



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

Carlos Roberto de Souza Camilo

Estudo por dinâmica molecular da ação do colesterol sobre o
acoplamento entre as faces de bicamadas fosfolipídicas.

São José do Rio Preto
2017

Carlos Roberto de Souza Camilo

Estudo por dinâmica molecular da ação do colesterol sobre o
acoplamento entre as faces de bicamadas fosfolipídicas.

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Ruggiero

São José do Rio Preto
2017

Estudo por dinâmica molecular da ação do colesterol sobre o acoplamento entre as faces de bicamadas fosfolipídicas.

Camilo, Carlos Roberto de Souza.

Estudo por dinâmica molecular da ação do colesterol sobre o acoplamento entre as faces de bicamadas fosfolipídicas. / Carlos Roberto de Souza Camilo . -- São José do Rio Preto, 2017
138 f. : il., tabs.

Orientador: José Roberto Ruggiero

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

1. Biologia molecular. 2. Biofísica. 3. Dinâmica molecular. 4. Colesterol. 5. Curcumina. 6. Bicamadas fosfolipídicas. 7. Polifenóis. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 539.2

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

Carlos Roberto de Souza Camilo

Estudo por dinâmica molecular da ação do colesterol sobre o
acoplamento entre as faces de bicamadas fosfolipídicas.

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. José Roberto Ruggiero
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Jorge Chahine
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Roberto Dias Lins Neto
FIOCRUZ – Recife

São José do Rio Preto
28 de Abril de 2017

gcq#480: "The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not *Eureka* but *That's funny...*."

Isaac Asimov

“A ciência, meu rapaz, é feita de erros, mas de erros que é bom cometer, pois conduzem pouco a pouco à verdade.”

Jules Verne

Viagem ao Centro da Terra (1864)

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é inteiramente dedicado à José Roberto Ruggiero, orientador, professor, conselheiro, amigo, e foi concluído graças à sua dedicação e auxílio.

Pela formação, agradeço à todos os professores do Departamento de Física do IBILCE/UNESP e docentes do Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular e, em especial, aos professores Leandro Cristante de Oliveira e Alexandre Suman de Araujo, pela avaliação do trabalho na Qualificação e conselhos durante minha formação; aos professores Jorge Chahine, Márcia Perez dos Santos Cabrera, Gustavo O. Bonilla Rodriguez e Sidney Jurado de Carvalho, sempre disponíveis para conversas e auxílio.

Agradeço ao Conselho do Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, na pessoa de seu coordenador, professor Marinonio Lopes Cornelio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

Aos meus colegas de curso e, em especial à Josimar Fernando da Silva e Mirian Guerra.

E, à minha mulher, Adriana Pereira da Silva, pelo companheirismo, dedicação e apoio fundamentais, mas também pelas críticas, incentivo e revisão do trabalho.

RESUMO

Simulações de bicamadas fosfolipídicas por dinâmica molecular são uma alternativa para o estudo computacional de propriedades estruturais e dinâmicas de membranas biológicas e de sua interação com outras moléculas. O colesterol é um importante componente lipídico das membranas de eucariotos e induz grandes alterações nas propriedades de uma membrana. Sua ação produz a coesão do plano da bicamada, induzindo o ordenamento das caudas dos fosfolipídios e o aumento da espessura. Este estudo avalia os efeitos da concentração de colesterol em bicamadas POPC, e revela que o colesterol reduz o acoplamento das faces da bicamada, com consequente redução da interação entre as duas faces constituintes; afeta também o acesso da água ao interior da estrutura, agindo principalmente sobre as caudas insaturadas do fosfolipídio.

A curcumina é um polifenol que têm associado à diversas atividades terapêuticas, inclusive ação antioxidante. Este trabalho avalia também a interação e estabilização de uma molécula de curcumina em bicamadas POPC com ou sem colesterol, e revela que o flavonoide se internaliza à estrutura, mas a posição em relação à bicamada e sua conformação de estabilidade são alteradas pela presença do colesterol.

Palavras-chave: Bicamadas fosfolipídicas. Colesterol. Acoplamento entre as faces de uma bicamada. Dinâmica molecular. Curcumina. Polifenóis.

ABSTRACT

Molecular dynamics simulations of phospholipid bilayers are an alternative for the computational study of structural and dynamic properties of biological membranes and their interaction with other molecules. Cholesterol is an important lipid component of eukaryotic membranes and it induces large changes in the properties of a membrane. Its action produces the lateral condensation of the bilayer, inducing the ordering of the tails of the phospholipids and increasing the bilayer thickness. This study evaluates the effects of cholesterol concentration on POPC bilayers, and reveals that cholesterol reduces the interleaflet coupling of the bilayer, with consequent reduction of the interaction between the two leaflets; also affecting the access of water to the interior of the structure, acting mainly on unsaturated tails of the phospholipid.

Curcumin, a polyphenol, has been associated with various therapeutic activities, including antioxidant action. This work also evaluates the interaction and stabilization of a curcumin molecule in POPC bilayers with or without cholesterol, and shows that the flavonoid is internalized to the structure, but the position in relation to the bilayer and its conformation of stability are altered by the presence of cholesterol.

Keywords: *Phospholipidic bilayers. Cholesterol. Interleaflet coupling. Molecular Dynamics. Curcumin. Polyphenols.*

LISTA DE FIGURAS

1.1 – Microscopia de um corte de célula mostrando a membrana plasmática e os meios celular e externo...	14
1.2 – Ilustração de uma micela e de uma bicamada.....	15
1.3 – Agregação de lipídios de caudas saturadas e mistura de lipídios de caudas saturadas e insaturadas....	16
1.4 – Esquematização da estrutura de um fosfolipídio.....	18
2.1 – Representação dos potenciais de interação harmônicos V_l e V_θ e do potencial torcional V_ϕ	28
2.2 – Representação do potencial diedral impróprio.....	28
2.3 – Ilustração de uma molécula de POPC na representação de todos os átomos e de átomos unidos.....	29
2.4 – Ilustração esquemática do método de integração <i>leap-frog</i>	31
2.5 – Representação da idealizada das condições periódicas de contorno.....	34
2.6 – Ilustração de modelos de três e quatro sítios para representação da molécula de água.....	36
2.7 – Distribuição da radial de pares entre $O_{\text{água}}-O_{\text{água}}$ para os modelos SPC e TIP3P.....	37
3.1 – Estrutura química de uma molécula de POPC (<i>1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina</i>).....	43
3.2 – Gráfico da oscilação da pressão do sistema com uma bicamada POPC pura.....	45
3.3 – Oscilação da temperatura da caixa de simulação – bicamada POPC pura.....	46
3.4 – Oscilação da energia potencial da caixa de simulação – bicamada POPC pura.....	46
3.5 – Energia de interação (Coulomb e VdW) entre os lipídios constituintes da bicamada POPC pura.....	47
3.6 – Energia de interação (Coulomb e VdW) entre os lipídios da bicamada e as moléculas de água.....	48
3.7 – Oscilação das dimensões da caixa de simulação – bicamada POPC pura.....	49
3.8 – Projeção frontal (plano xz) da posição dos átomos de fósforo das moléculas de POPC.....	50
3.9 – Ilustração da decomposição de um plano em diagramas de Voronoi.....	50
3.10 – Oscilação da área por lipídio da bicamada POPC pura.....	51
3.11 – Visualização do sistema contendo uma bicamada POPC pura.....	53
3.12 – Perfil de densidade para a bicamada POPC pura.....	53
3.13 – Comparação do perfil de densidade do grupo fosfato e dos átomos de fósforo do POPC.....	55
3.14 – Oscilação da espessura da bicamada POPC pura.....	56
3.15 – Parâmetro de ordem (S_{CD}) para as caudas saturadas da bicamada POPC pura.....	57
3.16 – Perfil de densidade dos grupos CH_3 terminais – comparação entre a face inferior e superior.....	59
3.17 – Comparação do perfil de densidade CH_3 terminais das caudas saturadas e insaturadas.....	60

