



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



Ricardo Belarmino de Souza Júnior

Estudo dos Efeitos de Regulação de Carga na Adsorção do Citocromo C em Poros Carregados

São José do Rio Preto

2023

Ricardo Belarmino de Souza Júnior

Estudo dos Efeitos de Regulação de Carga na Adsorção do Citocromo C em Poros Carregados

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

Financiadora: CNPq - Proc. 156223/2021-0

Orientador: Prof. Dr. Sidney J. de Carvalho

Co-orientador: Dr. Daniel Lucas Z. Caetano

São José do Rio Preto

2023

S729e

Souza, Ricardo Belarmino Júnior de

Estudo dos efeitos da regulação de carga na adsorção do citocromo c em poros carregados / Ricardo Belarmino Júnior de Souza. -- São José do Rio Preto, 2023

74 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Sidney Jurado de Carvalho

Coorientador: Daniel Lucas Zago Caetano

1. Adsorção de proteínas. 2. Regulação de carga. 3. Método de Monte Carlo. 4. Citocromo c. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Ricardo Belarmino de Souza Júnior

Estudo dos Efeitos de Regulação de Carga na Adsorção do Citocromo C em Poros Carregados

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

Financiadora: CNPq - Proc. 156223/2021-0

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Sidney Jurado de Carvalho
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Ícaro Putinhon Caruso
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Ernesto Raúl Caffarena
Fundação Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro

São José do Rio Preto
31 de Agosto de 2023

Agradecimentos

A jornada que trilhei até aqui esteve repleta de pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para torná-la possível (ou, no mínimo, menos árdua). Sem minha avó e minha mãe, eu certamente não estaria aqui. Desde os dias de escola até hoje, foram elas que sempre e incondicionalmente me apoiaram a seguir o caminho que eu julgasse melhor (talvez seria diferente se minha avó soubesse a diferença entre física e educação física), e por isso a elas eu sempre serei irretribuivelmente grato.

Durante o recorrentemente penoso decorrer da vida acadêmica, também tive a sorte de encontrar algumas boas pessoas que, entre discussões produtivas e outras nem tanto, trouxeram alegria e estiveram presentes em momentos importantes dessa caminhada. Por mais injusto e difícil que seja citar nomes, principalmente porque não representa a exata contribuição de cada um, tampouco a ordem de importância, acredito que seria uma injustiça ainda maior me abster de agradecer, para início de conversa, ao meu melhor amigo Gustavo, que nunca precisou estar fisicamente presente para me ajudar nos momentos mais difíceis; aos inabaláveis e talvez ~~com toda certeza, não se engane~~ doidos amigos 017 Carlos, Piloto, Gui, Buffo, Perles, Italo, entre outros; aos amigos que fiz depois, especialmente na caminhada da pós, como Dante, Henry, João Marcos, Amanda e demais amigos do grupo de pesquisa; às tão inesperadas quanto especiais amigadas de Leonan e Ju; à Brenda, indescritivelmente importante em muitas frentes da minha vida; entre tantos outros que não foram citados explicitamente por falta de uma memória melhor e de espaço desta seção - a todos vocês dedico minha gratidão.

Evidentemente que essa jornada contou com alguns bons professores aos quais devo minha gratidão, em especial meu orientador Sidney, que investiu grande paciência e dedicação no meu trabalho e aprendizado (com o bônus das conversas inspiradoras e das histórias engraçadas); meu co-orientador Daniel, por toda a ajuda no processo inicial com os códigos; os professores que me orientaram e ensinaram muito, tanto na graduação, quanto na pós, na pesquisa e na sala de aula, mesmo com uma menção implícita, não deixo de expressar meus agradecimentos; os membros da banca,

Ícaro Putinhon Caruso e Ernesto Raúl Caffarena; Bruno, Valéria e Barbosa, por todas as prestações de ajuda em toda sorte de problemas e por manter o departamento inteiro e funcionando.

Por fim, é claro, meus extensos agradecimentos à CNPq (Proc. 156223/2021-0) e seus avaliadores, que forneceram o auxílio financeiro a esse projeto e possibilitou que o presente trabalho fosse efetivamente realizado; ao professor Vitor Leite, pela disponibilização de seus recursos computacionais; e ao IBILCE, por possibilitar literalmente toda a jornada acadêmica trilhada até aqui.

"R2, I have a bad feeling about this"

— C-3PO

Resumo

A adsorção de proteínas em superfícies porosas carregadas tem sido amplamente investigada devido ao seu potencial de aplicação nas áreas de biotecnologia e biomedicina, como em biossensores e *drug delivery*. Em geral, a adsorção é favorecida em pH próximo do ponto isoelétrico (pI) da proteína, no qual a repulsão eletrostática proteína-proteína é minimizada, e os *patches* de carga de sinal oposto à da superfície promovem a atração proteína-poro. Entretanto, resultados experimentais da adsorção do citocromo *c* em mesoporos de sílica SBA-15 mostraram que o pH no qual ocorre a máxima adsorção está significativamente abaixo do pI da proteína. Nossa hipótese é que o mecanismo de regulação de carga pode ser importante para esse comportamento. Para investigar essa questão, estudamos a adsorção do citocromo *c* enovelado, utilizando um modelo simplificado baseado em estrutura, por meio de simulações computacionais de Monte Carlo a pH constante. A proteína foi confinada em um poro cilíndrico carregado negativamente e foram avaliados os efeitos do pH, da concentração de sal e do raio de confinamento na distribuição de cargas da proteína e na energia de ligação proteína-superfície. Nós observamos que a regulação de carga causada pela presença da superfície favorece a protonação dos resíduos ionizáveis da proteína, mas esse comportamento é invertido para $\text{pH} > \text{pI}$. Esse aumento da carga líquida resulta em menores energias de ligação para raios maiores e salinidades menores. Também vimos que a regulação de carga aumenta a estabilidade da orientação do citocromo *c* durante a adsorção, além de possibilitar que a adsorção ocorra em $\text{pH} \approx \text{pI}$, o que não acontece sem considerar a regulação de carga.

Palavras-chave: Adsorção de proteína. Regulação de carga. Citocromo *c*. Método de Monte Carlo.

Abstract

Protein adsorption onto charged porous surfaces has been extensively investigated in the literature due to its applicability in biotechnology and biomedicine, such as biosensors and drug delivery systems. Typically, adsorption is favored in pH values close to the protein's isoelectric point (pI), in which protein-protein electrostatic repulsion is minimized and the oppositely charged regions of the protein promote protein-surface attraction. However, experimental results of cytochrome *c* adsorption into SBA-15 silica mesopores have shown that the pH at which maximum adsorption occurs is significantly below pI. We propose that the charge regulation mechanism might play a crucial role in this behavior. To address this hypothesis, we employ pH-constant Monte Carlo simulations with a simplified structure-based model of folded cytochrome *c*, confined within a negatively charged cylindrical pore. We evaluate the effects of pH, salt concentration and confinement radius on the protein's charge distribution and the protein-surface binding energy. Our results indicate that the charge regulation induced by the surface promotes the protonation of titratable residues in the protein, although this behavior is inverted for $\text{pH} > \text{pI}$. This increased charge state results in lower binding energies for larger confinement sizes and lower salinities. We have also shown that charge regulation increases the stability of cytochrome *c* orientation during adsorption and promotes adsorption at $\text{pH} \approx \text{pI}$, which does not occur without employing charge regulation.

Keywords: Protein adsorption. Charge regulation. Cytochrome *c*. Monte Carlo method.

Lista de Ilustrações

Figura 1.1 – Estrutura geral de um aminoácido. No esquema, um grupo amina (azul) e um grupo carboxílico (vermelho) ligam-se ao carbono central (carbono- α ou C_α), que além do átomo de hidrogênio, também está ligado a uma cadeia lateral (roxo) responsável por distinguir os diferentes aminoácidos. 19

Figura 1.2 – Formação da ligação peptídica. No esquema, dois aminoácidos com cadeias laterais R^1 e R^2 formam um dipeptídeo, no qual o hidrogênio do grupo amina (R^2) e a hidroxila do grupo carboxílico (R^1) formam uma molécula de água por condensação, estabelecendo uma ligação peptídica (sombreada) no dipeptídeo. 19

Figura 1.3 – Os 4 níveis estruturais da proteína. A estrutura primária (**A**) é a sequência linear dos resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica. A estrutura secundária são conformações espaciais locais na proteína (como folhas- β e α -hélices) (**B**), compostas por um segmento de resíduos interconectados. Essas estruturas locais se arranjam tridimensionalmente para formar um polímero emaranhado. Esse arranjo caracteriza a estrutura terciária da proteína (**C**), que depende da sequência linear dos resíduos. Por fim, a estrutura quaternária é a composição espacial de subunidades proteicas de estruturas terciárias, formando o complexo proteico (**D**). . . . 20

Figura 1.4 – Estrutura geral do grupo heme. Este grupo prostético está presente na mioglobina, na hemoglobina, nos citocromos e outras hemoproteínas. Sua estrutura é formada por um anel orgânico de protoporfirina ligado a um átomo de ferro (Fe-Protoporfirina-IX), que realiza 6 ligações coordenadas: 4 covalentes no plano da molécula e 2 axiais perpendiculares ao plano. Os grupos vinil ($CH_2=CH$) circulos de magenta na imagem formam ligação covalente com os resíduos de cisteína 14 e 17 do citocromo *c*. 24

- Figura 1.5 – Grupo prostético heme do citocromo *c*. Liga-se covalentemente ao citocromo *c* por meio de duas ligações tioéster (azul) com duas cisteínas (Cys) da proteína. Já o ferro, no estado nativo da proteína, realiza 2 ligações não-covalentes perpendiculares ao plano da protoporfirina com o citocromo *c*: uma histidina e uma metionina. 25
- Figura 1.6 – Representação visual da estrutura do citocromo *c*. À esquerda, a estrutura completa da proteína, onde o grupo heme está representado em verde. À direita, o grupo heme (azul) em detalhes, realizando ligações não-covalentes com a Met-80 e a His-18 da proteína (laranja). . . . 26
- Figura 1.7 – Ilustração da presença de contraíons positivos atraídos por uma superfície carregada negativamente. Além de causar um efeito de blindagem eletrostática no potencial da superfície, os contraíons também promovem uma perturbação do pH local, originando um efeito de regulação de carga em corpos próximos à superfície. 28
- Figura 3.1 – Representação visual da cadeia do citocromo *c* em nosso modelo CG SBM- C_α . Na imagem, a GLY-1 é o N-terminal e o Glu-104, o C-terminal. 33
- Figura 3.2 – Esquema das interações intramoleculares entre os monômeros da proteína. No diagrama, r é a distância entre dois monômeros ligados e θ e ϕ são ângulos formados por uma sequência de monômeros. 34
- Figura 3.3 – Representação do grupo heme. À esquerda, o heme, em vermelho, ligado ao citocromo *c* por meio de duas ligações covalentes com as cisteínas 14 e 17, em azul escuro. O átomo de ferro, em vermelho sólido, centrado no retângulo formado pelos 4 pseudoátomos que compõem o heme, em vermelho transparente. À direita, o heme com todos os átomos explícitos (compare com a figura 1.4). Destacados em vermelho, os 4 átomos de carbono escolhidos para serem as posições dos 4 pseudoátomos da figura à esquerda. Em ciano, os átomos de nitrogênio nos quais está ligado covalentemente o átomo de ferro, em rosa. 35
- Figura 3.4 – Esquema do modelo de poro confinante. 37

Figura 3.5 – À esquerda, a fração de contatos nativos do citocromo *c* em função da constante ϵ_C , à temperatura $T = 349,15$ K. Modelando uma sigmoide na curva, obtemos $\epsilon_C \approx 0,668$ kcal/mol para metade dos contatos nativos, portanto usamos $\epsilon_C = 0,67$ kcal/mol em nossas simulações. À direita, o calor específico a volume constante C_V do citocromo *c* com o ϵ_C determinado. O pico da curva de C_V representa a temperatura de transição da proteína (pelo gráfico, $T \approx 349$ K). 43

Figura 4.1 – Carga líquida do citocromo *c* em função do pH, em salinidades de 1 mM (A), em azul, e 10 mM (B), em vermelho. Os círculos preenchidos representam as simulações com regulação de carga, enquanto os círculos vazios representam as simulações com a proteína livre em solução. As tonalidades mais claras de cada cor simbolizam os raios de confinamento menores, e as tonalidades mais escuras são os raios maiores, conforme legenda. O desvio dos valores de carga, em unidades da carga elementar e , é da ordem do tamanho dos círculos no gráfico. 47

Figura 4.2 – Energia média de interação eletrostática proteína-poro, em concentrações de sal de 1 mM (A), em azul, e 10 mM (B), em vermelho. As tonalidades mais claras de cada cor simbolizam os raios de confinamento menores, e as tonalidades mais escuras são os raios maiores, conforme legenda. O desvio dos valores de energia é da ordem de $3 k_B T$ 49

Figura 4.3 – Comparação entre as energias médias de interação eletrostática proteína-poro com (círculos preenchidos) e sem (círculos vazios) o efeito da regulação de cargas, em concentrações de sal de 1 mM (A), em azul, e 10 mM (B), em vermelho. As tonalidades mais claras de cada cor simbolizam os raios de confinamento menores, e as tonalidades mais escuras são os raios maiores, conforme legenda. O desvio dos valores de energia é da ordem de $3 k_B T$ 50

Figura 4.4 – Distribuição da densidade de probabilidade dos resíduos mais próximos da superfície, em raio de confinamento de 160 Å, salinidade de 1 mM e valores de pH 8, 9 e 10. As linhas sólidas representam as simulações com regulação de carga, enquanto as linhas tracejadas indicam as simulações mantendo a proteína com suas cargas fixas. 52

Figura 4.5 – Distribuição da densidade de probabilidade de resíduos que promovem duas orientações de adsorção, em raio de confinamento de 160 Å, salinidade de 1 mM e pH 10. As linhas sólidas representam as simulações com regulação de carga, enquanto as linhas tracejadas indicam as simulações mantendo a proteína com suas cargas fixas. 54

Figura 4.6 – Projeção Mollweide da densidade superficial de carga do citocromo *c*, em raio de confinamento de 160 Å, salinidade 1 mM e pH 8, com regulação de carga. Os círculos em azul claro representam a Arg-38 e a Lys-39, as cruzes brancas as lisinas 72 e 73, a cruz em vermelho claro a Lys-86 e o losango branco o átomo de ferro. 55

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 – pK_a dos aminoácidos de cadeia lateral ionizável em solução aquosa . . .	23
Tabela 3.1 – Densidade superficial de carga σ em função do pH para sílica SBA-15 . .	38
Tabela 4.1 – Densidade superficial de cargas do citocromo c em raio de 160 Å. . . .	55

Sumário

1	Introdução	16
1.1	Proteínas	18
1.1.1	Estrutura das proteínas	19
1.1.2	Influência do pH	21
1.1.3	O citocromo <i>c</i> e o grupo heme	24
1.2	Regulação de Carga	26
2	Objetivos	31
3	Metodologia	32
3.1	Modelo da Proteína	32
3.1.1	Modelo Baseado em Estrutura	32
3.1.2	O grupo heme	35
3.2	A Solução Iônica	36
3.3	A Superfície Carregada	37
3.4	O Programa	38
3.4.1	O Método de Monte Carlo	38
3.4.2	O algoritmo de Metropolis	39
3.4.3	Amostragem de Estados	40
3.5	Detalhes Computacionais	41
3.5.1	Determinação do parâmetro ϵ_c	42
3.5.2	Simulações e Análises	44
3.5.3	Projeção da Densidade Superficial de Carga	44
4	Resultados e Discussão	46
4.1	Carga Líquida e ponto Isoelétrico	46
4.2	Energia Potencial de Ligação	48
4.3	Distribuição dos Resíduos	51
4.4	Projeção da Densidade Superficial de Carga	54
5	Conclusões	58

Referências	60
Apêndices	68
A – Potencial Eletrostático de uma Superfície Cilíndrica Carregada	68
A.1 Equação de Poisson-Boltzmann	68
A.2 Aproximação de Debye-Hückel	69
A.3 Solução	70
A.4 Condições de Contorno	72

1 Introdução

A adsorção de proteínas em superfícies é um tema que vem sendo estudado há décadas [1, 2], dada a importância de se entender tanto os recorrentes processos naturais envolvendo esse tema, como atividade de anticorpos [1, 3], catálise enzimática [4–6], e sinalização transmembrana [7, 8], quanto possíveis aplicações biomédicas e biotecnológicas, como sistemas de *drug delivery* [9–11] e biossensores [12, 13]. Nos dois últimos casos, destaca-se a adsorção de proteínas em nanomateriais porosos, como a sílica, uma vez que o confinamento pode conferir às proteínas maior estabilidade térmica e química [14, 15], protegendo contra sua desnaturação e até contra decomposição biológica, devido ao poro ser menor do que estruturas bacterianas [16]. Os nanoporos baseados em silício, além de serem materiais biocompatíveis [13], podem funcionar como um dispositivo óptico, e há décadas já têm sido usados como biossensores [17]. Remédios anticâncer possuem baixa solubilidade em água, de modo que o confinamento em poros de sílica, por possuir ampla área superficial e grande variabilidade de raio de confinamento, surge também como uma boa opção para entrega de drogas hidrofóbicas de diferentes tamanhos [10, 18].

Na literatura, o modelo predominante usado para descrever a adsorção de proteínas em superfícies carregadas se baseia nas interações eletrostáticas. Esse modelo leva em consideração a competição entre as interações repulsiva proteína-proteína e atrativa proteína-superfície [14, 16, 19–21]. Com isso, espera-se que o pH no qual a adsorção é máxima ocorra no ponto isoelétrico (pI) da proteína [14, 16, 20]. Isso porque, nesse pH, a repulsão proteína-proteína é mínima e, por conta das proteínas serem moléculas poliméricas com distribuição heterogênea de cargas, as regiões da proteína de carga oposta à da superfície promovem a adsorção por atração eletrostática [22–24]. Em valores de pH diferentes do pI, a repulsão entre as proteínas na solução desfavorece um maior empacotamento nos poros [16]. Embora a força que leva a proteína a se ligar à superfície carregada envolva mecanismos tanto entálpicos, como atração eletrostática e forças de Van der Waals, quanto entrópicos, como liberação de contraíons [25, 26], o modelo eletrostático é, em geral, suficiente para explicar a maioria das observações experimentais referentes à adsorção de proteínas [16].

Entretanto, o trabalho publicado em 2015 por Moerz e Huber [27], referente

à adsorção do citocromo *c* em mesoporos de sílica SBA-15, revelou um comportamento que o modelo eletrostático falha em explicar: é observada máxima adsorção em pH próximo de 7,5 que é significativamente abaixo do pI de 10,5 da proteína [28–30], o que vai na contramão de alguns resultados obtidos em outros estudos [14, 20]. Os autores afirmam, em seu trabalho, que os experimentos tipicamente utilizam superfícies cobertas por uma camada de polietilenoglicol (PEG), cuja espessura excede o comprimento de Debye, o que pode afetar o comportamento esperado pelas previsões dos modelos teóricos [16]. Ainda segundo os autores, outro aspecto importante a ser considerado para o entendimento desses resultados, para além dos fatores entálpicos e entrópicos supracitados, é o mecanismo da regulação de carga (seção 1.2), que diz respeito à forma como a distribuição de cargas de uma molécula é perturbada ao se aproximar de um campo elétrico externo [31, 32]. Mais especificamente, uma superfície carregada em uma solução iônica resulta em uma interface com distribuição desigual de íons, culminando em um pH local que difere do pH no *bulk* da solução [33]. Assim, alguns resíduos de aminoácido ionizáveis da proteína podem apresentar uma carga alterada na interface em relação ao caso livre em solução, o que afeta a maneira como a proteína interage eletricamente com a superfície. A própria adsorção também afeta o potencial e a distribuição de cargas na interface, gerando uma contribuição adicional à energia livre do sistema [34], o que resulta em uma afinidade eletrostática que não segue necessariamente as previsões do modelo eletrostático [33].

Contudo, em trabalhos experimentais, o fator limitante para a inclusão do mecanismo de regulação de carga na interpretação de resultados é a dificuldade em quantificar seu impacto no experimento, já que para calcular o pH da superfície é preciso conhecer o potencial superficial, que é afetado tanto pela protonação dos grupos silanol da sílica, quanto pela carga e quantidade de proteínas adsorvidas. Além disso, mesmo sabendo o potencial e a alteração do valor do pH, ainda seria preciso conhecer informações específicas da proteína, como a distribuição de seus grupos carregados e como eles dependem do pH, sua estrutura e sua orientação durante a adsorção [16, 27].

Com o objetivo de esclarecer os detalhes desses efeitos da regulação de carga na adsorção de proteínas, Daniel L. Z. C. et al [35], em 2021, publicaram um trabalho de simulação computacional analisando os efeitos da regulação de cargas na adsorção da lisozima em poro carregado. Um de seus resultados indicou que a regulação de carga promove uma mudança de orientação dependente do pH que estabiliza a adsorção [35]. Também descobriram que a mínima energia de ligação ocorre em pH relativamente próximo do pI da lisozima, que é o valor de pH, obtido por Moerz et al [27], em que se observa máxima quantidade de proteína adsorvida nos poros. Embora os efeitos associados à interação proteína-proteína não tenham sido contemplados nesse trabalho,

os efeitos causados pela regulação de carga indicam que esse mecanismo pode ser bastante importante para o entendimento de resultados experimentais.

