ns e de 4,3 em coil, valores muito próximo do pK_a do resíduo isolado que é 4,4, como se esperava já que o peptídeo é muito pequeno.

A fim de comparação do método aqui desenvolvido com um método mais utilizado que é a λ -dinâmica foi utilizado o trabalho de Goh et. al. de 2014[49] de CpHMD utilizando λ -dinâmica e solvente explícito para determinar os valores de pK_a de vários aminoácidos, incluindo o ácido glutâmico. Desse trabalho, têm se a curva de titulação apresentada na figura 3.4.



Figura 3.4: Curva de titulação do ácido glutâmico adaptado de Goh et. al.

Pode-se notar que os valores obtidos nesse trabalho condizem muito bem com Goh et. al. e também com o valor de pK_a do resíduo isolado. O que mostra certa confiabilidade do método de Dinâmica Molecular a pH constante aqui desenvolvido.

3.2 Energias

Em simulações de DM é importante analisar como se comporta a energia no decorrer da simulação, para saber se o sistema atingiu um equilíbrio, se houve mudanças conformacionais dentre outros fatores. Então, nesse trabalho foram realizadas análises energéticas em função do tempo de simulação de três tipos: a energia eletrostática do sistema calculada no GROMACS, a energia eletrostática calculada pelo APBS, e a energia total também calculada pelo GROMACS.

Primeiro, foram feitos gráficos de energia eletrostática e total pelo GROMACS a fim de avaliar se a simulação atinge um equilíbrio. Os gráficos das energias eletrostáticas para as simulações de 10 ns estão na figura 3.5, os das energias totais na figura 3.6, para a simulação de 50 ns, ambos os gráficos estão na figura 3.7.

Também foram plotados os gráficos com as energias calculadas em cada passo pelo APBS, nestes gráficos foram utilizadas apenas as energias dos estados escolhidos (protonado ou desprotonado) a cada passo, os dados estão apresentados na figura 3.8.

Foram obtidos valores de energia diferentes para configurações de estrutura secundária diferentes e, em todas as simulações os valores de energia se comportaram de forma linear, o que mostra uma estabilidade energética da simulação. Também, os valores de energia ao mudar o estado de protonação não variam significativamente em comparação com o sistema inteiro. Os valores de energia livre calculados com o APBS pela equação 2.15 mostram que as energias para protonar ou desprotonar são pequenas, muito menores do que 1 k_BT .



Figura 3.5: Gráficos de energia eletrostática calculada pelo GROMACS versus tempo para as simulações de 10 ns nos pHs (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4, (e) 4,4, (f) 5, (f) 6 e (h) 7.



Figura 3.6: Gráficos de energia total calculada pelo GROMACS versus tempo para as simulações de 10 ns nos pHs (a) 1, (b) 2, (c) 3_{42} d) 4, (e) 4,4, (f) 5, (g) 6 e (h) 7.



Figura 3.7: Gráficos de energia eletrostática e total calculadas pelo GROMACS versus tempo para a simulação de 50 ns nos pHs (a) 1, (b) 23 (c) 3, (d) 4, (e) 4,4, (f) 5, (g) 6 e (h) 7.



Figura 3.8: Gráficos de energia livre calculada pelo APBS versus tempo para todas as simulações nos pHs (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4, (e) 4,4, (f) 5, (g) 6 e (h) 7. $\begin{array}{c} 44 \end{array}$

3.3 Análise de Estrutura Secundária

Na tentativa de reproduzir os resultados experimentais de fração de hélice para esse peptídeo foram realizadas análises de estrutura secundária, utilizando o VMD, para cada configuração nos diferentes pHs.

Na maioria das simulações a estrutura secundária não variou muito, mas na simulação que se iniciou em configuração coil a fração de hélice aumentou muito com o pH, os gráficos de estrutura secundária por resíduo por passo para todos os pHs da simulação em coil estão na figura 3.10^2 . Os gráficos de fração de hélice por pH para todas as simulações na figura 3.9.