3.18 – Perfil de densidade dos CH ₃ terminais da face superior – comparação em relação ao tipo de cauda..	61
4.1 – Estrutura química da molécula de colesterol.....	64
4.2 – Representação do sistema contendo uma bicamada mista POPC/Colesterol.....	67
4.3 – Comparação da energia de interação (Coul.) estabelecida entre os lipídios das bicamadas.....	68
4.4 – Comparação da energia de interação (VdW) entre os lipídios das diferentes bicamadas POPC/Col....	68
4.5 – Interação lipídios-água (Coul.) nas bicamadas de diferentes concentrações de colesterol.....	69
4.6 – Interação lipídios-água (termo van der Waals) nas diferentes bicamadas POPC/Colesterol.....	69
4.7 – Comparação dos perfis de densidade nas bicamadas de diferentes concentrações de colesterol.....	71
4.8 – Área por lipídio nas bicamadas de diferentes concentrações de colesterol.....	72
4.9 – Oscilação da espessura das bicamadas POPC/Colesterol.....	73
4.10 – Parâmetro de ordem das caudas saturadas das bicamadas de diferentes concentrações de colesterol.	74
4.11 – Parâmetro de ordem das caudas insaturadas das bicamadas POPC/Colesterol.....	74
4.12 – Representação de uma molécula de POPC com as caudas desordenadas (a) e ordenadas (b).....	74
4.13 – Energia de interação POPC-POPC (Coulomb) nas diferentes bicamadas.....	76
4.14 – Energia de interação POPC-POPC (van der Waals) nas diferentes bicamadas.....	76
4.15 – Energia de interação POPC-Colesterol (Coul. e VdW) nas diferentes bicamadas.....	77
4.16 – Energia de interação Colesterol-Colesterol (Coul. e VdW) nas bicamadas mistas.....	77
4.17 – Comparação perfil de densidade carbonilas _{POPC} com a distribuição da água nas bicamadas.....	82
4.18 – Distribuição radial de pares entre os átomos de fósforo _{POPC} e as moléculas de água.....	84
4.19 – Comparação perfis de densidade CH ₃ terminais face superior x face inferior.....	86
4.20 – Comparação perfis de densidade CH ₃ terminais caudas saturadas x caudas insaturadas.....	88
4.21 – Comparação perfis de densidade CH ₃ terminais caudas saturadas x insaturadas na face superior.....	89
4.22 – Quantidade de moléculas de água calculada a partir dos CH ₃ terminais – comparação tipo de cauda	91
4.23 – Energia de interação (Coul. e VdW) interna à monocamada superior, e inferior – bicamada 20%....	92
4.24 – Energia de interação (Coul. e VdW) entre a monocamada superior e inferior – comparação.....	93
5.1 – Estrutura química molécula de curcumina.....	97
5.2 – Ilustração configuração inicial e final – (A) curcumina inserida na fase aquosa.....	101
5.3 – Ilustração configuração inicial e final – (B) curcumina inserida dentro da bicamada (fase lipídica)...	103
5.4 – Ilustração configuração inicial e final – (C) automontagem da bicamada em presença da curcumina..	103
5.5 – Processo de automontagem acompanhado através da projeção em z das coordenadas átomos P _{POPC} ...	105

5.6 – Molécula de curcumina na representação de átomos unidos e átomos de interesse marcados.....	106
5.7 – Interação entre curcumina e bicamadas 0% colesterol (métodos A, B e C).....	107
5.8 – Interação entre curcumina e bicamadas 20% colesterol acompanhada através projeção em z.....	108
5.9 – Interação entre curcumina e bicamadas 40% colesterol.....	109
5.10 – Comparação (S_{CD}) das caudas saturadas – bicamadas 20% colesterol com e sem curcumina.....	113
5.11 – Comparação (S_{CD}) das caudas insaturadas – bicamadas 20% colesterol com e sem curcumina.....	113
5.12 – Perfil de densidade bicamada com curcumina – exemplo da bicamada com 20% colesterol.....	115
5.13 – Perfis de densidade átomos marcados – bicamadas 0% colesterol (informação conformação).....	118
5.14 – Perfis de densidade átomos marcados na curcumina – bicamadas 20% colesterol.....	119
5.15 – Perfis de densidade átomos marcados na curcumina – bicamadas 40% colesterol.....	120
5.16 – Histograma do ângulo estabelecido pelos átomos marcados (informação sobre a conformação).....	122
5.17 – Distribuição radial de pares entre os átomos H-hidroxila _{Curcumina} e as moléculas de água.....	123

LISTA DE TABELAS

1.1 – Principais fosfolípidios de interesse biológico.....	18
4.1 – Ligações H estabelecidas pelos lípidios nas bicamadas de diferentes concentrações de colesterol.....	79
4.2 – Área média ocupada por molécula de lípidio (A_{POPC} e $A_{Col.}$) nas diferentes bicamadas.....	81
4.3 – Espessura e distâncias Carbonilas _{POPC} -Carbonilas _{POPC} e N_{POPC} - N_{POPC} nas diferentes bicamadas.....	83
5.1 – Área por lípidio e espessura nas diferentes bicamadas – comparação sistemas com e sem curcumina.	111
5.2 – Distância curcumina – plano da bicamada nos diferentes sistemas.....	116
5.3 – Interação energética total (Coul. + VdW) entre a curcumina e demais componentes dos sistemas.....	124
5.4 – Ligações H estabelecidas entre curcumina e os demais componentes dos sistemas.....	124
A1 – Composição das caixas e tempo total de simulação.....	134
A2 – Composição das bicamadas, por face.....	135

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATB - *Automated Topology Builder and Repository*

Col. - Colesterol

Curc. - Curcumina

DOPC – *dipalmitoilfosfatidilcolina*

GROMACS – *Groningen Machine for Chemical Simulations*

GROMOS – Campo de forças

l_o – *liquid-ordered*

l_d – *liquid-disordered*

MemGen – *Membrane Generator*

MD – *Molecular Dynamics*

POPC – *1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina*

P_{ref} – Pressão de referência

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SPC – Modelo para representação computacional da molécula de água

TIP3-P – Modelo computacional para a representação da molécula de água

T_m – Temperatura de transição de fase (*melting temperature*)

T_{ref} – Temperatura de referência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lipídios e Membranas Biológicas.....	14
1.2 Lipídios em Solução Aquosa.....	15
1.3 Fosfolipídios.....	17
1.4 Colesterol.....	19
1.5 Interação entre as Monocamadas de uma Membrana.....	20
1.6 Peroxidação Lipídica e Polifenóis.....	22
1.6.1 Curcumina.....	23
1.7 Simulação Computacional de Sistemas Biológicos.....	24
1.8 Objetivos.....	25

2 METODOLOGIA

2.1 Dinâmica Molecular.....	26
2.1.1 Campo de forças.....	26
2.1.2 Equações de movimento e integração numérica.....	30
2.1.3 Condições iniciais, minimização e equilíbrio.....	32
2.1.4 <i>Ensemble</i> e controle de temperatura e pressão.....	32
2.1.5 Caixa de simulação e condições periódicas de contorno.....	33
2.1.6 Mínima imagem, raio de corte e interações de curto e longo alcance.....	35
2.1.7 Solvatação e modelos para a molécula de água.....	36
2.1.8 Pacotes de Simulação.....	38
2.2 Estrutura e Topologia das Moléculas.....	38
2.3 Parâmetros de Simulação.....	40
2.3.1 Construção das caixas de simulação.....	41
2.3.2 Análise das trajetórias.....	41

3 SIMULAÇÃO DE BICAMADAS FOSFOLIPÍDICAS

3.1 Introdução.....	42
3.2 POPC.....	43
3.3 Simulação de uma Bicamada POPC Pura.....	44
3.3.1 Estabilidade do sistema.....	44
3.4 Análise da Bicamada.....	48
3.4.1 Área por lipídio.....	48
3.4.2 Análise da estrutura da bicamada.....	52
3.4.3 Espessura da bicamada.....	54
3.4.4 Parâmetros de ordem.....	56
3.4.5 Acoplamento entre as faces da bicamada.....	58

3.5 Conclusão.....	62
4 AÇÃO DO COLESTEROL EM BICAMADAS FOSFOLIPÍDICAS	
4.1 Introdução.....	63
4.2 Simulações de Bicamadas Contendo Colesterol.....	64
4.3 Efeitos da Concentração de Colesterol em Bicamadas POPC.....	66
4.3.1 Estabilidade das bicamadas.....	67
4.3.2 Estruturação das bicamadas.....	70
4.3.3 Área por lipídio, espessura da bicamada e parâmetro de ordem.....	72
4.3.4 Ação do colesterol sobre as interações energéticas na bicamada.....	75
4.3.5 Efeitos sobre a hidratação das bicamadas.....	82
4.3.6 Ação sobre o acoplamento entre as faces das bicamadas.....	85
4.4 Conclusão.....	94
5 CURCUMINA	
5.1 Introdução.....	96
5.2 Interação da Curcumina com Bicamadas de Diferentes Concentrações de Colesterol.....	99
5.2.1 Método A: inserção da curcumina na fase aquosa.....	100
5.2.2 Método B: inserção da curcumina na fase lipídica.....	102
5.2.3 Método C: automontagem da bicamada em presença da molécula de curcumina.....	104
5.2.4 Resultados.....	105
5.3 Efeitos da Curcumina sobre as Propriedades da Bicamada.....	110
5.4 Estabilização da Molécula de Curcumina.....	115
5.5 Conformação da Molécula no Ambiente de Bicamada.....	117
5.6 Interações Energéticas Estabelecidas pela Curcumina.....	123
5.7 Conclusão.....	125
REFERÊNCIAS	127
APÊNDICE – Resumo das simulações e composição dos sistemas estudados.....	134

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lipídios e Membranas Biológicas

"A primeira célula provavelmente veio a existir quando uma membrana formou-se, delimitando um pequeno volume de solução aquosa e separando-a do resto do ambiente" (Nelson e Cox, 2004). A compartimentalização de moléculas em um ambiente isolado consistiu num processo fundamental para evolução das moléculas abióticas em sistemas mais complexos e o surgimento da vida. Membranas biológicas são as estruturas responsáveis pela separação do conteúdo celular do resto do ambiente (ver Figura 1.1); seu componente fundamental são os lipídios – moléculas orgânicas anfipáticas ou hidrofóbicas.

