

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 31/08/2024.



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 ($CH_2=CH$) circulados 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]

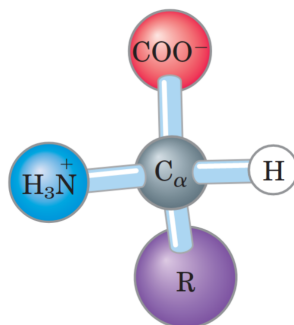


Figura 1.1: Estrutura geral de um aminoácido. No esquema, um grupo amina (azul) e um grupo carboxílico (vermelho) ligam-se ao carbono central (carbono- α ou C_α), que além do átomo de hidrogênio, também está ligado a uma cadeia lateral (roxo) responsável por distinguir os diferentes aminoácidos.

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

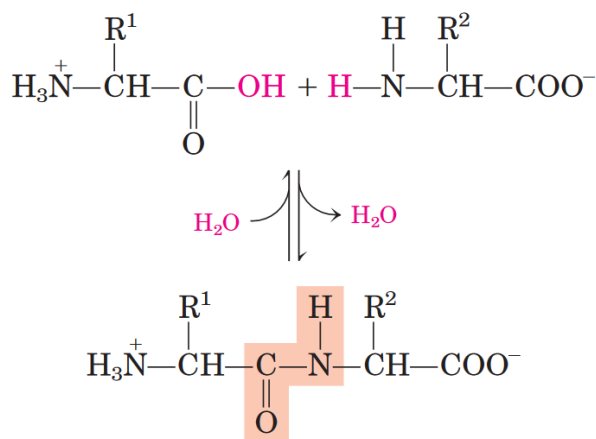


Figura 1.2: Formação da ligação peptídica. No esquema, dois aminoácidos com cadeias laterais R^1 e R^2 formam um dipeptídeo, no qual o hidrogênio do grupo amina (R^2) e a hidroxila do grupo carboxílico (R^1) formam uma molécula de água por condensação, estabelecendo uma ligação peptídica (sombreada)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

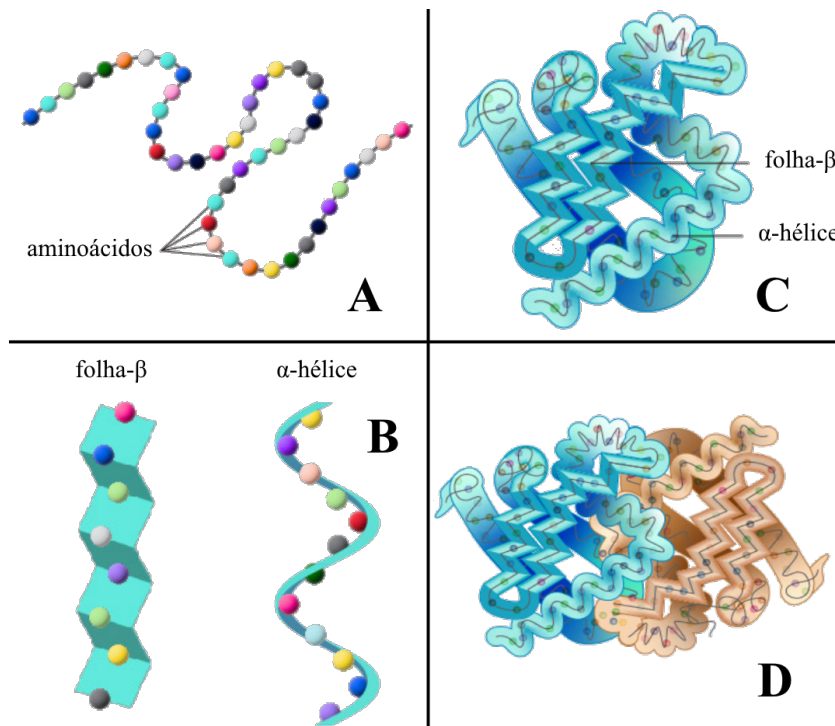


Figura 1.3: Os 4 níveis estruturais da proteína. A estrutura primária (A) é a sequência linear dos resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica. A estrutura secundária são conformações espaciais locais na proteína (como folhas- β e α -hélices) (B), compostas por um segmento de resíduos interconectados. 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]