Pode-se notar que o resultado obtido nesse passo foi muito diferente do esperado. Não foi possível observar uma variação de 10% no aumento da fração de hélice com o aumento do pH como o esperado de acordo com resultados experimentais. Isso de deve ao fato de não haver informação sobre o tempo que leva para ocorrer uma protonação (ou despronotação) desse peptídeo, o tempo utilizado de 100 ps e de 500 ps podem não ter sido suficientes para mimetizar o sistema de maneira mais realística. Também o tamanho total da simulação (da ordem de nanossegundos) pode não ter sido o suficiente para observar mudanças tão minuciosas estrutura secundária.



Gráfico de Fração de Hélice versus pH

Figura 3.9: Gráfico de fração de hélice versus pH para todas as simulações.

 $^{^{2}}$ Os gráficos para as outras conformações foram omitidas por não haver variação efetiva da estrutura secundária com o tempo e nem com a mudança no pH, então, somente são apresentados os gráficos de fração de hélice versus pH para as outras conformações.



Figura 3.10: Gráfico de estrutura secundária por resíduo resultado da simulação de 10 ns do peptídeo em configuração coil.

Capítulo 4

Conclusões

Com base nos resultados obtidos, percebe-se que a Dinâmica Molecular a pH constante reproduz melhor o comportamento do sistema do que a Dinâmica convencional porque o estado de protonação pôde variar com o tempo no decorrer da simulação. De forma geral, o método implementado teve sucesso pois os gráficos construídos de carga versus tempo foram satisfatórios chegando no resultado esperado pois em pHs mais baixos o peptídeo ficou maior parte do tempo protonado e foi aumentando gradativamente a desprotonação até que, em pHs bem mais altos do que o pK_a do ácido glutâmico (4,4) o peptídeo estava na maior parte do tempo desprotonado.

Os valores de pK_a para o ácido glutâmico também foram satisfatórios, pois concordaram muito com o valor tabelado e também com o valor obtido teoricamente pelo trabalho de Goh et. al.

A comparação do gráfico de fração de hélice *versus* pH com os resultados experimentais não foi bem sucedida pois a variação na fração de hélice é muito pequena, de apenas 10% o que, no caso, corresponde à aproximadamente um resíduo e também, não se sabe se a porcentagem de hélice nos resultados de CD reportados no trabalho, de 40 a 50%, significa que todos os peptídeos da solução apresentam essa porcentagem de hélice ou se temos essa porcentagem de peptídeos em hélice perfeita e o restante em random coil.

Capítulo 5

Perspectivas Futuras

Como perspectiva futura desse trabalho têm-se que realizar mais simulações longas, com tempos variados na tentativa de reproduzir melhor os resultados experimentais de estrutura secundária.

Deseja-se futuramente generalizar o sistema aqui desenvolvido para funcionar com qualquer tipo de peptídeo que tenha outros tipos de resíduos ionizáveis e também mais de um resíduo desse tipo. E também, desenvolver um sistema para calcular a energia livre de protonação (ou desprotonação) do sistema de maneira a incluir uma membrana fosfolipídica como outro meio com o qual o peptídeo possa interagir. Essa abordagem tem por aplicabilidade estudar teoricamente a interação de peptídeos antimicrobianos com membranas a pH constante. Trabalho esse que é desenvolvido por outros grupos de pesquisa experimental e computacional do departamento.

Referências Bibliográficas

- [1] D. Voet and J. G. Voet. *Bioquímica*. Artmed, 4 edition, 2013.
- [2] P. Atkins and J. de Paula. Físico-Química v. 1. LTC Livros Técnicos e Científicos Editora S. A., 8 edition, 2008.
- [3] D. L. Nelson and M. M. Cox. Princípios de Bioquímica de Lehninger. Artmed, 6 edition, 2014.
- [4] S. R. Trevino, J. M. Scholtz, and C. N. Pace. Amino acid contribution to protein solubility: Asp, glu, and ser contribute more favorably than the other hydrophilic amino acids in {RNase} sa. Journal of Molecular Biology, 366(2):449 – 460, 2007.
- [5] M. F. Perutz. Electrostatic effects in proteins. *Science*, 201(4362):1187–1191, 1978.
- [6] A. Warshel. Calculations of chemical processes in solutions. The Journal of Physical Chemistry, 83(12):1640–1652, 1979.
- [7] A. Warshel and S. T. Russell. Calculations of electrostatic interactions in biological systems and in solutions. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 17:283–422, 8 1984.
- [8] J. B. Matthew. Electrostatic effects in proteins. Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry, 14(1):387–417, 1985. PMID: 3890885.
- [9] M. Machuqueiro and A. M. Baptista. Molecular dynamics at constant ph and reduction potential: Application to cytochrome c3. Journal of the American Chemical Society, 131(35):12586-12594, 2009. PMID: 19685871.
- [10] T. K. Harris and G. J. Turner. Structural basis of perturbed pka values of catalytic groups in enzyme active sites. *IUBMB Life*, 53(2):85–98, 2002.
- [11] J. E. Nielsen and J. A. McCammon. Calculating pka values in enzyme active sites. *Protein Science*, 12(9):1894–1901, 2003.
- [12] E. Demchuk, U. K. Genick, T. T. Woo, E. D. Getzoff, and D. Bashford. Protonation states and ph titration in the photocycle of photoactive yellow protein. *Biochemistry*, 39(5):1100–1113, 2000. PMID: 10653656.