Moléculas de lipídios desempenham diversas funções em organismos vivos, sendo classificadas de acordo com suas características moleculares; as principais classes de lipídios de importância biológica são os esteroides (como o colesterol), que desempenham funções de sinalização hormonal entre tecidos e também sinalização intracelular, e os ácidos graxos, ou ácidos graxos esterificados ao glicerol (mono, di ou triglicerídeos), que constituem a principal forma de armazenamento de energia em organismos superiores. Glicerídeos podem ser modificados com a adição de um grupo fosfato ao glicerol dando origem a moléculas chamadas de fosfolipídios, as componentes estruturais das membranas biológicas.

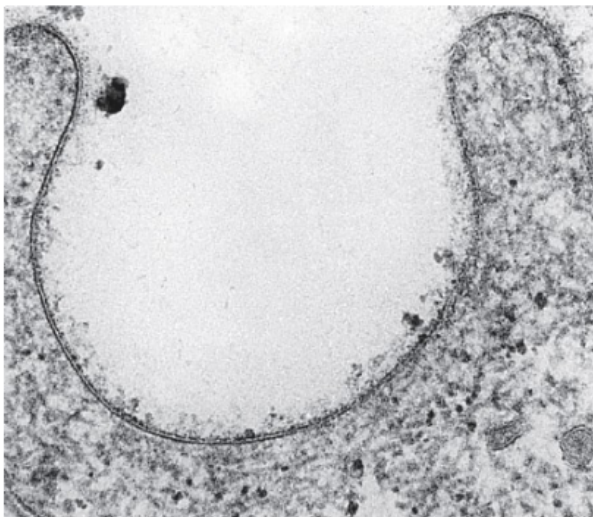


Figura 1.1 – Microscopia de um corte de célula. A membrana plasmática delimita o ambiente celular, propiciando um microambiente com características distintas das do meio externo. Extraída de Nelson e Cox, 2004.

1.2 Lipídios em Solução Aquosa

Ácidos graxos são cadeias longas de átomos de carbono cujas ligações podem ser completamente saturadas, ou conter várias insaturações. A esterificação de ácidos graxos ao glicerol dá origem a moléculas anfipáticas (apresentam uma região hidrofílica, solúvel em água, e outra hidrofóbica, insolúvel): os glicerídeos. Em solução aquosa, as interações hidrofóbicas tendem agrupar as cadeias de carbono, que são apolares, minimizando sua superfície de contato com a água e expondo somente grupos polares à região hidratada. A estrutura formada depende da quantidade de cadeias de ácidos graxos e também da quantidade de insaturações presentes nestas.

Lipídios de apenas uma cadeia carbônica apresentam simetria cônica e tendem a agrupar-se em estruturas globulares (que podem ter alta excentricidade) chamadas micelas (ver Figura 1.2a). A simetria cilíndrica de lipídios de duas cadeias carbônicas, entretanto, lhes confere a possibilidade de agrupar-se em estruturas constituídas por duas camadas antiparalelas, as chamadas bicamadas (Figura 1.2b); os componentes fundamentais das bicamadas são os fosfolipídios e sua organização estrutural é a chave para a formação das membranas biológicas.

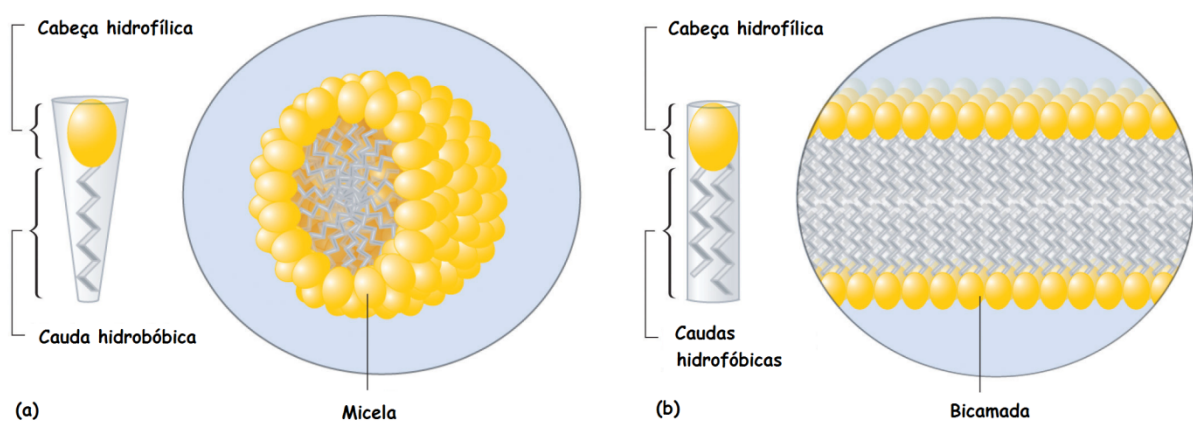


Figura 1.2 – Micela (a) e bicamada (b), duas possibilidades de organização estrutural de lipídios em água: a geometria dos lipídios constituintes, principalmente de suas caudas, determina a estrutura formada. Adaptada de Averill e Eldredge, 2007.

A duas monocamadas, ou *faces*, de uma bicamada são organizadas de forma que as cadeias de carbono, aqui chamadas de *caudas*, estejam internas à estrutura, enquanto que os grupos polares, aqui chamados de *cabeças*, ficam voltadas para o lado externo, em contato

com a água. Esta organização propicia uma separação de fases no sistema, definindo um ambiente aquoso interno e outro externo (as bicamadas são estruturas fechadas), além da região hidrofóbica das caudas, onde podem estar presentes outras moléculas apolares.

Existe ainda uma terceira possibilidade estrutural, as lipossomas, que são estruturas esféricas formadas por bicamadas concêntricas. Tais estruturas são vesículas que mantêm um microambiente interno isolado do meio e por isso desempenham papel no transporte de substâncias (peptídeos, proteínas, genes não-virais, etc.) que precisam ser mantidas em seu meio nativo para permanecerem biologicamente ativas.

Micelas, bicamadas e lipossomas são estruturas lipídicas observadas em solução aquosa devido à característica anfipática dos lipídios (gliceróis e fosfolipídios). Sua formação ocorre por interações hidrofóbicas¹, mas sua estabilização é devida a interações do tipo van der Waals entre seus componentes, e ligações de hidrogênio entre as cabeças dos lipídios. A estabilização de tais estruturas depende não somente das características das cabeças polares dos lipídios que as constituem, mas também das de suas caudas (tamanho e quantidade de insaturações). A dupla ligação presente nas insaturações das cadeias de carbono impõem restrições ao movimento das caudas e lhes confere uma torção – característica que afeta a acomodação das caudas em estruturas lipídicas devido a impedimentos estéricos (Figura 1.3).

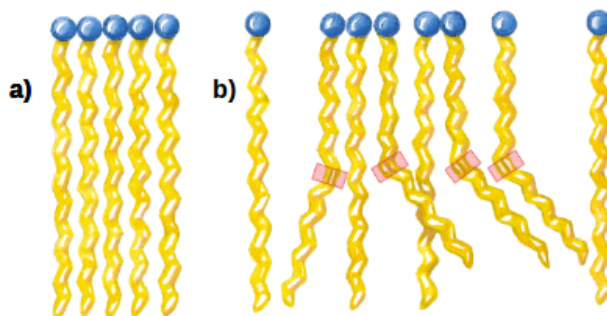


Figura 1.3 – A presença de insaturações nas caudas dos lipídios (em amarelo; as cabeças são apresentadas em azul) afeta as propriedades da estrutura formada pelas moléculas em solução aquosa: a) estrutura viscosa formada por ácidos graxos saturados; b) estrutura fluida constituída por uma mistura de ácidos graxos saturados e insaturados (as insaturações estão destacadas em rosa).
Extraída de Nelson e Cox, 2004.