Tendo em vista a continuidade do trabalho de Daniel, o presente trabalho consiste num estudo dos efeitos da regulação de carga na adsorção do citocromo *c* em um poro cilíndrico carregado, via simulação computacional de Monte Carlo à pH constante, analisando a influência de diferentes condições de salinidade, pH e raio do poro na energia de ligação proteína-poro e na distribuição de cargas da proteína, com o objetivo de entender melhor o papel da regulação de carga na adsorção de proteínas e como ele pode complementar o modelo eletrostático estabelecido na literatura para descrever esse tipo de sistema.

1.1 Proteínas

As proteínas têm papel vital no funcionamento biológico, participando de quase todas as funções celulares e constituindo cerca de 50% da massa celular [36, 37]. Podem desempenhar tanto funções estruturais, como promover o transporte de outras moléculas, clivar estruturas poliméricas de ácidos nucleicos e compor a estrutura e rigidez do citoesqueleto, quanto funções regulatórias, como formar canais que controlam o transporte de substâncias nas células, acelerar reações químicas e sinalizar outras moléculas com informações importantes para o funcionamento correto das células [36–38].

As proteínas são biomoléculas poliméricas, cujos monômeros da cadeia principal são os aminoácidos – moléculas compostas por um grupo amina, um ácido carboxílico e uma cadeia lateral, conforme a figura 1.1 [37]. A última tem grande importância na proteína, uma vez que ela é a responsável por diferir um aminoácido de outro, e com isso atribuir características à proteína, como estrutura, tamanho, carga e solubilidade em água [36, 37, 39]. Os aminoácidos se ligam por meio da condensação química, que ocorre na ligação covalente peptídica, onde uma molécula de água é liberada para que 2 aminoácidos se liguem, formando uma cadeia de resíduos de aminoácidos, conhecida como polipeptídeo [37]. A figura 1.2 ilustra a formação de um dipeptídeo. Polipeptídeos que possuem mais de 50 resíduos, são chamados de proteínas [36, 37]. Ao todo, existem 20 aminoácidos que podem formar uma proteína *in vivo*, embora existam outros aminoácidos não essenciais [38, 40, 41].

Fonte: Retirada do livro "Princípios de Bioquímica de Lehninger" [37]

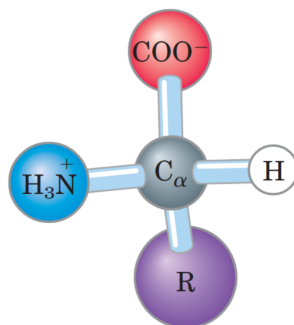


Figura 1.1: Estrutura geral de um aminoácido. No esquema, um grupo amina (azul) e um grupo carboxílico (vermelho) ligam-se ao carbono central (carbono- α ou C_α), que além do átomo de hidrogênio, também está ligado a uma cadeia lateral (roxo) responsável por distinguir os diferentes aminoácidos.

Fonte: Retirada do livro "Princípios de Bioquímica de Lehninger" [37]

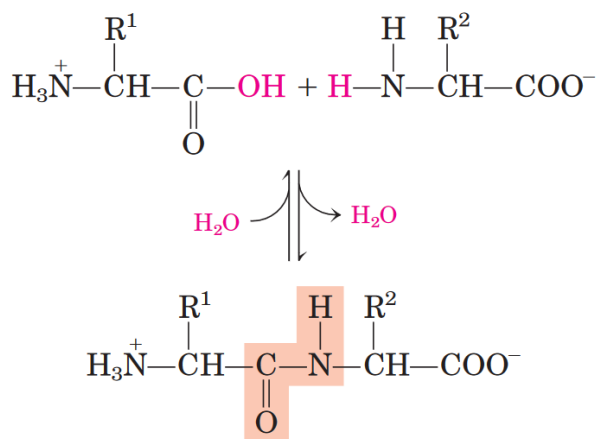


Figura 1.2: Formação da ligação peptídica. No esquema, dois aminoácidos com cadeias laterais R^1 e R^2 formam um dipeptídeo, no qual o hidrogênio do grupo amina (R^2) e a hidroxila do grupo carboxílico (R^1) formam uma molécula de água por condensação, estabelecendo uma ligação peptídica (sombreada) no dipeptídeo.

1.1.1 Estrutura das proteínas

A estrutura de uma proteína é entendida em 4 níveis: a estrutura primária, na qual a proteína é representada linearmente por sua sequência de resíduos de aminoácidos (figura 1.3-A); a estrutura secundária (figura 1.3-B), que possui representações de estruturas locais na proteína (como α -hélice, folha- β ou sem estrutura bem definida, chamada de *random coil*); a estrutura terciária, na qual há uma organização tridimensional da cadeia polipeptídica (figura 1.3-C); e a estrutura quaternária, em que as estruturas terciárias se unem espacialmente (figura 1.3-D), formando um complexo proteico [36–39].

Fonte: Adaptado do National Human Genome Research Institute (NIH) [42]

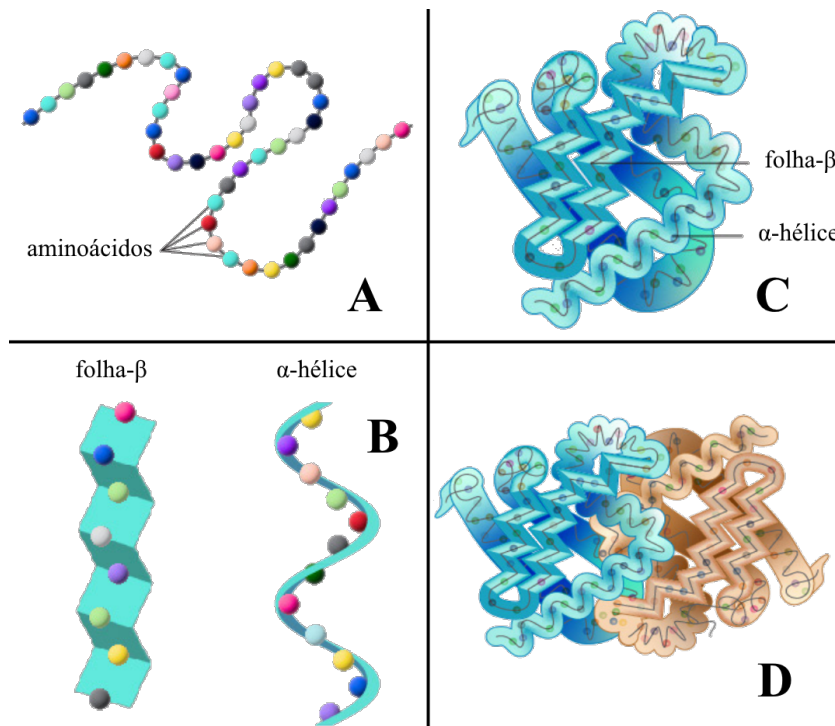


Figura 1.3: Os 4 níveis estruturais da proteína. A estrutura primária (A) é a sequência linear dos resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica. A estrutura secundária são conformações espaciais locais na proteína (como folhas- β e α -hélices) (B), compostas por um segmento de resíduos interconectados. Essas estruturas locais se arranjam tridimensionalmente para formar um polímero emaranhado. Esse arranjo caracteriza a estrutura terciária da proteína (C), que depende da sequência linear dos resíduos. Por fim, a estrutura quaternária é a composição espacial de subunidades proteicas de estruturas terciárias, formando o complexo proteico (D).

A estrutura tridimensional que a proteína assume é entendida como o estado enovelado da proteína, ou estado nativo, pois é nessa conformação que a proteína desempenha suas funções biológicas, e o processo pelo qual uma proteína evolui da estrutura primária à terciária ou quaternária, é chamado de enovelamento [37, 39]. Para que esses arranjos tridimensionais se formem e se estabilizem, tanto na estrutura secundária, como na terciária e quaternária, inúmeras interações inter e intramoleculares atuam na proteína, como ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals, interações eletrostáticas e hidrofóbicas [38, 43].

O enovelamento pode ser analisado por meio de uma grandeza importante da física aplicada à biologia molecular e bioquímica, conhecida como energia livre. Essa grandeza representa a energia que pode ser aproveitada para realização de trabalho ou formação de ligações químicas [36, 37]. A energia livre G para o ensemble canônico, no qual o número de partículas, o volume V e a temperatura T se mantêm constantes, é dada por $G \equiv H - TS$, em que H é a entalpia, dada por $H = U + PV$, uma função de

estado que leva em conta a energia interna U de um sistema, e a energia de interação do sistema com o meio, descrita pelo produto da pressão P do meio com o volume V do sistema. T é a temperatura e S é a entropia [44, 45]. Para que uma reação química ocorra de forma espontânea, a variação de energia livre ΔG do sistema, à temperatura T constante, deve ser negativa, isto é, a energia livre deve diminuir de um estado para outro ($\Delta G < 0$) [36, 37, 44]. Pela Segunda Lei da Termodinâmica, a entropia do universo, somando o sistema e a vizinhança, nunca pode diminuir, isto é, $\Delta S_{univ} \geq 0$, sendo $\Delta S_{univ} = 0$ em processos reversíveis e $\Delta S_{univ} > 0$ em processos irreversíveis [44].

A estrutura enovelada da proteína representa a configuração de mínima energia livre G do sistema, considerando tanto as interações intramoleculares (proteína com ela mesma), quanto as interações intermoleculares (proteína-sistema). Isso inclui as contribuições entálpica H , como as interações fracas supracitadas que formam e mantêm a estrutura enovelada, e entrópica TS , que se relaciona com a liberdade conformacional da cadeia polipeptídica¹ e das moléculas do meio [38, 46]. Se fosse considerada apenas a proteína, o processo de enovelamento leva a cadeia polipeptídica a uma diminuição da entropia, por estar bem ordenada numa conformação mais rígida e menos flexível, e portanto $\Delta S_{prot} < 0$ [46]. Entretanto, considerando também a vizinhança do sistema, as moléculas de solvente que antes interagiam com a proteína (solvatação) são "liberadas" ao sistema à medida que a cadeia se enovela e diminui sua superfície de contato, o que garante um aumento da entropia das moléculas de solvente e do sistema como um todo, portanto $\Delta S_{prot} + \Delta S_{meio} = \Delta S_{univ} \geq 0$ [37, 38, 46]. Como o termo entrópico contribui negativamente para a energia livre, quanto maior a temperatura ou o aumento da entropia, menor o ΔG .

O enovelamento da proteína também depende das condições do ambiente em que a proteína se encontra, como o pH (seção 1.1.2), a concentração e o tipo de soluto na solução, a presença de íons, a temperatura e a influência de outros corpos na proteína. O processo de enovelamento realizado de forma errada pode acarretar em doenças neurodegenerativas em humanos, como o mal de Alzheimer e o mal de Huntington [36–39]

1.1.2 Influência do pH

O pH mede o grau de acidez de uma solução aquosa. Quantitativamente, o pH é calculado com base na concentração de íons H^+ da solução em que se encontra.

¹Na física estatística, a entropia de um corpo diz respeito à liberdade que esse corpo possui em um espaço de configurações (ou microestados) possíveis. Logo, a entropia da proteína é maior quando ela pode acessar uma quantidade maior de conformações, e menor à medida que ela se enovela [46].

Essa propriedade decorre do fato de que a água pura possui um pequeno grau de ionização, por meio do qual suas moléculas de H_2O dissociam-se nos íons hidrogênio (H^+) e hidróxido (OH^-), descrita pela reação de equilíbrio $H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$, cuja constante de equilíbrio da reação é:

$$K_{eq} = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}, \quad (1.1)$$

onde $[]$ denota a concentração molar. Como a concentração da água pura, à temperatura ambiente de 298 K, é $[H_2O] = 55,5$ mols/L, e a constante $K_{eq} = 1,8 \times 10^{-16}$ mol/L [37]), temos que:

$$[H^+][OH^-] = K_{eq}[H_2O] = 55,5 \times 1,8 \times 10^{-16} \approx 1,0 \times 10^{-14} (\text{mols/L})^2. \quad (1.2)$$

O produto das concentrações iônicas da água pura é uma constante, e o pH é definido como:

$$pH = -\log[H^+]. \quad (1.3)$$

Assim, o pH pode assumir valores em uma escala entre 0 e 14, a depender das concentrações de íons positivos e negativos. Quando essas concentrações são iguais, o pH é 7,0 e é considerado neutro [36].

Alguns grupos químicos também possuem a capacidade de se dissociar em íons positivos e negativos quando em solução aquosa, $HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$, e por conta disso são considerados grupos ionizáveis. Sua constante de equilíbrio K_a é dada por:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \quad \text{e} \quad pK_a = -\log(K_a), \quad (1.4)$$

sendo que o pK_a é conhecido como a constante de dissociação ácida de um grupo ionizável.

Para entender melhor o que essa grandeza representa na física de biomoléculas e complementar a abordagem físico-química que fizemos até agora, vamos interpretar o efeito do pH do ponto de vista estatístico. Em uma solução iônica, a agitação térmica das moléculas dita um comportamento dinâmico da reação de ionização descrita pela equação 1.4. Isso quer dizer que quando a espécie HA é formada, ela logo será dissociada novamente nos íons $H^+ + A^-$, até que essa reação reversível atinja o equilíbrio, no qual $[HA]$ e $[A^-]$ são formados a uma taxa que os mantém, em média, constantes [47]. Ainda assim, o próton H^+ continua em constante processo de dissociação e associação, e a probabilidade de que ele esteja ligado ou livre em solução, em um determinado instante, depende da relação de concentrações das espécies iônicas na solução. A equação 1.4

Tabela 1.1: pK_a dos aminoácidos de cadeia lateral ionizável em solução aquosa

Aminoácido	Tyr	Cys	Lys	His	Arg	Asp	Glu
pK_a	9,6	8,2	10,6	6,3	12,0	4,0	4,5

Fonte: Retirada do trabalho de Daniel L. Z. C. et al [35]

apresenta a constante K_a que estabelece essa relação. Se o $pH = pK_a$, então

$$-\log[H^+] = -\log(K_a) \Rightarrow [H^+] = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \Rightarrow [HA] = [A^-]. \quad (1.5)$$

Assim, o pK_a determina o valor do pH em que a probabilidade do grupo A estar protonado ou desprotonado é a mesma. Em outras palavras, quando $pH < pK_a$, o grupo tem probabilidade maior de estar protonado. Quando $pH > pK_a$, é mais provável que esteja desprotonado. [36, 37].

A carga de um aminoácido livre em função do pH é determinada pelo pK_a dos grupos químicos ionizáveis que o formam. Tanto o grupo H_3N^+ quanto o COO^- de um aminoácido (figura 1.1) são ionizáveis. O grupo carboxila pode ganhar prótons num pH mais ácido e se tornar $COOH$, ou num pH mais básico, o grupo amina pode perder um próton e se tornar NH_2 . Esses dois grupos estão presentes em todos os aminoácidos, e o pK_a deles não difere muito de um para outro. Dos 20 aminoácidos padrão, o pK_a do COO^- varia entre 1,8 e 2,4, enquanto o pK_a do grupo H_3N^+ varia entre 8,9 e 10,9. Assim, em pH neutro predomina a forma zwitteriônica do aminoácido, isto é, uma região positiva (amina) e uma negativa (carboxila) [37].

Entretanto, com exceção dos resíduos terminais de uma proteína (das extremidades), mais conhecidos como N-terminal e C-terminal, os aminoácidos presentes nas proteínas não estão livres, pois os grupos amina e carboxila estão ligados covalentemente, formando a ligação peptídica (figura 1.2) e, com isso, não são mais ionizáveis. Sendo assim, a diferença de carga elétrica entre proteínas distintas se origina da cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos. Nem todos os aminoácidos possuem cadeias laterais capazes de receber ou doar prótons - dos 20 aminoácidos padrões, apenas 7 são ionizáveis: a tirosina (Tyr), a cisteína (Cys), a lisina (Lys), a histidina (His), a arginina (Arg), o ácido aspártico (Asp) e o ácido glutâmico (Glu). Seus valores de pK_a estão dispostos na tabela² 1.1. São eles os responsáveis por formar a distribuição de cargas de uma proteína em um determinado pH [37].

A importância do pH em sistemas biológicos é grande, uma vez que praticamente todos os processos biológicos dependem do pH. Variações neste grau de acidez

²O pK_a da cisteína foi retirado do livro "Princípios de Bioquímica de Lehninger" [37]

Fonte: Retirada do livro "Princípios de Bioquímica de Lehninger" [37]

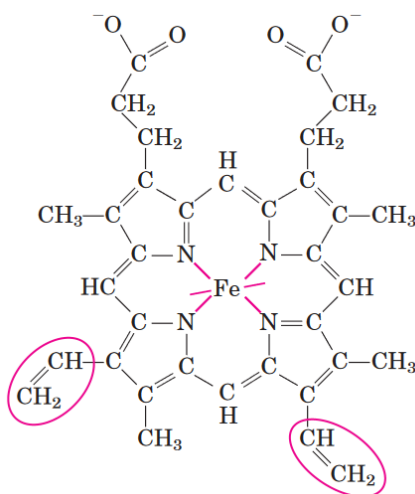


Figura 1.4: Estrutura geral do grupo heme. Este grupo prostético está presente na mioglobina, na hemoglobina, nos citocromos e outras hemoproteínas. Sua estrutura é formada por um anel orgânico de protoporfirina ligado a um átomo de ferro (Fe-Protoporfirina-IX), que realiza 6 ligações coordenadas: 4 covalentes no plano da molécula e 2 axiais perpendiculares ao plano. Os grupos vinil ($\text{CH}_2=\text{CH}$) circulosados de magenta na imagem formam ligação covalente com os resíduos de cisteína 14 e 17 do citocromo *c*.

podem influenciar atividades importantes como mecanismos de reação de enzimas [48], ou mesmo a própria estrutura de biomoléculas, como a desnaturação de uma proteína induzida por ácidos ou o enovelamento errôneo da proteína [36, 49].

1.1.3 O citocromo *c* e o grupo heme

Nem todas as proteínas são constituídas apenas por resíduos de aminoácidos. Algumas também contêm outros componentes químicos permanentemente associados a suas cadeias. Esses componentes são conhecidos como grupos prostéticos. Exemplos conhecidos são as glicoproteínas, cujo grupo prostético são açúcares, ou as lipoproteínas, que possuem lipídeos. Geralmente, o grupo prostético desempenha uma função biológica importante, como também ocorre com as hemoproteínas (ou proteínas-heme), que possuem um grupo heme [37]. O grupo heme é uma estrutura complexa orgânica em anel, a protoporfirina-IX, que se liga a um átomo de ferro no estado ferroso (Fe^{2+}) (figura 1.4). Existem diferentes tipos de grupos heme, cada um podendo desempenhar um tipo de função [50].

As hemoproteínas, como a hemoglobina, estudadas desde 1850 [51], estão presentes universalmente em quase todos os organismos aeróbicos [52] por possuírem funções importantes, atribuídas ao grupo heme, nas células. Por exemplo, na hemoglo-

Fonte: Retirada do livro "Princípios de Bioquímica de Lehninger" [37]

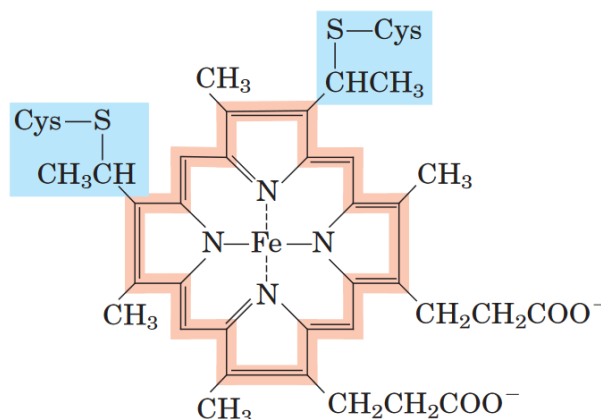


Figura 1.5: Grupo prostético heme do citocromo *c*. Liga-se covalentemente ao citocromo *c* por meio de duas ligações tioéster (azul) com duas cisteínas (Cys) da proteína. Já o ferro, no estado nativo da proteína, realiza 2 ligações não-covalentes perpendiculares ao plano da protoporfirina com o citocromo *c*: uma histidina e uma metionina.

bina, o grupo heme se liga reversivelmente a uma molécula de oxigênio por meio do seu átomo de ferro, conferindo à hemoglobina a capacidade de transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos [36, 37].

Os citocromos são uma família de hemoproteínas globulares, nos quais o grupo heme atua como transportador de elétrons, devido à função oxirredutora do átomo de ferro, em que ele pode alternar entre o estado férrico (3^+) e ferroso (2^+). Seu nome é dado porque os citocromos surgem como pigmentos celulares em alguns métodos de espectroscopia e são localizados, em geral, na membrana citoplasmática [37, 50]. Os citocromos atuam na cadeia transportadora de elétrons, processo encontrado na membrana interna da mitocôndria e envolvido na respiração celular, no qual os elétrons são transferidos através de uma cadeia de diferentes complexos enzimáticos, mediados por proteínas transportadoras, como o citocromo *c*. Ao fim do processo, os elétrons entram no complexo citocromo-oxidase, onde se combinam com uma molécula de oxigênio O_2 para a formação de água [37]. Em nosso trabalho, estudaremos o citocromo do tipo *c* (ou citocromo *c*).