- [13] V. Dillet, H. J. Dyson, and D. Bashford. Calculations of electrostatic interactions and pkas in the active site of escherichia coli thioredoxin,. *Biochemistry*, 37(28):10298–10306, 1998. PMID: 9665738.
- [14] E. J. Wood. Proteins: Structures and molecular properties: By t e creighton. pp 515. w h freeman, new york. 1983. £33.75 isbn 0-7167-1566-x. *Biochemical Education*, 13(2):88– 88, 1985.
- [15] D. G. Herries. Enzyme structure and mechanism (second edition), by alan fersht. pp 475. w h freeman, new york. 1984. isbn 0–7167–1614–3 or isbn 0–7167–1615–1 (pbk). Biochemical Education, 13(3):146–146, 1985.
- [16] A. Bierzynski, P. S. Kim, and R. L. Baldwin. A salt bridge stabilizes the helix formed by isolated c-peptide of rnase a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(8):2470–2474, 1982.
- [17] D. N. Brems S. Marqusee E. J. York I. M. Chaiken J. M. Stewart R. L. Baldwin K. R. Shoemaker, P. S. Kim. Nature of the charged-group effect on the stability of the c-peptide helix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(8):2349–2353, 1985.
- [18] M. Schaefer, H. W. T. Van Vlijmen, and M. Karplus. Electrostatic contributions to molecular free energies in solution. In Enrico Di Cera, editor, *Linkage Thermodynamics* of Macromolecular Interactions, volume 51 of Advances in Protein Chemistry, pages 1 – 57. Academic Press, 1998.
- [19] J. W. Kelly. Alternative conformations of amyloidogenic proteins govern their behavior. Current Opinion in Structural Biology, 6(1):11 – 17, 1996.
- [20] F. B. Sheinerman, R. Norel, and B. Honig. Electrostatic aspects of protein-protein interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(2):153 – 159, 2000.
- [21] A. Warshel. Electrostatic basis of structure-function correlation in proteins. Accounts of Chemical Research, 14(9):284–290, 1981.
- [22] N. Narayana S. S. Taylor P. H. Hünenberger, V. Helms and J. A. McCammon. Determinants of ligand binding to camp-dependent protein kinase. *Biochemistry*, 38(8):2358– 2366, 1999. PMID: 10029529.
- [23] B. Honig and A. Nicholls. Classical electrostatics in biology and chemistry. Science, 268(5214):1144–1149, 1995.
- [24] J. Gao, P. Müller, M. Wang, S. Eckhardt, M. Lauz, K. M. Fromm, and B. Giese. Electron transfer in peptides: The influence of charged amino acids. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(8):1926–1930, 2011.

