



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

Ingrid Bernardes Santana Martins

**Estudo da interação dos peptídeos
antimicrobianos MP1 e H-MP1 com modelo de
membranas bacterianas por Dinâmica Molecular**

São José do Rio Preto

2021

Ingrid Bernardes Santana Martins

**Estudo da interação dos peptídeos antimicrobianos MP1 e
H-MP1 com modelo de membranas bacterianas por
Dinâmica Molecular**

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

Financiadora: Capes

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Suman de Araújo

Coorientador: Prof. Dr. Sidney Jurado de Carvalho

São José do Rio Preto

2021

M386e

Martins, Ingrid Bernardes Santana

Estudo da interação dos peptídeos antimicrobianos MP1 e H-MP1 com modelo de membranas bacterianas por Dinâmica Molecular / Ingrid Bernardes Santana Martins. -- São José do Rio Preto, 2021

81 f.

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

Orientador: Alexandre Suman de Araujo

Coorientador: Sidney Jurado de Carvalho

1. Biofísica Molecular. 2. Dinâmica Molecular. 3. Peptídeos antimicrobianos. 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.

Ingrid Bernardes Santana Martins

Estudo da interação dos peptídeos antimicrobianos MP1 e H-MP1 com modelo de membranas bacterianas por Dinâmica Molecular

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

Financiadora: Capes

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Alexandre Suman de Araujo

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Orientador

Prof. Dr. Jorge Chahine

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Ernesto Raúl Caffarena

Fundação Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro

Profa. Dra. Natália Bueno Leite Slade

Universidade Federal do Triângulo Mineiro - Uberaba

Prof. Dr. Alessandro Silva Nascimento

Universidade de São Paulo - São Carlos

São José do Rio Preto

28 de Junho de 2021

Dedico esse trabalho aos meus pais, Ana Luiza e Alessandro, que me ensinaram que eu posso ser o que eu quiser.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, porque Dele e para Ele são todas as coisas.

À toda a minha família, em especial a minha mãe Ana Luiza, o meu pai Alessandro, a minha irmã Emily, meus avós, tios, primos, ao meu noivo Gabriel, pelo companheirismo e apoio em todos os momentos, principalmente os mais difíceis, e os meus amigos que também são minha família.

Ao meu orientador, o professor Alexandre que me ensina e orienta desde a graduação com toda a paciência e respeito. Aos colaboradores desse trabalho, o professor João Ruggiero Neto, Taisa, Dayane e o professor Sidney. Aos amigos do departamento de Física: Alex, Antônio, Carolina, Daniel, Davi, Fernando, Gabriela, Guilherme, Hugo, Isabela, Janine, João, Karoline, Kenneth, Monique, Murilo, Paulo, Raphael, Renan, Thalita e Vinícius que não só tornaram a jornada muito mais prazerosa como também são presentes todos os dias nas discussões científicas importantes no meu amadurecimento científico durante o doutorado (e não científicas também).

Ao professor Benoît Roux que me recebeu no seu grupo durante o período sanduíche, que me possibilitou um período muito enriquecedor e de muito aprendizado, bem como aos colegas de grupo que foram muito receptivos. E aos amigos brasileiros Arthur, Camila, Flávio, Marcelo e Sílvia, que estavam presentes nesse período dividindo os perrengues e sendo apoio uns dos outros em todos os momentos.

Agradeço ao Laboratório Nacional de Computação Científica por fornecer o poder computacional do supercomputador Santos Dumont. À Unesp e a The University of Chicago pela infraestrutura. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“- Gostaria que isso não tivesse acontecido na minha época - disse Frodo.

- Eu também - disse Gandalf. - Como todos que vivem nesses tempos. Mas a decisão não é nossa. Tudo o que temos de decidir é o que fazer com tempo que nos é dado.”
J. R. R. Tolkien em A Sociedade do Anel [1].

Resumo

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são parte do sistema imune de muitas espécies e, devido ao seu modo de ação, dificultam o desenvolvimento de cepas de bactérias resistentes promovidas por antibióticos convencionais, sendo assim compostos que têm potencial de aplicação antibiótica. Os PAMs são, geralmente, ricos em resíduos de aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos e agem diretamente na fase lipídica da membrana celular. O peptídeo Polybia-MP1 é um peptídeo extraído da vespa *Polybia paulista* e possui amplo espectro bactericida em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e não é hemolítico nem citotóxico. O H-MP1 é um análogo sintético em que as lisinas do MP1 são substituídas por histidinas, para que a carga líquida possa responder às mudanças no pH da solução. Nesse trabalho usamos técnicas biofísicas computacionais para investigar o efeito do pH da solução nas propriedades estruturais desses peptídeos e na sua interação com a bicamada lipídica que mimetiza a membrana celular de bactérias Gram-negativas. Os resultados indicam que a adsorção do H-MP1, sensível ao pH, aumenta com um ambiente ácido se assemelhando ao MP1, que não é influenciado pela pequena variação de pH da solução. As simulações de Dinâmica Molecular mostraram que o processo de adsorção de ambos os peptídeos se inicia pela interação do N-terminal com a bicamada, seguido por uma completa adsorção do peptídeo paralelo ao plano da bicamada, induzindo aumento no conteúdo helicoidal o que intensificou o contato do peptídeo com a fase hidrofóbica da bicamada. As simulações ainda mostraram uma desestabilização do empacotamento lipídico da bicamada caracterizada pela diminuição do parâmetro de ordem calculado para as cadeias acílicas. Simulações de Dinâmica Molecular a pH Constante, que foram realizadas a partir das estruturas dos peptídeos adsorvidos obtidas por Dinâmica Molecular convencional, foram capazes de elucidar detalhes da eletrostática envolvida no processo de adsorção. Elas mostraram que a adsorção desses peptídeos na bicamada lipídica aumenta em aproximadamente duas unidades os valores de pK_a calculados para os resíduos ionizáveis. Com isso, esses peptídeos apresentam carga mais positiva quando estão na presença da bicamada do que quando estão apenas em solução aquosa. Dessa forma, a magnitude da atração eletrostática dos mesmos pela bicamada aniônica é aumentada, evidenciando a seletividade que tais peptídeos possuem pela bicamada mimética de bactérias.

Palavras-chave: *Peptídeos antimicrobianos. Peptídeos sensíveis ao pH. Simulações por Dinâmica Molecular. Análises conformacionais. Dinâmica Molecular a pH Constante.*

Abstract

Antimicrobial peptides (AMPs) are part of the innate immune system of many species and are compounds with potential application against the development of resistant bacterial strains promoted by conventional antibiotics. The AMPs are rich in cationic and hydrophobic residues and act directly on the lipidic phase of the cell membranes. The MP1 has a broad-spectrum bactericide activity in both Gram-negative and positive bacteria, not being hemolytic or cytotoxic. H-MP1 is a synthetic analog of MP1 with lysines replaced by histidines so that its net charge could be responsive to changes in solution pH. In the present work, we applied computational biophysics techniques in order to investigate the effect of the solution pH on the structural properties, in the adsorption and insertion of these peptides in lipid bilayers mimicking the cell membrane of Gram-negative bacteria. The results indicate that the adsorption of H-MP1 is sensitive to pH, increasing to an acidic environment, matching that of MP1, which is not influenced by solution pH. Molecular Dynamic simulations indicated that the adsorption process of both peptides started by the interaction of the N-terminus with the bilayer, followed by the complete adsorption of the peptide laying parallel to the bilayer plane, inducing an increase in the peptide's helical content enhancing peptides contact with the bilayer hydrophobic phase. The simulations also presented a lipid packing perturbation of the bilayer characterized for a decrease of the acyclic chains order parameter. Constant pH Molecular Dynamics simulations, that were performed utilizing the structures of the adsorbed peptides obtained on the conventional Molecular Dynamics simulations, were able to enlighten details of the electrostatics of the adsorption process. They demonstrated that these peptides' adsorption into the lipid bilayer increases about two units the pK_a values calculated for the titratable residues. Thereby, these peptides presented higher net charges when in presence of the bilayer than when they are only in aqueous solution. Thus, the electrostatic attraction magnitude of these peptides for the anionic bilayer is increased, pointing out the selectivity that both peptides have for the bacteria mimetic bilayer.

Keywords: *Antimicrobial peptides. Sensitive pH peptides. Molecular Dynamics Simulations. Conformational analysis. Constant pH Molecular Dynamics.*

Lista de Figuras

- 1.1 Peptídeos MP1 e H-MP1 na estrutura inicial utilizada nas simulações desse trabalho. Em (a) o MP1, em (b) o H-MP1 com as histidinas protonadas, em (c) o H-MP1 com as histidinas desprotonadas. Os peptídeos estão em configuração da estrutura secundária e coloridos da seguinte forma: os aminoácidos hidrofóbicos estão apresentados em branco, os carregados positivamente em azul, os carregados negativamente em vermelho, e os polares não-carregados em verde. 23

- 3.1 Representação da caixa de simulação contendo água (superfície cinza), a bicamada de POPC (ciano) e POPG (laranja), íons Na^+ (azul) e Cl^- (vermelho) e o peptídeo em representação de estrutura secundária (α -hélice representada em roxo e *random coil* em branco). No início da simulação os peptídeos são posicionados de maneira aleatória a uma distância de aproximadamente 10 Å da bicamada lipídica. 34

- 3.2 Esquema básico das simulações de Dinâmica Molecular a pH Constante, onde é realizada uma simulação de Dinâmica Molecular convencional em um estado fixo de protonação, seguido por um passo de neMD/MC a fim de amostrar novos estados de protonação. O esquema mostra o que acontece quando essa mudança pode ser aceita ou rejeitada. 38

- 4.1 Estrutura secundária em função do tempo para cada aminoácido durante a simulação dos peptídeos em solução aquosa, (a) MP1 e (b) H-MP1. Na cor azul quando o resíduo apresenta estrutura secundária em conformação α -hélice, ciano para conformação *random coil* e vermelho para folha- β . . . 42

- 4.2 Porcentagem do tempo total da trajetória em que a ligação de hidrogênio entre os resíduos i e $i + 4$ do backbone existem para o MP1 e o H-MP1 em solução aquosa. O objetivo é observar o quão forte é a estruturação em α -hélice desses peptídeos no decorrer da simulação. O MP1 está representado em roxo e o H-MP1 em verde. 43

4.3	Distância das pontes salinas entre os aminoácidos carregados dos peptídeos MP1 na figura (a) e H-MP1 na figura (b) para as simulações dos mesmos em solução aquosa. Ligações entre os resíduos 2 e 4 estão representadas em preto, 2 e 5 em vermelho, 8 e 4 em ciano, 8 e 5 em azul e 8 e 11 em laranja.	44
4.4	Estrutura secundária de cada aminoácido durante a simulação, (a) MP1 e (b) H-MP1. Na cor azul quando o resíduo apresenta estrutura secundária em conformação α -hélice, ciano para conformação <i>random coil</i> e vermelho para folha- β . O MP1 está adsorvido na bicamada a partir de 100 ns do tempo de simulação, e o H-MP1 a partir de 400 ns. É importante notar que após a adsorção a porcentagem de conformação α -hélice da estrutura secundária aumenta.	45
4.5	Porcentagem do tempo em que a ligação de hidrogênio entre os resíduos $i-i+4$ do <i>backbone</i> existe na simulação para MP1 e H-MP1 a fim de investigar a estabilidade da estrutura de α -hélice durante a simulação. O MP1 está representado em roxo e o H-MP1 está dividido em duas situações: antes da adsorção completa em laranja, e depois em verde.	46
4.6	Distância das pontes salinas formadas entre os aminoácidos carregados dos peptídeos (a) MP1 e (b) H-MP1 para as simulações na presença da bicamada. Ligações entre os resíduos 2 e 4 estão representadas em preto, 2 e 5 em vermelho, 8 e 4 em ciano, 8 e 5 em azul e 8 e 11 em laranja.	47
4.7	Processo de adsorção dos peptídeos antimicrobianos MP1 em roxo (a) e H-MP1 em verde (b). A bicamada está representada em cinza nas das duas figuras.	49

4.8	<p><i>Snapshots</i> das simulações em que foram observadas a adsorção dos dois peptídeos estudados. (a) e (c) Instante em que os peptídeos primeiramente tocam a bicamada com o N-terminal carregado. Pode-se notar que parte da estrutura secundária se configura em <i>random coil</i>. (b) e (d) Peptídeos após a adsorção completa, paralelos à bicamada, com estrutura majoritariamente helicoidal, com a face hidrofóbica em contato com as cadeias acílicas e a hidrofílica com as cabeças polares e água. Destaque para o triptofano posicionado na interface hidrofílica/hidrofóbica como indicado por experimentos de fluorescência. Os peptídeos estão representados em <i>cartoon</i> e coloridos pelo tipo de resíduo (resíduos hidrofóbicos representados em branco, positivos em azul, negativos em vermelho e polares não-carregados em verde). O resíduo de triptofano (TRP) está representado em laranja, as moléculas de água em <i>iceblue</i>, lipídeos pelo nome de cada átomo: carbonos em ciano, nitrogênios em azul, oxigênios em vermelho e fósforos em dourado.</p>	50
4.9	<p>Distância entre diferentes regiões dos peptídeos ao centro de massa da bicamada lipídica. Três posições para ambos os peptídeos foram consideradas aqui, o centro de massa (COM) considerando o peptídeo inteiro em preto, o N-terminal como sendo o centro de massa do primeiro resíduo (Ile1) em roxo o C-terminal sendo o centro de massa do último resíduo (Leu14) em ciano. (a): MP1, (b): H-MP1, <i>inset</i>: nos primeiros 6 nanossegundos da simulação, quando o peptídeo está fora da bicamada (mais de 20 Å de distância), podemos ver que o peptídeo começa paralelo à bicamada e rapidamente muda para uma orientação perpendicular e começa a se aproximar da bicamada. .</p>	51
4.10	<p>Perfil de densidade de número para as simulações dos dois peptídeos, MP1 em (a) em que o peptídeo adsorvido está representado em roxo e o HMP1 em (b) em que o peptídeo adsorvido está representado em verde, em ambas as figuras a bicamada de 7POPC:3POPG e solução aquosa. A água está representada em azul, as cabeças polares em vermelho, as cadeias acílicas em ciano, e os peptídeos antes de ocorrer a adsorção em laranja.</p>	52
4.11	<p>Histograma das distâncias entre o centro de massa do triptofano dos peptídeos (Trp3) e o centro de massa da bicamada durante a simulação, mostrando qual é a distância mais frequente entre esse aminoácido e o CM da bicamada. Em (a) para o MP1 e em (b) para o H-MP1.</p>	53

4.12	Parâmetros de ordem calculados para as cadeias acíclicas dos lipídios da bicamada na ausência de peptídeo na caixa de simulação (em preto), com o peptídeo MP1 adsorvido na bicamada (em roxo) e com o peptídeo H-MP1 adsorvido na bicamada (em verde). Para os gráficos onde o peptídeo está adsorvido o parâmetro de ordem foi calculado apenas para os lipídeos que estejam a uma distância do peptídeo de no máximo 10 Å. Em (a) estão apresentados os resultados calculados para a cadeia insaturada e em (b) para a cadeia saturada de ambos os lipídeos, POPC e POPG.	54
4.13	Média da energia eletrostática em (a) e energia de Van der Waals em (b) da interação entre cada resíduo de aminoácido dos peptídeos MP1 (IDWKLLDAAKQIL-NH ₂) e H-MP1 (IDWHLLDAAHQIL-NH ₂) e os fosfolipídeos da bicamada e seus respectivos desvios padrão. MP1 está representado em roxo e o H-MP1 em verde.	56
4.14	Distribuição radial de pares calculada para os resíduos de ácido aspártico do peptídeo MP1 com o nitrogênio protonável da lisina mais próxima. Em (a) estão apresentados os valores para o ácido aspártico 2 e a lisina 5, em (b) para o ácido aspártico 8 com a lisina 4 e em (c) do ácido aspártico 8 com a lisina 11.	64
4.15	Distribuição radial de pares calculada para os resíduos de ácido aspártico do peptídeo H-MP1 com o nitrogênio protonável da histidina mais próxima. Em (a) estão apresentados os valores para o ácido aspártico 2 e a histidina 4, em (b) para o ácido aspártico 8 com a histidina 5 e em (c) do ácido aspártico 8 com a histidina 11.	65
4.16	Disposição dos resíduos ionizáveis dos peptídeos utilizados nesse trabalho. Os resíduos ácidos e básicos estão representados em vermelho e turquesa, respectivamente. O <i>backbone</i> se encontra representado em cinza.	66

Lista de Tabelas

4.1	Fração protonada para cada resíduo do peptídeo MP1 obtidas pelas simulações de CpHMD nas três configurações e três pHs diferentes.	59
4.2	Cargas líquidas calculadas para o MP1	59
4.3	Fração protonada para cada resíduo do peptídeo H-MP1 obtidas pelas simulações de CpHMD nas três configurações e três pHs diferentes.	60
4.4	Cargas líquidas calculadas para o H-MP1	60
4.5	Valores de pK_a e coeficientes de Hill para os resíduos do MP1.*	62
4.6	Valores de pK_a e coeficientes de Hill para os resíduos do H-MP1.*	62

Lista de Abreviaturas

PAMs Peptídeos Antimicrobianos

DM Dinâmica Molecular

CpHMD Dinâmica Molecular a pH Constante

POPC 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-fosfatidilcolina

POPG 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-fosfatidilglicerol

TFE Trifluoroetanol

VDW Van der Waals

MC Monte Carlo

GB *Generalized Born*

TREX *Temperature Replica Exchange*

HEWL *Hen Egg-White Lysozyme*

AMBER *Assisted Model Building with Energy Refinement*

CHARMM *Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics*

OPLS *Optimized Potentials for Liquid Simulations*

GROMOS *GROningen MOlecular Simulation*

PBC *Periodic Boundary Conditions*

PME *Particle Mesh Ewald*

NAMD *NAnoscale Molecular Dynamics*

VMD *Visual Molecular Dynamics*

neMD *Nonequilibrium Molecular Dynamics*

CD *Circular Dichroism*

DSSP *Define Secondary Structure of Proteins*

Lys Lisina

Asp Ácido Aspártico

His Histidina

Trp Triptofano

Leu Leucina

Ile Isoleucina

COM *Center of Mass*

Sumário

1	Introdução e Justificativa	18
1.1	Propriedades e Mecanismos de Ação dos Peptídeos Antimicrobianos	19
1.2	Os Peptídeos MP1 e H-MP1	21
1.3	Dinâmica Molecular	25
1.4	Dinâmica Molecular a pH constante	27
2	Objetivos	29
3	Metodologia	30
3.1	Dinâmica Molecular	30
3.1.1	Detalhes Computacionais	33
3.2	Dinâmica Molecular a pH Constante	36
3.2.1	Detalhes Computacionais	40
4	Resultados e Discussão	41
4.1	Adsorção dos peptídeos MP1 e H-MP1 por simulações de Dinâmica Molecular	41
4.1.1	Análises de Estrutura Secundária	41
4.1.2	Processo de adsorção	48
4.1.3	Alterações na bicamada	54
4.1.4	Análises energéticas	56
4.2	Análises de regulação de carga da adsorção dos peptídeos por CpHMD . . .	58
5	Conclusão	67

Capítulo 1

Introdução e Justificativa

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são uma nova classe de agentes antibióticos altamente efetivos e também boas alternativas aos antibióticos convencionais para enfrentar o aumento de cepas bacterianas resistentes [2–4], já que mecanismo de ação de organismos invasores contra esses tipos de antimicrobianos são raramente observados [5] e também por já ser conhecido que eles possuem atividade contra bactérias resistentes a vários tipos de antibióticos [6].

Esses peptídeos fazem parte do sistema imune de muitas espécies. Diferente dos antibióticos convencionais, PAMs agem na fase lipídica da membrana plasmática sem que sejam necessários receptores de membrana [7, 8], sendo uma vantagem devido ao fato de que o desenvolvimento de mecanismos de resistência pela bactéria pode ser dificultado quando o peptídeo age na membrana celular [9].

Nesse trabalho, procuramos elucidar em nível atômico-molecular o processo de adsorção e os detalhes da interação de dois peptídeos antimicrobianos com a bicamada lipídica, monitorando as mudanças estruturais que acontecem nos peptídeos, alterações provocadas na membrana modelo e também como ocorre a regulação de carga no peptídeo quando exposto à presença da bicamada e alterações de pH.

1.1 Propriedades e Mecanismos de Ação dos Peptídeos Antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos normalmente possuem cadeias curtas, com menos de 50 resíduos de aminoácidos e carga líquida positiva. Esses peptídeos também apresentam estrutura secundária que forma uma hélice anfipática na interface hidrofóbica/hidrofílica da membrana alvo [10]. Por possuírem essa estrutura e serem ricos em resíduos apolares e catiônicos, esses peptídeos possuem seletividade por membranas lipídicas aniônicas características de organismos procariotos [11]. Existem alguns peptídeos antimicrobianos que não adquirem estrutura anfipática e ainda assim são capazes de induzir atividade lítica através de um mecanismo de ação interfacial [12]. Os peptídeos antimicrobianos têm atividade lítica que desestabiliza o empacotamento lipídico, resultando em apoptose celular [5].

A membrana alvo de bactérias possui densidade superficial de carga negativa enquanto diversos peptídeos antimicrobianos, como já mencionado, são ricos em resíduos catiônicos fazendo com que a interação eletrostática conduza esse processo de adsorção. O que também é conhecido acerca desse mecanismo de ação é que esses peptídeos têm uma tendência a se orientar de forma paralela ao plano da superfície da membrana [13–15] e as cadeias acíclicas, que são altamente flexíveis, se ajustam em torno do peptídeo causando distorções elásticas na membrana, com mudanças na área por lipídio na monocamada em que esses peptídeos estão adsorvendo [16, 17]. Essas modificações das cadeias acíclicas causam perturbação do empacotamento lipídico e alterações no parâmetro de ordem e, por consequência, nas propriedades da membrana [18]. Além disso, o estiramento de uma monocamada pode induzir tanto ao afinamento da membrana [19] como mudanças em sua curvatura [20]. Ademais, a densidade local de cargas positivas na superfície da membrana causada pela adsorção do peptídeo pode causar segregação de lipídeos, atraindo lipídeos de carga oposta para próximo do peptídeo [21, 22].

Nos últimos anos, diversos mecanismos de ação foram propostos para diferentes peptídeos antimicrobianos [23–26]; contudo, os modelos são restritos a apenas a ação de alguns peptídeos [27]. De maneira geral os mecanismos incluem a adsorção dos peptídeos na membrana e o seu acúmulo até uma concentração em que a tensão elástica na membrana torna-se grande o suficiente para que, quando aliviada, cause a lise celular através da formação de poros ou defeitos [28, 29]. O tipo de poro ou defeito que será formado depende diretamente da tensão elástica que age na sua borda e da tensão superficial gerada pela mudança da área da membrana [28, 30], que também tem relação com o formato dos lipídeos que formam a membrana [31] e da repulsão eletrostática entre as cabeças polares [32]. Dentre os diversos tipos de mecanismos de permeação na membrana que são amplamente discutidos na literatura se destacam, por exemplo, o poro do tipo barril [30], poro

toroidal [33–35], carpete [36, 37], formação de fase não lamelar [25], segregação de lipídeos [24] e tipo detergente [38, 39]. A maioria desses modelos se baseiam em análises experimentais de vazamento em vesículas, em que se insere um corante fluorescente no lúmen de vesículas grandes (ou gigantes) unilamelares [40–42]. Os peptídeos que serão apresentados nesse trabalho possuem estrutura mais curta do que a espessura da membrana. Então, seu mecanismo de ação não inclui a formação de um poro transmembranar estável [30].