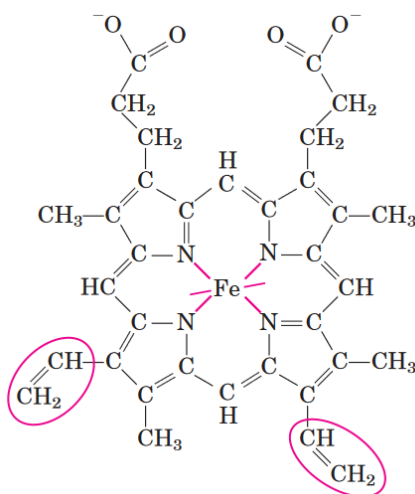


Figura 1.4: Estrutura geral do grupo heme. Este grupo prostético está presente na mioglobina, na hemoglobina, nos citocromos e outras hemoproteínas. Sua estrutura é formada por um anel orgânico de protoporfirina ligado a um átomo de ferro (Fe-Protoporfirina-IX), que realiza 6 ligações coordenadas: 4 covalentes no plano da molécula e 2 axiais perpendiculares ao plano. Os grupos vinil (CH₂=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 (Fe²⁺) (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]

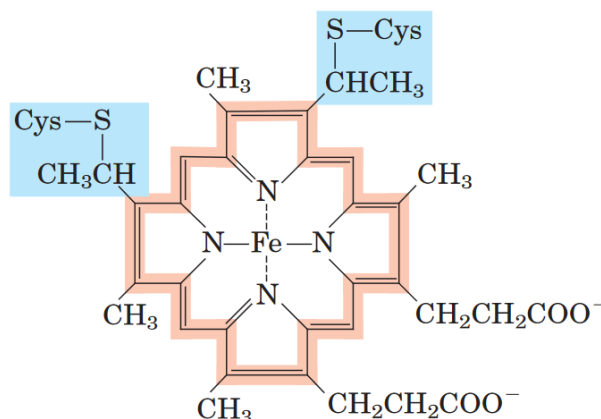


Figura 1.5: Grupo prostético heme do citocromo *c*. Liga-se covalentemente ao citocromo *c* por meio de duas ligações tioéster (azul) com duas cisteínas (Cys) da proteína. Já o ferro, no estado nativo da proteína, realiza 2 ligações não-covalentes perpendiculares ao plano da protoporfirina com o citocromo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

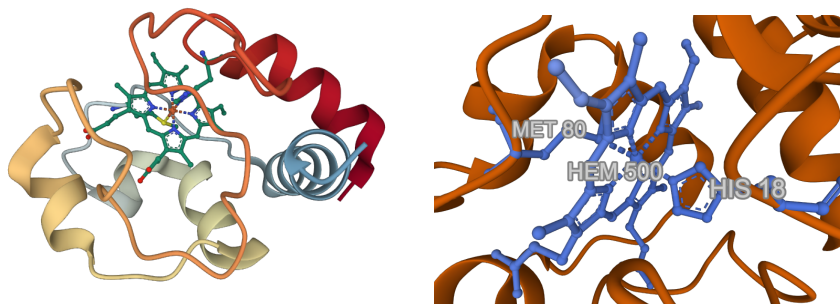


Figura 1.6: Representação visual da estrutura do citocromo *c*. À esquerda, a estrutura completa da proteína, onde o grupo heme está representado em verde. À direita, o grupo heme (azul) em detalhes, realizando ligações não-covalentes com a Met-80 e a His-18 da proteína (laranja).

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].

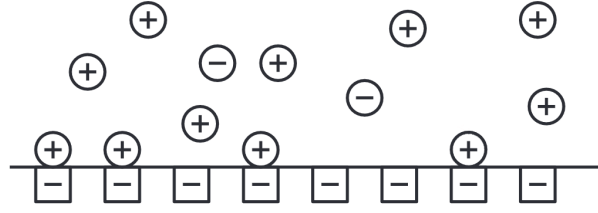


Figura 1.7: Ilustração da presença de contraíons positivos atraídos por uma superfície carregada negativamente. Além de causar um efeito de blindagem eletrostática no potencial da superfície, os contraíons também promovem uma perturbação do pH local, originando um efeito de regulação de carga em corpos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

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.; GŌ, 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.