Os citocromos *c* são proteínas globulares de pouco mais de 100 resíduos de aminoácidos, cujo grupo heme é do tipo *c* (heme *c*). O heme *c* consiste numa Fe-protoporfirina-IX ligada à proteína, por meio de dois grupos vinil ($CH_2=CH$), realizando ligação tioéster com as cisteínas 14 e 17 do motivo peptídico Cys-X-X-Cys-His [50, 53, 54]. A representação bidimensional da estrutura do heme *c* é exibida na figura 1.5. No estado nativo do citocromo *c* (figura 1.6), o ferro do grupo heme também realiza duas ligações axiais não-covalentes: uma com a His-18, do motivo

Fonte: Retirada do PDB da proteína 2B4Z (citocromo *c* de coração bovino) [29]

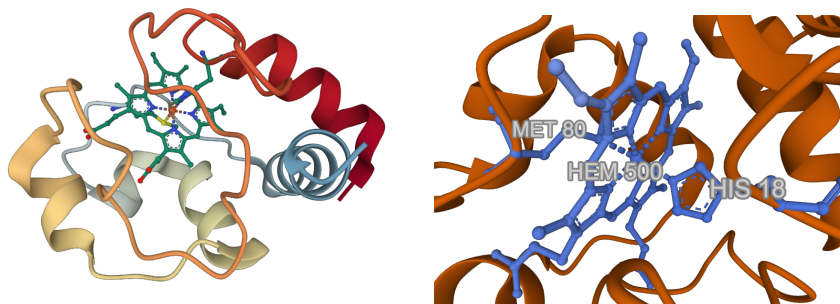


Figura 1.6: Representação visual da estrutura do citocromo *c*. À esquerda, a estrutura completa da proteína, onde o grupo heme está representado em verde. À direita, o grupo heme (azul) em detalhes, realizando ligações não-covalentes com a Met-80 e a His-18 da proteína (laranja).

CXXCH supracitado, e outra com a Met-80 (figura 1.6) [29, 54, 55]. Além do transporte de elétrons, os citocromos do tipo *c* também podem atuar em sítios catalíticos de enzima [53, 56] e em apoptose celular [37, 57]. O grupo heme também é importante no processo de enovelamento do citocromo *c*, não só porque atua como um sítio de nucleação para ligação de cadeias laterais de aminoácidos, mas também por possuir uma grande superfície hidrofóbica [58, 59]. Sob condições de desnaturação, causadas por hidróclorido de guanidina ou ureia, a ligação do heme com a Met-80 é perdida, mas são mantidas tanto a ligação com a His-18, quanto as ligações covalentes [50, 55]. Na condição de apocitocromo, isto é, citocromo sem o grupo prostético, a proteína se encontra desenovelada [60].

1.2 Regulação de Carga

Para melhor entendimento do mecanismo de regulação de carga, vamos considerar novamente a reação de equilíbrio de um grupo ionizável, $HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$, mas levando em conta as interações iônicas com outros corpos carregados. A constante de equilíbrio K_a dessa reação é dada por:

$$K_a = K_\gamma \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}; \quad K_\gamma \equiv \frac{\gamma_{H^+}\gamma_{A^-}}{\gamma_{HA}}, \quad (1.6)$$

sendo K_γ a constante de atividade, definida pelos coeficientes de atividade γ , que compreende interações quando a solução não é considerada infinitamente diluída (*i.e.* fora da idealidade, quando $\gamma = 1$) [32, 45]. Rearranjando a equação e aplicando o

logaritmo, temos:

$$\log(K_a) - \log(\gamma_{H^+}[H^+]) = \log\left(\frac{[A^-]}{[HA]}\right) + \log\left(\frac{\gamma_{A^-}}{\gamma_{HA}}\right). \quad (1.7)$$

Substituindo as equações 1.3 e 1.4 na última, obtemos:

$$-\log\left(\frac{[A^-]}{[HA]}\right) = -pH + pK_a + \log\left(\frac{\gamma_{A^-}}{\gamma_{HA}}\right) \quad (1.8)$$

$$-\log\left(\frac{[HA]}{[A^-]}\right) = pH - pK_a + \log\left(\frac{\gamma_{HA}}{\gamma_{A^-}}\right) \quad (1.9)$$

A partir da equação 1.9 podemos entender o efeito da regulação de carga no comportamento do estado de protonação de grupos ionizáveis, como em proteínas, do ponto de vista físico-químico. O termo do lado esquerdo da equação caracteriza a carga média do grupo ionizável A , uma vez que os íons positivos estão constantemente se associando e dissociando do grupo, por conta da agitação térmica da solução [32]. Como discutido na seção 1.1.2, quando pH é muito diferente do pK_a , a probabilidade é alta do grupo se encontrar protonado ($pH < pK_a$) ou desprotonado ($pH > pK_a$). Nesse caso, a diferença $pH - pK_a$ deve ser decisiva na média da carga do grupo ionizável. No entanto, quando $pK_a \approx pH$, a equação 1.9 se torna

$$-\log\left(\frac{[HA]}{[A^-]}\right) \approx \log\left(\frac{\gamma_{HA}}{\gamma_{A^-}}\right), \quad (1.10)$$

de modo que a carga média passa a depender muito dos coeficientes de atividade γ . Numa solução ideal desconsiderando interação com outros corpos, $\gamma = 1$ e não há alteração na carga média do grupo ionizável. Mas quando esse grupo se aproxima de outro corpo carregado, como uma proteína se aproximando de uma superfície carregada, os coeficientes de atividade passam a ditar o comportamento de protonação do grupo, que se torna muito diferente de quando ele está livre em solução. Esse mecanismo que altera a configuração de cargas de uma molécula, devido à presença de uma região carregada, é chamado de regulação de carga [31, 32].

A regulação de carga pode ser entendida como uma alteração no pH de uma região devido à presença de um potencial externo. O potencial de uma superfície carregada, como uma membrana, uma proteína ou um poro, atrai íons de carga oposta à da superfície (contraíons), ilustrado na figura 1.7, o que perturba o pH da vizinhança dessa superfície e modifica o estado de protonação de uma molécula ionizável que se aproxima dessa região. Ou seja, a diferença $pH - pK_a$ é alterada, e isso causa uma regulação de cargas nos grupos ionizáveis da molécula [31, 32, 61].

Fonte: Retirada do trabalho de Podgornik *et al* [61].

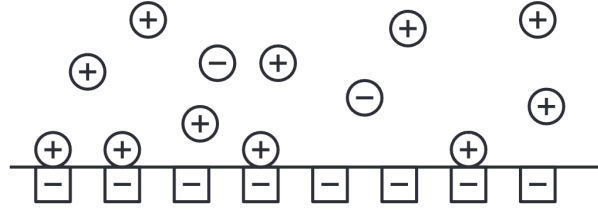


Figura 1.7: Ilustração da presença de contraíons positivos atraídos por uma superfície carregada negativamente. Além de causar um efeito de blindagem eletrostática no potencial da superfície, os contraíons também promovem uma perturbação do pH local, originando um efeito de regulação de carga em corpos próximos à superfície.

Como discutido na seção 1.1.2, o processo de protonação de um grupo ionizável é dinâmico - os prótons não ficam ligados ou desligados o tempo todo, mas têm probabilidade de estarem ligados ou não. Podemos retomar essa interpretação, agora empregando o formalismo da mecânica estatística. Vamos retornar à equação 1.9, mas considerando novamente a idealidade do sistema, em que $\gamma = 1$. Neste caso,

$$-\ln\left(\frac{[HA]}{[A^-]}\right) = (pH - pK_a) \ln 10. \quad (1.11)$$

A diferença de energia livre ΔG entre os estados protonado (HA) e desprotonado (A^-) do grupo ionizável A é expressa por $\Delta G = -k_B T \ln([HA]/[A^-])$, ou, em termos do pH e do pK_a [31, 32]:

$$\Rightarrow \beta \Delta G = -\ln\left(\frac{[HA]}{[A^-]}\right) = (pH - pK_a) \ln 10, \quad (1.12)$$

sendo $\beta^{-1} \equiv k_B T$. Definimos, então, a função partição ζ desse sistema de dois estados, considerando que no estado desprotonado, a energia $G_{A^-} = 0$. Assim,

$$\zeta = \sum_i e^{-\beta G_i} = e^{-\beta G_{A^-}} + e^{-\beta G_{HA}} = 1 + e^{-(pH - pK_a) \ln 10} \quad (1.13)$$

e, com isso, equacionamos o valor esperado da valência do grupo ionizável A :

$$\langle z \rangle = \frac{\sum_i z_i e^{-\beta G_i}}{\zeta} = \frac{z_{A^-} + z_{HA} e^{(pH - pK_a) \ln 10}}{\zeta}. \quad (1.14)$$

Para grupos ácidos, $z_{A^-} = -1$, para básicos, $z_{A^-} = 0$, e $z_{HA} = z_{A^-} + z_{H^+}$, onde $z_{H^+} = +1$ para prótons, de modo que

$$\langle z \rangle = \frac{z_{A^-} + (z_{A^-} + z_{H^+}) e^{(pH - pK_a) \ln 10}}{\zeta}. \quad (1.15)$$

A flutuação de carga do sítio de ligação é dada pela variância c

$$c = \langle z^2 \rangle - \langle z \rangle^2 = \frac{z_{H^+}^2 e^{(pH - pK_a) \ln 10}}{\zeta^2} = -\frac{z_{H^+}}{\ln 10} \frac{\partial \langle z \rangle}{\partial pH}. \quad (1.16)$$

A variância c pode ser interpretada como uma medida da quantidade de carga que pode ser induzida em um sítio de ligação por uma variação do pH. Alguns trabalhos definem c como a capacitância, relacionada a uma resposta da carga do sistema a uma perturbação elétrica externa. Dessa forma, ela pode ser um parâmetro quantitativo para a regulação de carga [31, 32, 62, 63].

Se agora considerarmos duas moléculas, A e B , com cargas pontuais z_i e z_j posicionadas em r_i e r_j , respectivamente, levando em conta que os centros de massa de ambas as moléculas sejam separados por $\vec{R}$, e que $\sum_i z_i = Z_A$ e $\sum_j z_j = Z_B$, então a energia potencial eletrostática de interação entre elas é dada por

$$\beta U^{ES}(R) = \sum_i \sum_j \frac{l_B z_i z_j}{r_{ij}} = \sum_i \sum_j \frac{l_B z_i z_j}{|\vec{R} + \vec{r}_j - \vec{r}_i|}, \quad (1.17)$$

sendo $l_B = \beta e^2 / 4\pi\epsilon_0\epsilon_s$ o comprimento de Bjerrum [31, 32]. Podemos usar a teoria da perturbação da mecânica estatística [64, 65] para introduzir o efeito causado por uma perturbação elétrica externa. Escrevemos a energia livre G aproximada de interação entre as moléculas A e B , levando em conta que $U \ll k_B T$, ou $|\beta U| \ll 1$, e expandimos a função exponencial em série de Taylor,

$$\beta G(R) = -\ln \langle e^{-\beta U(R)} \rangle \approx -\ln \left\langle 1 - \beta U(R) + \frac{1}{2} \beta^2 U^2(R) \right\rangle, \quad (1.18)$$

$$\beta G(R) \approx -\ln \left[1 - \langle \beta U(R) \rangle + \frac{1}{2} \langle \beta^2 U^2(R) \rangle \right]. \quad (1.19)$$

A notação $\langle \dots \rangle$ representa a média sobre todas as orientações e estados de ionização da molécula no sistema não-perturbado (livre em solução iônica) [31]. Podemos realizar a mesma aproximação agora com a função logaritmo, obtendo a expansão em série de Taylor até segunda ordem, $\ln(1 - x) \approx -(x + x^2/2)$:

$$\beta G(R) \approx \langle \beta U(R) \rangle - \frac{1}{2} \langle \beta^2 U^2(R) \rangle + \frac{1}{2} \left[-\langle \beta U(R) \rangle + \frac{1}{2} \langle \beta^2 U^2(R) \rangle \right]^2. \quad (1.20)$$

Considerando, então, o sistema não perturbado, em que as duas moléculas estão muito distantes e não interagem, $R \gg r_i, r_j \Rightarrow 1/r_{ij} \approx 1/R$. Substituindo a

equação 1.17 na equação 1.20, e levando em conta apenas os termos até $1/R^2$, temos

$$\beta G(R) \approx \frac{l_B \langle Z_A \rangle \langle Z_B \rangle}{R} - \frac{l_B^2}{2R^2} \left[\langle Z_A^2 \rangle \langle Z_B^2 \rangle - \langle Z_A \rangle^2 \langle Z_B \rangle^2 \right]. \quad (1.21)$$

Podemos reescrever a última equação em termos da capacitância $C = \langle Z^2 \rangle - \langle Z \rangle^2$ da molécula:

$$\beta G(R) \approx \frac{l_B \langle Z_A \rangle \langle Z_B \rangle}{R} - \frac{l_B^2}{2R^2} \left[\langle Z_A \rangle^2 C_B + \langle Z_B \rangle^2 C_A \right] - \frac{l_B^2}{2R^2} (C_A C_B). \quad (1.22)$$

A equação 1.22 representa uma expressão aproximada para a energia livre de interação entre duas moléculas carregadas, considerando apenas os termos de monopolo³. O primeiro termo da equação representa a interação de Coulomb direta, o segundo é uma interação carga-carga induzida, e o terceiro termo indica uma interação carga induzida-carga induzida [31, 32]. Isso significa que existe uma contribuição das flutuações de carga, resultantes da influência de outros corpos carregados, na energia livre de interação entre as moléculas A e B [32]. Essa contribuição, que atribuímos à regulação de carga, pode ser importante para melhor compreensão do fenômeno de adsorção de proteínas.

³Considerando macromoléculas com distribuição heterogênea de cargas, num caso em que $1/r_{ij} \approx 1/R$ não é válido, os termos de multipolo de ordem superior têm uma contribuição significativa na regulação de carga [35]. Porém, o resultado da equação 1.22, considerando apenas contribuições de monopolo, já revela os efeitos importantes das flutuações de carga na interação entre moléculas carregadas.

2 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é estudar os efeitos do mecanismo de regulação de carga na adsorção do citocromo *c* em um poro cilíndrico carregado, por meio de simulação computacional de Monte Carlo. Para isso, o trabalho consiste nas seguintes etapas:

1. Modelar adequadamente um sistema composto pelo citocromo *c* em solução, em sua forma enovelada, confinado em um poro cilíndrico de sílica SBA-15, considerando detalhamento suficiente para reproduzir adequadamente os efeitos da superfície carregada confinante no equilíbrio ácido-base, e aproximações que permitam uma otimização do tempo e reduzam custo computacional.
2. Avaliar, em diferentes condições de sal, pH e raio de confinamento, o efeito da regulação de carga na adsorção da proteína, por meio das análises da energia de ligação proteína-poro, da variação da carga líquida da proteína confinada e livre e da distribuição superficial de cargas da proteína.
3. Relacionar os resultados com outros trabalhos, a fim de verificar se o modelo consegue não apenas reproduzir, como também ajudar na compreensão do comportamento visto na literatura.

3 Metodologia

Neste trabalho, realizamos um estudo da proteína citocromo *c* em seu estado enovelado numa solução com íons implícitos dentro de um poro carregado. Analisamos esse sistema em diferentes condições de sal, pH e tamanho do poro cilíndrico (seção 3.5). Realizamos a modelagem da proteína, da solução iônica e da superfície carregada, conforme descrito nas seções 3.1, 3.2, e 3.3, respectivamente. O programa e os métodos computacionais empregados para realizar nossas simulações estão descritos na seção 3.4.

3.1 Modelo da Proteína

A proteína que utilizamos foi o citocromo *c* de coração bovino, cuja estrutura, estudada e obtida por métodos de cristalografia de raio-x, foi depositada e disponibilizada no PDB (*Protein Data Bank* [66]), sob o código "2B4Z" [29] (figura 1.6). O citocromo *c* de coração bovino possui 104 resíduos e um grupo prostético heme (seção 1.1.3), e a distribuição de seus resíduos carregados confere um ponto isoelétrico de aproximadamente 10,7 [28–30]. Tanto o potencial de interação não-eletrostática entre os resíduos, quanto a representação estrutural da proteína, foram descritos de acordo com o Modelo Baseado em Estrutura, descrito na seção 3.1.1, e o grupo heme teve seu modelo implementado conforme descrito na seção 3.1.2. Já o potencial eletrostático de interação entre os resíduos foi dado pelo potencial de Coulomb blindado, discutido na seção 3.2. Por fim, o potencial eletrostático de interação entre a proteína e o poro cilíndrico foi dado pela solução da equação linear de Poisson-Boltzmann, abordado na seção 3.3.

3.1.1 Modelo Baseado em Estrutura

Os modelos que se baseiam na estrutura tridimensional da proteína enovelada como a estrutura geométrica de mínima energia, são conhecidos como modelos baseados em estrutura (SBM, do inglês "*Structure Based Model*") [39, 67–69].

Um dos modelos baseados em estrutura é o SBM- C_α , um modelo *coarse-*

Fonte: Elaborado pelo autor

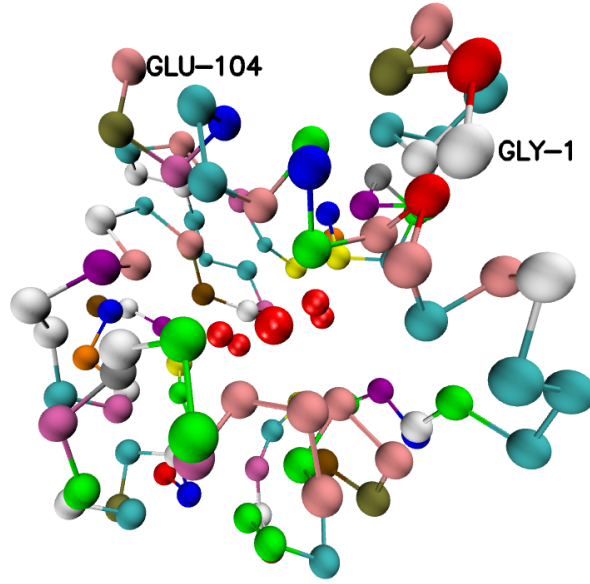


Figura 3.1: Representação visual da cadeia do citocromo *c* em nosso modelo CG SBM- C_α . Na imagem, a GLY-1 é o N-terminal e o Glu-104, o C-terminal.

grained, no qual cada resíduo de aminoácido da cadeia é modelado como um único monômero esférico (figura 3.1), e a energia potencial $\mathbb{U}(\Gamma, \Gamma_0)$ de interação entre eles, quando a proteína se encontra na conformação $\Gamma(r, \theta, \phi, r_{ij})$, é dada pela equação 3.1, sendo que a energia potencial¹ mínima é aquela para a conformação nativa da proteína $\Gamma_0(r_0, \theta_0, \phi_0, d_{ij})$, em que os monômeros estão na posição do carbonon- α na estrutura nativa [39, 70]:

$$\begin{aligned} \mathbb{U}_{\text{res-res}}(\Gamma, \Gamma_0) = & \sum_{\text{ligações}} \left\{ \epsilon_r (r - r_0)^2 \right\} + \sum_{\text{ângulos}} \left\{ \epsilon_\theta (\theta - \theta_0)^2 \right\} + \\ & + \sum_{\text{diedros}} \epsilon_\phi \left\{ [1 - \cos(\phi - \phi_0)] + \frac{1}{2} [1 - \cos(3\phi - 3\phi_0)] \right\} + \\ & + \sum_{\text{contatos}} \left\{ \epsilon_C \left[5 \left(\frac{d_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 6 \left(\frac{d_{ij}}{r_{ij}} \right)^{10} \right] \right\} + \sum_{\text{não-contatos}} \left\{ \epsilon_{NC} \left(\frac{\sigma_{NC}}{r_{ij}} \right)^{12} \right\}. \end{aligned} \quad (3.1)$$

O primeiro termo representa a soma das contribuições de energia das ligações covalentes entre dois resíduos adjacentes, modeladas por um potencial harmônico, sendo que r é a distância de ligação entre esses resíduos, como o par 1-2 da figura 3.2.

O segundo termo é a soma das energias potenciais relacionadas aos ângulos formados por 3 resíduos adjacentes, também dado por um potencial harmônico, sendo

¹Em geral, neste trabalho, utilizamos em equações "U" para energia potencial, e "V" para potencial elétrico. Para diferenciar interações eletrostáticas e não eletrostáticas, utilizamos a notação sobrescrita "ES" nos casos eletrostáticos.

Fonte: Adaptado do trabalho de Ponder et al [71].

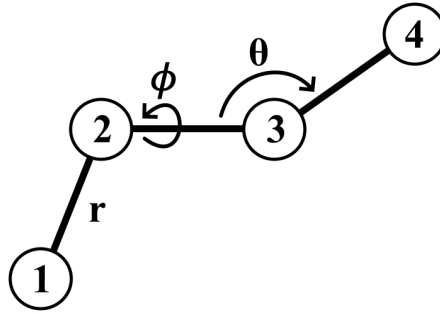


Figura 3.2: Esquema das interações intramoleculares entre os monômeros da proteína. No diagrama, r é a distância entre dois monômeros ligados e θ e ϕ são ângulos formados por uma sequência de monômeros.

que θ é o ângulo formado por esses 3 resíduos, conforme os monômeros 2-3-4 da figura 3.2.

O terceiro termo é a soma dos potenciais de diedros (ou ângulos de torção da cadeia), sendo que ϕ é o ângulo de diedro da sequência 1-2-3-4 da figura 3.2.

O quarto termo corresponde à energia de interação entre os resíduos i e j ($i < j - 3$), distantes entre si por r_{ij} , que fazem contato na estrutura nativa da proteína, de acordo com o mapa de contato CSU [72], sendo que d_{ij} é a distância entre esses resíduos na estrutura nativa. Modelos baseados em estrutura requerem um mapa de contatos da proteína, isto é, a informação de quais resíduos realizam contato na estrutura nativa e por meio de quais critérios são definidos esses contatos [73]. Existem mapas de contato que fazem uso de critérios simples, como uma distância de corte entre dois resíduos na estrutura nativa - se a distância entre os resíduos i e j for menor que a distância de corte, então eles fazem contato [74]. Outros mapas usam critérios mais elaborados, como é o caso do *Contacts Structural Units* (CSU), que leva em conta a sobreposição dos raios de Van der Waals entre dois resíduos [72, 75]. Os mapas de contatos são muito importantes na utilização do modelo SBM e têm sido amplamente estudados nas últimas décadas [74, 76, 77]. Neste trabalho, utilizamos o mapa de contato CSU. O potencial de contatos, representado pelo potencial Lennard-Jones 10-12, é o resultado das interações não-covalentes importantes para formar e manter a estrutura tridimensional da proteína, discutidas na seção 1.1.1.