1.2 Os Peptídeos MP1 e H-MP1

O sistema imune de diversos organismos vivos evoluiu ao longo do tempo para combater patógenos invasores. Os insetos possuem um forte sistema de defesa composto por células imunes, barreiras anatômicas e também peptídeos antimicrobianos. Os mastoparanos são uma família de peptídeos antimicrobianos catiônicos de cadeias curtas, presentes no veneno de insetos do tipo himenópteros, como as vespas. Eles possuem cerca de três lisinas e com grande presença de resíduos hidrofóbicos, mais especificamente leucinas e isoleucinas. Como proteção a ataques proteolíticos, esses peptídeos possuem uma amidação em sua estrutura [43]. Em geral, os peptídeos dessa família possuem ampla atividade antimicrobiana contra bactérias, sendo que alguns apresentam atividade hemolítica e citotóxica em células eucarióticas [44].

O tetradecapeptídeo Polybia-MP1 (IDWKKLLDAAKQIL-NH₂), ou simplesmente MP1, é um peptídeo antimicrobiano da família dos mastoparanos, extraído da vespa brasileira *Polybia paulista*, que exibe um amplo-espectro bactericida potente contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas [45]. O peptídeo MP1 não é hemolítico nem citotóxico e também mostrou efeito inibitório na proliferação de cultura de células cancerosas de próstata e bexiga [8] e também contra células leucêmicas multirresistentes [46]. O MP1 ainda mostrou seletividade entre linfócitos leucêmicos a sadios e estudos de citometria de fluxo evidenciaram intensa atividade antitumoral [47].

Outros exemplos de peptídeos antimicrobianos da mesma família do MP1 cujos mecanismos de ação vêm sendo amplamente estudados derivados do MP-I são: o Asn2-Polybia-MPI, ou NMP-I (INWKKLLDAAKQIL-NH₂) e o Polybia-MP III, ou MP-III (IDW-LKLGKVMVDVL-NH₂) e também peptídeos sintéticos que possuem características semelhantes com os da família do MP-I como a carga líquida, a hidrofobicidade média, a estrutura helicoidal anfipática do peptídeo em interfaces hidrofóbicas/hidrofílicas, a posição e natureza dos resíduos carregados que formam *clusters* de carga em regiões específicas quando o peptídeo se estrutura e a presença de um resíduo ácido na região do N-terminal [48, 49]. Essas semelhanças fazem com que possuam as mesmas características de ser bactericida e pouco tóxico do MP1. Eles são: o L1A (IDGLKAIWKKVADLLKNT-NH₂), o Ac-L1A (Ac-IDGLKAIWKKVADLLKNT-NH₂) e o ABZ-L1A-W8V (Abz-IDGLKAIWKKVADLLKNT-NH₂) [48]. Esses peptídeos apresentam ação lítica sobre células bacterianas, podendo ser estudados por técnicas experimentais e computacionais que usam como modelo para a membrana celular bicamadas lipídicas com diferentes composições.

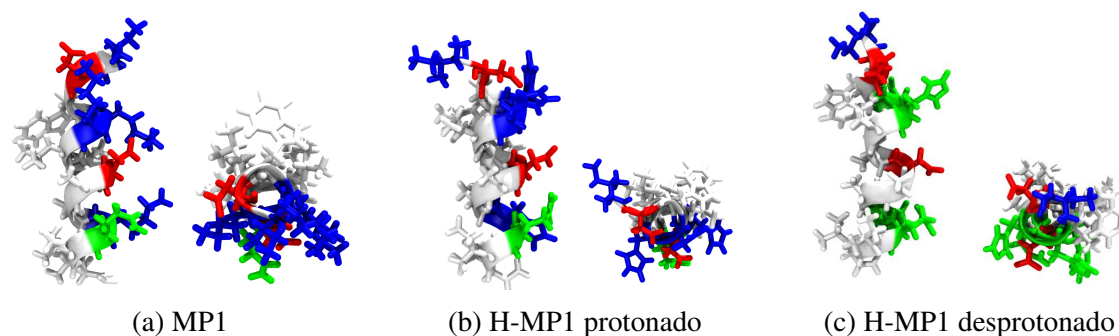
A característica anfipática desses peptídeos faz com que ambas propriedades eletrostáticas e hidrofóbicas apresentadas por eles devam ser estudadas. Uma hidrofobicidade ótima é necessária, já que quando esses peptídeos se inserem na membrana são os

aminoácidos apolares os que interagem e causam perturbação das cadeias acílicas. Em contrapartida, uma hidrofobicidade muito elevada faz com que esses peptídeos interajam também com células de mamíferos, ou seja, o peptídeo perde seletividade pela membrana de bactérias e passa a ser tóxico em mamíferos [2, 50, 51].

O peptídeo MP1 possui hidrofobicidade média por resíduo igual a -0,11 [52], dois ácidos aspárticos e quatro lisinas distribuídas de forma que cada ácido aspártico tem lisinas como seus terceiro e quarto vizinhos na sequência e um resíduo de triptofano na terceira posição [53, 54]. A presença de resíduo de triptofano é importante porque esse resíduo funciona como um fluoróforo, possibilitando a utilização de técnicas experimentais de fluorescência para determinar o posicionamento do peptídeo em relação à bicamada lipídica quando adsorvido.

Estudos experimentais realizados com esse peptídeo mostraram o papel fundamental desempenhado pelos resíduos ácidos na modulação da afinidade do MP1 a vesículas aniônicas e zwitteriônicas [55–57]. Análises conformacionais experimentais de sua adsorção em uma bicamada lipídica associada com simulações em solução aquosa com TFE mostraram como ocorre a estabilização da α -hélice da estrutura helicoidal anfipática que está relacionada com a maneira que os resíduos ácidos e básicos estão distribuídos no MP1 [55]. A disposição desses resíduos é favorável às interações intra cadeia, resultando em alterações do pK_a dos resíduos ionizáveis. Desse modo, a carga líquida que esse peptídeo possui é função do pH do meio e do potencial eletrostático gerado pela membrana.

De acordo com os estudos anteriormente apresentados, a atividade bactericida dos PAMs muitas vezes é modulada pelo pH do ambiente. A distribuição de resíduos ácidos e básicos ao longo da estrutura primária dos peptídeos MP1 e H-MP1 leva à formação de uma hélice anfipática quando em contato com interfaces hidrofílicas/hidrofóbicas. A figura 1.1 apresenta ambos os peptídeos nessa estrutura secundária. Apesar de sofrerem variações, os valores de pK_a do ácido aspártico (~ 4.0) e lisina (~ 10.4) do MP1 sugerem que esse peptídeo apenas vai responder a mudanças de pH próximas a esses valores como observado para outro peptídeo similar ao MP1 [58–60]. Em solução em pH fisiológico, esse peptídeo possui carga líquida +2e, relativamente baixa se comparada a peptídeos antimicrobianos altamente seletivos no mesmo pH. Substituindo as lisinas do MP1 por histidinas, que apresentam pK_a mais baixo ($\sim 6,5$), temos o peptídeo modificado H-MP1 responsivo a uma estreita variação de pH aproximadamente duas unidades abaixo do fisiológico.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 1.1: Peptídeos MP1 e H-MP1 na estrutura inicial utilizada nas simulações desse trabalho. Em (a) o MP1, em (b) o H-MP1 com as histidinas protonadas, em (c) o H-MP1 com as histidinas desprotonadas. Os peptídeos estão em configuração da estrutura secundária e coloridos da seguinte forma: os aminoácidos hidrofóbicos estão apresentados em branco, os carregados positivamente em azul, os carregados negativamente em vermelho, e os polares não-carregados em verde.

A adsorção desses peptídeos à membrana da bactéria é seguida por sua estruturação em α -hélice, envolvendo interações tanto eletrostáticas como hidrofóbicas. Após a adsorção, de acordo com a orientação dos peptídeos, alterações em diversas propriedades físicas da membrana podem ser observadas, tais como: espessura [61], diminuição do parâmetro de ordem das cadeias acíclicas [62] e alterações de comportamento de fase da membrana [18].

A membrana modelo que é utilizada nos experimentos e nas simulações é um sistema simplificado que mimetiza o arranjo lipídico das membranas biológicas. Uma membrana biológica real possui muitos tipos de lipídeos e proteínas. A utilização de uma membrana com menos componentes (por exemplo, apenas dois lipídeos) permite uma análise mais precisa dos resultados [63], já que podemos apontar mais facilmente os efeitos causados pela interação dos peptídeos, sem o ruído causado por inúmeros componentes em uma só membrana. O uso dessas estruturas é particularmente útil para estudos que tem por objetivo investigar as propriedades inerentes da membrana, com respeito aos seus componentes e suas características e também fornecer informações a nível molecular.

De maneira geral, a monocamada externa das membranas plasmáticas de bactérias é aniônica [64]. Entretanto, dependendo do micro-organismo alvo em que um determinado peptídeo antimicrobiano age, a membrana modelo que será utilizada tem uma composição lipídica que depende das características principais dessa membrana que se deseja mimetizar. Por exemplo, bactérias Gram-negativas e Gram-positivas se diferenciam em composição lipídica. Enquanto as membranas de bactérias Gram-negativas possuem fosfolipídeos aniônicos como fosfatidilglicerol (PG) e cardiolipina e uma predominância do lipídio zwitteriônico fosfatidiletanolamina, as bactérias Gram-positivas contém predominantemente PG, cardiolipina

e lysoPG [65, 66]. Já a membrana celular externa das células eucarióticas é rica em lipídeos zwitteriônicos como fosfatidilcolina (PC), colesterol e esfingomioelina [67]. No caso dos organismos eucarióticos existe uma assimetria entre a monocamada externa e interna, já que a monocamada interna também contém fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina (que é um lipídeo aniônico) em uma célula cancerígena essa assimetria é desfeita e esses lipídeos também são encontrados na monocamada externa [68, 69].

Na tentativa de elucidar detalhes da adsorção e interação dos peptídeos antimicrobianos MP1 e H-MP1 com bicamadas lipídicas que não foram possíveis de observar experimentalmente, podemos fazer uso de simulações computacionais. Uma das técnicas de simulação mais utilizadas no estudo de biomoléculas é a Dinâmica Molecular (DM).

1.3 Dinâmica Molecular

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

A primeira simulação por Dinâmica Molecular foi realizada em 1957 por Alden e Wainwright utilizando modelo de esferas rígidas [70]. Com o tempo, a técnica evoluiu até ser possível a simulação de um líquido. A primeira simulação desse tipo foi uma simulação de água líquida realizada por Stillinger em 1974 [71]. Avanços na área computacional e desenvolvimento de novos modelos tornaram possível simular sistemas de maior complexidade e tamanho como as macromoléculas biológicas. A primeira simulação de Dinâmica Molecular de uma proteína foi o estudo da BPTI (inibidor pancreático bovino da tripsina) realizado por McCammon em 1977 [72] e de uma bicamada lipídica por Berendsen e Van Der Ploeg em 1982 [73]. Desde então, as simulações de DM vêm sendo amplamente utilizadas no estudo dos mais diversos sistemas biológicos sendo, no caso de proteínas, a principal técnica de simulação.

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

O potencial hidrogeniônico (pH) é a propriedade físico-química que mede o grau de acidez ou alcalinidade de uma solução. Praticamente todos os processos biológicos que acontecem na célula envolvendo biomoléculas sofrem influência do pH, já que o pH determina o estado de protonação dos resíduos ionizáveis e então, por consequência, determina a distribuição de cargas na proteína [74–76]. Em proteínas, essa distribuição de cargas influencia fortemente na estabilidade da estrutura, na catálise e até no acoplamento de ligantes [77–81]. Consequentemente, existe uma faixa estreita de pH onde elas desempenham sua função

biológica de forma eficiente, estando essa função diretamente relacionada com a presença de resíduos ionizáveis em posições-chave [82]. Devido a esses fatores, o pH é estritamente regulado na célula por diversos mecanismos fisiológicos [83, 84].

Um exemplo de molécula biológica cujo comportamento depende diretamente do pH do meio são os peptídeos antimicrobianos citados anteriormente, os quais são caracterizados por possuírem sequências curtas, resíduos catiônicos e um caráter anfipático. Quando em contato com uma bicamada lipídica aniônica, como a dos micro-organismo procariotos, esses peptídeos podem desestabilizar essa membrana e destruir a célula invasora [2]. O mecanismo de ação desses peptídeos e sua eficácia estão relacionados com sua estrutura, e sua afinidade por membranas aniônicas é dependente da protonação dos resíduos do peptídeo; logo, variações no pH podem influenciar nesse processo [26].

Entretanto, processos que estão diretamente relacionados com o pH do meio não são observados em simulações de DM convencional devido ao fato de que nelas o estado de protonação dos resíduos ionizáveis deve ser escolhido baseado no pK_a desse resíduo isolado, e esse estado se mantém durante toda a simulação. Utilizando essa técnica, além de não serem observados os efeitos do pH na conformação e função da proteína, pode-se escolher um estado que não seja o mais favorável energeticamente, uma vez que os valores de pK_a dos resíduos em uma determinada proteína podem divergir drasticamente dos valores intrínsecos desses resíduos isolados em solução, conforme o ambiente eletrostático que esse resíduo experimenta.

O ideal, então, é que o estado de protonação dos resíduos ionizáveis possa variar no decorrer da simulação. Para que esse efeito do pH seja incorporado computacionalmente em simulações de DM, várias técnicas já foram desenvolvidas e implementadas por meio da protonação discreta via Metropolis - Monte Carlo (MC) [85–89] ou protonação contínua via λ -dinâmica[90–94].

1.4 Dinâmica Molecular a pH constante

A Dinâmica Molecular a pH Constante (CpHMD, do inglês *Constant pH Molecular Dynamics*) utilizando a protonação discreta consiste em interromper periodicamente as simulações de DM convencionais para realizar a mudança do estado de protonação dos resíduos ionizáveis via passos de Monte Carlo Metropolis. Para tanto, utilizamos o valor da energia livre de mudança do estado de protonação e a influência do pH.

A primeira implementação de CpHMD com protonação discreta foi proposta por Baptista et. al. [85], aplicando a equação de Poisson-Boltzmann no modelo eletrostático contínuo, ou seja, tratando o solvente como um dielétrico para estimar energias livres de protonação e desprotonação e utilizá-las no critério de Metropolis. Depois desse, diversos métodos surgiram diferenciados entre si principalmente pelo modelo de solvente utilizado como o desenvolvido por Mongan, Case e McCammon [87].

Na tentativa de se obter uma convergência mais rápida dos valores de pK_a foi incorporada a técnica de *Replica-Exchange* (TREX) por Brooks[93], promovendo uma melhor amostragem conformacional no método de CpHMD. Utilizando nove proteínas como teste, foram obtidos valores precisos de pK_a que convergiram entre 500 ps e 1 ns por réplica. Esse método também foi aplicado por Meng e Roitberg utilizando o modelo de solvente implícito *Generalized-Born* (GB) [88].

Também na tentativa de melhorar a acurácia e a rapidez na convergência Williams, de Oliveira e McCammon acoplaram CpHMD de protonação discreta com Dinâmica Molecular acelerada para vários resíduos da HEWL (*Hen Egg-White Lysozyme*) [95]. Depois disso, Itoh e colaboradores desenvolveram um método para CpHMD baseado em pH e TREX para melhorar de forma direta a amostragem dos estados de protonação [96]. Esse método foi implementado no pacote *AMBER* [97] e testado para o pK_a calculado para a HEWL [98].

A primeira ideia para CpHMD de protonação contínua foi proposta por Brooks[91, 93] utilizando o conceito de simulações de λ -dinâmica [90]. Na λ -dinâmica o estado de protonação de cada sítio ionizável é definido por meio de uma variável (λ), também podendo ser chamada de coordenada de titulação, que evolui lentamente entre os valores de 0 a 1 representando simultaneamente os estados desprotonado e protonado. A aplicação desse método utiliza o modelo GB para o solvente implícito para propagação tanto das coordenadas espaciais quanto da de titulação [91, 93] e foi implementado para o pacote *CHARMM* [99].

Nos últimos anos, estudos de CpHMD vêm sendo utilizados para analisar fatores estruturais responsáveis pela dependência com o pH da ligação de substrato em β -

glucosidases [100], o mecanismo de transporte de prótons no canal M2 [101], entender os *flaps* de proteases de HIV [102] que controlam o acesso das proteases a substratos e inibidores, e também o acoplamento entre os estados de protonação e a conformação do citocromo c oxidase [103].

Mais recentemente, o grupo do Prof. Benoit Roux, da Universidade de Chicago, implementou para o programa NAMD um sistema de CpHMD que acopla simulações de dinâmica convencional com passos de dinâmica fora do equilíbrio em que acontecem mudanças no estado de protonação de um resíduo e cálculos da energia que descreve se a mudança de protonação é favorável ou não [104]. Este método, além de simulações de Dinâmica convencional, também foi utilizado nesse trabalho.

Nesse estudo, comparamos os efeitos dos pHs ácido e fisiológico da solução na adsorção dos peptídeos antimicrobianos MP1 e seu análogo contendo histidina H-MP1 no modelo de membrana mista aniônica (7POPC:3POPG), e análises conformacionais desses peptídeos. Essa configuração foi escolhida por mimetizar eletricamente a membrana plasmática de bactérias Gram-negativas [65]. O lipídeo zwitteriônico predominante das bactérias Gram-negativas é a fosfatidiletanolamina (PE), entretanto, devido à curvatura negativa apresentada por esse lipídeo os experimentos que deram suporte às nossas simulações foram realizados com outro lipídeo zwitteriônico, o POPC. Na investigação complementamos as informações experimentais obtidas de adsorção e inserção do peptídeo, e também vazamento de vesículas, com simulações de Dinâmica Molecular (DM) dos peptídeos e bicamada por mais de 10 μ s para cada sistema, bem como quase 10 μ s de Dinâmica Molecular a pH Constante desses peptídeos em diferentes pHs e diferentes situações. Com essa estratégia, conseguimos novas revelações do ponto de vista atômico do processo de adsorção desses peptídeos na membrana. Os resultados indicam que a interação que guia a aproximação entre os peptídeos e a bicamada acontece através do N-terminal, bem como foi observado que o posicionamento do peptídeo na interface hidrofílica/hidrofóbica da bicamada favorece o aumento da estrutura helicoidal do peptídeo e perturbação do empacotamento lipídico da bicamada, marcado pela diminuição da ordem das cadeias acílicas, como indicado pelos resultados experimentais [105]. Análises energéticas e eletrostáticas também foram realizadas através das simulações a pH constante, em que os estados de protonação de cada resíduo foram discriminados, levando em conta diferentes ambientes químicos em que esses resíduos podem se encontrar (*bulk*, ou na presença de uma bicamada lipídica). Mostrando como o potencial eletrostático gerado pela bicamada e sentido por esses peptídeos altera os estados de protonação dos resíduos ionizáveis evidenciando a seletividade desses peptídeos por bicamadas lipídicas aniônicas, resultados esses que também foram confrontados e concordam com os dados experimentais realizados pelos colaboradores [106].

Capítulo 2

Objetivos

O objetivo geral desse estudo é reproduzir o processo de adsorção dos peptídeos MP1 e H-MP1 em um modelo de membrana celular bacteriana por meio de simulações computacionais. Com isso, espera-se obter resultados complementares aos já obtidos experimentalmente, de modo a compreender melhor o processo em questão e fornecer *insights* sobre a ação antibacteriana dessas moléculas.

Sendo assim, nesse estudo temos por objetivos específicos:

1. Acompanhar as modificações na estrutura secundária dos peptídeos durante o processo de adsorção e correlacionar essa propriedade dos peptídeos com sua ação sobre a bicamada.
2. Identificar como aminoácidos interagem com a bicamada, a natureza das interações e sua magnitude.
3. Verificar modificações na bicamada lipídica causadas pela adsorção do peptídeo.
4. Estudar, por Dinâmica Molecular a pH Constante, diferenças entre os estados de protonação dos aminoácidos em diferentes pHs e diferentes ambientes químicos.
5. Com base nas cargas líquidas dos peptídeos (mais precisamente de cada um de seus resíduos ionizáveis) entender a especificidade das interações entre peptídeos e bicamada.

Capítulo 3

Metodologia

3.1 Dinâmica Molecular

A Dinâmica Molecular nos fornece a evolução temporal do sistema que se deseja simular resolvendo as equações de movimento: as equações de Newton (equação 3.1). Essas equações são resolvidas numericamente, uma vez que uma solução analítica não é possível para um sistema de muitos corpos [107, 108].

$$\vec{F}_i(t) = m_i \cdot \vec{a}_i \quad (3.1)$$

onde $\vec{F}_i(t)$ é a força resultante que atua sobre cada partícula i de massa m_i e aceleração \vec{a}_i do sistema em um instante de tempo t .

Em uma Dinâmica Molecular os átomos são modelados como se fossem partículas, ligadas por molas, interagindo com as outras partículas dentro do seu raio de alcance por um potencial de interação. Para se obter as equações de movimento é necessário um potencial que modele o sistema da maneira mais realística possível. A melhor modelagem seria descrever o sistema fazendo uso da Mecânica Quântica, o que demandaria um tempo computacional muito grande pra um sistema de tantos corpos. A alternativa é, então, utilizar potenciais clássicos que incorporem esses efeitos quânticos. A escolha do campo de força a ser utilizado na simulação é o que nos dá a forma do potencial e parâmetros de modelagem.

O sistema a ser estudado e as propriedades que vão ser analisadas nessa simulação vão guiar a escolha do campo de força a ser utilizado. De maneira geral, os campos de força mais utilizados para macromoléculas biológicas são: OPLS [109], AMBER [110], CHARMM [111], GROMOS [112], entre outros.

Nesse trabalho, o campo de força utilizado foi o CHARMM, no qual o potencial

é dado por:

$$\begin{aligned}
V = & \sum_{\text{ligações}} K_r(r - r_0)^2 + \sum_{\text{ângulos}} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 \\
& + \frac{1}{2} \sum_{n, \text{diedrais}} C_n [1 - (-1)^n \cos(n\phi - \gamma_n)] \\
& + \sum_{\text{impróprios}} K_\omega(\omega - \omega_0)^2 + \sum_{\text{Urey-Bradley}} K_u(u - u_0)^2 \\
& + \sum_{\text{CMAP}} u_{\text{CMAP}}(\Phi, \Psi) \\
& + \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} + \sum_{i,j} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^6 \right], \tag{3.2}
\end{aligned}$$

onde cada termo descreve mudanças na energia potencial em função de diferentes parâmetros do sistema. O primeiro termo é devido ao estiramento e contração da ligação covalente entre os átomos, o segundo termo à variação do ângulo entre três átomos, o terceiro à variação do ângulo diedral, o quarto aos diedros impróprios, o quinto é o termo harmônico de Urey-Bradley e o sexto termo, CMAP, é aplicado para aprimorar as propriedades conformacionais do *backbone* das proteínas, o sétimo à interação coulombiana devido a forças eletrostáticas entre as cargas parciais dos átomos e o último descreve as interações de Van der Waals entre os átomos por um potencial de Lennard-Jones 6-12.