- [25] M. Nishikawa, S. Hasegawa, F. Yamashita, Y. Takakura, and M. Hashida. Electrical charge on protein regulates its absorption from the rat small intestine. *American Journal* of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology, 282(4):G711–G719, 2002.
- [26] K. Včeláková, I. Zusková, E. Kenndler, and B. Gaš. Determination of cationic mobilities and pka values of 22 amino acids by capillary zone electrophoresis. *ELECTROPHORE-SIS*, 25(2):309–317, 2004.
- [27] Y. Henchoz, J. Schappler, L. Geiser, J. Prat, P. Carrupt, and J. Veuthey. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 389(6):1869–1878, 2007.
- [28] R. J. Motekaitis and A. E. Martell. Program pkas: a novel algorithm for the computation of successive protonation constants. *Canadian Journal of Chemistry*, 60(2):168–173, 1982.
- [29] J. A. Wallace and J. K. Shen. Chapter 19 predicting pka values with continuous constant ph molecular dynamics. In *Biothermodynamics, Part B*, volume 466 of *Methods* in *Enzymology*, pages 455 – 475. Academic Press, 2009.
- [30] M. R. Gunner, X. Zhu, and M. C. Klein. Mcce analysis of the pkas of introduced buried acids and bases in staphylococcal nuclease. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 79(12):3306–3319, 2011.
- [31] J. Antosiewicz, J. A. McCammon, and M. K. Gilson. Prediction of ph-dependent properties of proteins. *Journal of Molecular Biology*, 238(3):415 – 436, 1994.
- [32] J. E. Nielsen and G. Vriend. Optimizing the hydrogen-bond network in poisson-boltzmann equation-based pka calculations. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 43(4):403–412, 2001.
- [33] B. J. Alder and T. E. Wainwright. Phase transition for a hard sphere system. The Journal of Chemical Physics, 27(5):1208–1209, 1957.
- [34] W. L. Jorgensen. Quantum and statistical mechanical studies of liquids. 10. transferable intermolecular potential functions for water, alcohols, and ethers. application to liquid water. Journal of the American Chemical Society, 103(2):335–340, 1981.
- [35] J. A. McCammon, B. R. Gelin, and M. Karplus. Dynamics of folded proteins. *Nature*, 267:585–590, 1977.
- [36] P. Van der Ploeg and H. Berendsen. Molecular dynamics simulation of a bilayer membrane. Journal of Chemical Physics, 76(6):3271–3276, 1982.
- [37] A. R. Leach. Molecular Modelling: Principles and Applications. Pearson Education. Prentice Hall, 2001.
- [38] A. M. Baptista, V. H. Teixeira, and C. M. Soares. Constant-ph molecular dynamics using stochastic titration. *The Journal of Chemical Physics*, 117(9):4184–4200, 2002.

- [39] R. Bürgi, P. A. Kollman, and W. F. van Gunsteren. Simulating proteins at constant ph: An approach combining molecular dynamics and monte carlo simulation. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 47(4):469–480, 2002.
- [40] J. Mongan and D. A. Case. Biomolecular simulations at constant ph. Current Opinion in Structural Biology, 15(2):157 – 163, 2005. Theory and simulation/Macromolecular assemblages.
- [41] J. Khandogin and C. L. Brooks III. Chapter 1 molecular simulations of ph-mediated biological processes. volume 3 of Annual Reports in Computational Chemistry, pages 3 - 13. Elsevier, 2007.
- [42] J. Chen, C. L. Brooks III, and J. Khandogin. Recent advances in implicit solvent-based methods for biomolecular simulations. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(2):140
 – 148, 2008. Theory and simulation / Macromolecular assemblages.
- [43] A. Ben-Shimon, D. E. Shalev, and M. Y. Niv. Protonation states in molecular dynamics simulations of peptide folding and binding. *Current Pharmaceutical Design*, 19(23):4173– 4181, 2013.
- [44] J. Mongan, D. A. Case, and J. A. McCammon. Constant ph molecular dynamics in generalized born implicit solvent. *Journal of Computational Chemistry*, 25(16):2038– 2048, 2004.
- [45] J. M. Swails, D. M. York, and A. E. Roitberg. Constant ph replica exchange molecular dynamics in explicit solvent using discrete protonation states: Implementation, testing, and validation. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 10(3):1341–1352, 2014. PMID: 24803862.
- [46] X. Kong and C. L. Brooks III. A new approach to free energy calculations. *The Journal of Chemical Physics*, 105(6):2414–2423, 1996.
- [47] J. Khandogin and C. L. Brooks III. Constant ph molecular dynamics with proton tautomerism. *Biophysical Journal*, 89(1):141 – 157, 2005.
- [48] M. S. Lee, F. R. Salsbury, and C. L. Brooks III. Constant-ph molecular dynamics using continuous titration coordinates. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 56(4):738–752, 2004.
- [49] G. B. Goh, B. S. Hulbert, H. Zhou, and C. L. Brooks III. Constant ph molecular dynamics of proteins in explicit solvent with proton tautomerism. *Proteins: Structure*, *Function, and Bioinformatics*, 82(7):1319–1331, 2014.
- [50] M. Machuqueiro and A. M. Baptista. Constant ph molecular dynamics with ionic strength effects protonation conformation coupling in decalysine. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(6):2927–2933, 2006. PMID: 16471903.