O último termo é o potencial de não-contatos, que representa uma interação repulsiva entre todos os resíduos que não realizam contato na estrutura nativa, sendo que $\sigma_{NC} = 4 \text{ \AA}$ é o parâmetro que ajusta o alcance desse potencial repulsivo [35, 39].

Em nosso trabalho, os parâmetros $\epsilon_r = 100\epsilon_c$, $\epsilon_\theta = 20\epsilon_c$, $\epsilon_\phi = \epsilon_{nc} = \epsilon_c$ são

Fonte: Elaborado pelo autor

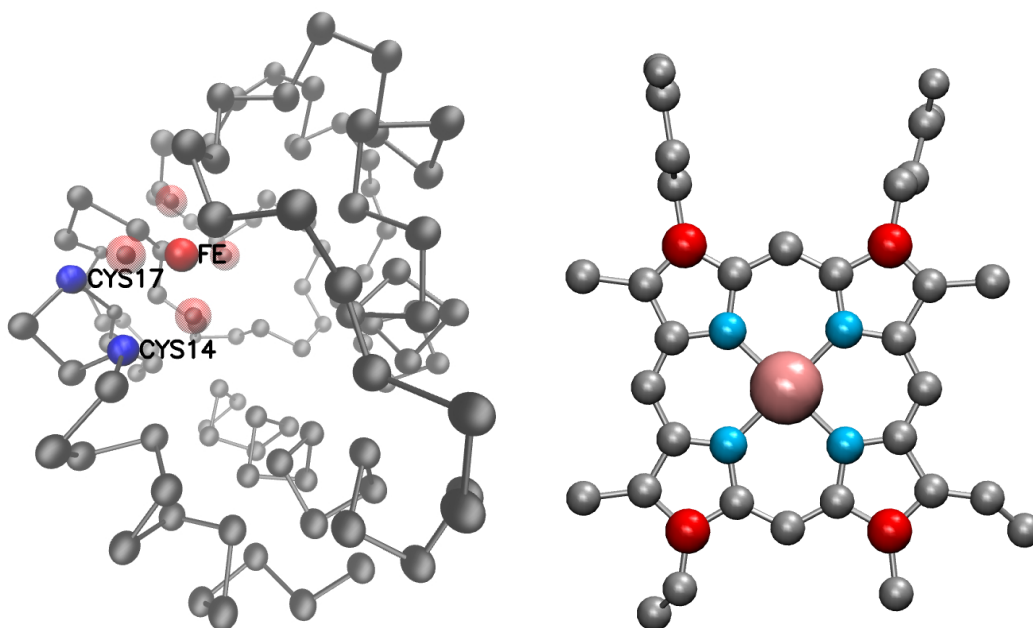


Figura 3.3: Representação do grupo heme. À esquerda, o heme, em vermelho, ligado ao citocromo *c* por meio de duas ligações covalentes com as cisteínas 14 e 17, em azul escuro. O átomo de ferro, em vermelho sólido, centrado no retângulo formado pelos 4 pseudoátomos que compõem o heme, em vermelho transparente. À direita, o heme com todos os átomos explícitos (compare com a figura 1.4). Destacados em vermelho, os 4 átomos de carbono escolhidos para serem as posições dos 4 pseudoátomos da figura à esquerda. Em ciano, os átomos de nitrogênio nos quais está ligado covalentemente o átomo de ferro, em rosa.

definidos em função do parâmetro ϵ_c , regulados para melhor representarem as interações no sistema estudado [39, 71]. O ϵ_c determina a magnitude da energia de interação entre os resíduos que realizam contato no mapa de contatos, e está relacionado com a temperatura de transição (temperatura de *melting*) da proteína [35].

3.1.2 O grupo heme

Modelar o citocromo *c* exigiu um cuidado adicional com o grupo heme, uma vez que ele não é um aminoácido na cadeia principal, mas um grupo prostético que se liga em dois monômeros formando uma ramificação na cadeia. Como discutido na seção 1.1.3, o grupo heme realiza 2 ligações covalentes, nos resíduos 14 e 17, e 2 ligações não-covalentes no estado nativo da proteína, com os resíduos 18 e 80. Sob condições de desnaturação, o ferro do heme perde a ligação com o resíduo 80, mas a ligação com o resíduo 18 e as ligações covalentes permanecem. O ferro se liga covalentemente a 4 nitrogênios numa geometria planar quadrada, conforme figuras 1.4 e 3.3, e 2 ligações axiais com os resíduos 18 e 80 no estado nativo.

Tendo em vista essas informações, modelamos a estrutura do grupo heme considerando 4 pseudoátomos, em vermelho transparente à esquerda da figura 3.3, que não interagem entre si, com suas posições centradas nas posições nativas dos átomos de carbono destacados em vermelho à direita da figura. Consideramos sua estrutura totalmente rígida, sem a capacidade de torsão nem vibração, ou seja, nunca nenhum dos 4 átomos se move em relação a eles mesmos. Dois desses átomos, os 2 vermelhos da parte inferior da imagem à direita, realizam ligação covalente com a proteína, então esses dois pseudoátomos interagem, um com o resíduo 14 outro com o 17, pelo potencial harmônico de ligações, o primeiro termo da equação 3.1. Os outros dois átomos, em vermelho na parte superior da imagem à direita, apenas formam a geometria planar do heme. A posição do átomo de ferro é determinada no modelo pelo centro geométrico dessa estrutura retangular, dada a simetria da estrutura do heme. O ferro também não interage com os 4 pseudoátomos do heme, mas interage com os resíduos 18 e 80 pelo potencial de contatos também do modelo SBM. Além disso, uma vez que o átomo de ferro está em estado ferroso, ele possui carga $+2e$, logo também atua nas interações eletrostáticas, tanto com os resíduos carregados da proteína (equação 3.2), quanto com a superfície carregada (equação 3.4).

3.2 A Solução Iônica

O intuito do trabalho é estudar a adsorção do citocromo *c* em mesoporo de sílica, estando este sistema em solução aquosa e temperatura ambiente. Dessa forma, os íons da solução foram representados implicitamente através do potencial de Coulomb blindado $\mathbb{U}_{\text{res-res}}^{\text{ES}}$, com a restrição de volume excluído:

$$\begin{cases} \mathbb{U}_{\text{res-res}}(r_{ij}) = \infty, & r_{ij} \leq b \\ \mathbb{U}_{\text{res-res}}^{\text{ES}}(r_{ij}) = \frac{z_i z_j e_0^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_s} \frac{e^{-\kappa r_{ij}}}{r_{ij}}, & r_{ij} > b \end{cases} \quad (3.2)$$

sendo que i e j representam o par de resíduos carregados, $b = 2 \text{ \AA}$ é o raio dos resíduos, z é sua valência, $e_0 = 1,602 \times 10^{-19} \text{ C}$ é a carga elementar do elétron, ϵ_0 é a permissividade elétrica do vácuo, $\epsilon_s = 78,7$ é a constante dielétrica do solvente (água), κ é o inverso do comprimento de Debye, dado pela equação A.10 do apêndice A e r_{ij} é a distância entre os resíduos i e j . O fator $e^{-\kappa r_{ij}}$ engloba o efeito de blindagem dos íons, que se acumulam em regiões de carga oposta (figura 1.7) e atenuam a magnitude do potencial eletrostático [43]. Já a constante dielétrica ϵ_s representa a influência também atenuadora do solvente no potencial, dados os efeitos de polarização de meios dielétricos [43, 78, 79]. Para

Elaborado pelo autor.

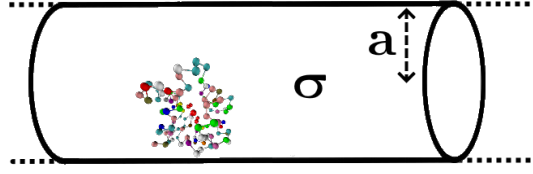


Figura 3.4: Esquema do modelo de poro confinante.

$r_{ij} \leq b$, o potencial assume valores muito altos de energia, então, para evitar isso, incluímos a repulsão de esfera rígida entre dois monômeros esféricos [43].

3.3 A Superfície Carregada

O poro de sílica foi modelado como uma superfície cilíndrica infinitamente longa com densidade superficial de carga σ e raio a (figura 3.4). Já a energia potencial eletrostática $\mathbb{U}_{\text{res-poro}}^{\text{ES}}$ entre um resíduo carregado k da proteína e a superfície cilíndrica carregada é dada pela solução da equação de Poisson-Boltzmann linearizada:

$$\mathbb{U}_{\text{res-poro}}^{\text{ES}} = z_k e_0 \mathbb{V}_{\text{poro}}, \quad (3.3)$$

sendo que $\mathbb{V}_{\text{poro}}$ é dado pela equação A.51, cuja obtenção e cálculos estão detalhados no apêndice A. Assim:

$$\begin{cases} \mathbb{U}_{\text{res-poro}}(r_i) = \infty, & r_i \geq a - b \\ \mathbb{U}_{\text{res-poro}}(r_k) = \frac{z_k e_0 \sigma \mathbb{K}_0(\kappa a)}{\varepsilon_0 \varepsilon_s \kappa [\mathbb{I}_0(\kappa a) \mathbb{K}_1(\kappa a) + \mathbb{I}_1(\kappa a) \mathbb{K}_0(\kappa a)]} \mathbb{I}_0(\kappa r_k), & r_k < a - b, \end{cases} \quad (3.4)$$

sendo que $\mathbb{I}$ e $\mathbb{K}$ são as funções de Bessel modificadas de primeiro e segundo tipo, respectivamente, e r_k é a distância radial do resíduo carregado k até o centro do poro [35]. O índice i itera sobre todos os resíduos, não somente os carregados, e r_i representa a distância radial entre um resíduo i e o centro do poro. Foi incluída uma repulsão de esfera rígida na condição $r_i \geq a - b$ para que a proteína se mantenha confinada [43], sendo b o raio do resíduo.

Cada valor de pH altera o estado de protonação dos resíduos tituláveis da proteína e também a densidade de carga da superfície cilíndrica, uma vez que estamos modelando um mesoporo de sílica SBA-15, cujos grupos silanol são tituláveis [16].

Tabela 3.1: Densidade superficial de carga σ em função do pH para sílica SBA-15

pH	σ (C/m ²)	pH	σ (C/m ²)	pH	σ (C/m ²)
3.0	-0.0005	7.0	-0.05	11.0	-0.21
3.5	-0.003	7.5	-0.065	11.5	-0.23
4.0	-0.0055	8.0	-0.08	12.0	-0.25
4.5	-0.0098	8.5	-0.105	12.5	-0.27
5.0	-0.014	9.0	-0.13	13.0	-0.29
5.5	-0.021	9.5	-0.15	13.5	-0.31
6.0	-0.028	10.0	-0.17	14.0	-0.33
6.5	-0.039	10.5	-0.19		

Fonte: Dados experimentais de Brown et al [80].

Assim, a densidade superficial de carga σ do cilindro variou com o pH conforme tabela 3.1 [80].

3.4 O Programa

Finalmente, para realizar as simulações do citocromo *c* em solução eletrolítica interagindo com uma superfície cilíndrica, utilizamos um programa escrito na linguagem Fortran [81], desenvolvido por Sidney J. de Carvalho e Daniel L. Z. Caetano e recentemente utilizado por eles para um estudo de adsorção da proteína lisozima [35]. O programa emprega o método de simulação de Monte Carlo a pH constante com critério de Metropolis [35, 67, 82, 83], realizando diferentes movimentos para amostragem dos estados conformacionais da proteína e sua posição e orientação em relação à superfície. No entanto, o programa foi modificado pelo discente para este trabalho, de modo a implementar no modelo *coarse-grained* polimérico SBM da proteína o grupo prostético heme do citocromo *c* (seção 3.1.2).

3.4.1 O Método de Monte Carlo

O método de Monte Carlo foi desenvolvido por von Neumann, Ulam e Metropolis, ao fim da Segunda Guerra Mundial, durante o Projeto Manhattan, para se estudar a difusão de nêutrons em material fissionável [84–87]. Devido ao extenso uso de números aleatórios, o nome Monte Carlo foi cunhado por Nicholas Metropolis em homenagem ao famoso e homônimo cassino localizado em Mônaco [86, 87].

O termo método de Monte Carlo sumariza uma variedade de métodos que se baseiam na amostragem de números aleatórios para se obter uma solução, amplamente

utilizados em problemas de física estatística. Por vezes, métodos determinísticos possuem um custo computacional mais elevado ou são incapazes de amostrar estados muito distantes do equilíbrio. Nestes casos, o método estocástico de Monte Carlo surge como uma boa alternativa [85, 88].

De modo geral, a ideia do método de Monte Carlo é gerar uma trajetória no espaço de configurações de um ensemble [85], a fim de se obter informações sobre um dado sistema [88], embora também existam métodos de Monte Carlo para cálculos de dinâmica [86]. O método é muitas vezes combinado com um critério de aceitação-rejeição para a amostragem aleatória, especialmente em sistemas físicos nos quais existem diferentes probabilidades para determinados estados, ou seja, uma função densidade de probabilidade. O critério mais comum e mais usado é o algoritmo de Metropolis [88], discutido na seção a seguir.

3.4.2 O algoritmo de Metropolis

Embora não haja uma forma única de construir um algoritmo de Monte Carlo, a metodologia mais comum é o esquema de Metropolis da cadeia de Markov [89], no qual a distribuição de estados é limitada por um critério de probabilidade, isto é, a amostragem de estados é feita passando do estado A para o estado B , respeitando a estatística de Boltzmann:

$$P_{A \rightarrow B} = e^{-\beta \Delta U}, \quad (3.5)$$

sendo que $P_{A \rightarrow B}$ é a probabilidade do sistema evoluir do estado A ao estado B , $\beta = 1/k_B T$ é o inverso da energia térmica do sistema e $\Delta U = U_B - U_A$ é a variação de energia quando o sistema evolui do estado A ao B [89]. Dessa forma, num ensemble termodinâmico onde a temperatura T é constante, estados mais prováveis são estados nos quais $U_B < U_A$.

Baseando-se nisso, o algoritmo de Metropolis [85, 86, 88] define um critério de aceitação-rejeição para as configurações da seguinte forma:

As equações 3.1, 3.2 e 3.4 somadas formam a energia potencial do sistema, e cada perturbação nas variáveis dessas funções resulta num estado diferente. Quando ocorre um movimento aleatório na proteína, por exemplo, o método de Monte Carlo está amostrando um estado aleatório diferente, e o critério de Metropolis decide se essa nova configuração é aceita ou não, respeitando a probabilidade de cada estado. Os tipos de movimentos aleatórios que exploram o espaço configuracional estão descritos na seção a seguir.

Algoritmo de Metropolis

```

for  $i = 1, 2, \dots, N$  do
  Calcula  $\mathbb{U}_A$ 
  Perturba o sistema
  Calcula  $\mathbb{U}_B$ 
  Sorteia número aleatório  $n \in [0, 1]$ 
  if  $n \leq \exp[-\beta(\mathbb{U}_B - \mathbb{U}_A)]$  then
     $A \leftarrow B$  ▷ i.e. Aceita o estado B
  else
    Rejeita o estado  $B$ 
  end if
end for

```

3.4.3 Amostragem de Estados

Ao todo, nosso programa realiza 5 tipos de movimentos aleatórios na proteína, a fim de explorar o espaço configuracional [35, 90]:

1. Translação de um resíduo: um resíduo da proteína é escolhido aleatoriamente para ser deslocado a uma distância aleatória em relação a suas coordenadas.
2. Translação da proteína: toda a proteína é deslocada a uma distância aleatória.
3. Rotação da proteína: é escolhido um eixo (x, y ou z) aleatoriamente para rotacionar a proteína, em torno desse eixo, por um deslocamento angular aleatório.
4. Rotação de pivô: um resíduo aleatório da proteína é escolhido, de modo que o trecho menor da proteína, a partir desse resíduo, sofre uma rotação em torno de um dos 3 eixos também aleatoriamente escolhido por um deslocamento angular aleatório
5. Rotação de *crank-shaft*: dois resíduos são escolhidos aleatoriamente, de modo que o intervalo de cadeia compreendido entre eles sofre uma rotação, por um deslocamento angular aleatório, em torno do eixo que passa pelos dois resíduos escolhidos.

Além de movimentos na cadeia, a variação dos estados de protonação dos resíduos ionizáveis também foi realizada utilizando o critério de Metropolis. A variação de energia deste processo é escrita em função dos valores de pK_a desses resíduos e do pH do meio (seção 1.1.2), conforme equação 3.6 [31, 35, 91, 92].

$$\Delta\mathbb{U} = \Delta\mathbb{U}^{\text{ES}} \pm \chi \left[k_B T (pH - pK_a^0) \ln(10) \right], \quad (3.6)$$

sendo que ΔU^{ES} é a variação de energia eletrostática (equações 3.2 e 3.4) quando o resíduo protona ou desprotona, pK_a^0 é o valor do pK_a do resíduo quando está livre na solução (tabela 1.1), $\chi = 1$ se o resíduo é básico e $\chi = -1$ se o resíduo é ácido. O sinal $\pm$ na equação 3.6 é positivo na protonação e negativo na desprotonação. O segundo termo da equação é a diferença de energia livre entre os estados protonado e desprotonado, discutida na seção 1.2. Essa abordagem considera que as variações no grau de protonação dos resíduos ionizáveis ocorrem também devido a interações eletrostáticas, e é bastante utilizada em simulações de biosistemas a pH constante [35, 67, 82, 83].

A cada passo de Monte Carlo um dos 5 movimentos é escolhido aleatoriamente e, em 30% dos passos, escolhe-se um resíduo ionizável aleatório da proteína para alterar seu estado de protonação [35], conforme critério de Metropolis com a variação de energia dada pela equação 3.6.

Por fim, ressaltamos a importância da determinação do parâmetro de deslocamento máximo δ_{max} nos movimentos citados acima. O parâmetro δ_{max} diz respeito ao deslocamento máximo que pode ocorrer nos movimentos de monômero e translação, e ao deslocamento angular máximo nos movimentos de rotação, pivô e *crank-shaft*. O valor de δ_{max} precisa ser regulado, porque um valor muito pequeno implicaria num índice de aceitação do critério de Metropolis muito alto, isto é, os novos estados seriam aceitos com muita frequência, por se tratar de configurações vizinhas com energias muito próximas, o que não permite explorar o espaço de configurações adequadamente. Por outro lado, um valor de δ_{max} muito alto resultaria numa aceitação muito baixa, o que, novamente, explora muito pouco o espaço de configurações do sistema [85]. Dessa forma, os valores de δ_{max} de cada movimento foram regulados durante as simulações, de modo que a frequência de aceitação ficasse o mais próximo possível de 50%.

3.5 Detalhes Computacionais

As simulações foram realizadas em 3 etapas principais: (1) Determinação de δ_{max} , (2) Equilibração da energia e (3) Produção.

Na primeira etapa (1), foram realizadas simulações curtas (10^4 passos e 200 configurações independentes²) a fim de regular o parâmetro δ_{max} (seção 3.4.3), de modo

²Esse número de configurações independentes, ou configurações descorrelacionadas, diz respeito à quantidade de movimentos de Monte Carlo explorados entre um passo e outro que são considerados para os cálculos das propriedades estatísticas. Isso é feito para que os passos utilizados para o cálculo das médias se tornem menos dependentes uns dos outros (no nosso caso, 200 configurações vizinhas entre uma amostra e outra).

que as aceitações dos movimentos se aproximassem o máximo possível de 50%. Para isso, os valores de δ_{max} de translação começaram sendo iguais ao raio do cilindro, e depois foram refinados para atingir aceitação ideal. O δ_{max} da translação de um resíduo manteve-se constante e igual a 0,12 Å, durante todas as simulações, o que garantiu aceitação ideal. Para os movimentos de *crank-shaft* e pivô, $\delta_{max} = 5^\circ$ foi o valor que mais aproximava as aceitações de 50%. Por fim, a rotação se iniciou em $\delta_{max} = 120^\circ$ e foi refinada até um valor mínimo de 30° . Na etapa (2), verificamos a equilibração do sistema, analisando as curvas de energia total do sistema e, novamente, as aceitações. Se a energia não estivesse oscilando em torno de um valor de equilíbrio, então simulações um pouco maiores (10^6 passos e 200 configurações independentes) seriam realizadas, de modo que o sistema atingisse o equilíbrio. Por fim, na etapa (3), com o sistema em equilíbrio, foi executada a produção (4×10^6 passos e 500 configurações independentes), a partir da qual toda a estatística e médias foram obtidas (seção 4).

3.5.1 Determinação do parâmetro ϵ_c

A temperatura de *melting* T_m de uma proteína pode ser definida como a temperatura de transição dos estados enovelado-desenovelado (também chamada de temperatura de *folding*, ou de enovelamento), isto é, a temperatura na qual a probabilidade de a proteína estar enovelada ou desenovelada é a mesma [93, 94]. Essa temperatura é característica de cada proteína e é importante para modelar o parâmetro ϵ_c do potencial de contatos do modelo baseado em estrutura (equação 3.1) [35].