Para realizar uma simulação de Dinâmica Molecular é necessário construir uma caixa de simulação com um número finito de partículas. O número de partículas na caixa de simulação pode ser insignificante perto do sistema macroscópico que se desejaria estudar, além de efeitos de borda que também se fazem presentes nesse caso. Uma alternativa para contornar essas limitações é criar réplicas em torno da caixa principal, onde o movimento de uma molécula será igual ao movimento mesma molécula nas outras caixas replicadas. Quando uma partícula sai da caixa principal, a mesma partícula entra pela face oposta da caixa, com a mesma velocidade, mantendo o número de partículas na caixa principal constante. Essa técnica é chamada de Condições Periódicas de Contorno (PBC, do inglês *Periodic Boundary Conditions*).

Com o emprego de PBC o número de interações entre as partículas pode aumentar muito, devido ao fato de que as partículas de uma determinada caixa podem interagir com as imagens presentes nas caixas réplicas. O aumento no número de interações também pode aumentar exponencialmente o tempo de simulação; dessa forma para contornar esse problema fazemos o uso de um raio de corte para as interações não ligadas. Assim, uma partícula vai interagir apenas com as que possuem o seu centro de massa dentro desse raio

de corte e, a partir dessa distância, a magnitude dessa interação varia devido à aplicação de uma função dependente da distância que modifica o potencial chamada *switching* que leva o valor da interação a zero. Além disso, o método da mínima imagem também é utilizado para impedir que uma partícula interaja com a sua própria imagem presente em uma das caixas replicadas.

A utilização de raio de corte funciona bem para as interações não ligadas de curto alcance como interações de Van der Waals. Para potenciais eletrostáticos, que são interações de longo alcance, essa abordagem leva o potencial a zero de maneira muito brusca em relação ao alcance desse potencial. Um dos métodos mais utilizados para contornar essa situação e tratar essas interações eletrostáticas é o método de *Particle Mesh Ewald* (PME), que consiste em utilizar o espaço recíproco para o cálculo das interações, sendo possível determinar a energia eletrostática das partículas.

Outras grandezas macroscópicas que precisam ser incluídas nas simulações de DM são o controle de temperatura e pressão, para simulações realizadas no *ensemble* isotérmico-isobárico (ou NPT), já que a maioria dos experimentos são realizados a temperatura e pressão constante. Esse *ensemble* descreve um sistema com um número fixo de partículas em contato com banhos térmico e de pressão [113, 114].

No *software* NAMD, é mais comum a utilização do método pistão de Langevin para o controle da pressão na simulação [115] e, no decorrer da simulação, o tamanho da célula é ajustado e as coordenadas das partículas são re-escaladas. Esse método é combinado ao termostato de Langevin [116], simulando um banho térmico e, a cada passo de simulação as velocidades também são re-calculadas, computando a energia cinética das partículas mantendo a temperatura constante.

Em suma, com a Dinâmica Molecular é possível obter a trajetória do sistema ao longo do tempo e, a partir dela, analisar diversas de suas propriedades físico-químicas. As análises foram realizadas usando o *software* VMD [117] e alguns de seus *plugins* como *Namdenergy*, *Membplugin* [118] e STRIDE [119] no cálculo da estrutura secundária. Para investigar a fluidez da membrana o parâmetro de ordem ($-S_{CH}$) foi calculado usando a equação [120]:

$$S_{CH} = 3/2 \cos^2(\theta) - 1/2, \quad (3.3)$$

via um script Tcl desenvolvido pelo grupo, onde θ é o ângulo entre as ligações C-H das cadeias acílicas com o eixo normal à bicamada. Os cálculos foram realizados focando nos lipídios que ficam próximos ao peptídeo adsorvido.

3.1.1 Detalhes Computacionais

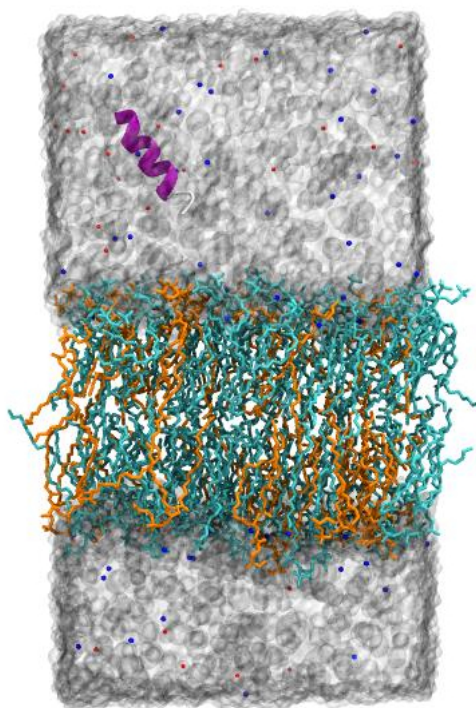
Para realizar as simulações de Dinâmica Molecular no equilíbrio dos sistemas aqui investigados, foi construída uma bicamada lipídica composta por 120 fosfolipídios (60 em cada monocamada) de POPC e POPG em uma proporção de 70:30 utilizando o *Membrane Builder plugin* [121] do *website* CHARMM-GUI [122] utilizando o campo de força CHARMM 36 [111]. A bicamada foi solvatada em uma caixa de água (modelo TIP3P [123]) com tamanho de aproximadamente $65 \times 65 \times 120 \text{ \AA}^3$ e as moléculas de água localizadas na região hidrofóbica da bicamada foram removidas. Então, foram adicionados íons para neutralizar a caixa e também sal NaCl a 150 mM para mimetizar o ambiente fisiológico. O software VMD [117] foi utilizado nesses processos. A caixa de simulação foi equilibrada por 10000 passos de minimização de energia utilizando o método do gradiente conjugado e 100 ns de Dinâmica Molecular utilizando o software NAMD [124].

Os peptídeos foram gerados em configuração α -hélice a partir da sequência de aminoácidos utilizando o *plugin Molefacture* no VMD e o campo de força CHARMM 36 [111]. Para ambos os peptídeos o C-terminal é amidado e o N-terminal é carregado positivamente. Cada um foi inserido na fase aquosa da caixa de simulação a aproximadamente 1 nm de distância da superfície da bicamada. O número de íons na caixa foi corrigido após a inserção do peptídeo. Pode-se observar uma das caixas de simulação montadas na figura 3.1.

As cargas dos aminoácidos dos dois peptídeos foram escolhidas baseado no pK_a de cada resíduo ionizável e no pH da simulação. Os novos sistemas com o peptídeo e a bicamada em solução aquosa foram equilibrados com 10000 passos de minimização de energia e 10 ns de dinâmica molecular com restrição da posição do *backbone* do peptídeo para a relaxação do solvente, usando o NAMD.

Nesse estudo, três sistemas foram investigados, um para o MP1 devido ao fato de que o intervalo de pHs aqui estudados (5,5 a 7,4) é longe do pK_a dos resíduos ionizáveis desse peptídeo, e duas situações para o H-MP1, uma a pH 7,4 e outra para o pH 5,5. Os estados de protonação para o MP1 usado nessas simulações são o N-terminal e as lisinas carregados positivamente e os ácidos aspárticos carregados negativamente, para o H-MP1 a pH 7,4 o N-terminal foi carregado positivamente, as histidinas neutras e ácidos aspárticos carregados negativamente e para o H-MP1 em pH 5,5 o N-terminal e as histidinas carregados positivamente e os ácidos aspárticos carregados negativamente.

Para amostrar melhor o espaço de fase desses sistemas, doze simulações com diferentes velocidades iniciais foram realizadas para cada sistema (MP1, H-MP1 protonado e, H-MP1 desprotonado), seguindo a ideia de um estudo recente que indicou que o uso de múltiplas réplicas é mais preciso do que apenas uma simulação longa [125]. No geral, aproximadamente $2 \mu\text{s}$ de Dinâmica Molecular foi realizada para o H-MP1 desprotonado, e



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3.1: Representação da caixa de simulação contendo água (superfície cinza), a bicamada de POPC (ciano) e POPG (laranja), íons Na^+ (azul) e Cl^- (vermelho) e o peptídeo em representação de estrutura secundária (α -hélice representada em roxo e *random coil* em branco). No início da simulação os peptídeos são posicionados de maneira aleatória a uma distância de aproximadamente 10 Å da bicamada lipídica.

10 μs cada para o MP1 e o H-MP1 protonado.

Para detectar eventos de adsorção, as distâncias entre o N-terminal, C-terminal e o centro de massa do peptídeo e o centro de massa da bicamada foram medidas para todas as simulações. Dizemos que ocorreu uma adsorção quando alguma das distâncias calculadas for menor do que a distância do centro de massa da bicamada ao plano dos fósforos dos fosfolípídeos que compõe a bicamada. Adsorções foram observadas apenas em sistemas em que os peptídeos estavam protonados e, as que tiveram as menores distâncias foram estendidas. Não foi observada inserção do peptídeo H-MP1 desprotonado em nenhuma das simulações, então nenhuma delas foi estendida. A ausência de eventos de adsorção nesse sistema era esperada já que o peptídeo e a bicamada possuem carga líquida com a mesma polaridade.

Todas as simulações de DM foram realizadas com um *time-step* de 2 fs, condições periódicas de contorno, no ensemble NPT a 298 K e 1 atm. Temperatura e pressão foram controladas pelo termostato Langevin [116] e pistão de Langevin [115], respectivamente. O algoritmo SHAKE [126] foi utilizado para controlar o comprimento das ligações covalentes,

e para preservar a geometria das moléculas de água o algoritmo SETTLE [127] foi aplicado. As interações de Van der Waals foram calculadas com um raio de corte de 14 Å com distância de *switching* de 12 Å e as interações de longo alcance foram tratadas com o algoritmo PME [128].

3.2 Dinâmica Molecular a pH Constante

Em sistemas em que a regulação de carga é variável importante no comportamento das macromoléculas biológicas envolvidas as simulações de Dinâmica Molecular a pH Constante (CpHMD) são mais indicadas. De maneira geral, uma simulação de CpHMD, diferente da DM convencional, permite que os estados de protonação dos resíduos ionizáveis variem com o tempo. O método aqui utilizado [104] foi pautado em diversos avanços na área de simulações híbridas de DM fora do equilíbrio e Monte Carlo (neMD/MC) [104, 129–133], utilizado para mudar os estados de protonação dos resíduos ionizáveis em solvente explícito.

Por exemplo, em uma proteína com dois resíduos ionizáveis que podem estar protonados ou desprotonados, são possíveis quatro diferentes estados de protonação. Em uma dinâmica convencional esses estados precisam ser construídos e simulados separadamente considerando o pH desejado e assumindo que apenas algum desses estados possui importância biológica. Do contrário, as transições de estados precisam ser exploradas separadamente utilizando cálculos de energia livre por exemplo. Em uma simulação de CpHMD essas transições são exploradas intercalando os diferentes estados de protonação e o método é particularmente importante quando o número de estados de protonações possível é muito grande (da ordem de dezenas de resíduos), e também quando informações acerca de algum estado de protonação específico não estão disponíveis.

Enquanto nas simulações de DM convencionais a amostragem estatística é feita no ensemble canônico, nas simulações a pH constante é utilizado o ensemble semi-grand canônico (equação 3.4) já que, nessas simulações, o número de átomos da proteína varia e das outras componentes (água por exemplo) não. Essa função de partição consiste em uma soma de funções de partição canônicas ponderadas por um vetor de ocupação cujo valor depende se o sítio de protonação está ou não ocupado.

$$\Xi(pH) = \sum_{\lambda \in S} Q_{\lambda} 10^{-n_{\lambda} pH} \quad (3.4)$$

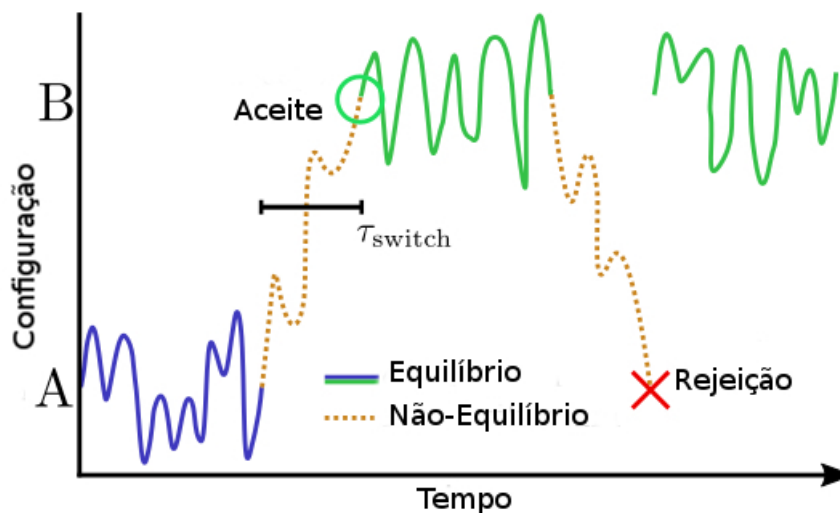
onde $\Xi(pH)$ é a chamada função de partição semi-grand canônica, Q_{λ} é uma função de partição canônica do sistema nos estados de protonação definidos no vetor de ocupação λ , cada elemento desse vetor pode adquirir os valores de zero ou um dependendo se um determinado sítio de protonação está ou não ocupado por um próton, respectivamente. S é o conjunto que contém todos os vetores λ possíveis levando em conta todos os estados de protonação, e n_{λ} é o número de prótons no sistema (em essência, a soma dos elementos de λ).

A simulação de Dinâmica Molecular a pH Constante deve, portanto, explorar o espaço de fase definido por cada uma das funções de partição bem como o espaço de fase

definido pelos diferentes vetores de ocupação. O tempo em que a simulação passa em cada um dos estados é definido pelo peso dado nessa soma que está diretamente relacionado ao pH da simulação. É importante notar que a diferença entre o pH do meio e o pK_a do resíduo ionizável em questão é levada em consideração no critério de Metropolis. O pK_a é calculado a cada ciclo, levando em consideração o ambiente químico que aquele resíduo está inserido. Esse novo pK_a calculado é então utilizado no próximo ciclo.

Logo, essas simulações são realizadas de forma que passos de DM convencional são realizados por um tempo computacional predefinido. Após esse tempo a simulação para e um sítio ionizável é sorteado. Nesse momento é realizada uma proposta de mudança de protonação que é aceita ou não com base no critério de Metropolis. Se aceita, essa nova configuração passa por uma simulação fora do equilíbrio (*switch*) por um tempo também pré determinado, e após o *switch* há uma nova decisão se esse novo estado é aceito ou não. Se aceito um novo ciclo de DM é realizado com a nova configuração; se rejeitado, a simulação continua a partir do estado anterior.

Portanto, uma simulação a pH constante consiste em uma série de ciclos compostos de uma etapa de DM e uma etapa de neMD/MC ao invés de apenas uma longa simulação convencional. O tamanho de cada ciclo é determinado pelo número de passos realizados em uma fase de equilíbrio e o número de passos realizados no *switch* propriamente dito. A mudança do estado de protonação passa por dois critérios de aceitação/rejeição a cada ciclo, um antes de o *switch* ser realizado que leva em consideração, no critério de Metropolis, o pH do meio, o pK_a do resíduo que foi sorteado, e o peso atribuído a cada sítio. Se rejeitado esse passo, a simulação retoma a configuração anterior e realiza mais uma etapa de DM. Se aceito, o *switch* ocorre por um tempo pré determinado e a energia livre de protonação/desprotonação e também o trabalho envolvido na criação/destruição do próton são calculados e incluídos no critério de Metropolis para o aceite ou não do *switch*. Se aceito, a nova configuração é considerada no próximo passo de DM realizado; se rejeitado a simulação retoma da configuração anterior. Esse processo está ilustrado no esquema da figura 3.2. O tempo determinado para o *switch* deve ser tal que não seja tão curto a ponto de que a mudança de protonação seja muito súbita, gerando energias muito altas dificultando que esse passo seja aceito, mas também não pode ser tão longo que, caso rejeitado, muito tempo computacional seja desperdiçado. Para peptídeos um tempo de 15 ps de *switch* é razoável e foi utilizado no artigo do método [104, 134].



Fonte: adaptado de Radak, Roux and Chipot, 2018.

Figura 3.2: Esquema básico das simulações de Dinâmica Molecular a pH Constante, onde é realizada uma simulação de Dinâmica Molecular convencional em um estado fixo de protonação, seguido por um passo de neMD/MC a fim de amostrar novos estados de protonação. O esquema mostra o que acontece quando essa mudança pode ser aceita ou rejeitada.

A fim de não desperdiçar tempo computacional amostrando configurações de protonação raras, é realizado um pré *screening* dessas configurações baseadas no pH da simulação e uma estimativa do pK_a para cada resíduo ionizável (chamado pelos autores do método de pK_a inerente), abordagem proposta por Chen e Roux [130], que direciona a maior parte do esforço computacional para as mudanças de protonação mais prováveis de serem aceitas. Essa abordagem permite que o valor de pK_a inerente calculado possa mudar no decorrer da simulação, dependendo do ambiente químico que os resíduos experimentam, sem prejuízo da estatística ao final da simulação. Esse algoritmo inclui os valores de pH da solução e pK_a inerente dos resíduos no critério de Metropolis, tornando a simulação mais eficiente e menos custosa.

Nessas simulações o número de átomos flutua, já que o mesmo resíduo em diferentes estados de protonação possui diferente quantidade de átomos. Contudo, em vez de remover esses átomos do sistema em uma eventual desprotonação, eles continuam existindo na forma de *dummy* prótons. Essa abordagem facilita a visualização da simulação porque as coordenadas são escritas da mesma maneira que na Dinâmica convencional. Um *dummy* próton não interage com os outros átomos fazendo com que a termodinâmica do sistema permaneça inalterada, isto é, não existiria diferença estatística se o *dummy* próton fosse removido, no entanto, ele sempre possui posição e velocidades que são plausíveis fisicamente se ele estivesse interagindo. Durante a simulação, a transição entre os estados de protonação

é realizada com o uso de coordenadas auxiliares que não aparecem na trajetória final.

Além dos *outputs* gerados pelas simulações convencionais, as simulações a pH Constante também produzem um arquivo com os vetores λ de cada ciclo de onde podem ser obtidos os estados de protonação de cada resíduo, com o detalhe de que resíduos diferentes podem ter mais de um sítio de ligação para o próton. Com esses dados, as curvas de titulação para esses resíduos podem ser geradas e o pK_a desses resíduos pode ser calculado, já que o mesmo resíduo em ambientes químicos diferentes terá valores de pK_a diferentes.

A função de partição semi-grand canônica pode ser reescrita como uma soma dessas funções de quando o sítio de protonação está ocupado ($\Xi_1(pH)$) ou não ($\Xi_0(pH)$).

$$\Xi(pH) = \Xi_0(pH) + \Xi_1(pH)10^{-pH} \quad (3.5)$$

A fórmula da mecânica estatística da equação de Henderson-Hasselbalch de onde se pode obter o pK_a dos resíduo é conhecida por:

$$pK_a(pH) = -\log \frac{\Xi_0(pH)}{\Xi_1(pH)} \quad (3.6)$$

A dependência do pK_a com o pH do meio é devido ao fato de que uma proteína pode ter diversos sítios de protonação do mesmo tipo, com diferentes valores de pK_a , e essa dependência deixa de existir quando existe apenas um tipo de sítio de interação. Expandindo a equação 3.6 em uma série de potências em torno de um valor de pK_a aparente ($pK_a^{(a)}$):

$$pK_a(pH) \approx pK_a^{(a)} + (1 - n)(pH - pK_a^{(a)}) \quad (3.7)$$

Para um determinado sítio de protonação s o elemento no vetor λ que dá a ocupação desse sítio é o elemento λ_s , cuja média com a adição do coeficiente de Hill (n) e utilizando a equação anterior tem-se:

$$\langle \lambda_s \rangle_{pH} \approx \frac{1}{1 + 10^{n(pH - pK_a)}} \quad (3.8)$$

Essa equação fornece, além do pK_a calculado para um determinado sítio, a correlação na protonação entre os sítios, dados pelo valor do coeficiente de Hill (n). Quando $n = 1$ não existe correlação entre os sítios, ou seja, a protonação em um sítio não facilita e nem dificulta a protonação de outro sítio. Quando um sítio apresenta $n > 1$ significa que esse sítio tem probabilidade maior de estar ocupado quando outros sítios no sistema não estão ocupados. Em contrapartida, para $n < 1$ tem-se que um sítio tem menor probabilidade de estar ocupado quando os outros sítios do sistema não estão ocupados.

Com isso, a probabilidade de ocupação de um determinado sítio pode ser obtida para diferentes pHs a partir da Dinâmica a pH Constante e utilizada nessa equação para obter valores de pK_a e coeficiente de Hill através de uma regressão não linear. O *script cphanalyze* desenvolvido por Radak [104] foi utilizado nesse trabalho para realizar esses cálculos utilizando os arquivos de saída da simulação.

3.2.1 Detalhes Computacionais

Nesse tipo de Dinâmica o campo de força usado também foi o CHARMM36 para modelar os peptídeos e os íons [111], e o TIP3P para as moléculas de água [123]. Em ambos os peptídeos o C-terminal e o N-terminal estão, respectivamente, amidado e positivamente carregado.

Todas as simulações foram realizadas utilizando condições periódicas de contorno (PBC) no *ensemble* NPT a 298 K e 1 atm, que foram mantidos constantes através do termostato de Langevin [116] e pistão de Langevin, respectivamente [115]. O algoritmo SETTLE [127] foi aplicado a fim de preservar a geometria das moléculas de água e o algoritmo SHAKE [126] para fixar o comprimento das ligações atômicas. Interações não ligadas e de curto alcance foram truncadas em 12 Å com a distância de *switching* de 10 Å. As interações de longo alcance foram tratadas com o método *Particle Mesh Ewald* (PME) [128].

As simulações de CpHMD foram realizadas com o módulo *namdcpH* do NAMD [104]. Nove simulações de ~ 25 ns (~ 200 ns para cada peptídeo e cada pH) foram realizadas a fim de amostrar a fração protonada de cada resíduo de cada peptídeo no bulk para cada pH desejado. As simulações contendo a bicamada lipídica foram realizadas por ~ 500 a 800 ns divididos em ~ 20 réplicas para cada peptídeo e cada pH. Todas as simulações compõem um agregado de $\sim 10\mu s$ de simulação. Essas simulações ocorreram em intervalos de 10 ps para tentativas de mudança de protonação, com *switches* de 15 ps. As análises (frações de protonação, pK_a e coeficientes de Hill e seus respectivos erros) foram realizadas utilizando o *script cphanalyze* [104].

Os peptídeos MP1 e H-MP1 foram simulados em três pHs diferentes (5,5, 6,5 e 7,4) e em três configurações, no bulk, a 10 Å da bicamada, que é a configuração inicial das simulações de DM convencional realizadas, e adsorvido na bicamada lipídica, situação de equilíbrio encontrada também nas simulações descritas anteriormente. Os resíduos considerados para mudar o estado de protonação são: 2 e 8 (Asp), 4, 5, e 11 (Lys/His).