1 O contato da água (ou outro solvente polar) com moléculas apolares reduz seus graus de liberdade; na tentativa de restituir os graus de liberdade perdidos, as moléculas de água tendem a interagir somente entre si ou com moléculas polares, isolando e agrupando moléculas apolares. É a interação hidrofóbica, portanto, que promove a agregação de moléculas ou grupos apolares quando em solução aquosa.

1.3 Fosfolipídios

Fosfolipídios são compostos por moléculas de glicerol esterificadas por duas cadeias de ácidos graxos, enquanto que a terceira hidroxila da molécula é modificada por um grupo fosfato. Um dos oxigênios do fosfato está ligado a um grupo substituinte que confere propriedades características ao fosfolipídio. Fosfolipídios normalmente apresentam uma cadeia saturada e uma insaturada², e o tamanho destas pode variar (ver Figura 1.4). Os átomos presentes no grupo característico de um fosfolipídio conferem características próprias à molécula pois são eles que definem a carga total do lipídio, podendo compensar a carga negativa do fosfato, tornando o fosfolipídio *zwitteriônico*, ou lhes conferindo outros valores de carga líquida (ver Tabela 1.1). A quantidade e a organização dos átomos do grupo característico podem interferir também na geometria da molécula.

Fosfolipídios são os componentes estruturais fundamentais de membranas pois são eles que definem e estabilizam estruturas em bicamada; eles não são os componentes majoritários em massa das membranas celulares – perfazem de 20~40% do "peso seco", dependendo do organismo e do tipo de célula (Nelson e Cox, 2004) – mas é o seu comportamento em solução aquosa que possibilita a formação de membranas e a necessária separação das fases do sistema para que haja a compartimentalização do ambiente.

O fato de bicamadas serem estabilizadas por interações do tipo van der Waals e Coulomb, ligações de hidrogênio, e efeito hidrofóbico, mas não por ligações covalentes, é de fundamental importância para a atividade biológica das membranas, pois é isto que lhes confere a fluidez necessária para compartimentalizar ambientes e, ao mesmo tempo, serem flexíveis para permitir o transporte de substâncias e a interação com proteínas – bicamadas são estruturas semipermeáveis.

A composição lipídica de uma bicamada (e consequentemente de uma membrana) afeta suas propriedades devido não apenas à diferenças entre os grupos característicos das cabeças polares, mas também pelo comprimento das caudas dos fosfolipídios. Membranas constituídas por lipídios de caudas maiores terão maior espessura e uma região apolar maior; fator que afeta sua fluidez, sua interação com outras moléculas e o transporte de substâncias através da membrana. Membranas biológicas são estruturas fluidas, e a liberdade com que

² Existem fosfolipídios em que as duas caudas são saturadas (como o DPPC, DPPE, etc.), ou em que as duas caudas apresentam insaturação (DOPC, DOPE, etc.). As duas primeiras letras da sigla designam os ácidos graxos que constituem as caudas do fosfolipídio, e as duas últimas indicam o grupo característico da cabeça.

seus componentes se deslocam pela estrutura (sua difusão) também é dependente das características dos lipídios que compõem a membrana.

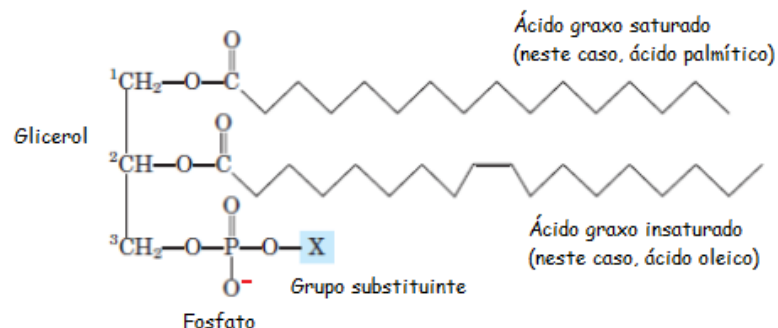


Figura 1.4 – Esquemática da composição de um fosfolípido; o grupo substituinte e o tamanho das caudas afetam as características da estrutura que grupos destas moléculas formam quando em solução aquosa. Adaptada de Averill e Eldredge, 2007.

Tabela 1.1 – Principais fosfolipídios de interesse biológico. Adaptada de Nelson e Cox, 2004.

Fosfolípido	Grupo característico	Carga líquida (em pH 7)
Ácido Fosfatídico	— H	-1
Fosfatidiletanolamina	— CH ₂ —CH ₂ —NH ₃ ⁺	0
Fosfatidilcolina	— CH ₂ —CH ₂ —N ⁺ (CH ₃) ₃	0
Fosfatidilserina	— CH ₂ —CH—NH ₃ ⁺ COO ⁻	-1
Fosfatidilglicerol	— CH ₂ —CH—CH ₂ —OH OH	-1
Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato		-4
Cardiolipina	— CH ₂ CHOH CH ₂ —O—P(=O)(O ⁻)—O—CH ₂ — CH—O—C(=O)—R ¹ CH ₂ —O—C(=O)—R ²	-2

1.4 Colesterol

O colesterol é o principal esteroide encontrado em membranas biológicas; abundante em células animais, representa 20~30% dos lipídios da membrana plasmática, mas pode atingir 50% nas células sanguíneas (Róg et al., 2009). É um lipídio de cadeia mista e longa, apresentando diversos anéis, que conferem rigidez à molécula, e uma pequena cadeia acíclica num dos extremos de sua estrutura; no extremo oposto, a presença de uma hidroxila determina uma região polar na molécula. O colesterol é portanto uma molécula anfipática, mas de propriedades muito diferentes das dos fosfolipídios; sua estrutura diversificada faz com que o colesterol atue como um modificador das propriedades de membranas biológicas.

No passado, a presença do colesterol no organismo foi associada à diversas doenças cardiovasculares, o que gerou uma concepção negativa da ação da molécula pela população em geral, com muitas pessoas buscando evitar o consumo de alimentos ricos em colesterol (como gema de ovo, queijos e fígado). Entretanto, sabe-se atualmente que a maior parte do colesterol presente no organismo de animais é sintetizada pelo próprio organismo; apenas uma pequena parte é adquirida pela alimentação³ (Alberts et al., 2002) e o organismo compensa o que é absorvido reduzindo a produção do esteroide (Lecerf e Lorgeril, 2011). O nível de colesterol no sangue (medido através das lipoproteínas que o transportam no meio celular) consiste, na realidade, num indício de se organismo apresenta algum problema – o colesterol atua como um sinalizador.

Diversas modificações estruturais em membranas biológicas são atribuídas à ação do colesterol: seu efeito regulador altera a fluidez da bicamada, afetando propriedades como a área de contato da cabeça dos lipídios com a água e a espessura da região hidrofóbica, além de reduzir a permeabilidade da estrutura lipídica à moléculas de água (Hofsäb et al., 2003; Róg et al., 2009). Tais modificações implicam em alterações na redução da mobilidade de lipídios e outras moléculas dentro da bicamada – o colesterol possui a capacidade de regular a fluidez de uma membrana. Na ausência do colesterol, a membrana pode tornar-se excessivamente fluida e permeável, o que compromete sua função de seletividade às moléculas que passam através da estrutura (Alberts et al., 2002).

3 A incidência de doenças cardiovasculares está sim associada à má alimentação, mas não pela ingestão de colesterol; o consumo exagerado de alimentos ricos em gordura eleva o risco de doenças como pressão alta e parada cardíaca porque se não houver compensação com o aumento do gasto metabólico (com atividade física, por exemplo), ocorrerá o acúmulo de lipídios no organismo, principalmente na forma de triglicerídios. Aliada à má alimentação, o sedentarismo e o tabagismo são os principais fatores de risco de doenças cardiovasculares.

O excesso de produção de colesterol em alguns indivíduos está associado a distúrbios genéticos.

O colesterol é um componente necessário em membranas biológicas de animais, mas em altas concentrações pode enrijecer excessivamente a estrutura, podendo inclusive fazer com que a membrana perca sua função biológica: as caudas dos fosfolipídios tornam-se tão ordenadas que a fluidez e permeabilidade da membrana ficam comprometidas; neste caso ocorre a transição da membrana da fase líquido-cristalina (fase em que as membranas são biologicamente ativas, havendo um equilíbrio entre fluidez e permeabilidade), para a fase gel⁴. Portanto, deve haver um equilíbrio entre a concentração de colesterol na membrana e as propriedades que ela deve apresentar; e é por este motivo que, assim como ocorre com os fosfolipídios, a proporção de colesterol na bicamada varia de acordo com o tipo de célula, com o tipo de organela, e até mesmo quanto à face considerada (se a face é voltada para o meio externo, ou para meio celular) (Nelson e Cox, 2004).