De acordo com a literatura [95], $T_m = 76^\circ\text{C} = 349,15\text{ K}$ para o citocromo *c* de coração bovino. Dessa forma, realizamos os seguintes passos, com a proteína livre em solução:

1. Fixamos a temperatura definida como a T_m experimental e realizamos algumas simulações variando ϵ_c .
2. Plotamos uma curva de fração de contatos nativos Q em função do valor de ϵ_c (à esquerda da figura 3.5).
3. Encontramos o valor $\epsilon_c = 0,67\text{ kcal/mol}$, onde $Q \approx 0,5$.
4. Fixamos o valor de ϵ_c encontrado e realizamos simulações variando as temperaturas em torno da T_m experimental.
5. Plotamos a curva do calor específico (à direita da figura 3.5).

Fonte: Elaborado pelo autor.

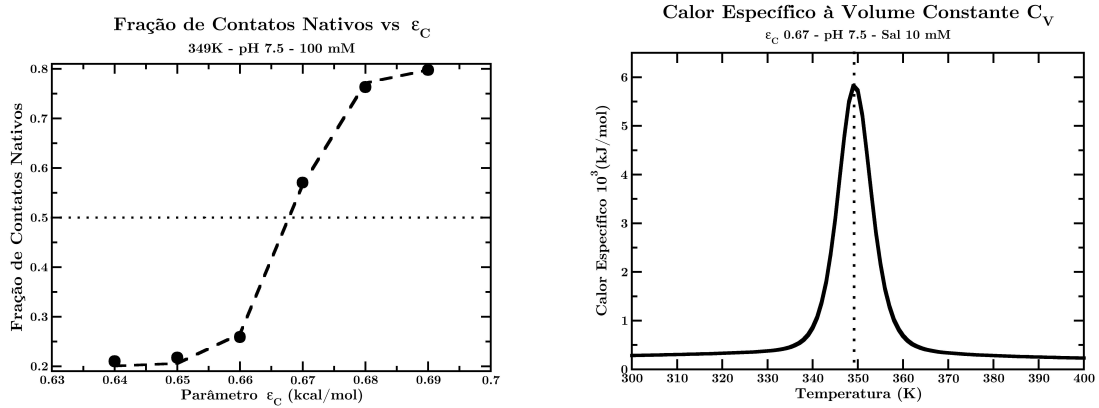


Figura 3.5: À esquerda, a fração de contatos nativos do citocromo c em função da constante ϵ_C , à temperatura $T = 349, 15$ K. Modelando uma sigmoide na curva, obtemos $\epsilon_C \approx 0,668$ kcal/mol para metade dos contatos nativos, portanto usamos $\epsilon_C = 0,67$ kcal/mol em nossas simulações. À direita, o calor específico a volume constante C_V do citocromo c com o ϵ_C determinado. O pico da curva de C_V representa a temperatura de transição da proteína (pelo gráfico, $T \approx 349$ K).

Para a obtenção da curva do calor específico $C_V = (\langle E^2 \rangle - \langle E \rangle^2) / k_B T$, utilizamos o método dos múltiplos histogramas, WHAM (*Weighted Histogram Analysis Method*), um algoritmo que calcula as densidades de estados do sistema a uma dada temperatura, por meio de histogramas de energias gerados em simulações com diferentes temperaturas [96, 97]. As simulações em diferentes temperaturas permitem que estados com energias mais altas sejam amostrados. O pico da curva do calor específico em função da temperatura indica a temperatura de transição (que estamos considerando como a temperatura de *melting* da literatura) [82].

Assim, a constante ϵ_c do potencial de contatos SBM foi determinada de modo que a temperatura de transição da proteína, de acordo com a nossa consideração, seja igual à T_m [35], uma vez que é o potencial de contatos quem mantém uma interação atrativa entre os pares de resíduos presentes no mapa de contatos, e portanto estabiliza sua estrutura enovelada.

Após estimarmos o ϵ_c , fixamos seu valor no potencial e produzimos 20 simulações, variando a temperatura de 260 K a 420 K, de 10 em 10 K. Isso foi feito para que houvesse uma estatística robusta para o cálculo das médias feito pelo WHAM, que fornece a curva do calor específico (à direita da figura 3.5). Pelo gráfico, a temperatura de transição é $T = 349$ K $\approx T_m$, conforme esperado.

3.5.2 Simulações e Análises

Depois que o parâmetro ϵ_c foi estabelecido, realizamos, então, as produções para as análises principais da adsorção do citocromo c , agora com a presença do potencial de interação do poro com a proteína, com e sem o mecanismo de regulação de carga. À temperatura ambiente de $T = 298$ K, variamos o pH (de 3 a 12,5) e o raio de confinamento (40 Å, 80 Å, 120 Å, 160 Å), em salinidades de 1 mM e 10 mM. A densidade superficial de carga σ do cilindro variou com o pH conforme tabela 3.1. A carga líquida média da proteína foi obtida a partir das médias da carga líquida da proteína, em cada pH, raio de confinamento e salinidade.

Em seguida, analisamos a energia de interação proteína-poro, definida pelas médias da energia eletrostática da interação da proteína com a superfície nas mesmas condições. Essa energia fornece informações do que seria, aproximadamente, a contribuição entálpica para a energia livre de ligação [37, 65].

Em todas as simulações, a proteína começou no centro da cavidade cilíndrica, em seu estado nativo. Os resíduos tituláveis começaram carregados (+1e ou -1e). Nas simulações sem regulação de carga, a probabilidade de protonação dos resíduos da proteína foi definida como zero (e não 30%, como descrito na seção 3.4.3), e as cargas dos resíduos tituláveis da proteína ficaram fixas durante as simulações, recebendo os valores das cargas médias obtidas nas simulações com a proteína livre. Isso foi feito porque o caso da proteína livre remove o efeito da regulação de carga causado pela superfície carregada, mas preserva o efeito do pH na probabilidade de protonação dos resíduos.

3.5.3 Projeção da Densidade Superficial de Carga

Anže L. Božič e Rudolf Podgornik publicaram, em 2018, um trabalho teórico sobre o mecanismo da regulação de carga [98]. Nesse trabalho é desenvolvido um modelo para projetar a densidade superficial de carga ϱ em pontos (θ, ϕ) sobre a superfície de uma esfera de raio R que compreende um conjunto de N cargas pontuais q_k . Essa densidade de carga é dada por

$$\varrho(\theta, \phi) = \frac{1}{4\pi R^2} \sum_{k=1}^N q_k^{\pm} \frac{\lambda_k}{\sinh(\lambda_k)} \exp[\lambda_k \cos(\gamma_k)], \quad (3.7)$$

sendo λ_k o parâmetro de concentração da k -ésima carga (se $\lambda_k \rightarrow 0$, a distribuição se torna uniforme sobre a superfície, enquanto que $\lambda_k \rightarrow \infty$ fornece uma distribuição de

cargas pontuais) e

$$\cos \gamma_k = \cos(\theta_k) \cos(\theta) + \sin(\theta_k) \sin(\theta) \cos(\phi_k - \phi) \quad (3.8)$$

é a menor distância (comprimento de arco) sobre a superfície que une os pontos (θ, ϕ) e (θ_k, ϕ_k) [98, 99].

Relacionando essa abordagem com nosso trabalho, com o intuito de mapear a distribuição de cargas do citocromo c , consideramos as cargas q_k como as cargas médias dos resíduos ionizáveis da proteína (valores entre -1 e 1, em unidades de carga elementar) e suas respectivas posições (r_k, θ_k, ϕ_k) , cuja origem é o centro de massa da proteína. Definimos $R = r$ do resíduo mais distante da origem.

Para o cálculo da equação 3.7, considerando 10^4 pontos (θ, ϕ) , desenvolvemos um programa em Fortran, cujos parâmetros de entrada são as posições e cargas dos resíduos da proteína, e o parâmetro de saída é a densidade superficial de carga $\varrho(\theta, \phi)$ da esfera que envolve a proteína. Para analisar toda a distribuição tridimensional de $\varrho(\theta, \phi)$ num plano 2D, desenvolvemos um programa em Python que recebe como parâmetro de entrada os valores de ϱ de todos os pontos (θ, ϕ) calculados e gera uma projeção Mollweide [98, 100].

4 Resultados e Discussão

4.1 Carga Líquida e ponto Isoelétrico

Avaliamos o efeito do pH e da regulação de carga na carga líquida do citocromo *c*, conforme figura 4.1. Pode ser notado pela figura 4.1-A que o pI da proteína sofre um aumento com o aumento do raio, embora a diferença seja muito pequena - $pI \approx 10,5$ pro caso livre e $pI \approx 10,7$ pro raio de confinamento de $160 \text{ \AA}$. Para concentração de sal de 10 mM , (figura 4.1-B), o comportamento é o mesmo, exceto para raio de $160 \text{ \AA}$, no qual o pI assume um valor próximo de $11,0$. Considerando que o desvio dos valores de carga é da ordem de $1e$, pode-se assumir que essa variação no pI é desprezível.

Esse aumento do pI com o aumento do raio de confinamento, embora pouco perceptível, está diretamente relacionado com o efeito da regulação de carga. Quando a proteína está sob influência do potencial elétrico da superfície, a energia ΔU da equação 3.6 também sofre uma variação, porque o termo ΔU^{ES} agora contabiliza a contribuição da interação eletrostática resíduo-superfície. Quanto mais forte essa interação, menor é ΔU^{ES} e consequentemente ΔU . Este último está diretamente relacionado com a probabilidade de protonação dos resíduos ionizáveis da proteína via critério de Metropolis (seção 3.4.2). Dessa forma, a tendência é que a protonação dos resíduos se torne mais provável à medida que a energia de interação com a superfície se torna mais negativa. Como veremos na seção 4.2, a energia potencial eletrostática proteína-poro de fato aumenta com o aumento do raio. Logo, para compensar esse aumento de ΔU^{ES} , o termo à direita da equação 3.6 precisa aumentar também - e ele aumenta se a diferença $\text{pH} - \text{pK}_a$ aumentar. Assim, para que a proteína desprotone seus resíduos até a neutralidade elétrica, é necessário um pH cada vez maior à medida que a força proteína-poro aumenta. Isso configura um aumento do ponto isoelétrico. Evidentemente, essa é a interpretação com base na equação 3.6, que descreve a protonação dinâmica dos resíduos carregados e, portanto, a regulação de carga em nosso modelo.

Do ponto de vista experimental, quanto maior o campo elétrico da superfície, maior a concentração de contraíons em suas proximidades, os quais não são descritos

Fonte: Elaborado pelo autor

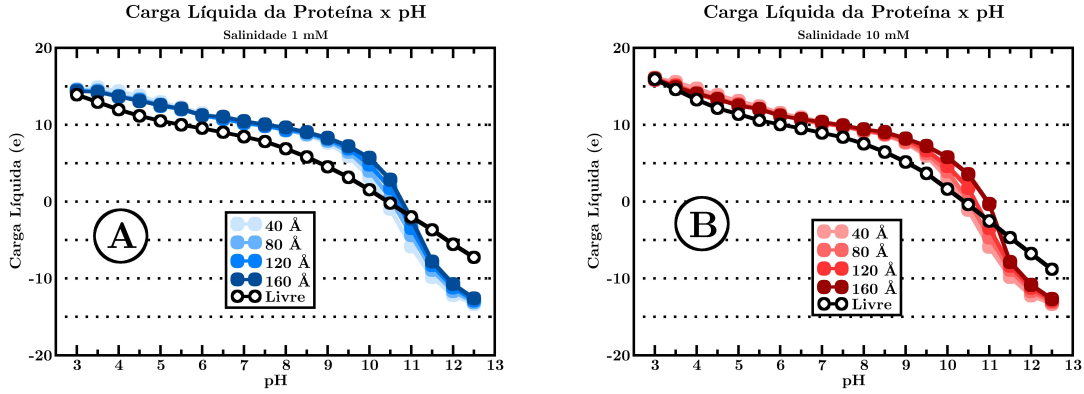


Figura 4.1: Carga líquida do citocromo *c* em função do pH, em salinidades de 1 mM (A), em azul, e 10 mM (B), em vermelho. Os círculos preenchidos representam as simulações com regulação de carga, enquanto os círculos vazios representam as simulações com a proteína livre em solução. As tonalidades mais claras de cada cor simbolizam os raios de confinamento menores, e as tonalidades mais escuras são os raios maiores, conforme legenda. O desvio dos valores de carga, em unidades da carga elementar e , é da ordem do tamanho dos círculos no gráfico.

explicitamente em nosso modelo. Como a superfície tem carga negativa, os contraíons são positivos. Com isso, conforme se aproxima da superfície, a proteína entra num microambiente de maior concentração de íons positivos, o que aumenta a probabilidade de protonação dos seus resíduos. Esse microambiente pode ser interpretado como uma região de menor pH do valor no *bulk*. Isso implica que, para que os resíduos básicos da proteína percam seus prótons até que a carga líquida da proteína se torne nula, é necessário um pH cada vez maior, o que, por sua vez, configura um aumento do pI da proteína. Isso pode ser visto avaliando a equação 1.9. Conforme a interação elétrica proteína-poro aumenta, o logaritmo à direita da equação sofre uma variação que precisa ser compensada pela diferença $\text{pH} - \text{pK}_a$ para que a carga média da proteína não sofra alterações. Sem a presença da superfície, a concentração de íons positivos na solução depende exclusivamente do pH no *bulk*, de forma que o pI da proteína é menor. Pela figura 4.1, $\text{pI} = 10,5$ do citocromo *c* livre é apenas levemente menor que o valor experimental de 10,7 [28–30].

De maneira geral, podemos assumir que o efeito observado da concentração de sal, implícito no κ de Debye (equação A.10), na carga líquida da proteína foi muito pequeno. Pode ser observado que a diferença máxima de carga líquida entre o confinamento em raio 160 Å, que foi o caso em que a proteína assume maior carga, e o caso livre ocorre em $\text{pH} \approx 9,5$, para 1 mM, e $\text{pH} \approx 10,0$, em 10 mM. Os raios de confinamento menores, devido à maior blindagem eletrostática em sal 10 mM, promovem

menor protonação do que o raio maior, e as curvas, nessa salinidade, se aproximam mais do caso livre.

Outra observação que pode ser feita é referente à intersecção entre a curva da proteína livre e as curvas da proteína confinada, que ocorre próximo do pI do citocromo *c*. Até o ponto isoelétrico, a proteína confinada apresenta maior protonação do que no caso livre, em ambas as salinidades. Porém, para valores de pH acima do pI, o comportamento se inverte - o confinamento, e portanto a regulação de carga, confere à proteína uma carga líquida mais negativa do que o caso livre. Era esperado, de acordo com a tendência observada entre os pHs 3 e 11, que a carga líquida da proteína confinada fosse, no mínimo, num caso em que a proteína ficasse no meio do poro, e portanto dessorvida, igual à da proteína livre, e não mais negativa. O confinamento leva a proteína a uma carga mais negativa, apesar da observada tendência do confinamento de aumentar a protonação dos resíduos ionizáveis.

Entendendo como a carga da proteína varia com o pH, vamos analisar a energia eletrostática proteína-poro em função do pH.

4.2 Energia Potencial de Ligação

Plotamos as curvas de energia potencial eletrostática de interação entre a superfície carregada do poro e a proteína, dada pela equação 3.4, em unidades de $k_B T$, em função do pH, na figura 4.2, em salinidades de 1 mM, em azul, e 10 mM, em vermelho. Em pH 3, todas as curvas da figura 4.2-A apresentam aproximadamente a mesma energia de potencial, uma vez que esse pH é próximo do ponto de carga nula da superfície (tabela 3.1), o que reduz o módulo da energia de interação dela com a proteína. Na figura 4.2-B, em maior salinidade, o mesmo ocorre, mas a energia é ainda mais próxima de zero, dada a maior blindagem causada pela concentração de sal de 10 mM.

Conforme o pH aumenta, a carga da superfície se torna mais negativa e a interação proteína-poro se intensifica. É possível notar que a energia de ligação é mais negativa com o aumento do raio do cilindro, isto é, quanto maior o raio de confinamento, mais forte é a atração eletrostática proteína-poro. Isso ocorre porque o potencial atrativo do poro se torna maior com o aumento do raio do poro a nesse intervalo, conforme dependência com as funções de Bessel da equação 3.4. Isso explica o efeito da regulação de carga ser maior em raios maiores, conforme discutido na seção 4.1. Experimentalmente, é observado que poros de sílica SBA-15 com diâmetros maiores apresentam uma maior capacidade de adsorção do citocromo *c* [14], o que pode estar

Fonte: Elaborado pelo autor.

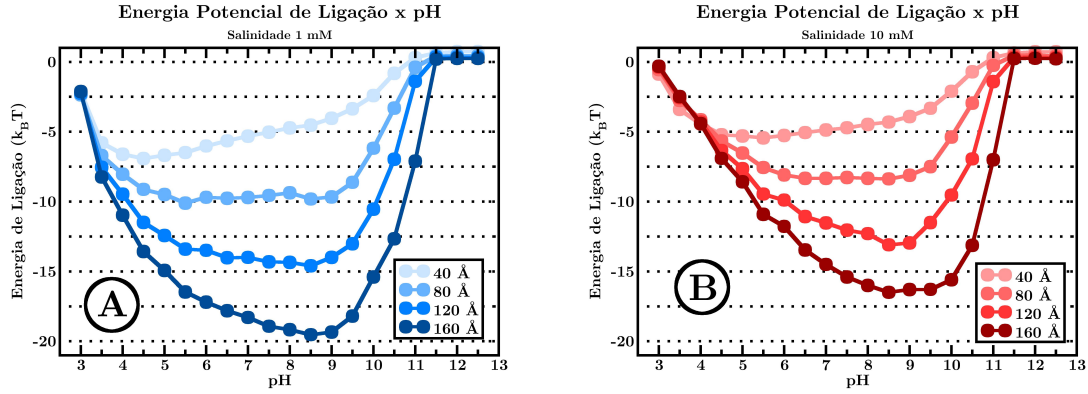


Figura 4.2: Energia média de interação eletrostática proteína-poro, em concentrações de sal de 1 mM (A), em azul, e 10 mM (B), em vermelho. As tonalidades mais claras de cada cor simbolizam os raios de confinamento menores, e as tonalidades mais escuras são os raios maiores, conforme legenda. O desvio dos valores de energia é da ordem de $3 k_B T$.

relacionado com essa maior força de interação eletrostática proteína-superfície em raios maiores, observada em nossos resultados.

Para valores de pH próximos de 9, a energia de ligação começa a aumentar, novamente à exceção do raio de 40 Å, no qual a energia começa a aumentar a partir do pH 4,5. A energia então se torna aproximadamente zero a partir do pH 11,5, nas duas salinidades. Até o pH 11,5, ainda existe uma energia potencial de ligação negativa entre a proteína e o poro. Porém, o pI do citocromo *c*, obtido pela figura 4.1, é menor do que 11, em concentração salina de 1 mM. Portanto, mesmo a proteína e a superfície possuindo ambas cargas negativas, ainda existe uma energia de interação negativa e, portanto, atrativa entre elas. Se a adsorção dependesse exclusivamente da carga líquida total da proteína, essa atração não ocorreria, porque a proteína e a superfície se repeliriam. Isso quer dizer que os termos de multipolo que contribuem para a interação proteína-poro são relevantes para a ocorrência da adsorção. Como será visto na seção 4.4, a distribuição de resíduos carregados formam *patches* de carga na superfície da proteína, importantes para que ocorra adsorção, mesmo em $\text{pH} > \text{pI}$. Isso também indica que a proteína deve possuir uma orientação preferencial para a ocorrência da adsorção, o que analisaremos na seção 4.3.

A figura 4.3 apresenta o efeito da regulação de carga na energia eletrostática proteína-poro. As curvas com círculos vazios representam as simulações nas quais a regulação de carga não foi implementada, ou seja, as cargas dos resíduos ionizáveis, definidas na discussão da seção 3.5.2, se mantiveram fixas durante a produção. O efeito do sal, comparando os gráficos A e B, tanto da figura 4.3, quanto da 4.2, é o de blindar a

Fonte: Elaborado pelo autor.

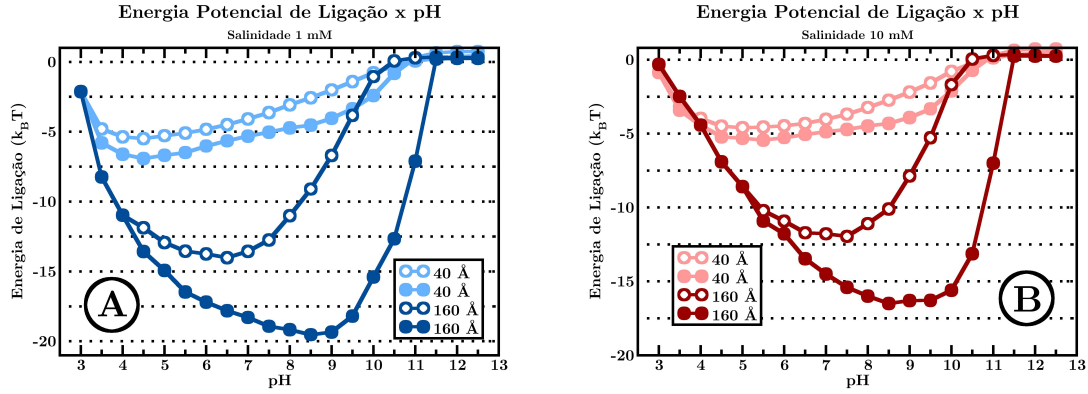


Figura 4.3: Comparação entre as energias médias de interação eletrostática proteína-poro com (círculos preenchidos) e sem (círculos vazios) o efeito da regulação de cargas, em concentrações de sal de 1 mM (A), em azul, e 10 mM (B), em vermelho. As tonalidades mais claras de cada cor simbolizam os raios de confinamento menores, e as tonalidades mais escuras são os raios maiores, conforme legenda. O desvio dos valores de energia é da ordem de $3 k_B T$

interação eletrostática, ou seja, reduzir o módulo da energia em todas as curvas, embora o comportamento e o intervalo de pH no qual ocorrem os mínimos de energia sejam os mesmos em ambas as salinidades.