Capítulo 4

Resultados e Discussão

Experimentos e análises experimentais desses sistemas foram realizados pela Dra. Taisa Giordano Viegas, pela Dra. Dayane dos Santos Álvares e pelo Prof. Dr. João Ruggiero Neto, resultados acerca desse assunto podem ser encontrados nos dois manuscritos anexos a esse texto para consulta.

As simulações de Dinâmica Molecular e de Dinâmica Molecular a pH Constante aqui apresentadas foram realizadas a fim de se obter novas informações do ponto de vista atômico-molecular desses sistemas. Os resultados obtidos a partir dos dois tipos de simulações e as discussões sobre eles serão apresentados nessa seção.

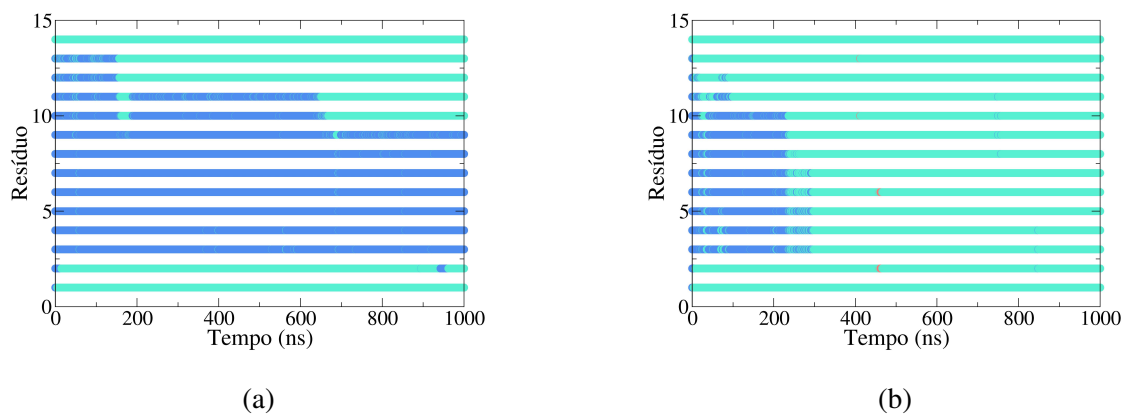
4.1 Adsorção dos peptídeos MP1 e H-MP1 por simulações de Dinâmica Molecular

4.1.1 Análises de Estrutura Secundária

A análise de estrutura secundária é primordial no estudo de adsorção dos peptídeos antimicrobianos devido ao fato de que esses peptídeos apresentam mudança conformacional quando adsorvem na membrana adquirindo, em geral, configuração anfipática em α -hélice. Esse tipo de estrutura favorece a inserção de peptídeos na interface hidrofílica/hidrofóbica de bicamadas lipídicas. A partir de experimentos de Dicroísmo Circular [105] sabe-se que a adsorção dos peptídeos Polybia-MP1 e seu análogo, estudados nesse trabalho, na membrana mimética de bactérias é acompanhada por um aumento da quantidade de estrutura em α -hélice na estrutura secundária. A mesma mudança conformacional foi observada nas simulações de Dinâmica Molecular que serão apresentadas nessa seção. Com a finalidade de evitar os longos tempos de simulação necessários para se obter os peptídeos em uma es-

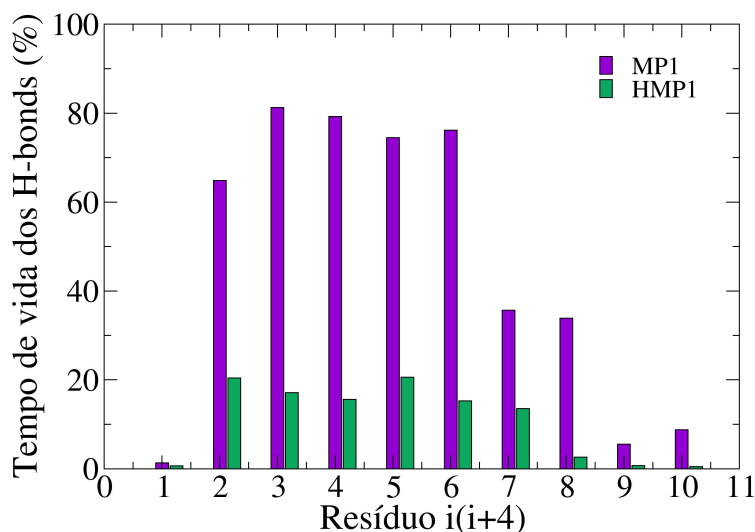
trutura rica em α -hélice, partimos de uma situação onde as moléculas já se encontram nessa condição.

Para fins de controle também foi analisada a estrutura secundária dos peptídeos sem a interferência da bicamada, ou seja em solução aquosa. Foram realizadas simulações de 1 μ s desses peptídeos em 150 mM de NaCl em água e em pH ácido. Os resultados de estrutura secundária dessa simulação, utilizando a análise de estrutura feita pelo *software* STRIDE [119], implementado no programa VMD, e também as ligações de hidrogênio entre os resíduos i e $i + 4$ no backbone, se encontram nas figuras 4.1 e 4.2, respectivamente, para os dois peptídeos em função do tempo de simulação. Essas figuras mostram que ambos peptídeos perdem, significativamente, a conformação helicoidal em solução aquosa adquirindo mais estrutura em *random coil*. O peptídeo MP1 perde 20% da estrutura nos primeiros 200 ns de simulação e, depois de 600 ns, cerca de 50% da sua estrutura ainda se encontra em hélice, concentrada nos aminoácidos centrais. O H-MP1, por outro lado, perde rapidamente metade de sua estrutura em α -hélice antes dos 200 ns de simulação e, depois, a perde completamente. Esses resultados estão em razoável concordância com os obtidos no espectro de CD, que mostram aproximadamente 30 e 10% de conformação helicoidal para o MP1 e o H-MP1, respectivamente.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4.1: Estrutura secundária em função do tempo para cada aminoácido durante a simulação dos peptídeos em solução aquosa, (a) MP1 e (b) H-MP1. Na cor azul quando o resíduo apresenta estrutura secundária em conformação α -hélice, ciano para conformação *random coil* e vermelho para folha- β .



Fonte: Elaborado pelo autor.

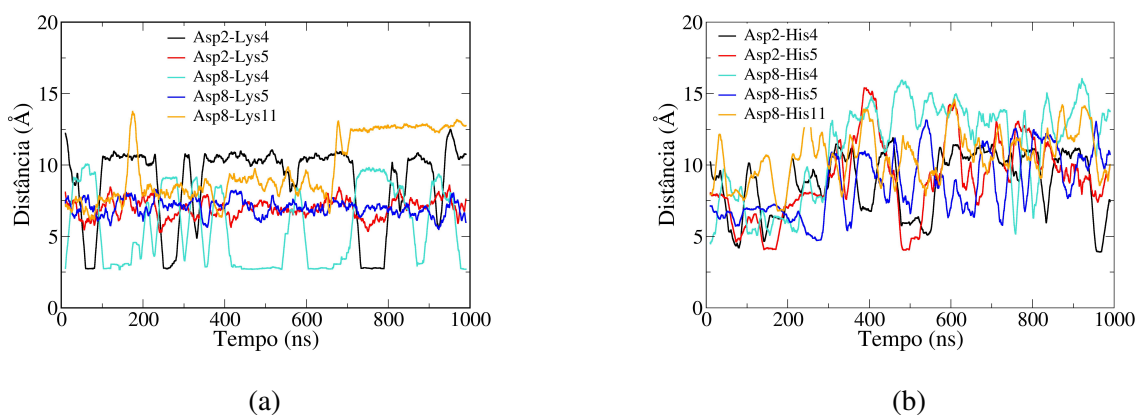
Figura 4.2: Porcentagem do tempo total da trajetória em que a ligação de hidrogênio entre os resíduos i e $i + 4$ do backbone existem para o MP1 e o H-MP1 em solução aquosa. O objetivo é observar o quão forte é a estruturação em α -hélice desses peptídeos no decorrer da simulação. O MP1 está representado em roxo e o H-MP1 em verde.

O STRIDE classifica o tipo da estrutura secundária com base nos ângulos diedrais ϕ e ψ , além das ligações de hidrogênio presentes no backbone. Fazendo as mesmas análises com o software DSSP [135], que não considera os ângulos de diedro, temos aproximadamente os mesmos valores de porcentagem de α -hélice, apenas um resíduo a menos se encontra nessa conformação. Os dois softwares são precisos em classificar a estrutura secundária de proteínas, no entanto, tendem a superestimar o conteúdo de α -hélice em peptídeos e proteínas pequenas [136]. Na tentativa de se obter uma melhor estimativa do conteúdo de α -hélice nesses peptídeos foi analisada a persistência das ligações de hidrogênio entre os resíduos i e $i + 4$ do *backbone*. A figura 4.2 apresenta a porcentagem do tempo de simulação que cada ligação de hidrogênio entre a carbonila de cada resíduo de aminoácido i e o grupo amino do resíduo $i + 4$ para os dois peptídeos. A figura também mostra que apenas cinco resíduos estão envolvidos em ligações de hidrogênio durante, pelo menos, 50% da simulação, indicando aproximadamente 36% de estrutura helicoidal estável para o MP1 (em roxo), em acordo com os resultados experimentais ($\sim 30\%$). Para o H-MP1 (em verde) pode-se notar que as ligações de hidrogênio foram persistentes por apenas 20% do tempo e, conseqüentemente, a porcentagem de resíduos em α -hélice é muito baixa, o que também está em bom acordo com os resultados experimentais ($\sim 10\%$).

Outra análise estrutural que pode ser relevante para investigar o papel das cadeias

laterais na estabilização da α -hélice é olhar para as pontes salinas formadas entre resíduos carregados. Pontes salinas são interações de longo alcance e não direcionais, podendo ser formadas também quando a estrutura está em random coil, enquanto ligações de hidrogênio no backbone são interações de curto alcance e direcionais. Em peptídeos baseados em alaninas, as pontes salinas ajudam a manter os resíduos carregados mais próximos, favorecendo a formação de ligações de hidrogênio $i-i + 4$ no backbone que são necessárias para que o peptídeo adquira uma conformação em α -hélice [137–139].

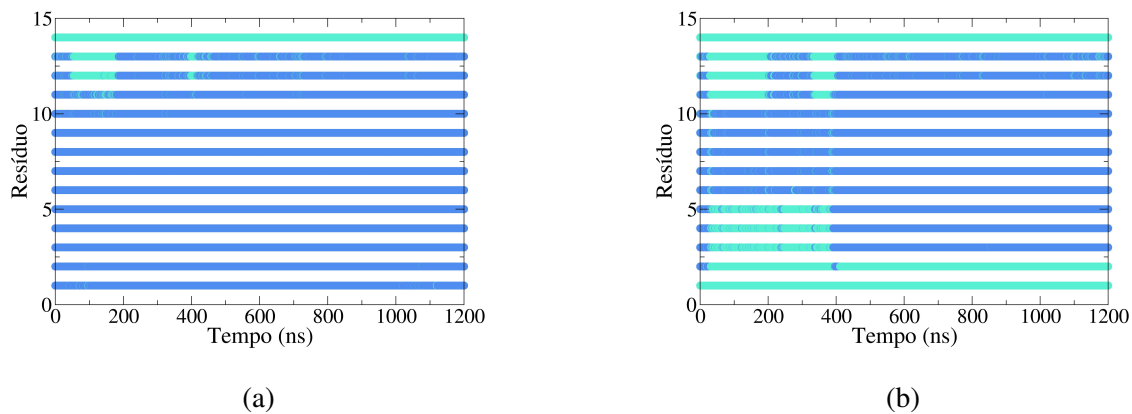
Para o MP1 em solução aquosa e 150 mM de NaCl, representado na figura 4.3a, pode-se perceber que as distâncias entre a lisina 4 (Lys4) e os ácidos aspárticos (Asp2 e Asp8) são compatíveis com a formação de duas pontes salinas que parecem comutar durante a simulação, com uma prevalência maior da Asp8-Lys4. Por outro lado, as distâncias entre os ácidos aspárticos e as histidinas no H-MP1, representadas na figura 4.3b, apresentam valores bem maiores, sugerindo que pontes salinas quase não se formaram, o que pode explicar a baixa porcentagem de conformação helicoidal desse peptídeo em solução aquosa, pois os resíduos carregados não se aproximam o suficiente para que haja interação e, em seguida, formação da hélice. As cadeias laterais das lisinas e histidinas, embora possam adquirir a mesma carga, possuem comprimentos diferentes, a cadeia lateral da lisina é bem mais comprida fazendo que esse peptídeo consiga ter uma aproximação maior dos ácidos aspárticos do que as histidinas, e favorecendo a formação das pontes salinas. Esses peptídeos então podem, em determinadas circunstâncias, apresentar cargas iguais sendo estruturalmente diferentes, resultando assim em afinidades diferentes pela bicamada.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4.3: Distância das pontes salinas entre os aminoácidos carregados dos peptídeos MP1 na figura (a) e H-MP1 na figura (b) para as simulações dos mesmos em solução aquosa. Ligações entre os resíduos 2 e 4 estão representadas em preto, 2 e 5 em vermelho, 8 e 4 em ciano, 8 e 5 em azul e 8 e 11 em laranja.

Como esperado dado o espectro de CD, concomitantemente à adsorção dos peptídeos na bicamada, acontece um aumento significativo na estrutura secundária em conformação helicoidal. As figuras 4.4a e 4.4b apresentam a estrutura secundária que cada resíduo adquire ao longo de 1.2 μ s de simulação para o MP1 e o H-MP1 na presença da bicamada lipídica. Essas figuras mostram que no MP1, após a adsorção (em \sim 200 ns), 13 resíduos se encontram em conformação α -hélice, o que corresponde a 93% de conteúdo helicoidal, acima do resultado experimental obtido. Já o peptídeo H-MP1 perde a maior parte da sua estrutura helicoidal nos primeiros 400 ns, depois disso, quando o peptídeo adsorve completamente (processo que será melhor detalhado na próxima seção), o peptídeo recupera a sua estrutura em α -hélice, apresentando 11 resíduos nessa conformação, o que corresponde a 79% do peptídeo, uma porcentagem novamente acima da obtida experimentalmente.



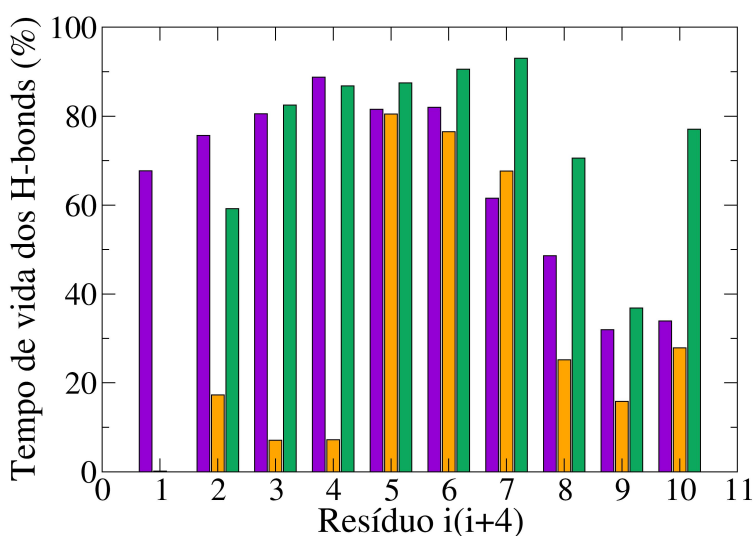
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4.4: Estrutura secundária de cada aminoácido durante a simulação, (a) MP1 e (b) H-MP1. Na cor azul quando o resíduo apresenta estrutura secundária em conformação α -hélice, ciano para conformação *random coil* e vermelho para folha- β . O MP1 está adsorvido na bicamada a partir de 100 ns do tempo de simulação, e o H-MP1 a partir de 400 ns. É importante notar que após a adsorção a porcentagem de conformação α -hélice da estrutura secundária aumenta.

O cálculo da porcentagem de tempo em que as ligações de hidrogênio $i-i + 4$ no *backbone* estão formadas (figura 4.5) melhorou a estimativa da estrutura secundária comparado com os resultados experimentais. Para o peptídeo MP1 adsorvido na bicamada as ligações de hidrogênio do *backbone* entre os pares de resíduos de 1-4 até 7-11 permaneceram por pelo menos 50% do tempo de simulação, correspondendo a sete em dez possibilidades, ou seja, oito resíduos que estão mais prováveis de estar em conformação de α -hélice. Comparando esses resultados com os obtidos na figura 4.2, que mostram as mesmas ligações de hidrogênio para a simulação do mesmo peptídeo no bulk, o MP1 tem cinco ligações de hidrogênio (2-5 até 6-10) que existem por mais de 50% do tempo de simulação, o que in-

dica um aumento na estrutura em conformação de α -hélice com a adsorção do peptídeo na bicamada. Esses resultados também mostram que a região C-terminal está, na maior parte do tempo, em conformação não-helicoidal, assumindo uma estrutura secundária em *random coil* como também visto na figura 4.1.

O perfil de ligações de hidrogênio $i-i + 4$ do *backbone* para o H-MP1 mostra um comportamento diferente antes e depois de ocorrer a completa adsorção. No início da simulação, quando apenas a porção N-terminal do peptídeo adsorve e o peptídeo está perpendicular à superfície do plano da bicamada (figura 4.9b), o conteúdo helicoidal diminui, e as ligações de hidrogênios que são estáveis por mais de 50% do tempo diminuem de dez para três (barras laranja na figura 4.5). Esse é um estado intermediário observado entre o peptídeo em 150 mM NaCl em solução aquosa (figura 4.2 - completamente desenovelado), e sua conformação depois de 400 ns, quando o peptídeo está completamente adsorvido e oito de dez $i-i + 4$ ligações de hidrogênio estão estáveis pela maior parte do tempo (barras magenta na figura 4.5).



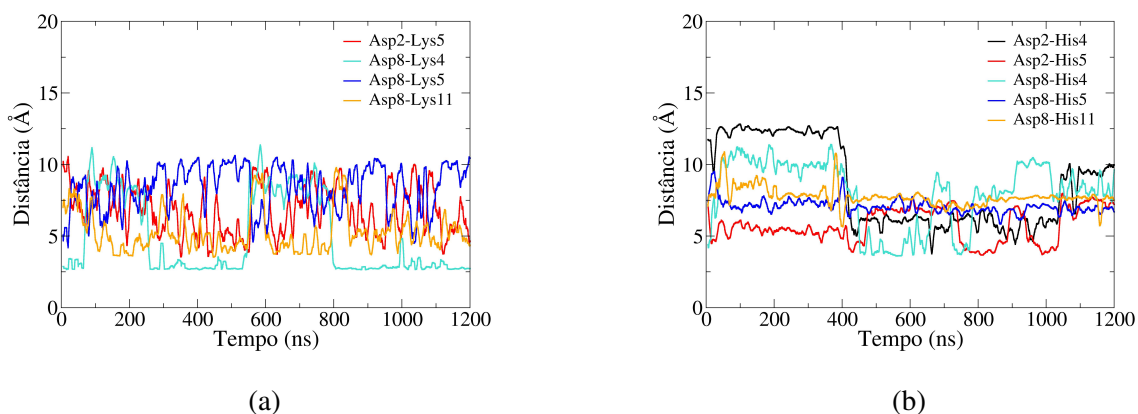
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4.5: Porcentagem do tempo em que a ligação de hidrogênio entre os resíduos $i-i + 4$ do *backbone* existe na simulação para MP1 e H-MP1 a fim de investigar a estabilidade da estrutura de α -hélice durante a simulação. O MP1 está representado em roxo e o H-MP1 está dividido em duas situações: antes da adsorção completa em laranja, e depois em verde.

Até onde sabemos, essa é a primeira vez que o processo de enovelamento para um análogo do peptídeo MP1 é observado em resolução atômica. Pelas nossas simulações, é possível observar em detalhes a mudança de estrutura secundária do peptídeo em estado desenovelado (*random coil*) no *bulk*; o estado intermediário quando o N-terminal adsorve

e o peptídeo começa a sentir a influência da bicamada na sua estrutura secundária; e o estado enovelado quando o peptídeo está totalmente adsorvido, paralelo ao plano da bicamada, em uma hélice anfipática com conformação rica em α -hélice induzida pela interface hidrofílica/hidrofóbica da bicamada.

A respeito das pontes salinas, pode-se notar que na simulação em que ocorre a adsorção do MP1, a Lys4 forma uma ponte salina estável com o Asp8 (figura 4.6a), como também observado na simulação do mesmo peptídeo em solução aquosa. Para o H-MP1, após a adsorção do N-terminal no início da simulação, a distância entre Asp2 e His5 (figura 4.6b) indica uma ponte salina que provavelmente sustenta a estrutura em α -hélice na região central do peptídeo. Depois de 400 ns, quando o peptídeo inteiro adsorve, outra ponte salina é formada entre o Asp8 e His4 que possivelmente influencia no enovelamento do peptídeo.



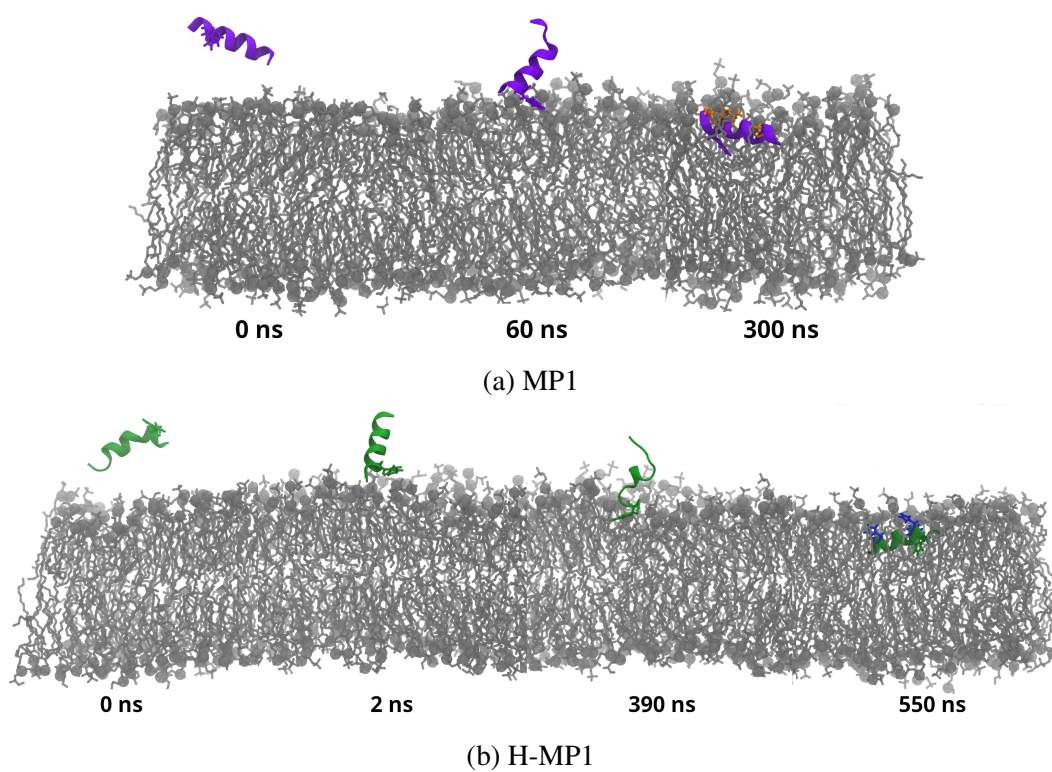
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4.6: Distância das pontes salinas formadas entre os aminoácidos carregados dos peptídeos (a) MP1 e (b) H-MP1 para as simulações na presença da bicamada. Ligações entre os resíduos 2 e 4 estão representadas em preto, 2 e 5 em vermelho, 8 e 4 em ciano, 8 e 5 em azul e 8 e 11 em laranja.