A influência da composição e da proporção de fosfolipídios e colesterol sobre as propriedades de uma membrana é alvo de estudos experimentais há décadas (Papahadjopoulos et al., 1973; Hjort Ipsen et al., 1987; Ohvo-Rekilä et al., 2002) e mais recentemente passou a ser abordada através de simulações computacionais de bicamadas (Berkowitz et al., 2009; Róg et al., 2009; Baoukina e Tieleman, 2015), que permitem o estudo das interações entre os componentes a nível atômico. Acredita-se que a compreensão das alterações promovidas pelo colesterol na estrutura e na dinâmica das membranas seja importante para entendimento de como ocorre sua atividade e de como esta pode vir a ser regulada (Yesylevskyy e Demchenko, 2015).

1.5 Interação entre as Monocamadas de uma Membrana

Membranas são sistemas constituídos por faces (ou monocamadas) antiparalelas que são mantidas unidas pela interação dos lipídios com a fase aquosa em ambas as monocamadas e também por interações do tipo van der Waals estabelecidas pelos átomos das caudas de uma monocamada com os da monocamada oposta. Uma das funções biológicas desempenhada pelo colesterol é a de sinalização hormonal através das membranas, e a transmissão da

4 A fase líquido-cristalina de uma membrana é chamada de l_d , do inglês, *liquid-disordered*, enquanto que na fase gel, a estrutura é denominada l_o , do inglês, *liquid-ordered*. A transição de determinada região da membrana de uma fase para a outra está intimamente ligada à concentração local de colesterol (Berkowitz, 2009).

Desconsiderando-se a ação do colesterol, a transição l_o - l_d ocorre em função da temperatura do sistema e a temperatura em que é verificada (T_m) depende da composição lipídica da estrutura.

informação envolve a passagem de moléculas através da estrutura. Inicialmente, os estudos sobre a sinalização e transporte através de membranas focavam no papel desempenhado por proteínas transmembrânicas que, integradas à estrutura lipídica, expõem regiões da molécula à fase aquosa através de ambas as monocamadas da membrana; esta abordagem pressupunha que as monocamadas atuavam independentemente uma da outra, desempenhando apenas a função estrutural de compartimentalizar o ambiente. Thompson e colaboradores (Schmidt et al., 1978), estudando vesículas compostas por um tipo de fosfolipídio e esfingomielina (um lipídio de apenas uma cadeia carbônica, que desempenha papel de sinalização no processo de sinapse entre neurônios) através de ressonância magnética nuclear (RMN), encontraram evidências de que as duas monocamadas interagem entre si, apresentando algum tipo de acoplamento. Estudos posteriores, indicaram que a fraca interação entre as monocamadas estava relacionada à fase (l_o ou l_d) da membrana, e que, ao induzir a transição de fases na monocamada externa de uma vesícula, o fenômeno repercutia na monocamada interna, sugerindo que o acoplamento poderia consistir no contato intercalado entre as caudas das duas monocamadas (Düzgünes et al., 1988).

A ação do colesterol modula as propriedades de uma membrana e pode induzir localmente a transição de fase da estrutura; o estabelecimento de domínios ricos em colesterol numa membrana têm sido associado à formação dos chamados *lipid rafts* – microdomínios funcionais na membrana que estão relacionados à processos de reconhecimento celular e sinalização (Berkowitz, 2009). Regiões de *rafts* são caracterizadas por um comportamento dinâmico distinto do resto da membrana e acredita-se que a acomodação dos extremos das caudas dos fosfolipídios desempenhe um papel importante em sua estruturação (Róg et al., 2009). Mas o extremo das cadeias dos fosfolipídios é a região onde ocorre o acoplamento entre as monocamadas; o estudo da interação dos grupos presentes nesta região pode portanto fornecer informações relevantes sobre a formação de microdomínios na membrana e seu papel na sinalização através da estrutura (Niemelä et al., 2009).

Embora a interação entre as monocamadas constituintes de uma membrana biológica ainda não tenha sido bem caracterizada, a recente abordagem computacional do problema através de simulações têm revelado informações que podem auxiliar na compreensão de como se dá o acoplamento entre as faces de uma bicamada, e qual é o efeito da composição lipídica sobre tal interação (Nickels et al., 2015; Capponi et al., 2016; Tian et al., 2016)

1.6 Peroxidação Lipídica e Polifenóis

Diversos processos biológicos que ocorrem na vizinhança das membranas biológicas podem induzir a peroxidação lipídica, que consiste na degradação oxidativa de lipídios por radicais livres. A ação da radiação (UV e raios-X), e também da poluição, continuamente promove a formação de radicais livres no ambiente celular (Košinová et al., 2011) que, entre diversos efeitos degenerativos, podem agir sobre membranas celulares, capturando elétrons das insaturações de ácidos graxos e se ligando à cauda insaturada do lipídio. As propriedades de uma membrana são sensíveis à quantidade de carbonos das caudas dos fosfolipídios que as constituem, e também à quantidade de insaturações que estas apresentam; assim, a ligação de um radical livre à cadeia acíclica promove profundas modificações nas características do fosfolipídio, induzindo alterações locais nas propriedades da membrana. A recorrência do processo de peroxidação pode levar à degradação da membrana e à perda de sua atividade biológica e, em larga escala, pode causar doenças ao organismo e também é associado ao processo de envelhecimento (Rikans e Hornbrook, 1997).

A ação de moléculas com propriedades antioxidantes reduz a formação de radicais livres e conseqüentemente previne a degradação de membranas celulares. Polifenóis são uma ampla classe de moléculas sintetizadas por plantas, muitas das quais fazem parte da dieta humana (frutas, vegetais, especiarias), e também são encontrados em produtos derivados destas plantas, como chás, chocolate, vinho e cervejas (Košinová et al., 2011); são divididos em diversos grupos, de acordo com sua estrutura química (flavonoides, taninos, lignanas, etc.), e têm sido muito estudados por sua possível atividade contra doenças cardíacas, câncer, envelhecimento e doenças degenerativas (Košinová et al., 2011; Havsteen, 2002). Entre suas diversas atividades biológicas, são poderosos antioxidantes.

Polifenóis são moléculas anfipáticas, constituídas por anéis aromáticos aos quais estão ligados uma ou mais hidroxilas (formando o grupo fenol, que dá nome ao grupo de moléculas); a ligação entre seus anéis é estabelecida por anéis condensados ou por cadeias acíclicas onde podem estar presentes grupos polares, como carbonilas. São as hidroxilas que conferem a atividade antioxidativa aos polifenóis, pois a reação e captura de radicais livres por estas inibe sua ação sobre componentes biológicos – como os fosfolipídios (Trouillas et al, 2006).

A anfipaticidade dos polifenóis lhes confere a possibilidade de interagirem ou integrarem membranas biológicas, e sua posição e orientação dentro de membrana dependerá

da quantidade e posição de suas hidroxilas. A localização de polifenóis em membranas permanece um caso controverso (ocorre na interface com a água, ou em regiões mais internas e apolares da membrana?) e o estudo por simulações computacionais da interação destas moléculas com bicamadas fosfolipídicas pode fornecer informações relevantes (Košinová et al., 2011; Kopeć et al. 2013).

Por outro lado, a própria presença destas moléculas pode vir a modificar as propriedades da membrana, e sabe-se que em concentrações elevadas os polifenóis são tóxicos, com o efeito reverso de induzirem a formação de radicais livres (Burgos-Morón et al., 2010). A ação destas moléculas sobre as propriedades de uma membrana é outra característica passível de ser estudada através de simulações computacionais.

1.6.1 Curcumina

A curcumina é um flavonoide (um subgrupo dos polifenóis) a que têm sido atribuído um amplo espectro de atividades terapêuticas: ação antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena e antimutagênica; entretanto, seus mecanismos de ação permanecem desconhecido (Ingolfsson et al., 2007). Abordagens computacionais ao problema têm fornecido dados que podem auxiliar na compreensão de como a molécula interage com o DNA (Koonammackal et al., 2011) e com proteínas envolvidas no processo de sinalização por lipopolissacarídeos (Wang et al., 2015).

A curcumina é o principal componente bioativo do açafrão-da-terra (*Curcuma longa*), possuindo portanto uma íntima relação com a culinária oriental. Estudos *in vitro* revelam que a curcumina modula as propriedades de bicamadas fosfolipídicas, tendo ação semelhante à observada em peptídeos antimicrobianos (também de características anfifílicas) (Ingolfsson et al., 2007; Hung et al., 2008), mas a forma como se dá tal interação ainda não é conhecida.

1.7 Simulação Computacional de Sistemas Biológicos

O estudo de sistemas biológicos através de simulações computacionais possibilita a análise de sua dinâmica e estabilidade a níveis atômico e molecular, resolução difícil de ser atingida através de técnicas experimentais. Simulações por dinâmica molecular possibilitam estudar a evolução temporal de um sistema e, se este estiver adequadamente representado, fornecer informações sobre a interação entre os componentes do sistema e os mecanismos de ação de moléculas.