A principal observação a ser feita da figura 4.3 é a comparação da energia eletrostática proteína-poro entre os casos com e sem regulação de carga. Em ambas as salinidades, a conclusão é a mesma: a regulação de carga promove uma energia eletrostática proteína-poro menor, uma vez que a carga líquida da proteína, até $\text{pH} = \text{pI}$, é mais positiva quando está confinada, do que quando está livre, conforme figura 4.1. Também podemos entender isso, a partir da equação 1.22. A variância ou, como apresentamos na seção 1.2, a capacitância $C = \langle Z^2 \rangle - \langle Z \rangle^2$ da proteína leva em conta as flutuações de carga. Considerando que a interação descrita na equação 1.22 é compreendida entre a proteína e o poro, e que a superfície do poro também mantém suas cargas fixas em todas as simulações, $C_{\text{poro}} = 0$ e nossa energia de interação se torna:

$$\beta G(R) \approx \frac{l_B \langle Z_{\text{prot}} \rangle \langle Z_{\text{poro}} \rangle}{R} - \langle Z_{\text{poro}} \rangle^2 C_{\text{prot}}. \quad (4.1)$$

Note que o segundo termo envolve a flutuação de cargas da proteína, caracterizada por C_{prot} , e representa, assim, a contribuição da regulação de carga para a energia de interação. Essa contribuição é negativa e, portanto, a regulação de carga diminui a energia de interação, como visto na figura 4.3. Quando as cargas da proteína se mantêm fixas, $C_{\text{prot}} = 0$ e a energia é simplesmente a interação de Coulomb direta, representada pelo primeiro termo da equação 4.1.

Finalmente, podemos avaliar os valores mínimos de energia potencial eletrostática para cada caso. Para o raio de confinamento de 160 Å, em ambas as salinidades, a energia assume seu valor mínimo entre os pHs 8 e 9, no caso com regulação de carga, e entre 6 e 7 pro caso da proteína com cargas fixas. Ou seja, a regulação de carga desloca o mínimo da energia para um pH maior, no qual a proteína é mais suscetível a flutuações de carga. Isso significa que pode ocorrer uma adsorção mais estável nesses intervalos de pH, e essa estabilidade diminui à medida que o pH se aproxima de 12. Para investigar essa questão, nas seções a seguir, analisamos a orientação da proteína durante a adsorção, bem como a distribuição de seus resíduos carregados.

4.3 Distribuição dos Resíduos

Analisamos, para os valores de pH 8, 9 e 10, a densidade de probabilidade espacial de alguns resíduos carregados em relação ao centro do poro durante as simulações. Identificamos os 5 resíduos mais próximos da superfície para esse intervalo de pH, nos casos com e sem regulação. Isso foi feito para entender a orientação da proteína durante a adsorção e quais resíduos podem ser importantes para estabilizar essa orientação. Escolhemos as condições de salinidade de 1 mM e raio 160 Å, nos baseando no gráfico 4.3, onde é vista uma diferença mais evidente de comportamento entre os casos com e sem a regulação de cargas. Isso quer dizer que um pico de distribuição concentrado próximo de 160 Å indica uma alta probabilidade do resíduo se encontrar a uma distância de 160 Å do centro do poro, isto é, em contato com a superfície.

Dos 5 resíduos mais próximos da superfície identificados, 3 lisinas são comuns em todos os casos analisados: Lys-72, Lys-73 e Lys-86. Suas distribuições de probabilidade em função da distância ao centro do poro, para os pHs 8, 9 e 10, estão dispostas na figura 4.4. Em pH 8, é possível perceber que a proteína parece adsorvida nos dois casos, com e sem regulação de carga, uma vez que para distâncias ao centro do poro abaixo de 120 Å, os valores das distribuições vão a zero. As lisinas 72 e 73 mostram um pico maior de adsorção próximo à superfície, enquanto a Lys-86 mostra um segundo pico, menor, a uma distância de aproximadamente 132 Å do centro do poro, ou a 28 Å da superfície, o que sugere uma segunda orientação de menor probabilidade. Esse comportamento é observado nos dois casos, em pHs 9 e 10 também.

O que fica mais claro nos pHs 9 e 10 é o efeito da regulação de carga em promover uma orientação mais estável, durante a adsorção, do que o caso sem regulação. Veja que em pH 9, no gráfico à esquerda, os picos de probabilidade das lisinas são muito maiores do que no caso sem regulação. Isso indica que, nesse pH, existe uma

Fonte: Elaborado pelo autor.

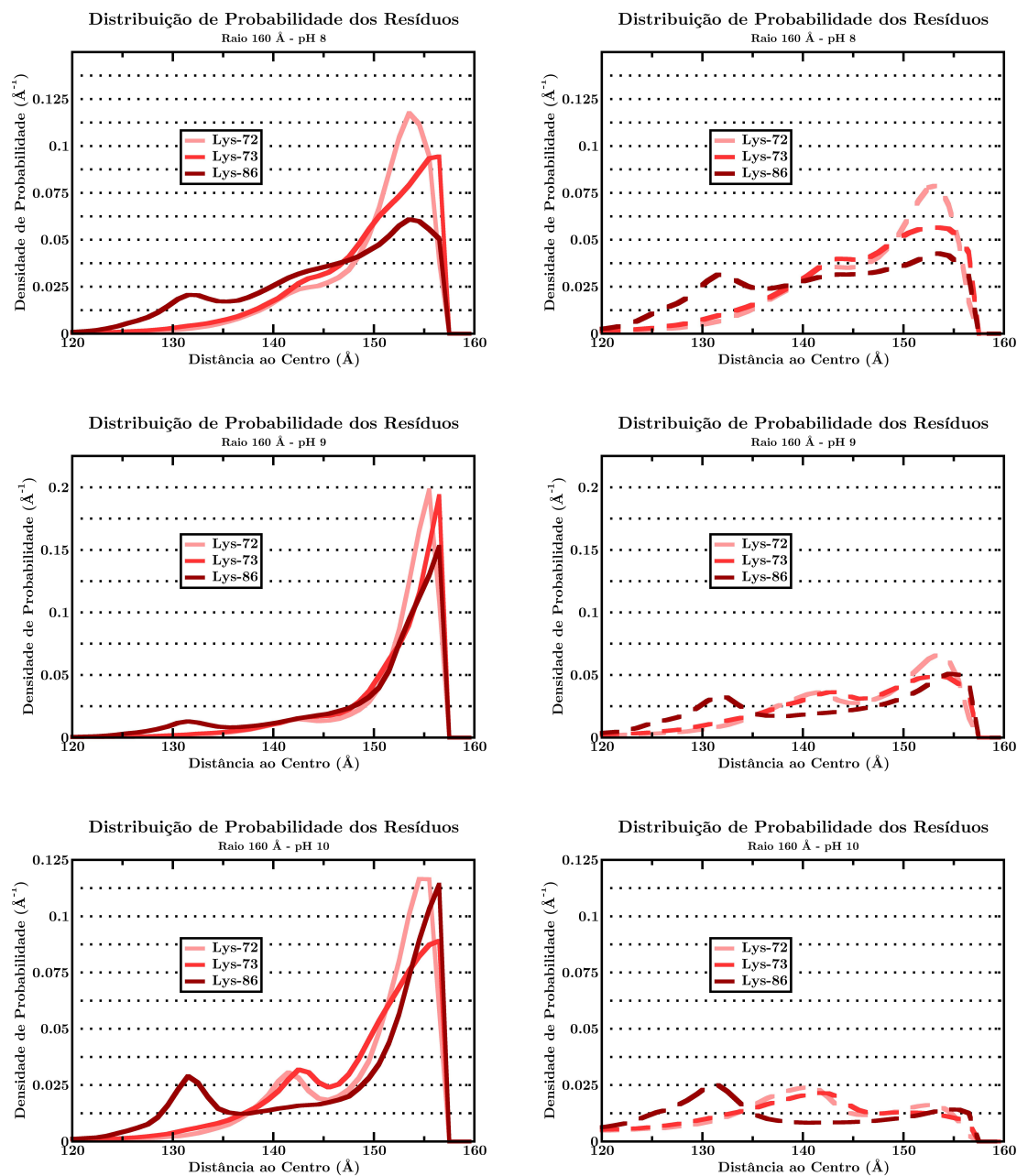


Figura 4.4: Distribuição da densidade de probabilidade dos resíduos mais próximos da superfície, em raio de confinamento de 160 Å, salinidade de 1 mM e valores de pH 8, 9 e 10. As linhas sólidas representam as simulações com regulação de carga, enquanto as linhas tracejadas indicam as simulações mantendo a proteína com suas cargas fixas.

orientação mais estável durante a adsorção, isto é, a regulação de carga promove maior direcionalidade na adsorção do citocromo *c*.

Note, comparando a escala dos três gráficos à esquerda, que os picos assumem valores maiores em pH 9 do que nos pHs 8 e 10. Isso mostra que a orientação, em que

as 3 lisinas analisadas ficam em contato com a superfície durante a adsorção, é mais estável em pH 9 do que nos outros pHs.

Em pH 10 a proteína se mantém adsorvida no caso com regulação, considerando que as curvas de distribuição apresentam picos próximos da superfície e vão a zero a 120 Å do centro do poro. No entanto, no caso com as cargas fixas, as curvas de distribuição se estendem até o centro do poro e não apresentam picos próximos da superfície, ou seja, dessorve sem a regulação. Olhando para a figura 4.3-A, a energia, em pH 10 e raio 160 Å, pro caso de cargas fixas é próxima de zero, enquanto a energia do caso com regulação de carga é da ordem de $-15 k_B T$. Logo, faz sentido que não ocorra adsorção no caso sem regulação de carga.

Também pode ser observado que as lisinas possuem dois picos de probabilidade, um maior, próximo à superfície, outro mais distante. Para a Lys-86, o pico maior ocorre aproximadamente a 2 Å da superfície, e o menor a 28 Å. Isso indica, considerando que o raio de giro do citocromo c $R_g \approx 13$ Å, que a proteína possui, nesse pH, uma orientação mais provável, na qual a Lys-86 fica próxima à superfície, e outra, menos provável, em que a Lys-86 fica do outro lado da proteína. Essa orientação menos provável evidencia que deve haver outros resíduos orientados próximos à superfície que promovem uma orientação adsorvida quando a Lys-86 está distante.

Investigando distribuições de resíduos que possuem dois picos, um maior mais distante da superfície e outro menor próximo da superfície, identificamos dois resíduos: a Arg-38 e a Lys-39. Plotamos as distribuições, em pH 10, na figura 4.5. Note que a Lys-39 e a Arg-38 assumem um pico a 3 Å da superfície, o que sugere que esses dois resíduos podem ser importantes para promover uma segunda orientação na adsorção da proteína, o que verificaremos na próxima seção. Quando as cargas se mantêm fixas, o citocromo c perde direcionalidade na adsorção e dessorve, conforme gráfico à direita da figura 4.5. Essas duas orientações também ocorrem para os pHs 8 e 9, como pode ser deduzido pelo pequeno pico da curva de distribuição da Lys-86 na figura 4.4, mas a orientação menos provável é mais discreta e menos estável que em pH 10.

Veremos, na próxima seção, a densidade superficial de cargas da proteína, a fim de entender melhor como a regulação de carga afeta os *patches* de carga, formados pelos resíduos ionizáveis analisados acima, de forma a favorecer a direcionalidade da proteína durante a adsorção.

Fonte: Elaborado pelo autor.

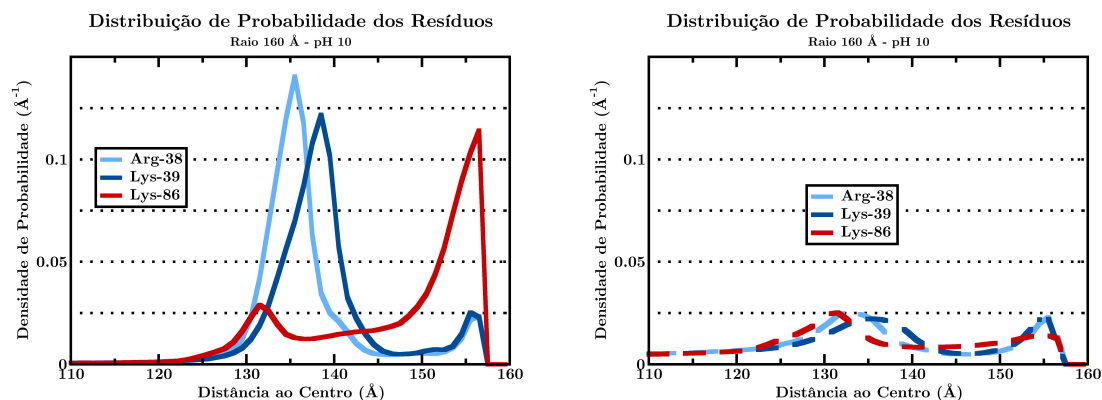


Figura 4.5: Distribuição da densidade de probabilidade de resíduos que promovem duas orientações de adsorção, em raio de confinamento de 160 Å, salinidade de 1 mM e pH 10. As linhas sólidas representam as simulações com regulação de carga, enquanto as linhas tracejadas indicam as simulações mantendo a proteína com suas cargas fixas.

4.4 Projeção da Densidade Superficial de Carga

Inicialmente, definimos as posições de alguns resíduos de interesse no mapa Mollweide do citocromo *c*, conforme figura 4.6. Note que as lisinas 72, 73 e 86, que vimos serem 3 dos resíduos mais próximos da superfície na orientação mais provável de adsorção, representadas por um símbolo de cruz na figura, formam dois *patches* de carga: a Lys-72 e Lys-73, em branco, formam um, um pouco abaixo do centro da projeção, e a Lys-86, em vermelho claro, forma outro, mais à direita inferior. Os dois resíduos Arg-38 e Lys-39, que discutimos na figura 4.5, representados por círculos em azul claro, também formam uma região carregada positivamente, à centro-esquerda da figura. A escala de cor do gráfico foi definida com valor máximo, em vermelho escuro, para o maior valor da densidade de carga de todos os casos analisados, e o valor mínimo, em azul escuro, para o menor de densidade. O átomo de ferro, que possui carga $+2e$, forma mais uma região carregada positivamente.

Em seguida, a fim de comparar com os resultados da figura 4.4, plotamos as densidades de carga para os pHs 8, 9 e 10, com e sem regulação de carga, na tabela 4.1. Pode-se ver, comparando as figuras à esquerda, que representam os casos com regulação de carga, com as à direita, nas quais a proteína manteve suas cargas fixas, que a regulação promove um aumento da protonação das regiões positivas, bem como uma maior desprotonação nas regiões negativas. No entanto, como entendido pela figura 4.1, nesses valores de pH, a carga líquida da proteína confinada é sempre mais positiva que a proteína livre. Isso quer dizer que, embora as regiões com densidade de carga

Fonte: Elaborado pelo autor.

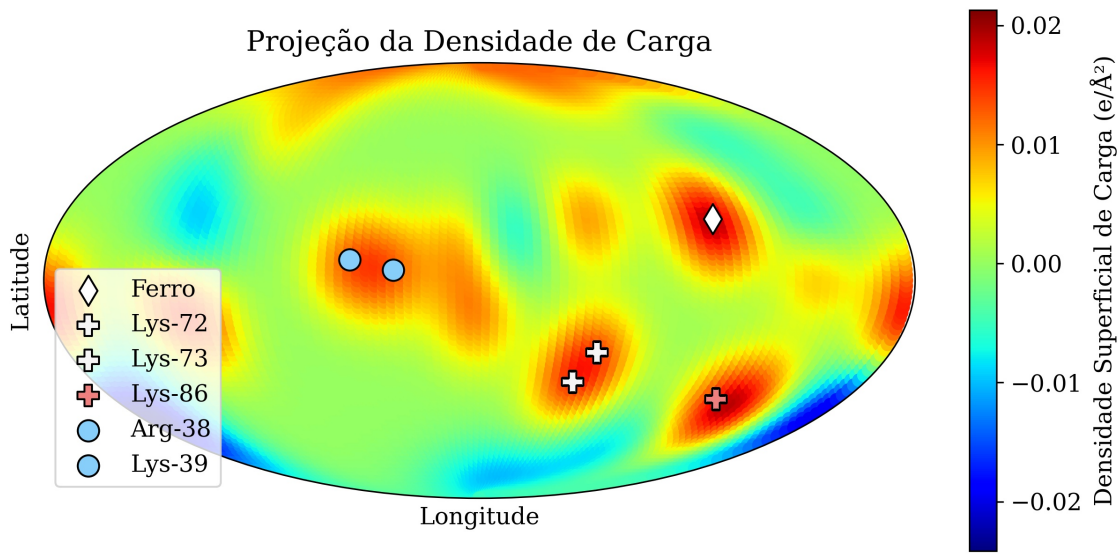
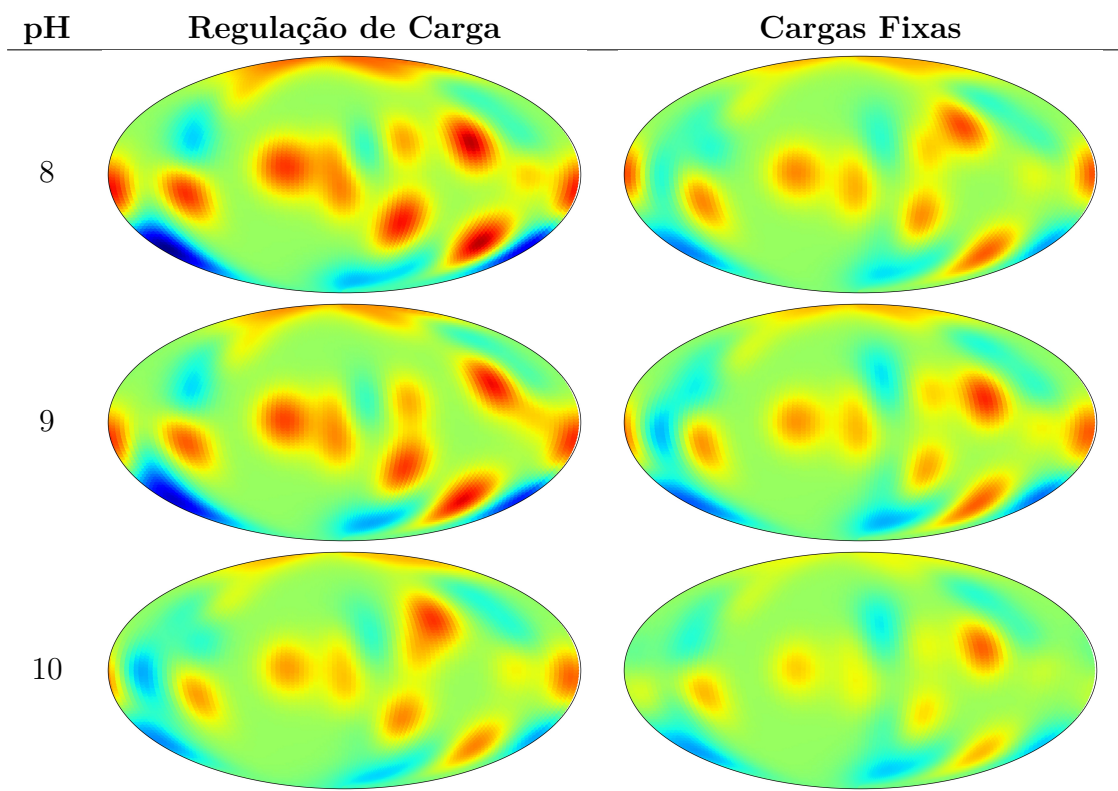


Figura 4.6: Projeção Mollweide da densidade superficial de carga do citocromo *c*, em raio de confinamento de 160 Å, salinidade 1 mM e pH 8, com regulação de carga. Os círculos em azul claro representam a Arg-38 e a Lys-39, as cruzes brancas as lisinas 72 e 73, a cruz em vermelho claro a Lys-86 e o losango branco o átomo de ferro.

Tabela 4.1: Densidade superficial de cargas do citocromo *c* em raio de 160 Å.



Fonte: Elaborado pelo autor.

negativa se tornem ainda mais negativas com a regulação de carga, a protonação dos *patches* positivos supera essa diminuição, o que garante a carga líquida positiva. Como consequência dessa diferença no estado de protonação, as curvas analisadas na figura 4.3 revelam uma energia mais negativa para o caso com regulação de carga, nesse intervalo de pH.

Em pH 8, comparando com a figura 4.4, em que as distribuições de probabilidade das lisinas 72, 73 e 86 assumem picos um pouco maiores no caso com regulação, vemos pela tabela 4.1 que a projeção da densidade de carga com regulação mostra que os *patches* de carga formados por esses resíduos estão mais positivos do que no caso sem regulação, o que é coerente com a densidade de cargas observada em pH 8.

Já em pH 9, observamos na seção anterior que a proteína, com regulação de carga, apresenta uma orientação mais estável, com pico de probabilidade aproximadamente duas vezes maior do que em outros pHs. Vemos pela tabela 4.1, comparando os casos com regulação de carga em pH 8 e 9, que as duas regiões positivas formadas pelas 3 lisinas mais próximas da figura 4.4 se aproximam levemente uma da outra, o que pode ter tido o efeito de aumentar a estabilidade da orientação da proteína na adsorção. Por outro lado, enquanto a região negativa, próxima desse *patch* de carga positivo em contato com a superfície, não mostrou diferença no caso sem regulação quando o pH muda de 8 para 9, o mesmo não pode ser dito para o caso sem regulação. A região negativa aumenta e isso resulta em uma orientação de adsorção menos estável, como pode ser visto comparando os pHs 8 e 9 no caso sem regulação da figura 4.4.