4.1.2 Processo de adsorção

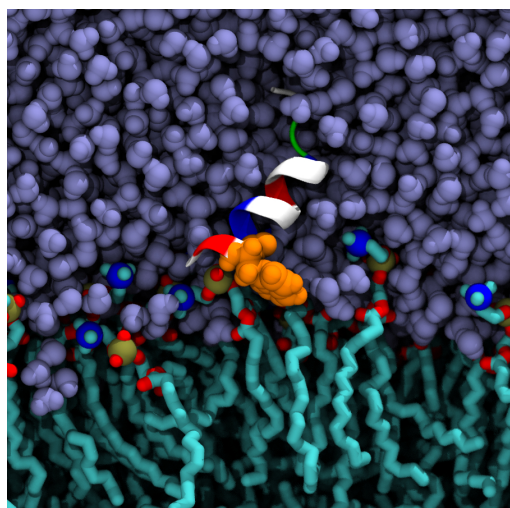
Nossas simulações de DM fornecem informações úteis em resolução atômica dos processos de adsorção dos dois peptídeos à bicamada aniônica (7POPC:3POPG). As evidências mostram que a adsorção de ambos os peptídeos, de maneira simplificada, se inicia pela inserção do N-terminal carregado positivamente na bicamada como observado nas figuras 4.7 e 4.8. Depois desse primeiro contato, o sistema evolui até que a porção central e o C-terminal amidado também adsorvem e a orientação final desse peptídeo é paralela ao plano da bicamada, com o C-terminal ligeiramente inclinado para a região hidrofóbica da bicamada. É possível notar que, quando adsorvido, o resíduo de triptofano dos dois peptídeos se insere na interface hidrofílica/hidrofóbica da bicamada, o que é esperado considerando os experimentos de fluorescência *quenching*, cujo resultado também pode ser observado no manuscrito em anexo.

A figura 4.7 descreve como o processo de adsorção ocorre. Pode se notar pela figura 4.7a, que mostra o processo de adsorção do peptídeo MP1, que ele inicia a simulação na solução, se aproxima da bicamada sofrendo uma alteração conformacional na porção C-terminal de α -hélice para *random coil*, e depois, o peptídeo se insere completamente na bicamada em posição paralela à superfície e sua configuração retorna para a estrutura secundária predominantemente em α -hélice. Na figura 4.7b podemos observar esse processo para o H-MP1. A adsorção ocorre de forma semelhante ao que acontece para o MP1. A diferença é que esse processo foi mais lento nessas simulações, e o peptídeo adquire mais conformação em *random coil* do que o MP1 enquanto está fora da bicamada. Entretanto, após a adsorção esse peptídeo retorna à estrutura predominante em α -hélice similar à encontrada para o MP1.

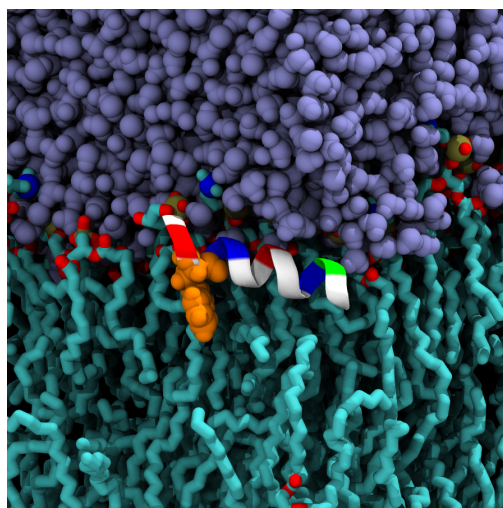


Fonte: Elaborado pelo autor.

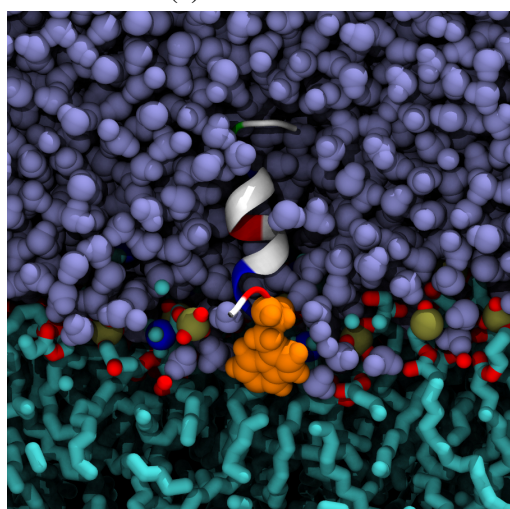
Figura 4.7: Processo de adsorção dos peptídeos antimicrobianos MP1 em roxo (a) e H-MP1 em verde (b). A bicamada está representada em cinza nas das duas figuras.



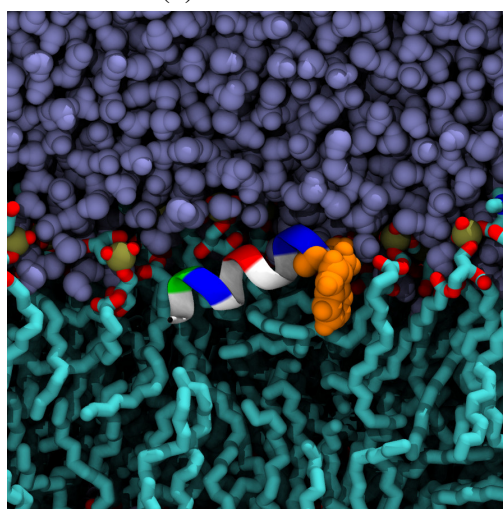
(a) MP1 - 70 ns



(b) MP1 - 200 ns



(c) H-MP1 - 100 ns



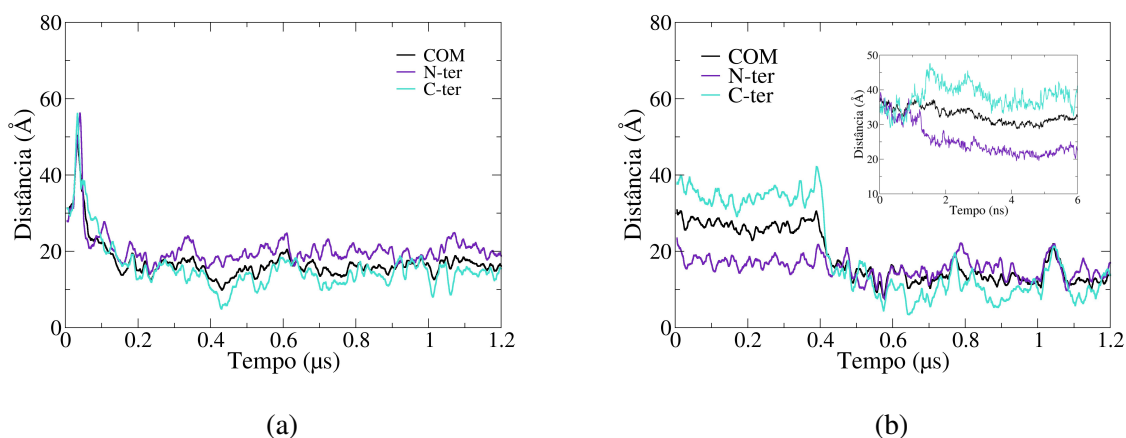
(d) H-MP1 - 500 ns

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4.8: *Snapshots* das simulações em que foram observadas a adsorção dos dois peptídeos estudados. (a) e (c) Instante em que os peptídeos primeiramente tocam a bicamada com o N-terminal carregado. Pode-se notar que parte da estrutura secundária se configura em *random coil*. (b) e (d) Peptídeos após a adsorção completa, paralelos à bicamada, com estrutura majoritariamente helicoidal, com a face hidrofóbica em contato com as cadeias acílicas e a hidrofílica com as cabeças polares e água. Destaque para o triptofano posicionado na interface hidrofílica/hidrofóbica como indicado por experimentos de fluorescência. Os peptídeos estão representados em *cartoon* e coloridos pelo tipo de resíduo (resíduos hidrofóbicos representados em branco, positivos em azul, negativos em vermelho e polares não-carregados em verde). O resíduo de triptofano (TRP) está representado em laranja, as moléculas de água em *iceblue*, lipídeos pelo nome de cada átomo: carbonos em ciano, nitrogênios em azul, oxigênios em vermelho e fósforos em dourado.

A orientação de cada peptídeo em relação à bicamada lipídica no decorrer da simulação pode ser obtida de forma quantitativa medindo as distâncias do N- e C-terminal e

também do centro de massa (COM) dos peptídeos ao COM da bicamada em cada configuração da simulação. Essas distâncias, apresentadas na figura 4.9a para o MP1, mostra que a adsorção acontece pela aproximação do N-terminal em aproximadamente 70 ns, então em 180 ns o peptídeo se insere, quase que por inteiro, paralelo à superfície da bicamada (no plano XY). Para o H-MP1, mostrado na figura 4.9b, em 6 ns do tempo de simulação o N-terminal se aproxima da bicamada e começa a se inserir na região hidrofílica da bicamada até 50 ns de simulação. A adsorção completa ocorre após 400 ns na mesma orientação que o MP1. As distâncias do COM (linha preta), C-terminal (ciano) e N-terminal (roxo) do COM da bicamada antes de 400 ns mostram o peptídeo orientado perpendicularmente à bicamada e, após esse tempo, essas distâncias são praticamente as mesmas até o final da simulação, o que indica que o peptídeo se re-orienta a fim de se posicionar paralelamente à bicamada, em orientação similar à do MP1. Esses resultados mostram que a interação entre o N-terminal positivo e os grupos fosfato da bicamada parecem ser o fator direcionador da adsorção para os dois peptídeos. Entretanto, como pode-se ver também na figura 4.9b, após a adsorção, o C-terminal do peptídeo fica mais enterrado na bicamada, provavelmente devido à amidação do C-terminal (que o torna não-carregado) e a predominância de resíduos hidrofóbicos dessa região. Também foi observado que, uma vez adsorvidos, os peptídeos permanecem nessa condição até o fim da simulação.

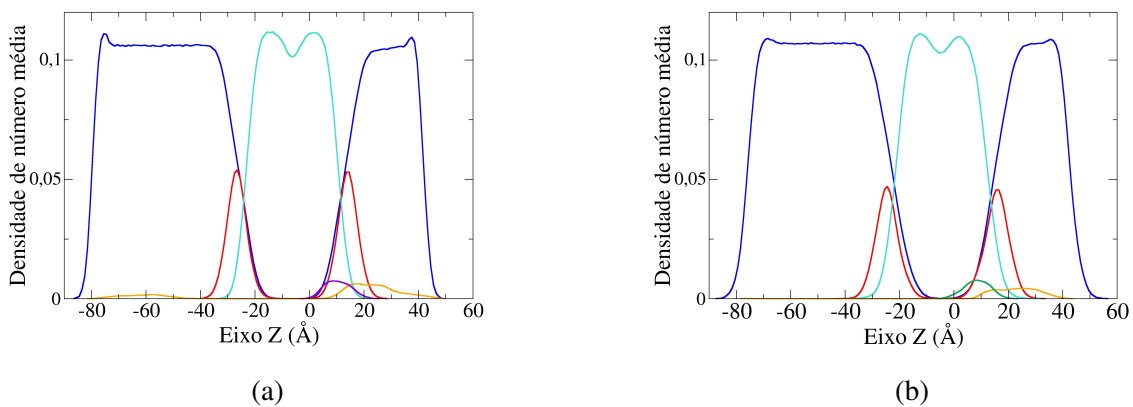


Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4.9: Distância entre diferentes regiões dos peptídeos ao centro de massa da bicamada lipídica. Três posições para ambos os peptídeos foram consideradas aqui, o centro de massa (COM) considerando o peptídeo inteiro em preto, o N-terminal como sendo o centro de massa do primeiro resíduo (Ile1) em roxo o C-terminal sendo o centro de massa do último resíduo (Leu14) em ciano. (a): MP1, (b): H-MP1, *inset*: nos primeiros 6 nanossegundos da simulação, quando o peptídeo está fora da bicamada (mais de 20 Å de distância), podemos ver que o peptídeo começa paralelo à bicamada e rapidamente muda para uma orientação perpendicular e começa a se aproximar da bicamada.

Apesar da distância entre o peptídeo e o centro de massa da bicamada nos fornecer informações acerca da dinâmica de adsorção dos peptídeos, também é importante investigar o ambiente no qual o peptídeo está inserido na bicamada. Essa análise é possibilitada através de cálculos do perfil de densidade de número para a bicamada, água, e peptídeo antes e depois da adsorção, apresentados na figura 4.10. O papel desse ambiente e as alterações eletrostáticas que são observadas nos peptídeos devido a ele serão melhor discriminados na seção 4.2.

Os resultados indicam que o perfil de densidade do peptídeo se move de fora da bicamada para dentro da bicamada no decorrer da simulação, ficando completamente inserido na interface hidrofílica/hidrofóbica, região onde coexistem água e as cabeças polares dos fosfolípidos. A orientação dos aminoácidos dos peptídeos adsorvidos nessa região está indicado na figura 4.8 que mostrou essa posição em mais detalhes, em que a face hidrofóbica do peptídeo fica enterrada na região das caudas acílicas da bicamada, enquanto os resíduos hidrofílicos interagem com água e as cabeças polares dos fosfolípidos. A combinação dessas duas análises nos fornecem o detalhamento da posição que o peptídeo adquire na bicamada após adsorção. Com isso as interações de cada aminoácido do peptídeo com a bicamada podem ser observadas também em mais detalhes, e os resultados serão explicitados nas seções posteriores.

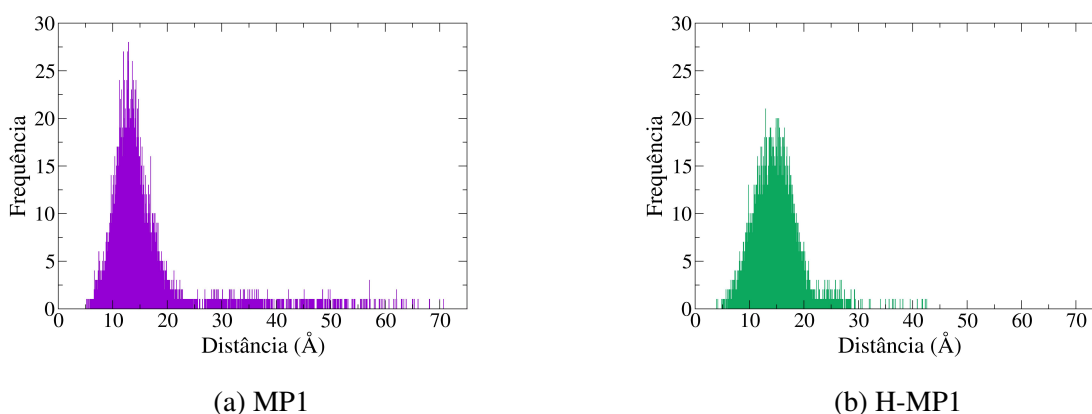


Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4.10: Perfil de densidade de número para as simulações dos dois peptídeos, MP1 em (a) em que o peptídeo adsorvido está representado em roxo e o HMP1 em (b) em que o peptídeo adsorvido está representado em verde, em ambas as figuras a bicamada de 7POPC:3POPG e solução aquosa. A água está representada em azul, as cabeças polares em vermelho, as cadeias acílicas em ciano, e os peptídeos antes de ocorrer a adsorção em laranja.

O posicionamento dos peptídeos na bicamada (figura 4.8) concorda com a posição média do triptofano obtida experimentalmente a partir da constante de Stern-Volmer (K_{SVV}/K_{SVB}) em experimentos de supressão de fluorescência do triptofano por acrilamida [105]. Para fins de comparação, foi gerado o histograma de frequências da posição em que o triptofano se encontra no decorrer da simulação, apresentados na figura 4.11. Essa análise foi realizada medindo a distância do centro de massa do Trp3 de ambos os peptídeos em relação ao centro de massa da bicamada durante a simulação.

A distância mais frequente obtida pra o MP1 é um pico bem estreito centrado entre 11,3 e 14,7 Å, e para o H-MP1 um pico um pouco mais largo entre 12,9 e 16,5 Å. Desse resultado podemos concluir que o Trp se insere na bicamada e fica posicionado na interface hidrofílica/hidrofóbica (a localização dessa interface pode ser observada na figura 4.10), como mostrado também na figura 4.8 e que foi constatado no experimento. Essa disposição também era esperada já que a estrutura do anel bicíclico indol da cadeia lateral do triptofano apresenta grupos químicos hidrofílicos e hidrofóbicos fazendo com que a localização na interface seja o ambiente mais apropriado. Da dinâmica molecular, podemos também notar que o resíduo de triptofano do MP1 está um pouco mais enterrado na fase hidrofóbica se comparado ao triptofano do H-MP1, o que está em bom acordo com os resultados de fluorescência *quenching*.



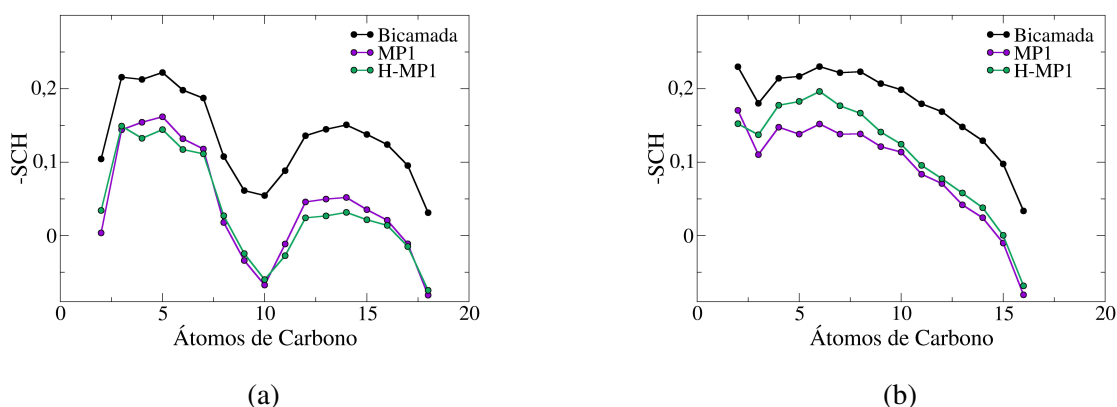
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4.11: Histograma das distâncias entre o centro de massa do triptofano dos peptídeos (Trp3) e o centro de massa da bicamada durante a simulação, mostrando qual é a distância mais frequente entre esse aminoácido e o CM da bicamada. Em (a) para o MP1 e em (b) para o H-MP1.

4.1.3 Alterações na bicamada

Como observado, os dois peptídeos adsorvem na bicamada lipídica em posição paralela à superfície adquirindo estrutura secundária em α -hélice. Esse processo de adsorção, bem como as alterações conformacionais que esses peptídeos sofrem foram compreendidas nas seções anteriores. No entanto, as discussões foram mais focadas no ponto de vista dos peptídeos, sendo importante também observar as alterações que a bicamada sofre com a adsorção desses peptídeos. Para isso, podemos fazer uso do parâmetro de ordem. Os resultados estão apresentados na figura 4.12.

O parâmetro de ordem foi calculado para bicamada lipídica sem a adsorção de nenhum peptídeo para as duas cadeias acílicas dos lipídeos (palmitoil e oleil) a fim de comparar o que acontece com essas cadeias quando o peptídeo está adsorvido na bicamada. Nessas situações foram utilizados os lipídios que estão mais próximos (10 Å) ao peptídeo adsorvido a fim de realmente monitorar a perturbação local que esses peptídeos causam. O cálculos foram realizados utilizando 50 ns de simulação em que os peptídeos se encontram adsorvidos.

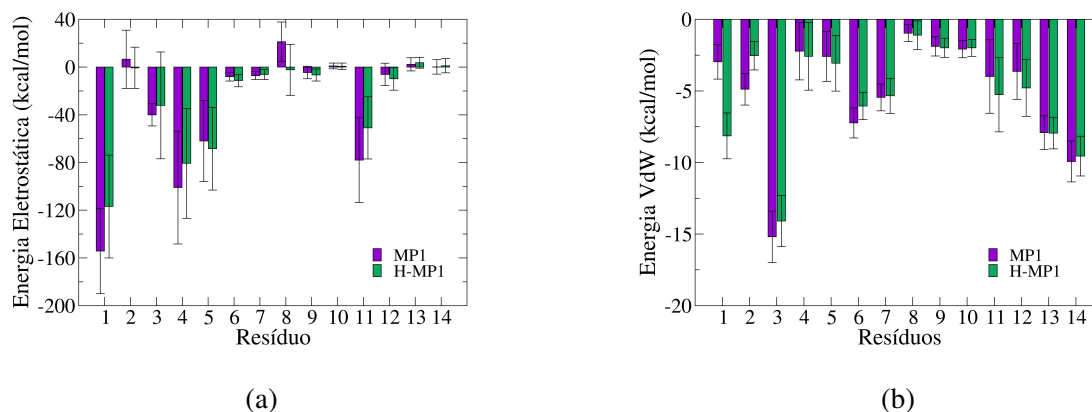


Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4.12: Parâmetros de ordem calculados para as cadeias acílicas dos lipídios da bicamada na ausência de peptídeo na caixa de simulação (em preto), com o peptídeo MP1 adsorvido na bicamada (em roxo) e com o peptídeo H-MP1 adsorvido na bicamada (em verde). Para os gráficos onde o peptídeo está adsorvido o parâmetro de ordem foi calculado apenas para os lipídios que estejam a uma distância do peptídeo de no máximo 10 Å. Em (a) estão apresentados os resultados calculados para a cadeia insaturada e em (b) para a cadeia saturada de ambos os lipídeos, POPC e POPG.

Pode-se notar pela figura 4.12 que a adsorção dos peptídeos diminuiu a ordem das duas cadeias acílicas, na cadeia insaturada a ordem foi praticamente a mesma com a adsorção dos dois peptídeos. Na cadeia saturada a ordem foi um pouco menor para o MP1 do que para o H-MP1, mostrando que o MP1 causou uma maior perturbação no empaco-

tamento lipídico. A diminuição da ordem desses lipídeos indica uma maior fluidez localizada nessa região da bicamada, causada por uma maior dispersão das cadeias acílicas. Por Dinâmica Molecular, observando a adsorção de apenas um peptídeo não foi possível constatar formação de poro na bicamada, ou vazamento de moléculas de água através da bicamada lipídica. No entanto, a diminuição da ordem desses lipídeos é uma evidência da desestruturação do empacotamento lipídico causado pela adsorção dos peptídeos que pode levar ao vazamento e, em grande escala, à morte celular do micro-organismo invasor ou seja, demonstrando a potencial efetividade da ação anti-microbiana desses peptídeos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4.13: Média da energia eletrostática em (a) e energia de Van der Waals em (b) da interação entre cada resíduo de aminoácido dos peptídeos MP1 (IDWKKLLDAAKQIL-NH₂) e H-MP1 (IDWHLLDAAHQIL-NH₂) e os fosfolípídeos da bicamada e seus respectivos desvios padrão. MP1 está representado em roxo e o H-MP1 em verde.