- [51] N. A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M. J. Holst, and J. A. McCammon. Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(18):10037–10041, 2001.
- [52] A. A. R. Teixeira, M. Lund, and F. L. B. da Silva. Fast proton titration scheme for multiscale modeling of protein solutions. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 6(10):3259–3266, 2010. PMID: 26616787.
- [53] J. M. Scholtz, H. Qian, V. H. Robbins, and R. L. Baldwin. The energetics of ion-pair and hydrogen-bonding interactions in a helical peptide. *Biochemistry*, 32(37):9668–9676, 1993. PMID: 8373771.
- [54] J. M. Scholtz, E. J. York, J. M. Stewart, and R. L. Baldwin. A neutral, water-soluble, .alpha.-helical peptide: the effect of ionic strength on the helix-coil equilibrium. *Journal* of the American Chemical Society, 113(13):5102–5104, 1991.
- [55] J. M. Scholtz, S. Marquese, R. L. Baldwin, E. J. York, J. M. Stewart, M. Santoro, and D. W. Bolen. Calorimetric determination of the enthalpy change for the alpha-helix to coil transition of an alanine peptide in water. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(7):2854–2858, 1991.
- [56] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten. VMD Visual Molecular Dynamics. Journal of Molecular Graphics, 14:33–38, 1996.
- [57] M. Lund and B. Jönsson. Charge regulation in biomolecular solution. Quarterly Reviews of Biophysics, 46:265–281, 8 2013.
- [58] D. Bashford and K. Gerwert. Electrostatic calculations of the pka values of ionizable groups in bacteriorhodopsin. Journal of Molecular Biology, 224(2):473 – 486, 1992.
- [59] D. Bashford and M. Karplus. pka's of ionizable groups in proteins: atomic detail from a continuum electrostatic model. *Biochemistry*, 29(44):10219–10225, 1990. PMID: 2271649.
- [60] D. Frenkel and B. Smit, editors. Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications. Academic Press, Inc., Orlando, FL, USA, 1st edition, 1996.
- [61] M. Abramowitz. Handbook of Mathematical Functions, With Formulas, Graphs, and Mathematical Tables, Dover Publications, Incorporated, 1974.
- [62] N. Metropolis, A. W. Rosenbluth, M. N. Rosenbluth, A. H. Teller, and E. Teller. Equation of state calculations by fast computing machines. *The Journal of Chemical Physics*, 21(6):1087–1092, 1953.
- [63] M. Ullner and B. Jönsson. A monte carlo study of titrating polyelectrolytes in the presence of salt. *Macromolecules*, 29(20):6645–6655, 1996.

- [64] A. Laguecir, S. Ulrich, J. Labille, N. Fatin-Rouge, S. Stoll, and J. Buffle. Size and ph effect on electrical and conformational behavior of poly(acrylic acid): Simulation and experiment. *European Polymer Journal*, 42(5):1135 – 1144, 2006.
- [65] C. E. Reed and W. F. Reed. Monte carlo study of titration of linear polyelectrolytes. *The Journal of Chemical Physics*, 96(2):1609–1620, 1992.
- [66] W. Chen, B. H. Morrow, C. Shi, and J. K. Shen. Recent development and application of constant ph molecular dynamics. *Molecular Simulation*, 40(10-11):830–838, 2014.
- [67] H. J. C. Berendsen, D. van der Spoel, and R. van Drunen. Gromacs: A messagepassing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communica*tions, 91(1-3):43 – 56, 1995.
- [68] B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, and M. Karplus. Charmm: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of Computational Chemistry*, 4(2):187–217, 1983.
- [69] J. D. Jackson, editor. *Eletrodinâmica Clássica*. Guanabara Dois, Rio de Janeiro, RJ, 2 edition, 1983.
- [70] E. Butkov, editor. *Física Matemática*. LTC Livros Técnicos e Científicos Editora S. A., Travessa do Ouvidor, 11. Rio de Janeiro, RJ, 1 edition, 1988.
- [71] D. Bashford. Macroscopic electrostatic models for protonation states in proteins. Frontiers in Bioscience, (9):1082–1099, 2004.