Em pH 10, é esperado que a adsorção seja bem menos direcional, nos dois casos, do que em pH 9. Isso faz sentido quando olhamos para a densidade de cargas, na qual os *patches* positivos se tornam mais fracamente carregados. No caso sem regulação, as regiões positivas praticamente desaparecem, o que reflete na dessorção observada, em pH 10, na figura 4.4. Outro fenômeno que pode ser estudado, nesse pH, é a questão da segunda orientação, menos provável, observada na figura 4.5. Como as regiões formadas pelas 3 lisinas perdem carga e tamanho, elas não mais garantem um grau de direcionalidade de adsorção tão grande quanto em pH 9. Note, pela figura 4.6, que os resíduos que formam a região positiva que promove a adsorção na segunda orientação, a Arg-38 e a Lys-39, apresentam uma densidade de carga similar à das regiões que estabilizam a primeira orientação, o que explica por que elas foram capazes de fazer com que a proteína assumisse uma nova orientação.

Comparando as densidades dos 3 pHs avaliados, nos casos com regulação de carga, vemos que as duas regiões positivas formadas pelas 3 lisinas estão mais unidas e mais carregadas em pH 9 do que nos outros pHs, o que pode explicar a maior

estabilidade de orientação observada na figura 4.4.

5 Conclusões

Nosso objetivo era estudar como o raio do poro, o pH, a concentração de sal e, em especial, o mecanismo da regulação de carga, afetariam o comportamento de adsorção do citocromo *c*. Como vimos no Capítulo 4, o confinamento intensifica os efeitos da regulação de carga, no sentido de favorecer uma maior protonação dos resíduos ionizáveis da proteína do que no caso livre, em $\text{pH} < \text{pI}$, cujo valor encontrado de 10,5 é coerente com a literatura. Essa carga líquida mais positiva, no caso em que há o efeito de regulação de carga causada pela superfície, promove, por consequência, uma interação eletrostática mais atrativa do que no caso em que a proteína mantém suas cargas fixas. Aumentando o raio de confinamento, a força de interação atrativa proteína-poro também aumenta. Com isso, em raios de confinamento maiores, a regulação de carga tem maior efeito. Isso é visto quando comparamos as curvas de energia eletrostática de interação proteína-poro nos casos com e sem regulação, e vimos que o primeiro apresenta energias menores. Isso mostra que a regulação de carga pode promover uma maior força de atração proteína-poro, e portanto uma maior estabilidade de adsorção da proteína. O valor dessa energia é mínimo entre os pHs 8 e 9, em pH abaixo do pI, o que sugere um favorecimento da adsorção nesse intervalo, conforme é observado experimentalmente por Moerz e Huber [27]. No entanto, não consideramos o efeito das interações proteína-proteína que existe em experimentos. Para valores de pH acima do pI, o confinamento favorece a desprotonação dos resíduos.

O efeito do sal, como esperado, é o de blindar as interações eletrostáticas. As energias são menos negativas em salinidade de 10 mM do que de 1 mM, embora as diferenças observadas, tanto na energia eletrostática proteína-poro, quanto na variação da carga da proteína pelo pH, foram pequenas entre essas duas concentrações de sal.

Também vimos que a regulação de carga promove maior direcionalidade na adsorção do citocromo *c*, como também foi observado para a lisozima nesse mesmo sistema [35]. A proteína assume duas orientações durante a adsorção, sendo a mais estável a que mantém os *patches* de carga formados pela Lys-72, Lys-73 e Lys-86 em contato com a superfície. Essa orientação é mais estável em pH 9. Em pH 10, no caso que levou em conta o efeito da regulação de carga, essa região desprotona e a proteína passa a ter uma segunda possível orientação, na qual o *patch* de carga positivo formado

pela Arg-37 e Lys-38 fica mais próximo da superfície. Nesse mesmo pH, sem a regulação de carga, a proteína perde esses *patches* de carga e não adsorve.

Considerando tudo que foi realizado neste trabalho, concluímos que a regulação de carga atua promovendo maior direcionalidade na adsorção do citocromo *c* em superfície porosa carregada, além de possibilitar sua adsorção em pH próximo do pI, o que não ocorre quando a proteína mantém suas cargas fixas durante as simulações.

Como perspectivas, podemos projetar metodologias, baseadas na continuidade deste trabalho, que possam complementar e melhorar os resultados obtidos, como, por exemplo, uma ferramenta metodológica que supere as limitações de amostragem estatística e possibilite analisar a energia livre da interação proteína-poro, que levaria em conta as contribuições entrópicas, e não apenas a energia eletrostática abordada neste trabalho.

Também podemos expandir as análises realizadas, como estudar diferentes proteínas que sejam de interesse atual na literatura para aplicações farmacológicas ou biotecnológicas. Outro estudo importante seria a realização de simulações envolvendo várias proteínas, a fim de avaliar o efeito repulsivo entre elas na adsorção. Esse estudo exigiria um grande custo computacional e, pensando nisso, poderíamos buscar a otimização do nosso código de Monte Carlo, paralelizando o programa para rodar em CPUs e/ou GPUs, ou mesmo avaliando outras linguagens de programação que possuam bibliotecas otimizadas para cálculos.

Outra possibilidade seria aprimorar o nosso modelo teórico, implementando o mecanismo de regulação de carga também na superfície carregada, ou utilizando um modelo para o potencial eletrostático da superfície que corrija a aproximação de Debye-Hückel por meio da camada de contraíons, o que tornará os resultados, para energias muito maiores do que a unidade de $k_B T$, mais precisos.

5 Referências

- 1 RABE, M.; VERDES, D.; SEEGER, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. **Advances in colloid and interface science**, Elsevier, v. 162, n. 1-2, p. 87–106, 2011.
- 2 NAKANISHI, K.; SAKIYAMA, T.; IMAMURA, K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. **Journal of bioscience and bioengineering**, Elsevier, v. 91, n. 3, p. 233–244, 2001.
- 3 NORDE, W.; HORBETT, T. A.; BRASH, J. L. Proteins at interfaces iii: introductory overview. **Proteins at Interfaces III State of the Art**, ACS Publications, p. 1–34, 2012.
- 4 LYNCH, M. M. et al. Chaperonin-inspired ph protection by mesoporous silica sba-15 on myoglobin and lysozyme. **Langmuir**, v. 32, n. 37, p. 9604–9610, 2016.
- 5 ZHOU, Z.; HARTMANN, M. Progress in enzyme immobilization in ordered mesoporous materials and related applications. **Chemical Society Reviews**, Royal Society of Chemistry, v. 42, n. 9, p. 3894–3912, 2013.
- 6 FRIED, D. I.; BRIELER, F. J.; FRÖBA, M. Designing inorganic porous materials for enzyme adsorption and applications in biocatalysis. **ChemCatChem**, v. 5, n. 4, p. 862–884.
- 7 KUPKE, T.; KLARE, J. P.; BRÜGGER, B. Heme binding of transmembrane signaling proteins undergoing regulated intramembrane proteolysis. **Communications Biology**, Nature Publishing Group UK London, v. 3, n. 1, p. 73, 2020.
- 8 HINDERLITER, A.; BILTONEN, R. L.; ALMEIDA, P. F. Lipid modulation of protein-induced membrane domains as a mechanism for controlling signal transduction. **Biochemistry**, ACS Publications, v. 43, n. 22, p. 7102–7110, 2004.
- 9 ADIGA, S. P. et al. Nanoporous membranes for medical and biological applications. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, Wiley Online Library, v. 1, n. 5, p. 568–581, 2009.
- 10 LU, J. et al. Mesoporous silica nanoparticles as a delivery system for hydrophobic anticancer drugs. **small**, WILEY-VCH Verlag Weinheim, v. 3, n. 8, p. 1341–1346, 2007.
- 11 ARGYO, C. et al. Multifunctional mesoporous silica nanoparticles as a universal platform for drug delivery. **Chemistry of materials**, ACS Publications, v. 26, n. 1, p. 435–451, 2014.
- 12 FAN, J. et al. Monitoring the progression of metastatic breast cancer on nanoporous silica chips. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, The Royal Society Publishing, v. 370, n. 1967, p. 2433–2447, 2012.

- 13 KILIAN, K. A.; BÖCKING, T.; GOODING, J. J. The importance of surface chemistry in mesoporous materials: lessons from porous silicon biosensors. **Chemical Communications**, Royal Society of Chemistry, n. 6, p. 630–640, 2009.
- 14 VINU, a. A.; MURUGESAN, V.; HARTMANN, M. Adsorption of lysozyme over mesoporous molecular sieves mcm-41 and sba-15: influence of ph and aluminum incorporation. **The Journal of Physical Chemistry B**, ACS Publications, v. 108, n. 22, p. 7323–7330, 2004.
- 15 KLIBANOV, A. M. Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. **Science**, American Association for the Advancement of Science, v. 219, n. 4585, p. 722–727, 1983.
- 16 MOERZ, S. T.; HUBER, P. Protein adsorption into mesopores: A combination of electrostatic interaction, counterion release, and van der waals forces. **Langmuir**, v. 30, n. 10, p. 2729–2737, 2014.
- 17 LIN, V. S.-Y. et al. A porous silicon-based optical interferometric biosensor. **Science**, American Association for the Advancement of Science, v. 278, n. 5339, p. 840–843, 1997.
- 18 HAN, Y.-J.; STUCKY, G. D.; BUTLER, A. Mesoporous silicate sequestration and release of proteins. **Journal of the American Chemical Society**, the American Chemical Society, v. 121, n. 42, p. 9897–9898, 1999.
- 19 ZHANG, X. et al. Immobilization and electrochemistry of cytochrome c on amino-functionalized mesoporous silica thin films. **Electrochemistry communications**, Elsevier, v. 9, n. 8, p. 2098–2104, 2007.
- 20 MIYAHARA, M. et al. Adsorption study of heme proteins on sba-15 mesoporous silica with pore-filling models. **Thin Solid Films**, Elsevier, v. 499, n. 1-2, p. 13–18, 2006.
- 21 HARTMANN, M. Ordered mesoporous materials for bioadsorption and biocatalysis. **Chemistry of materials**, ACS Publications, v. 17, n. 18, p. 4577–4593, 2005.
- 22 BOUBETA, F. M.; SOLER-ILLIA, G. J. d. A. A.; TAGLIAZUCCHI, M. Electrostatically driven protein adsorption: charge patches versus charge regulation. **Langmuir**, ACS Publications, v. 34, n. 51, p. 15727–15738, 2018.
- 23 LUNKAD, R.; SILVA, F. L. Barroso da; KOSOVAN, P. Both charge-regulation and charge-patch distribution can drive adsorption on the wrong side of the isoelectric point. **Journal of the American Chemical Society**, ACS Publications, v. 144, n. 4, p. 1813–1825, 2022.
- 24 CAETANO, D. L. et al. Critical adsorption of periodic and random polyampholytes onto charged surfaces. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Royal Society of Chemistry, v. 19, n. 34, p. 23397–23413, 2017.
- 25 PASCHE, S. et al. Effects of ionic strength and surface charge on protein adsorption at pegylated surfaces. **The Journal of Physical Chemistry B**, ACS Publications, v. 109, n. 37, p. 17545–17552, 2005.

- 26 MALMSTEN, M. Formation of adsorbed protein layers. **Journal of colloid and interface science**, Elsevier, v. 207, n. 2, p. 186–199, 1998.
- 27 MOERZ, S. T.; HUBER, P. ph-dependent selective protein adsorption into mesoporous silica. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 48, p. 27072–27079, 2015.
- 28 FLATMARK, T. On the heterogeneity of beef heart cytochrome c. ii. some physico-chemical properties of the main subfractions (cy i-cy 3). **Acta Chemica Scandinavica**, v. 20, n. 6, p. 1476–1486, 1966.
- 29 MIRKIN, N. et al. High resolution x-ray crystallographic structure of bovine heart cytochrome c and its application to the design of an electron transfer biosensor. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, Wiley Online Library, v. 70, n. 1, p. 83–92, 2008.
- 30 NEILANDS, J. The isolation and properties of cytochrome c from different sources. **The Journal of biological chemistry**, v. 197, p. 701–8, 06 1952.
- 31 LUND, M.; JÖNSSON, B. On the charge regulation of proteins. **Biochemistry**, ACS Publications, v. 44, n. 15, p. 5722–5727, 2005.
- 32 LUND, M.; JÖNSSON, B. Charge regulation in biomolecular solution. **Quarterly reviews of biophysics**, Cambridge University Press, v. 46, n. 3, p. 265–281, 2013.
- 33 HARTVIG, R. A. et al. Protein adsorption at charged surfaces: the role of electrostatic interactions and interfacial charge regulation. **Langmuir**, ACS Publications, v. 27, n. 6, p. 2634–2643, 2011.
- 34 BIESHEUVEL, P. M.; VEEN, M. van der; NORDE, W. A modified poisson-boltzmann model including charge regulation for the adsorption of ionizable polyelectrolytes to charged interfaces, applied to lysozyme adsorption on silica. **The Journal of Physical Chemistry B**, ACS Publications, v. 109, n. 9, p. 4172–4180, 2005.
- 35 CAETANO, D. L. et al. Adsorption of lysozyme into a charged confining pore. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Royal Society of Chemistry, v. 23, n. 48, p. 27195–27206, 2021.
- 36 ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da Biologia Celular-4**. [S.l.]: Artmed Editora, 2006.
- 37 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. [S.l.]: Artmed Editora, 2022.
- 38 TUSZYNSKI, J. A.; KURZYNSKI, M. **Introduction to molecular biophysics**. [S.l.]: CRC press, 2003.
- 39 CONTESSOTO, V. d. G. et al. Introdução ao problema de enovelamento de proteínas: uma abordagem utilizando modelos computacionais simplificados. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, SciELO Brasil, v. 40, 2018.

- 40 GDR, H. B.; SHARON, N.; AUSTRALIA, E. W. Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. **Pure and Applied Chemistry**, v. 56, p. 595–624, 1984.
- 41 COOPER, A. **Biophysical chemistry**. [S.l.]: Royal Society of Chemistry, 2015.
- 42 BRODY, L. **Genetics Glossary: Protein**. 2023. <<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Protein>>.
- 43 ISRAELACHVILI, J. **Intermolecular and Surface Forces**. [S.l.]: Elsevier Science, 2011. (Intermolecular and Surface Forces). ISBN 9780123919335.
- 44 ZEMANSKY, M. W.; DITTMAN, R. H. **Heat and thermodynamics**. [S.l.]: American Association of Physics Teachers, 1998.
- 45 ATKINS, P.; ATKINS, P. W.; PAULA, J. de. **Atkins' Physical Chemistry**. [S.l.]: Oxford university press, 2014.
- 46 BRADY, G. P.; SHARP, K. A. Entropy in protein folding and in protein—protein interactions. **Current opinion in structural biology**, Elsevier, v. 7, n. 2, p. 215–221, 1997.
- 47 MCQUARRIE, D. A.; SIMON, J. D. **Physical chemistry: A Molecular Approach**. [S.l.]: University science books Sausalito, CA, 1997. v. 1.
- 48 MARANGONI, A. G. **Enzyme kinetics: a modern approach**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2003.
- 49 YANG, A.-S.; HONIG, B. On the ph dependence of protein stability. **Journal of molecular biology**, Elsevier, v. 231, n. 2, p. 459–474, 1993.
- 50 THÖNY-MEYER, L. Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. **Microbiology and molecular biology reviews**, Am Soc Microbiol, v. 61, n. 3, p. 337–376, 1997.
- 51 SMITH, L. J.; KAHRAMAN, A.; THORNTON, J. M. Heme proteins—diversity in structural characteristics, function, and folding. **Proteins: structure, function, and bioinformatics**, Wiley Online Library, v. 78, n. 10, p. 2349–2368, 2010.
- 52 JR, J. W. Heme proteins. In: **Advances in protein chemistry**. [S.l.]: Elsevier, 1948. v. 4, p. 407–531.
- 53 DALTROP, O. et al. In vitro formation of ac-type cytochrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, v. 99, n. 12, p. 7872–7876, 2002.
- 54 FISHER, W. R.; TANIUCHI, H.; ANFINSEN, C. B. On the role of heme in the formation of the structure of cytochrome c. **Journal of Biological Chemistry**, ASBMB, v. 248, n. 9, p. 3188–3195, 1973.
- 55 ELOVE, G. A.; BHUYAN, A. K.; RODER, H. Kinetic mechanism of cytochrome c folding: involvement of the heme and its ligands. **Biochemistry**, ACS Publications, v. 33, n. 22, p. 6925–6935, 1994.

- 56 RODRIGUES, M. et al. Crystallization and preliminary structure determination of the membrane-bound complex cytochrome c nitrite reductase from *desulfovibrio vulgaris hildenborough*. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, International Union of Crystallography, v. 62, n. 6, p. 565–568, 2006.
- 57 MARTINOU, J.-C.; DESAGHER, S.; ANTONSSON, B. Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. **Nature cell biology**, Nature Publishing Group, v. 2, n. 3, p. E41–E43, 2000.
- 58 WEINKAM, P.; ZONG, C.; WOLYNES, P. G. A funneled energy landscape for cytochrome c directly predicts the sequential folding route inferred from hydrogen exchange experiments. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, v. 102, n. 35, p. 12401–12406, 2005.
- 59 WEINKAM, P. et al. The folding energy landscape and free energy excitations of cytochrome c. **Accounts of chemical research**, ACS Publications, v. 43, n. 5, p. 652–660, 2010.
- 60 DUMONT, M. E.; CORIN, A. F.; CAMPBELL, G. A. Noncovalent binding of heme induces a compact apocytochrome c structure. **Biochemistry**, ACS Publications, v. 33, n. 23, p. 7368–7378, 1994.
- 61 PODGORNIK, R.; ANDELMAN, D.; MARKOVICH, T. Charged membranes: Poisson-boltzmann theory, dlvo paradigm and beyond. p. 1–9, 03 2016.
- 62 KUBO, R. The fluctuation-dissipation theorem. **Reports on progress in physics**, IOP Publishing, v. 29, n. 1, p. 255, 1966.
- 63 FORNÉS, J. A. The electrical capacitance of small systems. **Journal of colloid and interface science**, Elsevier, v. 226, n. 1, p. 172–179, 2000.
- 64 MCQUARRIE, D. A. **Statistical Mechanics**. [S.l.]: Harper and Row, 1976.
- 65 HILL, T. L. **An introduction to statistical thermodynamics**. [S.l.]: Courier Corporation, 1986.
- 66 BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. **Nucleic acids research**, Oxford University Press, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.
- 67 CONTESSOTO, V. G. et al. Ntl9 folding at constant ph: the importance of electrostatic interaction and ph dependence. **Journal of Chemical Theory and Computation**, ACS Publications, v. 12, n. 7, p. 3270–3277, 2016.
- 68 CLEMENTI, C.; NYMEYER, H.; ONUCHIC, J. N. Topological and energetic factors: what determines the structural details of the transition state ensemble and “en-route” intermediates for protein folding? an investigation for small globular proteins. **Journal of molecular biology**, Elsevier, v. 298, n. 5, p. 937–953, 2000.
- 69 WHITFORD, P. C. et al. An all-atom structure-based potential for proteins: bridging minimal models with all-atom empirical forcefields. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, Wiley Online Library, v. 75, n. 2, p. 430–441, 2009.

- 70 TAKETOMI, H.; UEDA, Y.; GÖ, N. Studies on protein folding, unfolding and fluctuations by computer simulation: I. the effect of specific amino acid sequence represented by specific inter-unit interactions. **International journal of peptide and protein research**, Wiley Online Library, v. 7, n. 6, p. 445–459, 1975.
- 71 PONDER, J. W.; CASE, D. A. Force fields for protein simulations. **Advances in protein chemistry**, Elsevier, v. 66, p. 27–85, 2003.
- 72 SOBOLEV, V. et al. Automated analysis of interatomic contacts in proteins. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 15, n. 4, p. 327–332, 1999.
- 73 WOŁEK, K.; GÓMEZ-SICILIA, À.; CIEPLAK, M. Determination of contact maps in proteins: a combination of structural and chemical approaches. **The Journal of Chemical Physics**, AIP Publishing LLC, v. 143, n. 24, p. 243105, 2015.
- 74 DUARTE, J. M. et al. Optimal contact definition for reconstruction of contact maps. **BMC bioinformatics**, BioMed Central, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2010.
- 75 SOBOLEV, V.; EDELMAN, M. Modeling the quinone-b binding site of the photosystem-ii reaction center using notions of complementarity and contact-surface between atoms. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, Wiley Online Library, v. 21, n. 3, p. 214–225, 1995.
- 76 NISHIKAWA, K. et al. Tertiary structure of proteins. i. representation and computation of the conformations. **Journal of the Physical Society of Japan**, The Physical Society of Japan, v. 32, n. 5, p. 1331–1337, 1972.
- 77 MIYAZAWA, S.; JERNIGAN, R. L. Estimation of effective interresidue contact energies from protein crystal structures: quasi-chemical approximation. **Macromolecules**, ACS Publications, v. 18, n. 3, p. 534–552, 1985.
- 78 GRIFFITHS, D. **Eletrodinâmica, 3ª Edição**. [S.l.]: Editora Pearson Education, 2011.
- 79 MACHADO, K. D. **Teoria do eletromagnetismo**. [S.l.]: UEPG, 2000. ISBN 9788586941078.
- 80 BROWN, M. A.; GOEL, A.; ABBAS, Z. Effect of electrolyte concentration on the stern layer thickness at a charged interface. **Angewandte Chemie**, Wiley Online Library, v. 128, n. 11, p. 3854–3858, 2016.
- 81 ADAMS, J. C. et al. **fortran 90 Handbook**. [S.l.]: McGraw-Hill New York, 1992. v. 32.
- 82 OLIVEIRA, V. M. D. et al. ph and charged mutations modulate cold shock protein folding and stability: A constant ph monte carlo study. **Journal of Chemical Theory and Computation**, ACS Publications, v. 16, n. 1, p. 765–772, 2019.
- 83 OLIVEIRA, V. M. de et al. Effects of ph and salt concentration on stability of a protein g variant using coarse-grained models. **Biophysical Journal**, Elsevier, v. 114, n. 1, p. 65–75, 2018.