4.1.4 Análises energéticas

Outra informação importante que as simulações de DM fornecem, e que é mais difícil de se obter dos experimentos, é a respeito das interações detalhadas dos resíduos de aminoácidos dos peptídeos com a bicamada lipídica. Energias de interações eletrostáticas e de Van der Waals foram obtidas via *NAMD energy plugin* no VMD entre cada resíduo e a bicamada lipídica inteira para todos os *frames* da simulação, então, a média e o desvio padrão foram calculados para os últimos 500 ns da simulação, quando os peptídeos estão inteiramente adsorvidos. Os resultados obtidos estão mostrados nas figuras 4.13a e 4.13b, discretizados para cada resíduo.

A figura 4.13a mostra que a interação eletrostática mais intensa ocorre entre a carga positiva do grupo amino do N-terminal dos peptídeos e a bicamada, mais especificamente, os grupos fosfato. O fato dessa interação ser a mais intensa pode explicar porque a adsorção dos peptídeos começa pelo N-terminal, uma vez que a interação eletrostática é de longo alcance e pode ter sido guia para o início da adsorção. Essa interação é mais pronunciada no MP1 do que no análogo. As lisinas contribuem com praticamente metade da energia que o N-terminal contribui. Os dois resíduos ácidos (Asp2 e Asp8) mostram energia de interação eletrostática com a bicamada ligeiramente desfavorável. A orientação que o peptídeo se insere na bicamada, já constatada anteriormente, faz com que esses resíduos fiquem em uma posição na qual a interação atrativa com os grupos colina ficam parcialmente deslocadas pela interação repulsiva com os grupos fosfato gerando valores de energia desfavoráveis mas de pequena magnitude. Observando os valores obtidos para o H-MP1, temos o

mesmo comportamento qualitativo do MP1, com o N-terminal e resíduos básicos sendo os de interação mais favorável e os ácidos ligeiramente desfavoráveis. Além disso, pode-se notar que todos os resíduos do H-MP1 mostram menor interação eletrostática do que as do MP1 e para a histidina 5 o valor é praticamente o mesmo. Esses resultados, junto aos apresentados nas seções anteriores, sustentam a hipótese de que o MP1 interage mais fortemente com a bicamada, fica mais enterrado e causa uma maior perturbação do empacotamento lipídico do que o H-MP1, mesmo que esses peptídeos tenham a mesma carga líquida.

As energias de interação de Van der Waals mais favoráveis foram pelo menos 10 vezes menos intensas quando comparadas com a interação eletrostática mais forte (grupo amino do N-terminal). O resíduo de triptofano possui a contribuição de energia de VDW mais pronunciada e de magnitude similar para ambos os peptídeos. Apesar de o Trp3 possuir a energia de VDW mais favorável (~ -14 kcal/mol), a grandeza é menos da metade do que a comparada para a energia eletrostática do mesmo aminoácido (~ -40 kcal/mol). Mesmo assim, o valor dessas duas energias é significativo e mostra o contato desse peptídeo com a interface hidrofílica/hidrofóbica. As energias de VDW de outros resíduos não-polares Leu6 e Leu7, posicionados na região hidrofóbica da bicamada, estão bem abaixo do valor da energia do Trp3 enquanto Ile13 e Leu4 no C-terminal são praticamente metade da energia obtida para o Trp3 para os dois peptídeos. Para o Asp2 o valor é praticamente o mesmo do que da energia eletrostática desfavorável obtida, sugerindo que essas energias podem se compensar. Mesmo com a dificuldade em se estimar energias eletrostáticas e de VDW no processo de adsorção experimentalmente, a comparação das constantes de partição, que podem ser observadas nos resultados experimentais no manuscrito, para o H-MP1 considerando cargas líquidas diferentes (em pH 5,5 e 7,4), evidencia a dominância das interações eletrostáticas na adsorção dos peptídeos o que mantém a estabilidade do mesmo quando adsorvido na bicamada.

É importante notar que o estado de protonação de cada aminoácido é o mesmo no decorrer da simulação, o que é uma limitação desse método de Dinâmica Molecular convencional utilizado. Dessa forma, análises de carga onde o estado de protonação dos resíduos possa variar com o tempo pode nos fornecer detalhes mais específicos no âmbito da eletrostática. Para isso, simulações de Dinâmica a pH constante também foram realizadas para esse sistema a fim de fornecer uma melhor descrição do papel de regulação de carga no processo de adsorção. Os resultados serão apresentados na próxima seção.

4.2 Análises de regulação de carga da adsorção dos peptídeos por CpHMD

As análises das interações eletrostáticas apresentadas anteriormente mostram que a regulação de carga é fator importante na seletividade e especificidade desses peptídeos pela bicamada aniônica. Logo, simulações de CpHMD, em que os resíduos ácidos e básicos podem variar seus estados de protonação no decorrer da simulação, são uma alternativa apropriada para investigar a relação entre a adsorção dos peptídeos e regulação de carga. Para isso, três situações (obtidas das simulações de DM convencional) foram consideradas como configurações para se realizar essas simulações: o peptídeo em solução, a 1 nm da superfície da bicamada e adsorvido. Comparando as cargas que o peptídeo adquire nessas três situações para um dado pH é possível determinar como o ambiente afeta o estado de protonação dos resíduos e, por consequência, sua seletividade pela membrana bacteriana.

Foram realizados quase 10 μ s de simulação divididos em 9 a 24 réplicas desses sistemas, sendo os sistemas com a presença da bicamada os maiores em tempo computacional. Esses três *setups* de simulações para cada um dos dois peptídeos foram realizados em três diferentes pHs: 5,5, 6,5 e 7,4.

Em termos dinâmicos, foi observado apenas um certo desenovelamento dos H-MP1 em solução aquosa, da mesma maneira que acontece na DM convencional. Nas simulações em que o peptídeo inicia fora da bicamada não foi observada adsorção, e nas simulações do peptídeo já adsorvido também não foi observado nenhum desligamento do peptídeo da bicamada. Já do ponto de vista eletrostático, mudanças do estado de protonação de cada resíduo ionizável dos peptídeos foram observadas nos diferentes pHs e configurações, apresentados nas tabelas 4.1 e 4.3. Essas frações protonadas foram então utilizadas para estimar a carga média de cada peptídeo nessas configurações, que estão apresentadas nas tabelas 4.2 e 4.4.

Tabela 4.1: Fração protonada para cada resíduo do peptídeo MP1 obtidas pelas simulações de CpHMD nas três configurações e três pHs diferentes.

	em solução aquosa		
	pH		
Resíduos	5.5	6.5	7.4
2:Asp	0.0061 ± 0.0005	0.0006 ± 0.0000	0.0001 ± 0.0000
4:Lys	1.0000 ± 0.0000	1.0000 ± 0.0000	1.0000 ± 0.0000
5:Lys	1.0000 ± 0.0000	1.0000 ± 0.0000	1.0000 ± 0.0000
8:Asp	0.0035 ± 0.0003	0.0004 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000
11:Lys	1.0000 ± 0.0000	1.0000 ± 0.0000	1.0000 ± 0.0000
	próximo à bicamada		
	pH		
Resíduos	5.5	6.5	7.4
2:Asp	0.6302 ± 0.0014	0.1569 ± 0.0008	0.0233 ± 0.0002
4:Lys	1.0000 ± 0.0000	1.0000 ± 0.0000	1.0000 ± 0.0000
5:Lys	1.0000 ± 0.0000	1.0000 ± 0.0000	1.0000 ± 0.0000
8:Asp	0.5752 ± 0.0015	0.1293 ± 0.0007	0.0188 ± 0.0001
11:Lys	1.0000 ± 0.0000	1.0000 ± 0.0000	1.0000 ± 0.0000
	adsorvido na bicamada		
	pH		
Resíduos	5.5	6.5	7.4
2:Asp	0.5363 ± 0.0018	0.0292 ± 0.0003	0.0022 ± 0.0000
4:Lys	1.0000 ± 0.0000	1.0000 ± 0.0000	1.0000 ± 0.0000
5:Lys	1.0000 ± 0.0000	1.0000 ± 0.0000	1.0000 ± 0.0000
8:Asp	0.6350 ± 0.0016	0.0582 ± 0.0004	0.0062 ± 0.0001
11:Lys	1.0000 ± 0.0000	1.0000 ± 0.0000	1.0000 ± 0.0000

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4.2: Cargas líquidas calculadas para o MP1

pH	em solução aquosa	próximo à bicamada	adsorvido na bicamada
5.5	2.010 ± 0.001	3.205 ± 0.003	3.171 ± 0.003
6.5	2.001 ± 0.000	2.286 ± 0.002	2.087 ± 0.001
7.4	2.000 ± 0.000	2.042 ± 0.000	2.008 ± 0.000

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4.3: Fração protonada para cada resíduo do peptídeo H-MP1 obtidas pelas simulações de CpHMD nas três configurações e três pHs diferentes.

	em solução aquosa		
	pH		
Resíduos	5.5	6.5	7.4
2:Asp	0.0030 ± 0.0003	0.0003 ± 0.0001	0.0000 ± 0.0000
4:His	0.4690 ± 0.0029	0.1204 ± 0.0015	0.0213 ± 0.0004
5:His	0.7410 ± 0.0023	0.2952 ± 0.0023	0.0566 ± 0.0008
8:Asp	0.0179 ± 0.0008	0.0092 ± 0.0005	0.0023 ± 0.0001
11:His	0.8804 ± 0.0015	0.4499 ± 0.0026	0.0988 ± 0.0011
	próximo à bicamada		
	pH		
Resíduos	5.5	6.5	7.4
2:Asp	0.5138 ± 0.0017	0.0874 ± 0.0007	0.0132 ± 0.0002
4:His	0.9946 ± 0.0002	0.9361 ± 0.0005	0.6363 ± 0.0019
5:His	0.9951 ± 0.0001	0.9684 ± 0.0004	0.8489 ± 0.0014
8:Asp	0.5477 ± 0.0017	0.0950 ± 0.0007	0.0119 ± 0.0002
11:His	0.9987 ± 0.0001	0.9928 ± 0.0002	0.9394 ± 0.0010
	adsorvido na bicamada		
	pH		
Resíduos	5.5	6.5	7.4
2:Asp	0.5646 ± 0.0015	0.1593 ± 0.0009	0.0243 ± 0.0002
4:His	0.9999 ± 0.0000	0.9981 ± 0.0001	0.9536 ± 0.0008
5:His	0.9982 ± 0.0001	0.9951 ± 0.0001	0.9346 ± 0.0010
8:Asp	0.7536 ± 0.0012	0.3015 ± 0.0013	0.0506 ± 0.0003
11:His	0.9999 ± 0.0000	0.9963 ± 0.0001	0.9415 ± 0.0009

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4.4: Cargas líquidas calculadas para o H-MP1

pH	em solução aquosa	próximo à bicamada	adsorvido na bicamada
5.5	1.111 ± 0.008	3.050 ± 0.004	3.316 ± 0.003
6.5	-0.125 ± 0.007	2.080 ± 0.003	2.450 ± 0.003
7.4	-0.821 ± 0.002	1.450 ± 0.005	1.905 ± 0.003

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados indicam que o pH local experimentado pelos peptídeos quando muito próximos à bicamada é menor do que o pH do *bulk*, facilitando a protonação dos resíduos ionizáveis e, por consequência, os peptídeos adquirem carga mais positiva, o que aumenta a interação eletrostática dos mesmos pela bicamada aniônica e facilita a adsorção. Esse efeito é mais eficiente e mais perceptível no análogo H-MP1, já que as histidinas são resíduos de aminoácidos que possuem pK_a muito próximo do pH fisiológico, mais próximo da faixa de pHs em que as simulações foram realizadas. Para o H-MP1 a adsorção do peptídeo na bicamada aumenta a carga do mesmo em aproximadamente duas unidades para todos os pHs, chegando ter uma carga negativa em solução aquosa e consideravelmente positiva quando adsorvido nos pHs 6,5 e 7,4. A diminuição do pH também influencia os estados de protonação dos resíduos ácidos Asp2 e Asp8 de ambos os peptídeos, o Asp2 passa mais tempo protonado do que o Asp8 em pH 5,5 mesmo que tenham aproximadamente a mesma quantidade de resíduos básicos vizinhos que possuem cargas similares.

As frações de protonação também podem ser usadas para calcular o pK_a aparente e o coeficiente de Hill para cada resíduo a partir da equação de Hill (4.1):

$$pH = pK_a + n * \log \left(\frac{[A^-]}{[AH]} \right) \quad (4.1)$$

onde pH é o pH da simulação, pK_a é o pK_a aparente obtido, n é o coeficiente de Hill, $[A^-]$ é a fração do tempo que o resíduo fica desprotonado, e $[AH]$ é a fração protonada.

Os valores de pK_a e coeficiente de Hill para os dois peptídeos nas três configurações estudadas foram calculados através do *script cphanalyze* disponibilizado pelo grupo que desenvolveu o método aqui utilizado, e estão apresentados nas tabelas 4.5 e 4.6.

Para as simulações em solução aquosa, o pK_a dos resíduos de histidina é similar ao pK_a de referência. Não foi possível obter os valores de pK_a e n para ácidos aspárticos em solução aquosa e lisinas em nenhuma das configurações devido à escolha dos valores pHs que foram utilizados para realizar as simulações. Nesses pHs não foi observada uma diferença entre estados protonado e desprotonado suficiente para que essas grandezas fossem calculadas. Entretanto, para o peptídeo próximo à bicamada e adsorvido, a amostragem dos estados de protonação foi suficiente para mensurar o pK_a dos resíduos de ácido aspártico de ambos os peptídeos e também dos resíduos de histidina.

Tabela 4.5: Valores de pK_a e coeficientes de Hill para os resíduos do MP1.*

Resíduos	próximo à bicamada		adsorvido na bicamada	
	pK_a	n	pK_a	n
2:Asp	5.74 ± 0.01	0.97 ± 0.01	5.53 ± 0.06	1.50 ± 0.11
8:Asp	5.64 ± 0.01	0.97 ± 0.01	5.65 ± 0.07	1.33 ± 0.11

Fonte: Elaborado pelo autor.

*os resultados para Asp em solução aquosa e para Lys nas três configurações estão omitidos por falta de amostragem.

Tabela 4.6: Valores de pK_a e coeficientes de Hill para os resíduos do H-MP1.*

Resíduos	em solução aquosa		próximo à bicamada		adsorvido na bicamada	
	pK_a	n	pK_a	n	pK_a	n
2:Asp	-	-	5.52 ± 0.02	1.02 ± 0.03	5.64 ± 0.05	0.90 ± 0.04
4:His	5.44 ± 0.03	0.84 ± 0.02	7.63 ± 0.02	1.04 ± 0.02	8.24 ± 0.05	1.56 ± 0.05
5:His	6.04 ± 0.03	0.88 ± 0.03	8.31 ± 0.00	0.82 ± 0.00	8.32 ± 0.19	1.26 ± 0.18
8:Asp	-	-	5.58 ± 0.00	1.06 ± 0.00	6.05 ± 0.04	0.92 ± 0.05
11:His	6.40 ± 0.00	0.96 ± 0.01	8.58 ± 0.14	1.02 ± 0.09	8.27 ± 0.03	1.38 ± 0.03

Fonte: Elaborado pelo autor.

*os resultados para Asp em solução aquosa estão omitidos por falta de amostragem.

Observando os valores de pK_a obtidos pode-se notar que nas simulações com a presença da bicamada, ou seja, quando os peptídeos sofrem a influência do potencial eletrostático gerado pela bicamada lipídica aniônica, o pK_a aparente desses resíduos sofre um aumento de aproximadamente duas unidades, o que pode ser explicado pelo pH local que esses resíduos experimentam que, na superfície da bicamada é aproximadamente 1 unidade mais baixo [57].

O pH na superfície da bicamada (pH_s) em relação ao pH do *bulk* (pH_b) pode ser obtido por:

$$pH_s = pH_b + \frac{F\psi_0}{2.3RT} \quad (4.2)$$

onde F é a constante de Faraday, ψ_0 é potencial da bicamada lipídica na superfície (que pode ser obtido através de experimentos de potencial zeta) e RT é a energia térmica [57, 140].

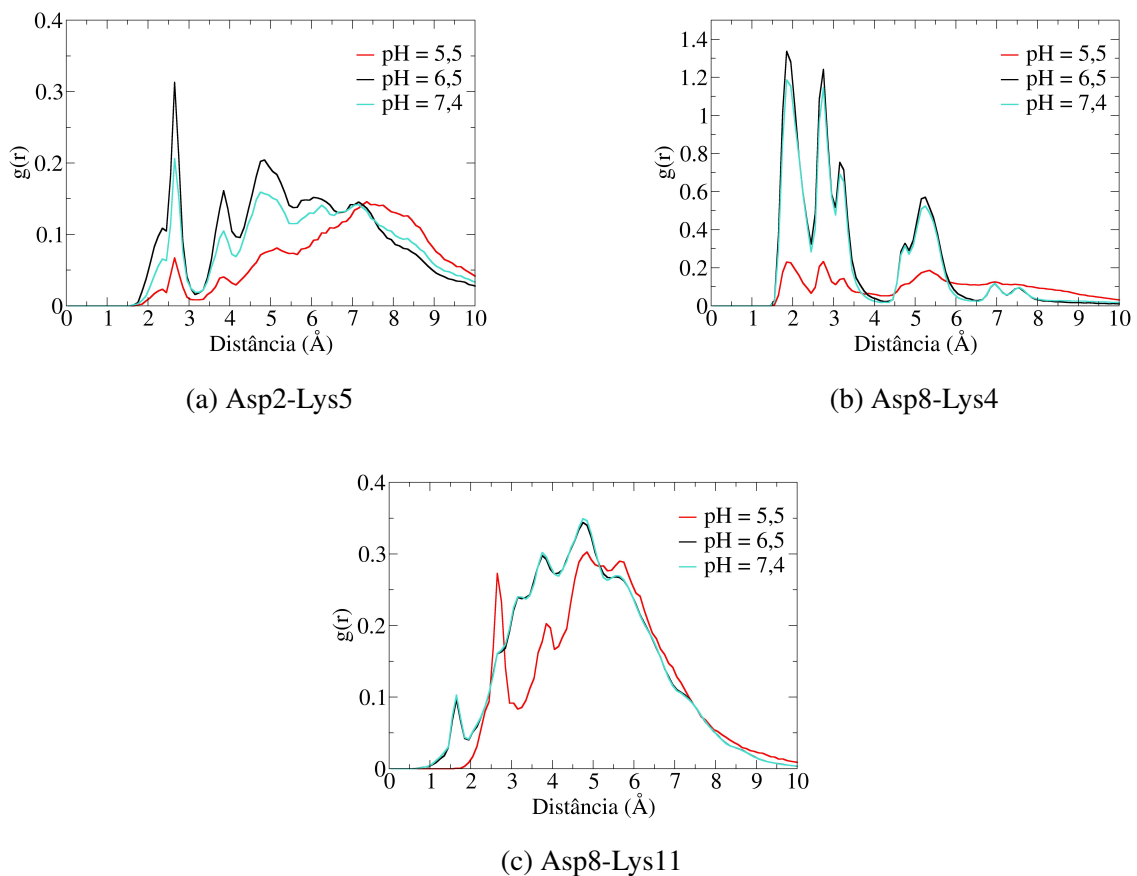
Utilizando o potencial zeta [57] para estimar o potencial da bicamada lipídica na superfície (ψ_0) temos que, quando pH do bulk é 5,5 o pH na superfície da bicamada é 4,7. Pode-se notar que essa diferença muda significativamente a fração de protonação dos resíduos ácidos, fazendo com que nesse pH a carga seja praticamente a mesma para os dois peptídeos (3,171 para o MP1 e 3,316 para o H-MP1). No pH 6,5 o pH da superfície da bicamada é 5,7, resultando em cargas 2,087 e 2,450 para o MP1 e para o H-MP1, respectivamente. No pH 7,4, na superfície da bicamada o pH é 6,6 e a fração de protonação das histidinas reduz significativamente, gerando uma carga líquida de 1,905 para o H-MP1 (para o MP1 a carga é de 2,008, muito próxima à calculada para o pH 6,5).

De todas as histidinas, a His 4 é a que sofre maior alteração do pK_a aparente. Esse resíduo está mais próximo da extremidade N-terminal do peptídeo, região essa que, no H-MP1, se encontra em configuração *random coil* (como observado na seção 4.1.1) conferindo maior flexibilidade a esse resíduo e a possibilidade de interagir com ambos ácidos aspárticos presentes nesse peptídeo. Esses resultados enfatizam que o ambiente que um determinado aminoácido experimenta influencia diretamente na propensão dele a ganhar ou perder próton, ou seja, no valor do seu pK_a .

O efeito de correlação da protonação entre os resíduos pode ser avaliado pelos valores dos coeficientes de Hill (n), que também estão apresentados nas tabelas 4.5 e 4.6. Quando o coeficiente de Hill de determinado resíduo é igual a 1, significa que a protonação do resíduo não é afetada pela protonação (ou desprotonação) de outros resíduos na proteína. Quando o coeficiente é maior do 1 que significa que a protonação de um resíduo favorece a protonação de outro, ou seja, o efeito na protonação dos resíduos é cooperativo. O oposto acontece quando o coeficiente de Hill é menor do que 1 e o processo é anti-cooperativo. A maioria dos resíduos apresenta coeficiente de Hill próximo de 1, com exceção dos resíduos de ácido aspártico do MP1 adsorvido na bicamada e nos resíduos de histidina do H-MP1 na mesma situação, em que o coeficiente de Hill varia entre 1,25 e 1,56. Sendo assim, além do efeito do potencial eletrostático da bicamada nos resíduos ionizáveis e no pH local, ele também influencia na cooperatividade de protonação dos resíduos citados acima.