Aplicadas ao estudo de membranas biológicas, simulações de bicamadas que mimetizam características importantes da estrutura lipídica, contribuem com dados sobre a dinâmica das interações estabelecidas entre os lipídios e as implicações destas sobre as propriedades da membrana (Tieleman et al., 1997; Marrink et al., 2009). Estudos sobre o comportamento de sistemas compostos por mais de um tipo de lipídio auxiliam na elucidação da ação específica de um tipo de molécula sobre a estrutura, possibilitando a avaliação de questões como formação de domínios e a condensação do sistema promovida por moléculas como o colesterol (Edholm e Nyberg, 1992; Berkowitz, 2009).

A ação de moléculas de interesse biológico sobre a membrana também pode ser abordada por simulações de bicamadas de composição apropriada, com o estudo da interação que a molécula estabelece com os lipídios da estrutura.

1.8 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho compreende a simulação por dinâmica molecular de bicamadas compostas por um tipo de fosfolipídio (POPC) e colesterol, e também a avaliação da interação destes sistemas com um tipo de flavonoide de interesse biológico (curcumina). Dentre os objetivos específicos do trabalho estão:

- a) Validar os parâmetros de simulação empregados, e a modelagem utilizada na representação computacional das moléculas, através de grandezas de interesse calculadas para uma bicamada POPC pura e sua comparação com dados experimentais disponíveis, e também com valores obtidos em outros trabalhos de simulação;
- b) Avaliar o efeito da concentração de colesterol sobre a estrutura lipídica através de bicamadas constituídas por moléculas de POPC e colesterol em três concentrações diferentes de colesterol: 0, 20 e 40%. As modificações promovidas pela ação do colesterol, com foco nas alterações sobre o acoplamento entre as duas faces da bicamada, serão analisadas por comparação com os resultados obtidos da bicamada pura (0% colesterol);
- c) Avaliar a interação entre uma molécula de curcumina e bicamadas de diferentes concentrações de colesterol, com foco na estabilização do flavonoide na estrutura e em possíveis alterações na bicamadas em decorrência da presença da curcumina. A interação entre flavonoide e bicamada será avaliada através de três métodos diferentes de inserção da molécula: na fase aquosa do sistema, na fase lipídica (na região apolar da bicamada), e através do processo de automontagem da bicamada em presença do flavonoide.

2. METODOLOGIA

2.1 Dinâmica Molecular

Simulações por dinâmica molecular constituem uma técnica computacional muito versátil que pode ser aplicada ao estudo desde macromoléculas de interesse biológico, até a ciência dos materiais. Fundamentadas nos princípios da Mecânica Clássica, simulações por dinâmica molecular podem fornecer informações sobre o comportamento dinâmico do sistema de interesse, a nível atômico e em escalas de tempo infinitesimais (normalmente, a partir de ps, isto é, $\sim 10^{-12}$ segundos). Propriedades macroscópicas dos sistemas também podem ser obtidas com a aplicação de formulações de Mecânica Estatística – o que possibilita a dedução de propriedades observáveis (temperatura, energia potencial, volume, densidade, etc.) a partir do comportamento microscópico do sistema.

As seções a seguir apresentam tópicos básicos ao desenvolvimento de simulações por dinâmica molecular.

2.1.1 Campo de forças

Em simulações por dinâmica molecular, as moléculas são tratadas como uma coleção de átomos unidos por potenciais clássicos. O conjunto de funções potencial de interação e os parâmetros nelas definidos constitui o chamado campo de forças – o campo de forças é uma modelagem matemática que tenta mimetizar o ambiente físico do sistema, e portanto deve ser adequado a representar as condições sob as quais se deseja realizar seu estudo (no vácuo, em ambiente aquoso implícito, ou explícito, etc.).

Um campo de forças deve incluir termos para representar átomos ligados (comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros) e termos para átomos não ligados (interações de van der Waals e de Coulomb); átomos são denominados ligados se estiverem separados por, no máximo, três ligações químicas, e ditos não ligados quando, seguindo as ligações químicas da molécula, forem separados por mais de três ligações.

Para se assegurar que o campo de forças representa satisfatoriamente o ambiente em estudo, às vezes é necessário modificá-lo a partir de dados empíricos, parametrizá-lo de forma que os resultados obtidos nas simulações sejam comparáveis às medições experimentais. A aplicação do campo de forças a um sistema bem caracterizado, uma simulação de controle, às vezes é necessária para se avaliar se o campo de forças utilizado é adequado, se necessita de modificações, ou até mesmo se deve ser substituído por outro.

O conjunto de potenciais de interação que compõem o campo de forças deve permitir o cálculo da energia potencial do sistema a partir da estrutura tridimensional de seus átomos. Um típico campo de forças assume a forma

$$V(\vec{r}) = \sum V_l + \sum V_\theta + \sum V_\varphi + \sum V_{vdW} + \sum V_{Eletr.} \quad , \quad (2.1)$$

onde V_l são termos que descrevem a vibração das ligações atômicas em torno do seu valor de equilíbrio, V_θ descreve as torções em torno das ligações de uma molécula, V_φ descreve a variação dos diedros em torno de um ângulo de equilíbrio, V_{vdW} representa o conjunto de termos que descrevem as interações do tipo van der Waals, e $V_{Eletr.}$ descreve as interações eletrostáticas entre cargas (ver Figura 2.1).

Os potenciais harmônicos V_l e V_θ são construídos com base na lei de Hooke, isto é, em termos de constantes de mola, k_l e k_θ , e da variação l e θ em torno da posição de equilíbrio l_0 e θ_0 :

$$V_l = k_l(l - l_0)^2 \quad \text{e} \quad V_\theta = k_\theta(\theta - \theta_0)^2 \quad . \quad (2.2 \text{ e } 2.3)$$

Como a própria lei que os fundamenta, estes potenciais são válidos apenas para pequenas oscilações em torno da posição de equilíbrio.

O potencial torcional V_φ trata dos diedros e normalmente assume a forma

$$V_\varphi = \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\varphi - \gamma)] \quad , \quad (2.4)$$

onde V_n é a barreira de energia para a torção, n é o número de máximos (ou mínimos) de energia em uma torção completa, φ é o ângulo diedro e γ é a diferença de fase no ângulo diedro que pode gerar um ponto de máximo ou mínimo em $\varphi = 0$.

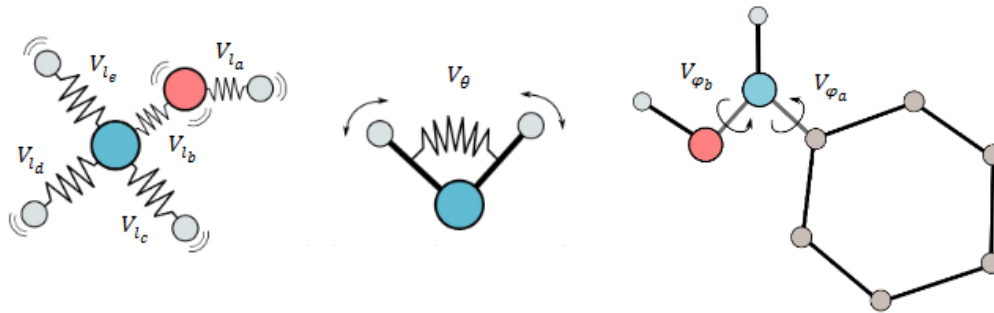


Figura 2.1 – Da esquerda para a direita, idealização dos potenciais harmônicos V_l e V_{θ} e do potencial torcional V_{φ} . Adaptada de Martínez, 2010.

As interações entre pares (i, j) de átomos não ligados são descritas por potenciais dos tipos van der Waals e eletrostático, representados, respectivamente, pelos potenciais de Lennard-Jones e de Coulomb

$$V_{vdW} = 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad \text{e} \quad V_{Eletros.} = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon_r r_{ij}}, \quad (2.5 \text{ e } 2.6)$$

onde ϵ_{ij} representa a profundidade do poço de potencial e σ_{ij} é a distância para qual o potencial interpartícula é zero, q_i e q_j são as cargas parciais dos átomos i e j , r_{ij} é a distância entre estes, ϵ_0 é a permissividade elétrica do vácuo e ϵ_r a constante dielétrica relativa do meio. Todos estes parâmetros são empíricos ou deduzidos de cálculos teóricos.