Apêndice A

A Equação de Poisson-Boltzmann

A lei de Gauss[69] é uma formulação integral muito utilizada para a descrição de campos eletrostáticos. Se quisermos fazer uso da forma diferencial dessa lei, pode-se utilizar o teorema da divergência. Por esse teorema, em qualquer campo vetorial bem comportado $\overrightarrow{A(x)}$, definido num volume V e limitado por uma superfície S fechada, vale a seguinte relação:

$$\oint_{S} \vec{A} \cdot \hat{n} \, da = \int_{V} \nabla \cdot \vec{A} \, d^{3}x \tag{A.1}$$

Aplicando o teorema da divergência na Lei de Gauss temos que:

$$\oint_{S} \overrightarrow{E} \cdot \hat{n} \, da = 4\pi \int_{V} \rho(x) \, d^{3}x \tag{A.2}$$

$$\int_{V} (\nabla \cdot \vec{E} - 4\pi\rho) \ d^{3}x = 0 \tag{A.3}$$

Logo:

$$\nabla \cdot \vec{E} = 4\pi\rho \tag{A.4}$$

onde ρ é a densidade volumétrica de cargas elétricas.

Para descrever um espaço vetorial quase completamente seu divergente e seu rotacional devem ser definidos em todos os pontos do espaço, o rotacional pode ser obtido como consequência da lei de coulomb generalizada, que é:

$$\overrightarrow{E} = -\nabla\Phi \tag{A.5}$$

$$\nabla \times \vec{E} = 0. \tag{A.6}$$

Essas duas equações descrevem o campo eletrostático. Elas podem ser combinadas em uma única equação diferencial parcial do potencial:

$$\nabla^2 \Phi = -4\pi\rho \tag{A.7}$$

Que é a Equação de Poison[69, 70] que é definida pelo Laplaciano do potencial $\nabla^2 \Phi$. Generalizando para uma situação onde a densidade de cargas da atmosfera iônica varia com a distância do íon \overrightarrow{r} em um solvente com constante dielétrica ϵ_s temos:

$$\nabla^2 \Phi(\overrightarrow{r}) = -\frac{\rho(\overrightarrow{r})}{\epsilon_s \epsilon_0} \tag{A.8}$$

Considerando uma solução iônica contendo espécies positivas e negativas de densidades numéricas n_+ e n_- a densidade pode ser descrita por:

$$\rho(\overrightarrow{r}) = q_{+}n_{+}(\overrightarrow{r}) + q_{-}n_{-}(\overrightarrow{r}) \tag{A.9}$$

onde q_+ e q_- representam as cargas dos íons positivos e negativos, respectivamente.

Em um sistema biológico, sistemas com cargas são imersos em meio aquoso contendo eletrólitos, cada átomo na molécula pode ter sua carga parcial descrita como cargas fixas ρ^f enquanto que as dos eletrólitos no solvente possuem densidade de carga determinada pela distribuição de Boltzmann:

$$\frac{n_i(\overrightarrow{r})}{n_{i^0}} = exp\left[-\frac{q_i\Phi(\overrightarrow{r})}{k_BT}\right]$$
(A.10)

onde n_i é a densidade numérica de íons de um tipo i por unidade de volume em uma dada região do espaço, n_{i^0} é a densidade desses íons em todo o espaço amostrado, q_i é a carga de cada íon, Φ é o potencial eletrostático, k_B a constante de Boltzmann e T a temperatura.