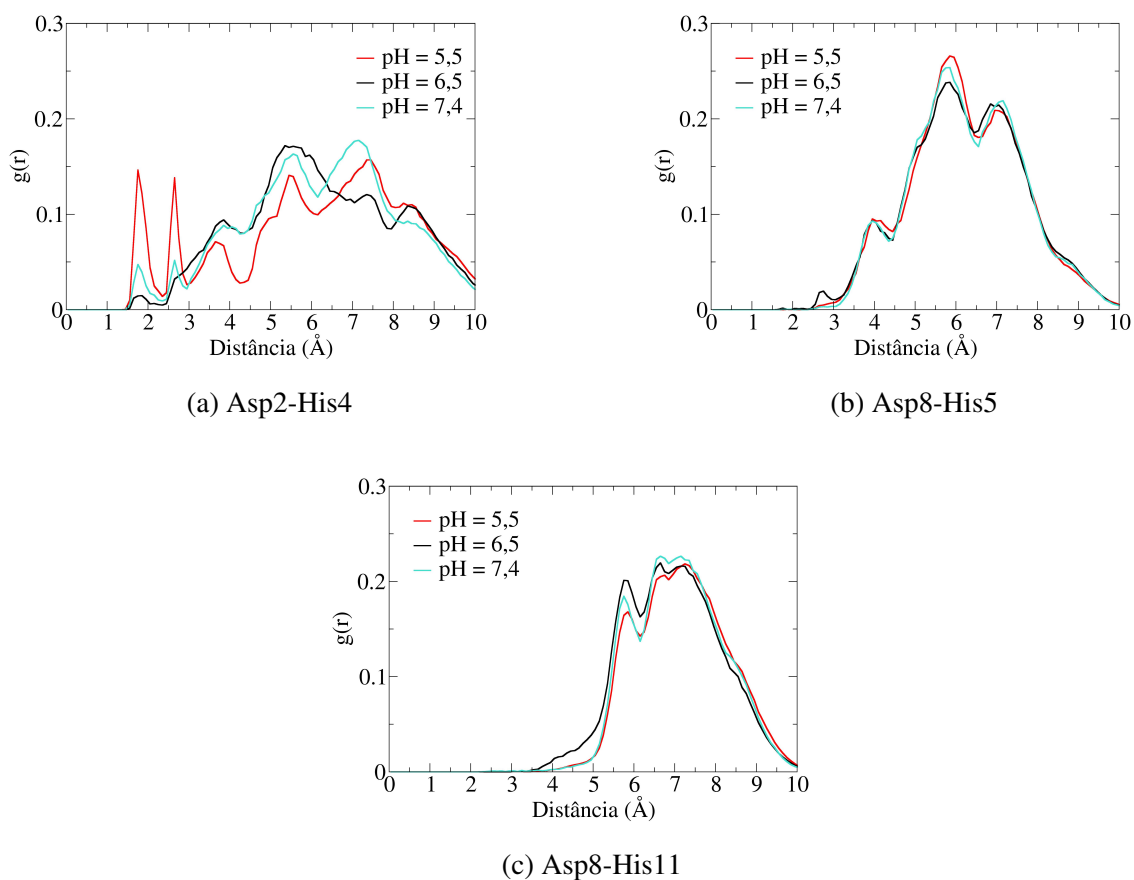
Outro fator a ser considerado para explicar as diferenças entre os estados de protonação dos resíduos de mesmo tipo é o posicionamento relativo dos resíduos protonáveis nesse peptídeo, ilustrado na figura 4.16. A presença de resíduos carregados em torno de outro resíduo carregado pode facilitar (ou dificultar) a ligação de um próton no mesmo. Utilizando cálculos de distribuição radial de pares podemos obter os valores médios da distância entre os resíduos ionizáveis de cada peptídeo. Esses resultados podem ser observados nas figuras 4.14 e 4.15. Pode-se notar que para o MP1, com o aumento do pH, os picos dos valores de $g(r)$ para as interações dos ácidos aspárticos com as lisinas se deslocam para um valor de menor distância. Isso se deve ao fato que em pH mais alto (6,5 e 7,4) os resíduos de ácido

aspártico ficam maior parte do tempo desprotonados, adquirindo carga negativa e interagindo com a cadeia lateral positiva da lisina que se aproxima do ácido aspártico. Para o H-MP1 de maneira geral, não há uma aproximação tão evidente como a do MP1 devido ao menor tamanho da cadeia lateral da histidina em comparação a lisina, logo ela não se dobra tanto ao aproximar do ácido aspártico. Entretanto com a diminuição do pH há um pico nos valores de $g(r)$ para o par Asp2-His4 já que nesse pH a histidina e o ácido aspártico passam mais tempo protonados do que nos outros pHs, interagindo mais fortemente. Esses resíduos se encontram em uma porção de maior flexibilidade no peptídeo do que os outros resíduos carregados.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4.14: Distribuição radial de pares calculada para os resíduos de ácido aspártico do peptídeo MP1 com o nitrogênio protonável da lisina mais próxima. Em (a) estão apresentados os valores para o ácido aspártico 2 e a lisina 5, em (b) para o ácido aspártico 8 com a lisina 4 e em (c) do ácido aspártico 8 com a lisina 11.

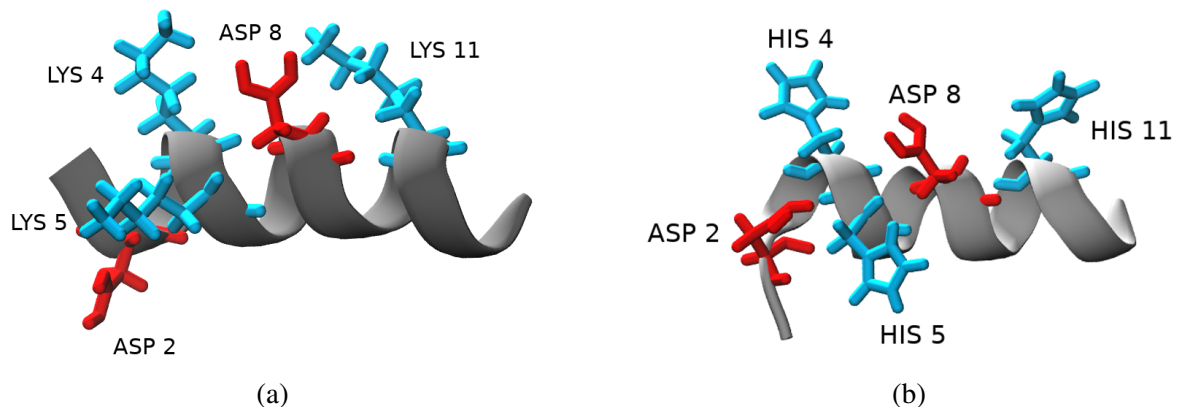


Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4.15: Distribuição radial de pares calculada para os resíduos de ácido aspártico do peptídeo H-MP1 com o nitrogênio protonável da histidina mais próxima. Em (a) estão apresentados os valores para o ácido aspártico 2 e a histidina 4, em (b) para o ácido aspártico 8 com a histidina 5 e em (c) do ácido aspártico 8 com a histidina 11.

Em razão da porção N-terminal do peptídeo H-MP1 estar em configuração *random coil*, em contraste com a mesma região no MP1 que permanece em α -hélice, o resíduo Asp2 tem maior flexibilidade no H-MP1. Por isso, no caso do H-MP1 a histidina mais próxima do Asp2 é a His4, diferente do MP1. Considerando também o fato de que as lisinas possuem cadeias laterais mais longas que as histidinas, como pode ser observado na figura 4.16, esses resíduos podem chegar mais perto da cadeia lateral do Asp2, fazendo uma maior interação eletrostática do que o mesmo resíduo com as histidinas no H-MP1. Esses efeitos de cadeia mais longa podem ser observados também no fato de que as distâncias entre os resíduos de ácido aspártico e lisinas são bem maiores do que para os mesmos resíduos com as histidinas, com exceção do par de resíduos 2-4 que possui maior aproximação no H-MP1, que estão em uma região desestruturada permitindo essa maior aproximação. Esses efeitos acoplados podem também ser responsáveis pelas diferenças de protonação encontradas entre

Asp2 e Asp8 e, também, entre ambos os peptídeos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4.16: Disposição dos resíduos ionizáveis dos peptídeos utilizados nesse trabalho. Os resíduos ácidos e básicos estão representados em vermelho e turquesa, respectivamente. O *backbone* se encontra representado em cinza.

Portanto, as simulações de CpHMD são capazes determinar os estados de protonação para os resíduos ionizáveis desses peptídeos com suas particularidades. O N-terminal de ambos os peptídeos foi mantido protonado durante as simulações o que, levando em conta o pH na superfície da bicamada 6,6 para as simulações feitas em pH 7,4 essa é uma aproximação razoável.

Como evidenciado pelas tabelas 4.1 e 4.3, na ausência da bicamada lipídica dificilmente os ácidos aspárticos de ambos os peptídeos protonam tanto em pH ácido quanto neutro. Entretanto, quando os peptídeos adsorvem na bicamada, em pH 5,5, a protonação do Asp8 é aproximadamente 20% e 30% maior do que a protonação do Asp2 no MP1 e no H-MP1, respectivamente. No pH neutro, Asp2 e Asp8 possuem fração de protonação dez vezes maior no H-MP1 do que no MP1. Dessa maneira, as diferenças entre a protonação dos resíduos ácidos indicam uma grande influência do potencial da bicamada aniônica em pH mais baixo aumentando a carga dos peptídeos, evidenciando a atração desses peptídeos pela membrana mimética de bactérias.

Capítulo 5

Conclusão

Nesse estudo foram investigadas, por dois tipos de simulações de Dinâmica Molecular, a influência do pH no processo de adsorção de dois peptídeos antimicrobianos da família dos mastoparanos, o Polybia-MP1 e seu análogo contendo histidina H-MP1, na bicamada lipídica mista mimética de bactérias e sua inserção espontânea na fase hidrofóbica da bicamada. Os resultados mostraram que o análogo H-MP1, com histidinas substituindo as lisinas do MP1, ficou mais responsivo ao pH do meio se comparado ao MP1. Ambos os peptídeos apresentam comportamento similar quando interagem com a bicamada, com aumento do conteúdo helicoidal com a adsorção, se posicionando paralelamente ao plano da bicamada. Apesar de os dois peptídeos apresentarem um estado adsorvido final semelhante, o processo de adsorção foi diferente. Antes de a adsorção ocorrer os peptídeos encostam o N-terminal primeiro na bicamada, o MP1 então, rapidamente adsorve, o análogo permaneceu perpendicular à bicamada por quase 400 ns na simulação apresentada, perdendo grande parte da sua estrutura secundária que estava em conformação α -hélice e depois se insere e também fica paralelo à bicamada, recuperando sua estrutura em α -hélice com a influência do ambiente hidrofílico/hidrofóbico da interface. A quantidade de estrutura em α -hélice calculada usando a ligação de hidrogênio dos resíduos $i-i + 4$ do *backbone* teve boa concordância com as determinadas experimentalmente por CD. As calculadas com o *software* STRIDE, superestimaram a quantidade de hélice nos dois peptídeos. As simulações de DM também evidenciaram que as pontes salinas das cadeias laterais ajudaram a estabilizar a estrutura secundária. Os peptídeos adsorvidos são favorecidos pela interação eletrostática de acordo com as análises energéticas que são as principais responsáveis pela adsorção e enovelamento em α -hélice do peptídeo. Além disso, alterações na bicamada lipídica também foram observadas através de cálculos de parâmetro de ordem dos fosfolipídios que ficam em torno do peptídeo adsorvido. Esses resultados mostraram uma diminuição da ordem das cadeias lipídicas com a adsorção dos peptídeos, indicando perturbação do empacotamento lipídico e aumento da fluidez da bicamada localizado nessa região.

A fim de analisar a eletrostática envolvida na interação desses peptídeos com a bicamada foram realizadas análises das simulações de Dinâmica Molecular a pH Constante. As cargas líquidas dos dois peptídeos foram calculadas, bem como os valores de pK_a aparente para cada resíduo ionizável em cada configuração, ressaltando as diferenças nas frações de protonação para os peptídeos em solução aquosa ou na presença da bicamada. O potencial eletrostático da bicamada e o pH da solução modulam a afinidade dos dois peptídeos pela bicamada modelo. Também foi investigado o efeito de alteração do pH local na superfície da bicamada causada por esse potencial eletrostático. As cargas de cada peptídeo em diferentes situações foram calculadas e o conjunto de fatores analisados auxilia no entendimento da seletividade do análogo contendo histidina no meio ligeiramente ácido. Essa seletividade pode ter um papel importante na atividade inibitória de proliferação celular de bactérias.

Referências

- 1 TOLKIEN, J. R. R. *O Senhor dos Anéis: A Sociedade do Anel*. 3ª edição. ed. Sao Paulo: Martins Fontes, 2000. ISBN 9788533613379.
- 2 YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*, v. 55, n. 1, p. 27–55, mar. 2003. ISSN 0031-6997.
- 3 MALIK, E. et al. pH Dependent Antimicrobial Peptides and Proteins, Their Mechanisms of Action and Potential as Therapeutic Agents. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, v. 9, n. 4, nov. 2016. ISSN 1424-8247.
- 4 HANEY, E. F.; STRAUS, S. K.; HANCOCK, R. E. W. Reassessing the Host Defense Peptide Landscape. *Frontiers in Chemistry*, v. 7, 2019. ISSN 2296-2646. Disponível em: <https://internal-journal.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2019.00043/full>.
- 5 ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, v. 415, n. 6870, p. 389–395, jan. 2002. ISSN 1476-4687. Number: 6870 Publisher: Nature Publishing Group. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/415389a>.
- 6 KANG, H.-K. et al. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, v. 55, n. 1, p. 1–12, jan. 2017. ISSN 1976-3794.
- 7 CHEN, Y. et al. Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 13, p. 12316–12329, abr. 2005. ISSN 0021-9258.
- 8 WANG, K.-r. et al. Antitumor effects, cell selectivity and structure-activity relationship of a novel antimicrobial peptide polybia-MPI. *Peptides*, v. 29, n. 6, p. 963–968, jun. 2008. ISSN 0196-9781.
- 9 GIULIANI, A.; PIRRI, G.; NICOLETTO, S. F. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Central European Journal of Biology*, v. 2, n. 1, p. 1–33, mar. 2007. ISSN 1644-3632. Disponível em: <https://doi.org/10.2478/s11535-007-0010-5>.
- 10 WANG, Z.; WANG, G. APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Research*, v. 32, n. Database issue, p. D590–592, jan. 2004. ISSN 1362-4962.
- 11 HANCOCK, R. E.; LEHRER, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology*, v. 16, n. 2, p. 82–88, fev. 1998. ISSN 0167-7799.

- 12 WIMLEY, W. C. Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. *ACS chemical biology*, v. 5, n. 10, p. 905–917, out. 2010. ISSN 1554-8929. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2955829/>.
- 13 BECHINGER, B.; ZASLOFF, M.; OPELLA, S. J. Structure and interactions of magainin antibiotic peptides in lipid bilayers: a solid-state nuclear magnetic resonance investigation. *Biophysical Journal*, v. 62, n. 1, p. 12–14, abr. 1992. ISSN 0006-3495.
- 14 MARASSI, F. M.; OPELLA, S. J. A Solid-State NMR Index of Helical Membrane Protein Structure and Topology. *Journal of Magnetic Resonance*, v. 144, n. 1, p. 150–155, maio 2000. ISSN 1090-7807. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090780700920354>.
- 15 KLOCEK, G. et al. Thermodynamics of melittin binding to lipid bilayers. Aggregation and pore formation. *Biochemistry*, v. 48, n. 12, p. 2586–2596, mar. 2009. ISSN 1520-4995.
- 16 FOŠNARIČ, M.; IGLIČ, A.; MAY, S. Influence of rigid inclusions on the bending elasticity of a lipid membrane. *Physical Review E*, v. 74, n. 5, p. 051503, nov. 2006. Disponível em: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.74.051503>.
- 17 PAVLIČ, J. I. et al. Bending elasticity of lipid membranes in presence of beta 2 glycoprotein I in the surrounding solution. *Journal of Physics: Conference Series*, v. 253, p. 012064, nov. 2010. ISSN 1742-6596. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1742-6596/253/1/012064>.
- 18 JING, W. et al. The structure of the antimicrobial peptide Ac-RRWWRF-NH2 bound to micelles and its interactions with phospholipid bilayers. *The Journal of Peptide Research: Official Journal of the American Peptide Society*, v. 61, n. 5, p. 219–229, maio 2003. ISSN 1397-002X.
- 19 SPAAR, A.; MÜNSTER, C.; SALDITT, T. Conformation of peptides in lipid membranes studied by x-ray grazing incidence scattering. *Biophysical Journal*, v. 87, n. 1, p. 396–407, jul. 2004. ISSN 0006-3495.
- 20 ZEMEL, A.; BEN-SHAUL, A.; MAY, S. Modulation of the spontaneous curvature and bending rigidity of lipid membranes by interfacially adsorbed amphipathic peptides. *The Journal of Physical Chemistry. B*, v. 112, n. 23, p. 6988–6996, jun. 2008. ISSN 1520-6106.
- 21 MAY, S.; HARRIES, D.; BEN-SHAUL, A. Lipid demixing and protein-protein interactions in the adsorption of charged proteins on mixed membranes. *Biophysical Journal*, v. 79, n. 4, p. 1747–1760, out. 2000. ISSN 0006-3495. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1301069/>.
- 22 EPAND, R. F. et al. Probing the “Charge Cluster Mechanism” in Amphipathic Helical Cationic Antimicrobial Peptides. *Biochemistry*, v. 49, n. 19, p. 4076–4084, maio 2010. ISSN 0006-2960. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi100378m>.
- 23 PARENTE, R. A.; NIR, S.; SZOKA, F. C. Mechanism of leakage of phospholipid vesicle contents induced by the peptide GALA. *Biochemistry*, v. 29, n. 37, p. 8720–8728, set. 1990. ISSN 0006-2960.

- 24 EPAND, R. F. et al. Lipid Segregation Explains Selective Toxicity of a Series of Fragments Derived from the Human Cathelicidin LL-37. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 9, p. 3705–3714, set. 2009. ISSN 0066-4804. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2737875/>).
- 25 HANEY, E. F. et al. Induction of non-lamellar lipid phases by antimicrobial peptides: a potential link to mode of action. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 163, n. 1, p. 82–93, jan. 2010. ISSN 1873-2941.
- 26 NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, v. 29, n. 9, p. 464–472, set. 2011. ISSN 1879-3096.
- 27 WIMLEY, W. C.; HRISTOVA, K. Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions. *The Journal of Membrane Biology*, v. 239, n. 1-2, p. 27–34, jan. 2011. ISSN 1432-1424.
- 28 BROCHARD, F.; GENNES, P. G. D.; PFEUTY, P. Surface tension and deformations of membrane structures : relation to two-dimensional phase transitions. *Journal de Physique*, v. 37, n. 10, p. 1099–1104, out. 1976. ISSN 0302-0738. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1051/jphys:0197600370100109900>).
- 29 PUECH, P.-H. et al. Line thermodynamics: adsorption at a membrane edge. *Physical Review Letters*, v. 90, n. 12, p. 128304, mar. 2003. ISSN 0031-9007.
- 30 HUANG, H. W.; CHEN, F.-Y.; LEE, M.-T. Molecular mechanism of Peptide-induced pores in membranes. *Physical Review Letters*, v. 92, n. 19, p. 198304, maio 2004. ISSN 0031-9007.
- 31 FOSNARIC, M. et al. Stabilization of pores in lipid bilayers by anisotropic inclusions. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 107, n. 45, p. 12519–12526, 2003. ISSN 1520-6106. Disponível em: <https://research.vu.nl/en/publications/stabilization-of-pores-in-lipid-bilayers-by-anisotropic-inclusion>).
- 32 BETTERTON, M. D.; BRENNER, M. P. Electrostatic Edge Instability of Lipid Membranes. *Physical Review Letters*, v. 82, n. 7, p. 1598–1601, fev. 1999. Disponível em: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.82.1598>).
- 33 MATSUZAKI, K. et al. Modulation of magainin 2-lipid bilayer interactions by peptide charge. *Biochemistry*, v. 36, n. 8, p. 2104–2111, fev. 1997. ISSN 0006-2960.
- 34 BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews. Microbiology*, v. 3, n. 3, p. 238–250, mar. 2005. ISSN 1740-1526.
- 35 SENGUPTA, D. et al. Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1778, n. 10, p. 2308–2317, out. 2008. ISSN 0005-2736. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273608001764>).
- 36 GAZIT, E. et al. Structure and orientation of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 within phospholipid membranes. *Journal of Molecular Biology*, v. 258, n. 5, p. 860–870, maio 1996. ISSN 0022-2836.

- 37 DEAN, R. E. et al. A carpet-based mechanism for direct antimicrobial peptide activity against vaccinia virus membranes. *Peptides*, v. 31, n. 11, p. 1966–1972, nov. 2010. ISSN 1873-5169.
- 38 SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1462, n. 1, p. 55–70, dez. 1999. ISSN 0005-2736. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000527369900200X>.
- 39 BECHINGER, B.; LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica Et Biophysica Acta*, v. 1758, n. 9, p. 1529–1539, set. 2006. ISSN 0006-3002.
- 40 CABRERA, M. P. dos S. et al. Interactions of mast cell degranulating peptides with model membranes: A comparative biophysical study. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 486, n. 1, p. 1–11, jun. 2009. ISSN 0003-9861. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986109000812>.
- 41 YANDEK, L. E.; POKORNY, A.; ALMEIDA, P. F. F. Wasp Mastoparans Follow the Same Mechanism as the Cell-Penetrating Peptide Transportan 10. *Biochemistry*, v. 48, n. 30, p. 7342–7351, ago. 2009. ISSN 0006-2960. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2774274/>.
- 42 MP, C. et al. New insight into the mechanism of action of wasp mastoparan peptides: lytic activity and clustering observed with giant vesicles. *Langmuir : the ACS Journal of Surfaces and Colloids*, v. 27, n. 17, p. 10805–10813, ago. 2011. ISSN 0743-7463, 1520-5827. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/21797216>.
- 43 ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers*, v. 47, n. 6, p. 415–433, 1998. ISSN 0006-3525.
- 44 CABRERA, M. P. D. S. et al. Conformation and lytic activity of eumennine mastoparan: a new antimicrobial peptide from wasp venom. *The Journal of Peptide Research*, v. 64, n. 3, p. 95–103, 2004. ISSN 1399-3011. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1399-3011.2004.00173.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1399-3011.2004.00173.x>.
- 45 SOUZA, B. M. et al. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides*, p. 2157–2164, nov. 2005. ISSN 0196-9781. Accepted: 2014-05-20T13:54:38Z Publisher: Elsevier B.V. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/19558>.
- 46 WANG, K.-r. et al. Novel mode of action of polybia-MPI, a novel antimicrobial peptide, in multi-drug resistant leukemic cells. *Cancer Letters*, v. 278, n. 1, p. 65–72, jun. 2009. ISSN 1872-7980.
- 47 CABRERA, M. P. dos S. et al. Influence of the bilayer composition on the binding and membrane disrupting effect of Polybia-MP1, an antimicrobial mastoparan peptide with leukemic T-lymphocyte cell selectivity. *Biochemistry*, v. 51, n. 24, p. 4898–4908, jun. 2012. ISSN 1520-4995.