Em alguns campos de força, um potencial adicional é incluído com o objetivo de manter a estrutura tridimensional, e suas oscilações, de átomos com quatro ligações simples (σ); este potencial é utilizado quando é necessário manter a tetraedricidade, ou a planaridade, de quatro átomos não ligados sequencialmente (ver Figura 2.2), e pode ser expresso por

$$V_{DI} = \frac{1}{2} k_{\alpha} (\alpha - \alpha_0)^2, \quad (2.7)$$

onde α_0 é ângulo de equilíbrio ($\alpha_0 = 0$, se o arranjo é planar; $\alpha_0 \approx 36^\circ$, se tetraédrico) e k_{α} é uma constante elástica que varia de acordo com o tipo de hibridização no átomo central.

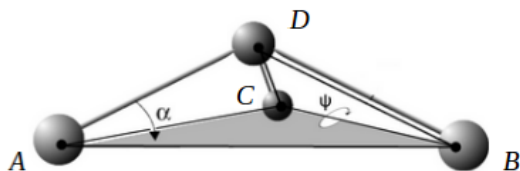


Figura 2.2 – Os três átomos ligados (A, B e C) estabelecem um plano enquanto o átomo central hibridizado (D) pode oscilar em relação a este; α é o ângulo de oscilação entre a ligação AD e o plano ABC. Adaptada de: <http://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/namd/>.

O potencial diedral impróprio é harmônico, com a energia oscilando com a variação conformacional do arranjo de átomos, e é um termo particularmente necessário para a manutenção da tetraedricidade dos átomos de carbono quando utilizada a representação de átomos unidos para os grupos CH, CH₂ e CH₃ para carbonos pouco reativos. Na representação de átomos unidos, grupos de átomos são substituídos por uma nova espécie atômica capaz de representar as propriedades mecânicas moleculares do grupo; os quatro átomos de um grupo CH₃, por exemplo, são substituídos por um pseudo-átomo cujas propriedades são equivalentes à do grupo (ver Figura 2.3).

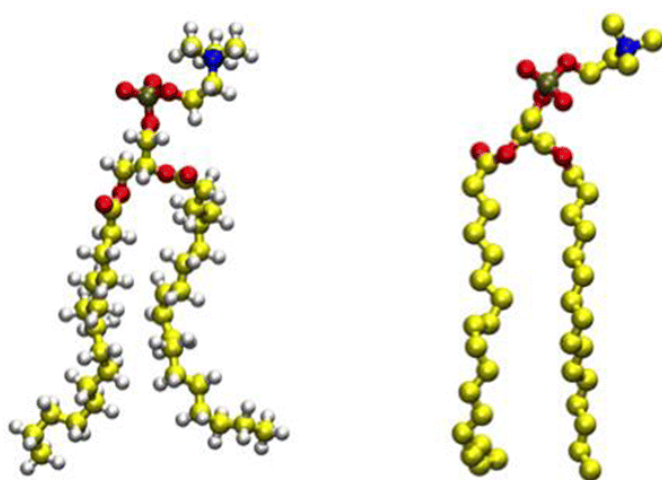


Figura 2.3 – Molécula de um fosfolipídio (POPC) nas representações de todos os átomos (esq.) e átomos unidos (dir.). A redução do número de átomos implica em ganho de tempo computacional. Extraída de Cascella e Vanni, 2015.

A escolha do campo de forças a ser utilizado numa simulação depende, essencialmente, do sistema a ser estudado e das propriedades de interesse a serem investigadas. Diversos campos de força foram desenvolvidos especificamente para sistemas compostos por moléculas biológicas, sendo os campos das famílias GROMOS (van Gunsteren e Berendsen, 1987; van Gunsteren et al., 1996), OPLS (Jorgensen e Tirado-Rivers, 1988), AMBER (Case et al., 2014) e CHARMM (Brooks et al., 1983; Brooks et al., 2009), exemplos bem-sucedidos.

As simulações desenvolvidas neste trabalho são baseadas no campo de forças GROMOS96 53A6 (van Gunsteren et al., 1996), otimizado com os parâmetros dos “lipídios de Berger” (Berger et al., 1997). Tal modificação é necessária devido ao fato das cadeias de alcanos das caudas dos fosfolipídios não serem satisfatoriamente tratadas pelos parâmetros ligados naturais do GROMOS. Os chamados “lipídios de Berger” utilizam a representação de átomos unidos para os grupos CH, CH₂ e CH₃ e são uma espécie de híbrido entre os tipos de átomos dos campos de força GROMOS e OPLS.

Este conjunto, campo de força GROMOS96 53A6 otimizado com parâmetros de Berger, apresenta desempenho satisfatório quando comparado a outros campos de forças utilizados para a simulação de bicamadas fosfolipídicas, conseguindo também reproduzir adequadamente algumas grandezas físicas de interesse (Piggot et al., 2012), como área por lipídio, espessura da bicamada, parâmetros de ordem e coeficiente de difusão.

2.1.2 Equações de movimento e integração numérica

Uma simulação de dinâmica molecular clássica (onde não há troca de elétrons) consiste fundamentalmente na resolução das equações de movimento de todos os i átomos do sistema em cada instante t :

$$\vec{F}_i(t) = m_i \vec{a}_i \quad . \quad (2.8)$$

Como não existe solução analítica para problemas com muitos corpos, a solução deve ser encontrada através de métodos numéricos.

A implementação de um campo de forças possibilita o cálculo das forças que atuam sobre cada átomo i do sistema através da derivada da energia potencial obtida do campo de forças empregado,

$$\vec{F}_i(t) = \frac{-\partial V(\vec{r}_i)}{\partial \vec{r}_i} = -\vec{\nabla}_i V(\vec{r}_i) = m_i \vec{a}_i \quad , \quad (2.9)$$

cálculo que fornece diretamente a aceleração $\vec{a}_i$ da partícula i no instante t . Conhecida a aceleração, pode-se integrar as equações do movimento para obter a velocidade da partícula que, com uma nova integração, fornece a posição da partícula em $t+\Delta t$. Determinadas as posições de todas as partículas do sistema, pode-se calcular a energia potencial total, cuja derivada fornecerá a aceleração $\vec{a}_i$ de cada partícula em $t+\Delta t$. A aplicação sucessiva deste método possibilita a determinação da posição e velocidade de cada partícula ao longo do tempo, ou seja, sua trajetória.

Na prática, as trajetórias das partículas são obtidas pela integração numérica das equações de movimento utilizando-se algoritmos baseados no método das diferenças finitas, que aproximam a derivada da energia potencial por pequenas diferenças finitas de intervalos

Δt (chamados de passo de integração), o que possibilita simular movimentos que ocorrem em intervalos de tempo tão pequenos quanto se desejar. Existem diversos algoritmos de integração que são empregados em dinâmica molecular, sendo os mais comuns os algoritmos de Verlet (Swope et al., 1982) e Beeman (Beeman, 1976) e o método *leap-frog* (Hockney e Eastwood, 1974).

O algoritmo *leap-frog* utiliza as posições r no instante t e as velocidades v no instante $t - \frac{1}{2}\Delta t$ (metade do passo de integração) para calcular as forças $F(t)$ sobre a partícula e atualizar sua velocidade v em $t + \frac{1}{2}\Delta t$ e sua posição r no instante $t + \Delta t$ através das fórmulas recursivas:

$$\vec{v}\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = \vec{v}\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \frac{\Delta t}{m} \vec{F}(t) \quad (2.10)$$

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \Delta t \cdot \vec{v}\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) \quad (2.11)$$

onde m é a massa da partícula. Velocidade e posição não são calculadas portanto para o mesmo instante de tempo, estando sempre intercaladas; esta característica é a origem do nome do método, como mostra a Figura 2.4.

O algoritmo *leap-frog* é dito ser de terceira ordem em r , pois trunca os termos da série de Taylor (de onde são derivadas as Equações 2.10 e 2.11) no termo de quarta potência, $O(\Delta t^4)$ (van der Spoel et al., 2010).

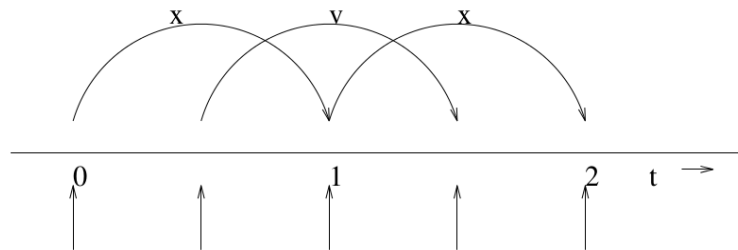


Figura 2.4 – Esquematisação do método *leap-frog*. Posições e velocidades são atualizadas de forma intercalada, como os saltos de um sapo ao andar. Extraída de van der Spoel et al., 2010.

2.1.3 Condições iniciais, minimização e equilibração

Um requisito para a aplicação dos algoritmos numéricos, que resolvem as equações de movimento e determinam a trajetória e velocidades das partículas em cada instante, são as condições iniciais do sistema, ou seja, a posição e a velocidade de cada partícula no instante $t = 0$, que fornecem as constantes de integração necessárias para a resolução da equação diferencial de 2ª ordem.