- 84 METROPOLIS, N.; ULAM, S. The monte carlo method. **Journal of the American statistical association**, Taylor & Francis, v. 44, n. 247, p. 335–341, 1949.
- 85 ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. **Computer simulation of liquids**. [S.l.]: Oxford university press, 2017.
- 86 FRENKEL, D.; SMIT, B. **Understanding molecular simulation: from algorithms to applications**. [S.l.]: Elsevier, 2001. v. 1.
- 87 MAZHRAKOV, M.; BENOVA, D.; VALKANOV, N. **The Monte Carlo method: engineering applications**. [S.l.]: ACMO Academic Press, 2018.
- 88 STICKLER, B. A.; STICKLER, B. A. **Basic concepts in computational physics**. [S.l.]: Springer, 2016.
- 89 VITALIS, A.; PAPPU, R. V. Methods for monte carlo simulations of biomacromolecules. **Annual reports in computational chemistry**, Elsevier, v. 5, p. 49–76, 2009.
- 90 BINDER, K. **Monte Carlo and molecular dynamics simulations in polymer science**. [S.l.]: Oxford University Press, 1995.
- 91 REED, C. E.; REED, W. F. Monte carlo study of titration of linear polyelectrolytes. **The Journal of chemical physics**, American Institute of Physics, v. 96, n. 2, p. 1609–1620, 1992.
- 92 BÜRGI, R.; KOLLMAN, P. A.; GUNSTEREN, W. F. V. Simulating proteins at constant ph: An approach combining molecular dynamics and monte carlo simulation. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, Wiley Online Library, v. 47, n. 4, p. 469–480, 2002.
- 93 KU, T. et al. Predicting melting temperature directly from protein sequences. **Computational biology and chemistry**, Elsevier, v. 33, n. 6, p. 445–450, 2009.
- 94 VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and molecular biology reviews**, Am Soc Microbiol, v. 65, n. 1, p. 1–43, 2001.
- 95 YANG, F. et al. Binding of ferulic acid to cytochrome c enhances stability of the protein at physiological ph and inhibits cytochrome c-induced apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, Elsevier, v. 170, n. 3, p. 231–243, 2007.
- 96 KUMAR, S. et al. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. i. the method. **Journal of computational chemistry**, Wiley Online Library, v. 13, n. 8, p. 1011–1021, 1992.
- 97 KUMAR, S. et al. Multidimensional free-energy calculations using the weighted histogram analysis method. **Journal of Computational Chemistry**, Wiley Online Library, v. 16, n. 11, p. 1339–1350, 1995.

-
- 98 BOŽIČ, A. L.; PODGORNIK, R. Anomalous multipole expansion: Charge regulation of patchy inhomogeneously charged spherical particles. **The Journal of chemical physics**, AIP Publishing, v. 149, n. 16, 2018.
- 99 BOŽIČ, A. L. From discrete to continuous description of spherical surface charge distributions. **Soft matter**, Royal Society of Chemistry, v. 14, n. 7, p. 1149–1161, 2018.
- 100 BOŽIČ, A. L.; PODGORNIK, R. pH dependence of charge multipole moments in proteins. **Biophysical journal**, Elsevier, v. 113, n. 7, p. 1454–1465, 2017.

A – Potencial Eletrostático de uma Superfície Cilíndrica Carregada

O potencial elétrico $\mathbb{V}$ em um solvente cuja permissividade elétrica é $\varepsilon = \varepsilon_s \varepsilon_0$ e densidade volumétrica de carga é ρ , é dado pela primeira lei de Maxwell em sua forma diferencial, mais conhecida como equação de Poisson:

$$\nabla^2 \mathbb{V} = -\frac{\rho}{\varepsilon}, \quad (\text{A.1})$$

sendo que ρ é uma função da distribuição espacial das cargas do sistema [78, 79].

A.1 Equação de Poisson-Boltzmann

Quando a densidade de carga é dada por uma distribuição de íons, ρ pode ser descrito por uma distribuição de Boltzmann:

$$\rho = \frac{q}{\tau} = qn_b = \sum q_i n_i \exp\left(-\frac{q_i \mathbb{V}}{k_B T}\right), \quad (\text{A.2})$$

sendo que q_i é a carga da i -ésima espécie iônica, τ é o volume, n_i é a densidade numérica de íons da i -ésima espécie iônica no *bulk* da solução (região onde $\mathbb{V} \rightarrow 0$), k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura. Como $q_i = eZ_i$, temos:

$$\rho = \sum eZ_i n_i \exp\left(-\frac{eZ_i \mathbb{V}}{k_B T}\right), \quad (\text{A.3})$$

e a equação de Poisson se torna a equação de Poisson-Boltzmann [61]:

$$\nabla^2 \mathbb{V} = -\frac{1}{\varepsilon} \sum eZ_i n_i \exp\left(-\frac{eZ_i \mathbb{V}}{k_B T}\right). \quad (\text{A.4})$$

A.2 Aproximação de Debye-Hückel

A equação de Poisson-Boltzmann é uma equação diferencial não-linear de segunda ordem. Uma forma de se obter uma solução analítica é linearizando a equação (A.5), por meio da aproximação de um potencial pequeno, em que $\mathbb{V} \ll k_B T$, conhecida como aproximação de Debye-Hückel [43, 61]. Dessa forma, podemos realizar uma expansão em série de Taylor da função exponencial em torno de zero ($\mathbb{V}/k_B T \approx 0$) até o segundo termo:

$$\nabla^2 \mathbb{V} = -\frac{1}{\varepsilon} \sum e Z_i n_i \exp\left(-\frac{e Z_i \mathbb{V}}{k_B T}\right) \quad (\text{A.5})$$

$$\Rightarrow \nabla^2 \mathbb{V} \approx -\frac{1}{\varepsilon} \sum e Z_i n_i \left(1 - \frac{e Z_i \mathbb{V}}{k_B T}\right) \quad (\text{A.6})$$

$$\Rightarrow \nabla^2 \mathbb{V} \approx -\frac{1}{\varepsilon} \left\{ \sum e Z_i n_i - \sum \frac{e^2 Z_i^2 n_i \mathbb{V}}{k_B T} \right\}. \quad (\text{A.7})$$

O primeiro termo corresponde à soma das cargas de todas as espécies iônicas no *bulk* da solução. Para uma solução de íons monovalentes 1:1, $Z_i = \pm 1$, o primeiro termo da equação A.7 é zero, o que configura a eletroneutralidade no *bulk*. Dessa forma, temos:

$$\nabla^2 \mathbb{V} \approx \frac{1}{\varepsilon} \sum \frac{e^2 Z_i^2 n_i \mathbb{V}}{k_B T} = \mathbb{V} \sum \frac{e^2 Z_i^2 n_i}{\varepsilon k_B T}, \quad (\text{A.8})$$

de modo que a equação de Poisson-Boltzmann se torna:

$$\nabla^2 \mathbb{V} = \kappa^2 \mathbb{V}, \quad (\text{A.9})$$

sendo que

$$\kappa^2 \equiv \sum \frac{e^2 Z_i^2 n_i}{\varepsilon k_B T}. \quad (\text{A.10})$$

Em coordenadas cilíndricas, a equação A.9 se torna:

$$\nabla^2 \mathbb{V} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial \mathbb{V}}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 \mathbb{V}}{\partial \theta^2} + \frac{\partial^2 \mathbb{V}}{\partial z^2} = \kappa^2 \mathbb{V}, \quad (\text{A.11})$$

ou

$$\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial \mathbb{V}}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 \mathbb{V}}{\partial \theta^2} + \frac{\partial^2 \mathbb{V}}{\partial z^2} - \kappa^2 \mathbb{V} = 0. \quad (\text{A.12})$$

A.3 Solução

Para resolver a equação A.12, vamos levar em consideração o problema que estamos tratando: um cilindro infinito com densidade superficial de carga. Nesse caso, o potencial elétrico não varia em z (se estende ao infinito nessa coordenada), de modo que $\partial^2 \mathbb{V} / \partial z^2 = 0$, o que reduz a equação A.12 a:

$$\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial \mathbb{V}}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 \mathbb{V}}{\partial \theta^2} - \kappa^2 \mathbb{V} = 0. \quad (\text{A.13})$$

Assim, podemos aplicar o método de separação de variáveis para encontrar a solução. Assumimos, então, que $\mathbb{V} = \mathbb{V}(r, \theta) = R(r)\Theta(\theta)$, e substituímos a solução proposta na equação A.13:

$$\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial [R(r)\Theta(\theta)]}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 [R(r)\Theta(\theta)]}{\partial \theta^2} - \kappa^2 R(r)\Theta(\theta) = 0 \quad (\text{A.14})$$

$$\Rightarrow \frac{\Theta(\theta)}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial R(r)}{\partial r} \right) + \frac{R(r)}{r^2} \frac{\partial^2 \Theta(\theta)}{\partial \theta^2} - \kappa^2 R(r)\Theta(\theta) = 0. \quad (\text{A.15})$$

Multiplicando ambos os lados da equação por r^2 e dividindo por $R(r)\Theta(\theta)$, temos:

$$\frac{r}{R(r)} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial R(r)}{\partial r} \right) + \frac{1}{\Theta(\theta)} \frac{\partial^2 \Theta(\theta)}{\partial \theta^2} - \kappa^2 r^2 = 0 \quad (\text{A.16})$$

$$\Rightarrow \frac{r}{R(r)} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial R(r)}{\partial r} \right) - \kappa^2 r^2 = -\frac{1}{\Theta(\theta)} \frac{\partial^2 \Theta(\theta)}{\partial \theta^2}. \quad (\text{A.17})$$

O lado esquerdo da equação A.17 só depende de r , e o direito só depende de θ . Para que essa igualdade seja válida, ambos os lados da equação devem ser constantes [78, 79]:

$$\frac{r}{R(r)} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial R(r)}{\partial r} \right) - \kappa^2 r^2 = m^2 = -\frac{1}{\Theta(\theta)} \frac{\partial^2 \Theta(\theta)}{\partial \theta^2}. \quad (\text{A.18})$$

Resolvendo primeiro a equação angular (lado direito da equação A.18), temos:

$$\frac{1}{\Theta(\theta)} \frac{d^2 \Theta(\theta)}{d\theta^2} = -m^2 \Rightarrow \frac{d^2 \Theta(\theta)}{d\theta^2} = -m^2 \Theta(\theta) \quad (\text{A.19})$$

$$\Rightarrow \frac{d^2 \Theta(\theta)}{d\theta^2} + m^2 \Theta(\theta) = 0. \quad (\text{A.20})$$

A solução da equação A.20 é dada por:

$$\Theta_m(\theta) = C_m \cos(m\theta) + D_m \sin(m\theta), \quad (\text{A.21})$$

sendo que C_m e D_m são constantes. Agora resolvendo a equação radial (lado esquerdo da equação A.18), temos:

$$\frac{r}{R(r)} \frac{d}{dr} \left(r \frac{dR(r)}{dr} \right) - \kappa^2 r^2 - m^2 = 0 \quad (\text{A.22})$$

$$\Rightarrow \frac{r}{R(r)} \left(\frac{dr}{dr} \frac{dR(r)}{dr} + r \frac{d^2 R(r)}{dr^2} \right) - \kappa^2 r^2 - m^2 = 0 \quad (\text{A.23})$$

$$\Rightarrow \frac{r}{R(r)} \frac{dR(r)}{dr} + \frac{r^2}{R(r)} \frac{d^2 R(r)}{dr^2} - \kappa^2 r^2 - m^2 = 0. \quad (\text{A.24})$$

Multiplicando ambos os lados da equação por $R(r)$ e dividindo por r^2 , temos:

$$\frac{d^2 R(r)}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{dR(r)}{dr} - \kappa^2 R(r) - m^2 \frac{R(r)}{r^2} = 0. \quad (\text{A.25})$$

$$\Rightarrow \frac{d^2 R(r)}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{dR(r)}{dr} - R(r) \left[\kappa^2 + \frac{m^2}{r^2} \right] = 0. \quad (\text{A.26})$$

A fim de simplificar a visualização das equações, vamos adotar a notação

$$\frac{dR(r)}{dr} \equiv R'(r) \quad e \quad \frac{d^2 R(r)}{dr^2} \equiv R''(r).$$

Assim, a equação A.26 fica:

$$R''(r) + \frac{R'(r)}{r} - R(r) \left[\kappa^2 + \frac{m^2}{r^2} \right] = 0. \quad (\text{A.27})$$

Podemos realizar algumas substituições para que a equação A.27 fique na forma de uma equação de Bessel [79]. Seja $x = \kappa r \Rightarrow r = x/\kappa \Rightarrow r^2 = x^2/\kappa^2$, então:

$$R'(r) = \frac{dR}{dr} = \frac{dx}{dr} \frac{dR}{dx} = \kappa \frac{dR}{dx} = \kappa R'(x), \quad (\text{A.28})$$

$$R''(r) = \frac{d^2 R}{dr^2} = \frac{d}{dr} \left(\kappa \frac{dR}{dx} \right) = \kappa \frac{d}{dx} \left(\kappa \frac{dR}{dx} \right) = \kappa^2 \frac{d^2 R}{dx^2} = \kappa^2 R''(x). \quad (\text{A.29})$$

Aplicando as substituições na equação A.27, temos:

$$\kappa^2 R''(x) + \frac{\kappa R'(x)}{x} - R(x) \left[\kappa^2 + \frac{\kappa^2 m^2}{x^2} \right] = 0 \quad (\text{A.30})$$

$$\Rightarrow R''(x) + \frac{R'(x)}{x} - R(x) \left[1 + \frac{m^2}{x^2} \right] = 0. \quad (\text{A.31})$$

A equação A.31 é a equação de Bessel modificada, cuja solução geral são as funções de Bessel modificadas [79], isto é:

$$R_m(r) = E_m \mathbb{I}_m(\kappa r) + F_m \mathbb{K}_m(\kappa r), \quad (\text{A.32})$$

sendo que E_m e F_m são constantes, e $\mathbb{I}_m(\kappa r)$ e $\mathbb{K}_m(\kappa r)$ são as funções de Bessel modificadas de primeiro e segundo tipo (ou as funções de Bessel e de Hankel modificadas), respectivamente, de ordem m .

Com isso, a solução geral do potencial é dada por:

$$\mathbb{V}_m(r, \theta) = \sum_{m=0}^{\infty} [E_m \mathbb{I}_m(\kappa r) + F_m \mathbb{K}_m(\kappa r)] [C_m \cos(m\theta) + D_m \sin(m\theta)]. \quad (\text{A.33})$$

A.4 Condições de Contorno

Inicialmente, devemos considerar que o potencial não pode depender de θ , dada a simetria cilíndrica do sistema. Dessa forma, a única solução não-trivial para o potencial é se $m = 0$. Nesse caso, a equação A.33 se torna:

$$\mathbb{V}(r) = [E_0 \mathbb{I}_0(\kappa r) + F_0 \mathbb{K}_0(\kappa r)] [C_0 \cos(0) + D_0 \sin(0)] \quad (\text{A.34})$$

$$\Rightarrow \mathbb{V}(r) = [E_0 \mathbb{I}_0(\kappa r) + F_0 \mathbb{K}_0(\kappa r)] C_0 \quad (\text{A.35})$$

$$\Rightarrow \mathbb{V}(r) = E \mathbb{I}_0(\kappa r) + F \mathbb{K}_0(\kappa r) \quad (\text{A.36})$$

Além disso, podemos olhar para o comportamento do potencial em $r = 0$. Sabemos que o potencial nesse ponto não pode divergir, então:

$$\Rightarrow \mathbb{V}(0) = E \mathbb{I}_0(0) + F \mathbb{K}_0(0) \quad (\text{A.37})$$

$\mathbb{K}(0)$ diverge, de modo que F tem de ser nulo dentro do cilindro. E ainda, o potencial deve tender a zero ao se distanciar radialmente da superfície cilíndrica, mas $\mathbb{I}(0)$ diverge quando $r \rightarrow \infty$, e $\mathbb{K}(r \rightarrow \infty) = 0$, de modo que E tem de ser nulo fora do cilindro. Assim,

$$\begin{cases} \mathbb{V}_{\text{int}}(r) = E \mathbb{I}_0(\kappa r), & r < a \\ \mathbb{V}_{\text{ext}}(r) = F \mathbb{K}_0(\kappa r), & r > a \end{cases} \quad (\text{A.38})$$

Agora, para encontrar as constantes E e F , podemos, primeiramente, aplicar a condição de contorno da continuidade do potencial elétrico, isto é, $\mathbb{V}_{\text{int}}(r = a) = \mathbb{V}_{\text{ext}}(r = a)$:

$$E \mathbb{I}_0(\kappa a) = F \mathbb{K}_0(\kappa a) \quad (\text{A.39})$$

$$\Rightarrow F = E \frac{\mathbb{I}_0(\kappa a)}{\mathbb{K}_0(\kappa a)}. \quad (\text{A.40})$$

Ademais, podemos aplicar a condição de contorno da descontinuidade do campo elétrico:

$$\varepsilon_s \frac{\partial \mathbb{V}_{ext}}{\partial r} \Big|_{r=a} - \varepsilon_s \frac{\partial \mathbb{V}_{int}}{\partial r} \Big|_{r=a} = -\frac{\sigma}{\varepsilon_0} \quad (\text{A.41})$$

$$\Rightarrow F \frac{\partial \mathbb{K}_0(\kappa r)}{\partial r} \Big|_{r=a} - E \frac{\partial \mathbb{I}_0(\kappa r)}{\partial r} \Big|_{r=a} = -\frac{\sigma}{\varepsilon_s \varepsilon_0} \quad (\text{A.42})$$

$$\Rightarrow -F \kappa \mathbb{K}_1(\kappa a) - E \kappa \mathbb{I}_1(\kappa a) = -\frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (\text{A.43})$$

$$\Rightarrow F \mathbb{K}_1(\kappa a) + E \mathbb{I}_1(\kappa a) = \frac{\sigma}{\varepsilon \kappa}. \quad (\text{A.44})$$

Substituindo a equação A.40 na equação A.44, temos:

$$\Rightarrow E \frac{\mathbb{I}_0(\kappa a)}{\mathbb{K}_0(\kappa a)} \mathbb{K}_1(\kappa a) + E \mathbb{I}_1(\kappa a) = \frac{\sigma}{\varepsilon \kappa} \quad (\text{A.45})$$

$$\Rightarrow E \left\{ \frac{\mathbb{I}_0(\kappa a)}{\mathbb{K}_0(\kappa a)} \mathbb{K}_1(\kappa a) + \mathbb{I}_1(\kappa a) \right\} = \frac{\sigma}{\varepsilon \kappa} \quad (\text{A.46})$$

$$\Rightarrow E \left\{ \frac{\mathbb{I}_0(\kappa a) \mathbb{K}_1(\kappa a) + \mathbb{I}_1(\kappa a) \mathbb{K}_0(\kappa a)}{\mathbb{K}_0(\kappa a)} \right\} = \frac{\sigma}{\varepsilon \kappa} \quad (\text{A.47})$$

$$\Rightarrow E = \frac{\sigma \mathbb{K}_0(\kappa a)}{\varepsilon \kappa [\mathbb{I}_0(\kappa a) \mathbb{K}_1(\kappa a) + \mathbb{I}_1(\kappa a) \mathbb{K}_0(\kappa a)]}. \quad (\text{A.48})$$

Encontramos a constante E . Substituindo a equação A.48 na A.40, encontramos F :

$$F = \frac{\sigma \mathbb{K}_0(\kappa a)}{\varepsilon \kappa [\mathbb{I}_0(\kappa a) \mathbb{K}_1(\kappa a) + \mathbb{I}_1(\kappa a) \mathbb{K}_0(\kappa a)]} \frac{\mathbb{I}_0(\kappa a)}{\mathbb{K}_0(\kappa a)} \quad (\text{A.49})$$

$$\Rightarrow F = \frac{\sigma \mathbb{I}_0(\kappa a)}{\varepsilon \kappa [\mathbb{I}_0(\kappa a) \mathbb{K}_1(\kappa a) + \mathbb{I}_1(\kappa a) \mathbb{K}_0(\kappa a)]}. \quad (\text{A.50})$$

Assim, o potencial eletrostático do poro cilíndrico é dado por:

$$\left\{ \begin{array}{l} \mathbb{V}(r) = \frac{\sigma \mathbb{K}_0(\kappa a)}{\varepsilon \kappa [\mathbb{I}_0(\kappa a) \mathbb{K}_1(\kappa a) + \mathbb{I}_1(\kappa a) \mathbb{K}_0(\kappa a)]} \mathbb{I}_0(\kappa r), \quad r < a \\ \mathbb{V}(r) = \frac{\sigma \mathbb{I}_0(\kappa a)}{\varepsilon \kappa [\mathbb{I}_0(\kappa a) \mathbb{K}_1(\kappa a) + \mathbb{I}_1(\kappa a) \mathbb{K}_0(\kappa a)]} \mathbb{K}_0(\kappa r), \quad r > a \end{array} \right\}. \quad (\text{A.51})$$