Utilizando essa distribuição, a equação A.8 pode ser modificada:

$$\nabla^2 \Phi(\vec{r}) = \frac{1}{\epsilon_s \epsilon_i} \sum_i q_i n_i^0 exp\left[-\frac{q_i \Phi(\vec{r})}{k_B T}\right]$$
(A.11)

No caso de potenciais eletrostáticos muito pequenos, a energia térmica é muito maior que a energia eletrostática, então:

$$exp\left[-\frac{q_i\Phi(\overrightarrow{r})}{k_BT}\right] \approx 1 - \frac{q_i\Phi(\overrightarrow{r})}{k_BT} \tag{A.12}$$

Então, com essa relação, têm-se:

$$\nabla^2 \Phi(\overrightarrow{r}) = \frac{1}{\epsilon_s \epsilon_i} \left[\sum_i q_i n_i^0 - \sum_i \frac{q_i^2 n_{i^0} \Phi(\overrightarrow{r})}{k_B T} \right]$$
(A.13)

Como o sistema deve estar neutro a somatória $\sum_i q_i n_i^0$ se anula. Assim obtemos a forma linearizada da equação de Poisson-Boltzmann:

$$\nabla^2 \Phi(\vec{r}) = \Phi(\vec{r}) \left[\frac{1}{\epsilon_s \epsilon_0 k_B T} \sum_i q_i^2 n_i^2 \right]$$
(A.14)

A partir da equação anterior e fazendo uso da teoria de Debye-Hückel podemos obter a equação fundamental:

$$\nabla^2 \Phi(\vec{r}) = \kappa^2 \Phi(\vec{r}) \tag{A.15}$$

onde κ tem dimensão de comprimento e é conhecido como comprimento de Debye e está relacionado com a blindagem eletrostática na interação entre os corpos carregados produzida pela solução eletrolítica. Essa equação de Poisson-Boltzmann linearizada é a equação que é resolvida pelo APBS para calcular a energia livre do sistema[71]. Ela pode ser resolvida no sistema de coordenadas esféricas, que é o que melhor caracteriza um í on em solução como mostrado na seção a seguir.

A.1 Resolução da Equação de Poisson Boltzmann Linearizada

Para se obter uma descrição do potencial eletrostático no espaço devem ser consideradas duas regiões delimitadas por *a*, a região 1 estando dentro do íon e 2 na solução:

$$\nabla^2 \Phi_1(\overrightarrow{r}) = 0 \quad , \quad 0 < \overrightarrow{r} \le a \tag{A.16}$$

$$\nabla^2 \Phi_2(\overrightarrow{r}) = \kappa \Phi_2(\overrightarrow{r}) \quad , \quad \overrightarrow{r} > a \tag{A.17}$$

A solução geral do Laplaciano em coordenadas esféricas pode ser aplicado para resolver as equações A.16 e A.17:

$$\frac{1}{r^2}\frac{d}{dr}\left[r^2\frac{d\Phi_1(r)}{dr}\right] = 0 \tag{A.18}$$

$$\frac{1}{r^2}\frac{d}{dr}\left[r^2\frac{d\Phi_2(r)}{dr}\right] = \kappa^2\Phi_2(r) \tag{A.19}$$

Essas equações têm solução geral:

$$\Phi_1(r) = \frac{X}{r} + Y \tag{A.20}$$

$$\Phi_2(r) = \frac{We^{\kappa r}}{r} + \frac{Ze^{-\kappa r}}{r}$$
(A.21)

Para se obter as constantes X, Y, Z e W, deve-se fazer uso das condições de contorno:

$$\Phi_2(r \to \infty) = 0 \tag{A.22}$$

$$\Phi_1(r \to a) = \Phi_2(r \to a) \tag{A.23}$$

$$-\Phi_1(r \to a) = -\Phi_2(r \to a) \tag{A.24}$$

$$-\oint_{r=a} \nabla \Phi_1(r) \cdot \overrightarrow{n} \, dA = \frac{q}{\epsilon_s \epsilon_0} \tag{A.25}$$

Utilizando as condições de contorno e a solução geral temos que os potenciais Φ_1 e Φ_2 são:

$$\Phi_1(r) = \frac{q}{4\pi\epsilon_s\epsilon_0} \left[\frac{1}{r} - \frac{\kappa}{(\kappa a+1)} \right] \quad , \quad 0 < r \le a \tag{A.26}$$

$$\Phi_2(r) = \frac{q}{4\pi\epsilon_s\epsilon_0} \frac{e^{-\kappa(r-a)}}{r(\kappa a+1)} \quad , \quad r > a \tag{A.27}$$

Sendo essa a resolução para a equação de Poisson-Boltzmann linearizada em coordenadas esféricas.

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" Campus de São J osé do Rio Preto

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, <u>13 109116</u>

Ingrid B & Martins Assinatura do autor