- 48 ZANIN, L. P. M. et al. Effects of N-terminus modifications on the conformation and permeation activities of the synthetic peptide L1A. *Amino Acids*, v. 48, n. 6, p. 1433–1444, jun. 2016. ISSN 1438-2199. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2196-1>.
- 49 ALVARES, D. S.; WILKE, N.; NETO, J. R. Effect of N-terminal acetylation on lytic activity and lipid-packing perturbation induced in model membranes by a mastoparan-like peptide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1860, n. 3, p. 737–748, mar. 2018. ISSN 0005-2736. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273617304108>.
- 50 DENNISON, S. R. et al. Amphiphilic alpha-helical antimicrobial peptides and their structure/function relationships. *Protein and Peptide Letters*, v. 12, n. 1, p. 31–39, jan. 2005. ISSN 0929-8665.
- 51 PASUPULETI, M. et al. Rational Design of Antimicrobial C3a Analogues with Enhanced Effects against Staphylococci Using an Integrated Structure and Function-Based Approach. *Biochemistry*, v. 47, n. 35, p. 9057–9070, set. 2008. ISSN 0006-2960. Publisher: American Chemical Society. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi800991e>.
- 52 D, E. et al. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *Journal of Molecular Biology*, v. 179, n. 1, p. 125–142, out. 1984. ISSN 0022-2836, 1089-8638. Disponível em: <http://europepmc.org/article/med/6502707>.
- 53 LEITE, N. B. et al. Effect of the aspartic acid D2 on the affinity of Polybia-MP1 to anionic lipid vesicles. *European Biophysics Journal*, v. 43, n. 4, p. 121–130, maio 2014. ISSN 1432-1017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00249-014-0945-1>.
- 54 ALVARES, D. S. et al. The interfacial properties of the peptide Polybia-MP1 and its interaction with DPPC are modulated by lateral electrostatic attractions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1858, n. 2, p. 393–402, fev. 2016. ISSN 0005-2736. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273615004083>.
- 55 CABRERA, M. P. dos S. et al. Selectivity in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1. *European biophysics journal: EBJ*, v. 37, n. 6, p. 879–891, jul. 2008. ISSN 0175-7571.
- 56 LEITE, N. B. et al. The effect of acidic residues and amphipathicity on the lytic activities of mastoparan peptides studied by fluorescence and CD spectroscopy. *Amino Acids*, v. 40, n. 1, p. 91–100, jan. 2011. ISSN 1438-2199.
- 57 ALVARES, D. d. S. et al. Modulatory Effects of Acidic pH and Membrane Potential on the Adsorption of pH-Sensitive Peptides to Anionic Lipid Membrane. *Membranes*, v. 11, n. 5, p. 307, maio 2021. Number: 5 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2077-0375/11/5/307>.
- 58 VOGT, T. C. B.; BECHINGER, B. The Interactions of Histidine-containing Amphipathic Helical Peptide Antibiotics with Lipid Bilayers THE EFFECTS OF CHARGES AND pH. *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 41, p. 29115–29121, out. 1999. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Publisher: American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/274/41/29115>.

- 59 MAKOVITZKI, A.; SHAI, Y. pH-Dependent Antifungal Lipopeptides and Their Plausible Mode of Action. *Biochemistry*, v. 44, n. 28, p. 9775–9784, jul. 2005. ISSN 0006-2960. Publisher: American Chemical Society. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi0502386>.
- 60 MAKOVITZKI, A.; FINK, A.; SHAI, Y. Suppression of Human Solid Tumor Growth in Mice by Intratumor and Systemic Inoculation of Histidine-Rich and pH-Dependent Host Defense-like Lytic Peptides. *Cancer Research*, v. 69, n. 8, p. 3458–3463, abr. 2009. ISSN 0008-5472, 1538-7445. Publisher: American Association for Cancer Research Section: Experimental Therapeutics, Molecular Targets, and Chemical Biology. Disponível em: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/69/8/3458>.
- 61 HE, K. et al. Antimicrobial peptide pores in membranes detected by neutron in-plane scattering. *Biochemistry*, v. 34, n. 48, p. 15614–15618, dez. 1995. ISSN 0006-2960.
- 62 KOENIG, B. W.; FERRETTI, J. A.; GAWRISCH, K. Site-specific deuterium order parameters and membrane-bound behavior of a peptide fragment from the intracellular domain of HIV-1 gp41. *Biochemistry*, v. 38, n. 19, p. 6327–6334, maio 1999. ISSN 0006-2960.
- 63 EEMAN, M.; DELEU, M. From biological membranes to biomimetic model membranes. *BASE*, jan. 2010. ISSN 1370-6233, 1780-4507. Disponível em: <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=6568>.
- 64 GENNIS, R. B. *Biomembranes: Molecular Structure and Function*. New York: Springer-Verlag, 1989. (Springer Advanced Texts in Chemistry). ISBN 9781475720679. Disponível em: <https://www.springer.com/gp/book/9781475720679>.
- 65 LOHNER, K.; SEVCSIK, E.; PABST, G. Chapter Five Liposome-Based Biomembrane Mimetic Systems: Implications for Lipid–Peptide Interactions. In: LIU, A. L. (Ed.). *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*. Academic Press, 2008. v. 6, p. 103–137. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S155445160706005X>.
- 66 DENNISON, S. R.; HARRIS, F.; PHOENIX, D. A. Chapter Three - Langmuir–Blodgett Approach to Investigate Antimicrobial Peptide–Membrane Interactions. In: IGLIČ, A.; KULKARNI, C. V. (Ed.). *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*. Academic Press, 2014. v. 20, p. 83–110. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124186989000034>.
- 67 DEVAUX, P. F. Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry*, v. 30, n. 5, p. 1163–1173, fev. 1991. ISSN 0006-2960.
- 68 FADOK, V. A. et al. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death and Differentiation*, v. 5, n. 7, p. 551–562, jul. 1998. ISSN 1350-9047.
- 69 ZWAAL, R. F. A.; COMFURIUS, P.; BEVERS, E. M. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, v. 62, n. 9, p. 971–988, maio 2005. ISSN 1420-682X.

- 70 ALDER, B. J.; WAINWRIGHT, T. E. Phase Transition for a Hard Sphere System. *The Journal of Chemical Physics*, v. 27, n. 5, p. 1208–1209, nov. 1957. ISSN 0021-9606, 1089-7690. Disponível em: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1743957>).
- 71 STILLINGER, F. H.; RAHMAN, A. Improved simulation of liquid water by molecular dynamics. *The Journal of Chemical Physics*, v. 60, n. 4, p. 1545–1557, fev. 1974. ISSN 0021-9606. Publisher: American Institute of Physics. Disponível em: <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1681229>).
- 72 MCCAMMON, J. A.; GELIN, B. R.; KARPLUS, M. Dynamics of folded proteins. *Nature*, v. 267, n. 5612, p. 585–590, jun. 1977. ISSN 0028-0836.
- 73 PLOEG, P. van der; BERENDSEN, H. J. C. Molecular dynamics simulation of a bilayer membrane. *The Journal of Chemical Physics*, v. 76, n. 6, p. 3271–3276, mar. 1982. ISSN 0021-9606. Publisher: American Institute of Physics. Disponível em: <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.443321>).
- 74 VOET, D.; VOET, J. G. *Bioquímica*. 4ª edição. ed. [S.l.]: Artmed, 2013.
- 75 ATKINS, P.; PAULA, J. d. *Físico-química - Fundamentos*. 6ª edição. ed. [S.l.]: LTC, 2017. ISBN 978-85-216-3422-5.
- 76 NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 7ª edição. ed. [S.l.]: Artmed, 2018.
- 77 WARSHEL, A. Calculations of chemical processes in solutions. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 83, n. 12, p. 1640–1652, jun. 1979. ISSN 0022-3654. Publisher: American Chemical Society. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/j100475a014>).
- 78 PERUTZ, M. F. Electrostatic effects in proteins. *Science*, v. 201, n. 4362, p. 1187–1191, set. 1978. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Publisher: American Association for the Advancement of Science Section: Articles. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/201/4362/1187>).
- 79 WARSHEL, A.; RUSSELL, S. T. Calculations of electrostatic interactions in biological systems and in solutions. *Quarterly Reviews of Biophysics*, v. 17, n. 3, p. 283–422, ago. 1984. ISSN 1469-8994, 0033-5835. Publisher: Cambridge University Press. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/quarterly-reviews-of-biophysics/article/abs/calculations-of-electrostatic-interactions-in-biological-systems-and-in-solutions/44186947919D48E7ED4AD63B27AA2676>).
- 80 MATTHEW, J. B. Electrostatic Effects in Proteins. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, v. 14, n. 1, p. 387–417, 1985. eprint: <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.14.060185.002131>. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.14.060185.002131>).
- 81 MACHUQUEIRO, M.; BAPTISTA, A. M. Molecular Dynamics at Constant pH and Reduction Potential: Application to Cytochrome c3. *Journal of the American Chemical Society*, v. 131, n. 35, p. 12586–12594, set. 2009. ISSN 0002-7863. Publisher: American Chemical Society. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja808463e>).

- 82 HARRIS, T. K.; TURNER, G. J. Structural basis of perturbed pKa values of catalytic groups in enzyme active sites. *IUBMB life*, v. 53, n. 2, p. 85–98, fev. 2002. ISSN 1521-6543.
- 83 BORON, W. F. Regulation of intracellular pH. *Advances in Physiology Education*, v. 28, n. 1-4, p. 160–179, dez. 2004. ISSN 1043-4046.
- 84 OCCHIPINTI, R.; BORON, W. F. Mathematical modeling of acid-base physiology. *Progress in biophysics and molecular biology*, v. 117, n. 1, p. 43–58, jan. 2015. ISSN 0079-6107. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4666298/>.
- 85 BAPTISTA, A. M.; TEIXEIRA, V. H.; SOARES, C. M. Constant-pH molecular dynamics using stochastic titration. *The Journal of Chemical Physics*, v. 117, n. 9, p. 4184–4200, ago. 2002. ISSN 0021-9606. Publisher: American Institute of Physics. Disponível em: <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1497164>.
- 86 DLUGOSZ, M.; ANTOSIEWICZ, J. M. Constant-pH molecular dynamics simulations: a test case of succinic acid. *Chemical Physics*, v. 302, n. 1, p. 161–170, jul. 2004. ISSN 0301-0104. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030101040400134X>.
- 87 MONGAN, J.; CASE, D. A.; MCCAMMON, J. A. Constant pH molecular dynamics in generalized Born implicit solvent. *Journal of Computational Chemistry*, v. 25, n. 16, p. 2038–2048, dez. 2004. ISSN 0192-8651.
- 88 MENG, Y.; ROITBERG, A. E. Constant pH replica exchange molecular dynamics in biomolecules using a discrete protonation model. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 6, n. 4, p. 1401–1412, abr. 2010. ISSN 1549-9626.
- 89 SWAILS, J. M.; YORK, D. M.; ROITBERG, A. E. Constant pH Replica Exchange Molecular Dynamics in Explicit Solvent Using Discrete Protonation States: Implementation, Testing, and Validation. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 10, n. 3, p. 1341–1352, mar. 2014. ISSN 1549-9618. Publisher: American Chemical Society. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ct401042b>.
- 90 KONG, X.; BROOKS, C. L. -dynamics: A new approach to free energy calculations. *The Journal of Chemical Physics*, v. 105, n. 6, p. 2414–2423, ago. 1996. ISSN 0021-9606. Publisher: American Institute of Physics. Disponível em: <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.472109>.
- 91 LEE, M. S.; SALSBUURY, F. R.; BROOKS, C. L. Constant-pH molecular dynamics using continuous titration coordinates. *Proteins*, v. 56, n. 4, p. 738–752, set. 2004. ISSN 1097-0134.
- 92 MONGAN, J.; CASE, D. A. Biomolecular simulations at constant pH. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 15, n. 2, p. 157–163, abr. 2005. ISSN 0959-440X. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X05000485>.
- 93 KHANDOGIN, J.; BROOKS, C. L. Constant pH molecular dynamics with proton tautomerism. *Biophysical Journal*, v. 89, n. 1, p. 141–157, jul. 2005. ISSN 0006-3495.

- 94 MACHUQUEIRO, M.; BAPTISTA, A. M. Constant-pH molecular dynamics with ionic strength effects: protonation-conformation coupling in decalysine. *The Journal of Physical Chemistry. B*, v. 110, n. 6, p. 2927–2933, fev. 2006. ISSN 1520-6106.
- 95 WILLIAMS, S. L.; OLIVEIRA, C. A. F. de; MCCAMMON, J. A. Coupling Constant pH Molecular Dynamics with Accelerated Molecular Dynamics. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 6, n. 2, p. 560–568, fev. 2010. ISSN 1549-9618. Publisher: American Chemical Society. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ct9005294>.
- 96 ITOH, S. G.; DAMJANOVIĆ, A.; BROOKS, B. R. pH replica-exchange method based on discrete protonation states. *Proteins*, v. 79, n. 12, p. 3420–3436, dez. 2011. ISSN 1097-0134.
- 97 SALOMON-FERRER, R.; CASE, D. A.; WALKER, R. C. An overview of the Amber biomolecular simulation package. *WIREs Computational Molecular Science*, v. 3, n. 2, p. 198–210, 2013. ISSN 1759-0884. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/wcms.1121>. Disponível em: <https://www.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/wcms.1121>.
- 98 SWAILS, J. M.; ROITBERG, A. E. Enhancing Conformation and Protonation State Sampling of Hen Egg White Lysozyme Using pH Replica Exchange Molecular Dynamics. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 8, n. 11, p. 4393–4404, nov. 2012. ISSN 1549-9618. Publisher: American Chemical Society. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ct300512h>.
- 99 BROOKS, B. et al. CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *Journal of computational chemistry*, v. 30, n. 10, p. 1545–1614, jul. 2009. ISSN 0192-8651. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2810661/>.
- 100 FLANNELLY, D. F.; AOKI, T. G.; ARISTILDE, L. Short-time dynamics of pH-dependent conformation and substrate binding in the active site of beta-glucosidases: A computational study. *Journal of Structural Biology*, v. 191, n. 3, p. 352–364, set. 2015. ISSN 1047-8477. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1047847715300277>.
- 101 JEONG, B.-S.; DYER, R. B. Proton Transport Mechanism of M2 Proton Channel Studied by Laser-Induced pH Jump. *Journal of the American Chemical Society*, v. 139, n. 19, p. 6621–6628, maio 2017. ISSN 0002-7863. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5509413/>.
- 102 SOARES, R. O. et al. Unraveling HIV protease flaps dynamics by Constant pH Molecular Dynamics simulations. *Journal of Structural Biology*, v. 195, n. 2, p. 216–226, ago. 2016. ISSN 1047-8477. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1047847716301125>.
- 103 OLIVEIRA, A. S. F. et al. Coupling between protonation and conformation in cytochrome c oxidase: Insights from constant-pH MD simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, v. 1857, n. 6, p. 759–771, jun. 2016. ISSN 0005-2728. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272816300718>.

- 104 RADAK, B. K. et al. Constant-pH Molecular Dynamics Simulations for Large Biomolecular Systems. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 13, n. 12, p. 5933–5944, dez. 2017. ISSN 1549-9618. Publisher: American Chemical Society. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00875>.
- 105 MARTINS, I. B. S. et al. The effect of acidic pH on the adsorption and lytic activity of the peptides Polybia-MP1 and its histidine-containing analog in anionic lipid membrane: a biophysical study by molecular dynamics and spectroscopy. *Amino Acids*, abr. 2021. ISSN 1438-2199. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00726-021-02982-0>.
- 106 ALVARES, D. S. et al. The antimicrobial peptide Polybia-MP1 differentiates membranes with the hopanoid, diplopterol from those with cholesterol. *BBA Advances*, p. 100002, jan. 2021. ISSN 2667-1603. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2667160321000016>.
- 107 LEACH, A. R.; LEACH. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. 2ª edição. ed. Harlow, England ; New York: Prentice Hall, 2001. ISBN 978-0-582-38210-7.
- 108 FRENKEL, D.; SMIT, B. *Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications*. 2ª edição. ed. [S.l.]: Academic Press, 2001.
- 109 JORGENSEN, W. L.; MAXWELL, D. S.; TIRADO-RIVES, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *Journal of the American Chemical Society*, v. 118, n. 45, p. 11225–11236, nov. 1996. ISSN 0002-7863. Publisher: American Chemical Society. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja9621760>.
- 110 HORNAK, V. et al. Comparison of multiple AMBER force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins*, v. 65, n. 3, p. 712–725, nov. 2006. ISSN 0887-3585. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4805110/>.
- 111 HUANG, J.; MACKERELL, A. D. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *Journal of Computational Chemistry*, v. 34, n. 25, p. 2135–2145, set. 2013. ISSN 1096-987X.
- 112 HORTA, B. A. C. et al. A GROMOS-Compatible Force Field for Small Organic Molecules in the Condensed Phase: The 2016H66 Parameter Set. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 12, n. 8, p. 3825–3850, ago. 2016. ISSN 1549-9618. Publisher: American Chemical Society. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.6b00187>.
- 113 BERENDSEN, H. J. C. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, v. 81, n. 8, p. 3684–3690, out. 1984. ISSN 0021-9606. Publisher: American Institute of Physics. Disponível em: <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.448118>.
- 114 ULINE, M. J.; CORTI, D. S. Molecular Dynamics at Constant Pressure: Allowing the System to Control Volume Fluctuations via a “Shell” Particle. *Entropy*, v. 15, n. 9, p. 3941–3969, set. 2013. Number: 9 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1099-4300/15/9/3941>.

- 115 FELLER, S. E. et al. Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method. *The Journal of Chemical Physics*, v. 103, n. 11, p. 4613–4621, set. 1995. ISSN 0021-9606. Publisher: American Institute of Physics. Disponível em: <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.470648>.
- 116 DAVIDCHACK, R. L.; HANDEL, R.; TRETYAKOV, M. V. Langevin thermostat for rigid body dynamics. *The Journal of Chemical Physics*, v. 130, n. 23, p. 234101, jun. 2009. ISSN 0021-9606. Publisher: American Institute of Physics. Disponível em: <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.3149788>.
- 117 HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, v. 14, n. 1, p. 33–38, fev. 1996. ISSN 0263-7855. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0263785596000185>.
- 118 R, G.-G. et al. MEMBPLUGIN: studying membrane complexity in VMD. *Bioinformatics (Oxford, England)*, v. 30, n. 10, p. 1478–1480, jan. 2014. ISSN 1367-4803, 1367-4811. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/24451625>.
- 119 FRISHMAN, D.; ARGOS, P. Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 23, n. 4, p. 566–579, 1995. ISSN 1097-0134. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/prot.340230412>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/prot.340230412>.
- 120 PIGGOT, T. J. et al. On the Calculation of Acyl Chain Order Parameters from Lipid Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 13, n. 11, p. 5683–5696, nov. 2017. ISSN 1549-9618. Publisher: American Chemical Society. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00643>.
- 121 JO, S. et al. CHARMM-GUI Membrane Builder for Mixed Bilayers and Its Application to Yeast Membranes. *Biophysical Journal*, v. 97, n. 1, p. 50–58, jul. 2009. ISSN 0006-3495. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2711372/>.
- 122 JO, S. et al. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*, v. 29, n. 11, p. 1859–1865, ago. 2008. ISSN 1096-987X.
- 123 MARK, P.; NILSSON, L. Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K. *The Journal of Physical Chemistry A*, v. 105, n. 43, p. 9954–9960, nov. 2001. ISSN 1089-5639. Publisher: American Chemical Society. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jp003020w>.
- 124 PHILLIPS, J. C. et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, v. 26, n. 16, p. 1781–1802, 2005. ISSN 1096-987X. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jcc.20289>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcc.20289>.
- 125 KNAPP, B.; OSPINA, L.; DEANE, C. M. Avoiding False Positive Conclusions in Molecular Simulation: The Importance of Replicas. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 14, n. 12, p. 6127–6138, dez. 2018. ISSN 1549-9618, 1549-9626. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jctc.8b00391>.

- 126 ELBER, R.; RUYMGAART, A. P.; HESS, B. SHAKE parallelization. *The European physical journal. Special topics*, v. 200, n. 1, p. 211–223, nov. 2011. ISSN 1951-6355. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3285512/>.
- 127 MIYAMOTO, S.; KOLLMAN, P. A. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *Journal of Computational Chemistry*, v. 13, n. 8, p. 952–962, 1992. ISSN 1096-987X. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jcc.540130805>. Disponível em: <https://www.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcc.540130805>.
- 128 DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An $N \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics*, v. 98, n. 12, p. 10089–10092, jun. 1993. ISSN 0021-9606. Publisher: American Institute of Physics. Disponível em: <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.464397>.
- 129 STERN, H. A. Molecular simulation with variable protonation states at constant pH. *The Journal of Chemical Physics*, v. 126, n. 16, p. 164112, abr. 2007. ISSN 0021-9606. Publisher: American Institute of Physics. Disponível em: <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.2731781>.
- 130 CHEN, Y.; ROUX, B. Constant-pH Hybrid Nonequilibrium Molecular Dynamics–Monte Carlo Simulation Method. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 11, n. 8, p. 3919–3931, ago. 2015. ISSN 1549-9618. Publisher: American Chemical Society. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00261>.
- 131 NILMEIER, J. P. et al. Nonequilibrium candidate Monte Carlo is an efficient tool for equilibrium simulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 45, p. E1009–E1018, nov. 2011. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Publisher: National Academy of Sciences Section: PNAS Plus. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/108/45/E1009>.
- 132 CHEN, Y.; ROUX, B. Efficient hybrid non-equilibrium molecular dynamics - Monte Carlo simulations with symmetric momentum reversal. *The Journal of Chemical Physics*, v. 141, n. 11, p. 114107, set. 2014. ISSN 0021-9606. Publisher: American Institute of Physics. Disponível em: <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.4895516>.
- 133 CHEN, Y.; ROUX, B. Generalized Metropolis acceptance criterion for hybrid non-equilibrium molecular dynamics—Monte Carlo simulations. *The Journal of Chemical Physics*, v. 142, n. 2, p. 024101, jan. 2015. ISSN 0021-9606. Publisher: American Institute of Physics. Disponível em: <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.4904889>.
- 134 RADAK, B. K.; ROUX, B. Efficiency in nonequilibrium molecular dynamics Monte Carlo simulations. *The Journal of Chemical Physics*, v. 145, n. 13, p. 134109, out. 2016. ISSN 0021-9606. Disponível em: <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.4964288>.
- 135 KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, v. 22, n. 12, p. 2577–2637, dez. 1983. ISSN 0006-3525.

- 136 WEINSTOCK, D. S. et al. Correlation between ^{13}C chemical shifts and helix content of peptide ensembles. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, v. 17, n. 5, p. 950–954, maio 2008. ISSN 0961-8368. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2327285/>.
- 137 MARQUSEE, S.; BALDWIN, R. L. Helix stabilization by Glu-...Lys+ salt bridges in short peptides of de novo design. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 84, n. 24, p. 8898–8902, dez. 1987. ISSN 0027-8424. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC299658/>.
- 138 FAIRMAN, R. et al. Further studies of the helix dipole model: Effects of a free $-\text{NH}_3^+$ or $-\text{COO}^-$ group on helix stability. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 5, n. 1, p. 1–7, 1989. ISSN 1097-0134. _eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/prot.340050102>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/prot.340050102>.
- 139 HUYGHUES-DESPOINTES, B. M. P.; SCHOLTZ, J. M.; BALDWIN, R. L. Helical peptides with three pairs of Asp-Arg and Glu-Arg residues in different orientations and spacings. *Protein Science*, v. 2, n. 1, p. 80–85, 1993. ISSN 1469-896X. _eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/pro.5560020108>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pro.5560020108>.
- 140 GAINES, G. L. *Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces*. New York: Interscience Publishers, 1966. OCLC: 178483.