A distribuição das posições iniciais deve ser feita de forma a se evitar a ocorrência de aproximações indevidas entre os átomos, podendo ser utilizados algoritmos que otimizam a distribuição inicial, alterando a posição de partículas de forma a minimizar a energia potencial do sistema; este processo é conhecido como minimização da energia e os algoritmos mais utilizados são o método dos gradientes conjugados e o método *steepest descent*.

Definidas as posições iniciais, são atribuídas velocidades aleatórias às partículas seguindo uma distribuição de Maxwell-Boltzmann para a temperatura de referência T_{ref} em que se deseja estudar o sistema. Normalmente, a determinação das condições iniciais não garante que o sistema esteja em equilíbrio termodinâmico, por isso é prática comum desconsiderar os passos iniciais de uma simulação onde suas propriedades não são constantes, ou realizar o aquecimento em incrementos pequenos da temperatura. Este período é chamado de equilibração do sistema e varia de acordo com os sistemas a serem estudados.

2.1.4 Ensemble e controle de temperatura e pressão

A partir do conjunto das posições e velocidades de todas as partículas da caixa de simulação em determinado instante t , pode-se definir o estado macroscópico do sistema correlacionando-o às variáveis macroscópicas que caracterizam um *ensemble* estatístico. Diversas opções de *ensemble* podem ser empregadas em simulações por dinâmica molecular, sendo os mais comuns o micro-canônico, ou *NVE* (o sistema é ajustado para que o número de partículas N , o volume V e a energia total E da caixa de simulação sejam conservadas), o canônico, ou *NVT* (número de partículas, volume e temperatura), e o isotérmico-isobárico, ou *NPT* (número de partículas, pressão e temperatura) (Namba et al., 2008).

Pressão, temperatura e quantidade/concentração de reagentes, são grandezas frequentemente controladas em técnicas experimentais. De maneira geral, simulações computacionais precisam fornecer resultados passíveis de serem comparados a medições experimentais, e é por este motivo que simulações no *ensemble NPT* são mais comuns do que nos demais *ensembles*.

O controle da temperatura do sistema em simulação é realizado através do reescalamento das velocidades das partículas por um fator de correção adequado a cada certo número de passos de integração, fazendo com que a temperatura oscile em torno do valor de referência. O efeito deste tratamento é equivalente a acoplar o sistema a um banho térmico de temperatura igual à temperatura T_{ref} de referência do sistema e é implementado através de algoritmos conhecidos como termostatos, sendo os mais comuns os termostatos de Berendsen (Berendsen et al., 1984), V-Rescale (Bussi et al., 2007) e Nosé-Hoover (Nosé, 1984; Hoover, 1985).

Um procedimento análogo ao do controle de temperatura é utilizado para garantir que a pressão do sistema oscile em torno de uma pressão de referência P_{ref} , mas desta vez, reescalando as coordenadas e as dimensões da caixa de simulação. Os algoritmos que implementam este processo são chamados de barostatos e os mais comuns são os barostatos de Berendsen (Berendsen et al., 1984) e o de Parrinello-Rahman (Parrinello e Rahman, 1981; Nosé e Klein, 1983).

2.1.5 Caixa de simulação e condições periódicas de contorno

Simulações de dinâmica molecular normalmente são aplicadas a sistemas que contém de centenas a milhões de átomos, quantidade praticamente insignificante se comparada ao número de átomos em sistemas macroscópicos ($\sim 10^{23}$ partículas), o que torna necessário um tratamento para que não haja influência de efeitos de borda (da caixa de simulação) sobre o sistema.

A forma mais comum de se contornar este problema é a utilização das chamadas condições periódicas de contorno. Nesta técnica, o sistema é construído dentro de uma "caixa" de simulação que é replicada em imagens em todas as direções do espaço, de forma que, se uma partícula sai da caixa adentrando uma caixa imagem, uma partícula idêntica entrará na

caixa de simulação vindo da caixa imagem da face oposta (ver Figura 2.5). Matematicamente, se L_i é o tamanho da caixa de simulação, $i = x, y, z$, tem-se que

$$\text{se } r_i(t+\Delta t) > L_i, \text{ então } r_i(t+\Delta t) = r_i(t+\Delta t) - L_i, \text{ ou,} \quad (2.12)$$

$$\text{se } r_i(t+\Delta t) < 0, \text{ então } r_i(t+\Delta t) = r_i(t+\Delta t) + L_i. \quad (2.13)$$

As condições periódicas de contorno fazem com que os átomos do sistema nunca enxerguem uma borda e garantem que o número total de partículas na caixa de simulação seja sempre o mesmo (fica então assegurada a conservação do número de partículas do sistema).

O formato da caixa de simulação não deve interferir nos resultados obtidos; ela deve ser suficientemente grande, nas três dimensões, de forma a garantir que uma molécula não interaja com sua própria imagem – o que, além de trazer problemas à evolução da simulação, implicaria em resultados espúrios originados do tratamento matemático aplicado ao sistema (as condições periódicas de contorno). Este problema torna-se mais relevante com o aumento do tamanho das moléculas simuladas e a questão de qual deve ser o tamanho da caixa de simulação para garantir que não ocorra será tratada na próxima seção.

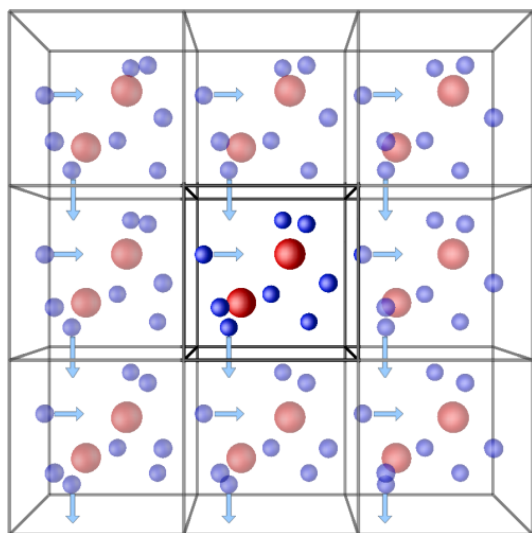


Figura 2.5 – Representação idealizada das condições periódicas de contorno: a caixa de simulação onde o sistema de interesse foi construído é envolvida por um número infinito de réplicas, em todas as direções. Extraída de: <isaacs.sourceforge.net/phys/abc.html>.

As dimensões da caixa de simulação são constantes apenas quando a simulação é realizada à volume constante. Quando é aplicado um controle de pressão sobre o sistema, caso mais comum, os eixos da caixa de simulação são deformados como parte do processo para garantir que a pressão do sistema oscile em torno do valor de referência P_{ref} . Isto pode ocorrer de três formas: no caso do acoplamento de pressão isotrópico, as dimensões x , y e z da caixa

de simulação são deformadas igualmente, mantendo a relação entre elas (se a caixa de simulação inicialmente for cúbica, permanecerá cúbica durante a simulação, embora sua aresta possa variar); no acoplamento semi-isotrópico, as dimensões x e y são acopladas e deformam-se igualmente, mas z é independente; e, no caso anisotrópico, todos os eixos são controlados de forma independente.

2.1.6 Mínima imagem, raio de corte e interações de curto e longo alcance

A utilização de condições periódicas de contorno insere uma complicação às simulações: o cálculo de um potencial de interação demanda a soma das interações sobre todos pares de partículas, inclusive as que estão nas imagens da caixa – seria uma soma de infinitos termos, portanto. Este problema é contornado com a utilização da chamada convenção da mínima imagem; o potencial para interações de curto alcance (interações do tipo van der Waals) é truncado para pares de partículas cuja distância seja maior do que um valor especificado, chamado de raio de corte (sempre menor do que metade do tamanho da caixa de simulação; isto, nas três dimensões), evitando que uma partícula interaja com sua própria imagem. Desta forma, para garantir que a caixa de simulação tenha tamanho suficiente para evitar que uma molécula interaja com sua imagem, deve-se assegurar que a caixa meça, no mínimo, a dimensão da molécula mais a medida do raio de corte aplicado (normalmente, a solvatação do sistema garante margem suficiente para evitar o problema).

O truncamento de termos a partir de um raio de corte pode ser aplicado à interações de curto alcance pois estas decaem com r^6 . Interações de longo alcance (interações de Coulomb) decaem muito mais lentamente e não podem ser tratadas da mesma forma sem que se corra o risco de serem produzidos efeitos artificiais que comprometam os resultados da simulação (o exemplo mais comum são saltos bruscos na energia potencial que podem tornar a dinâmica instável). Interações de longo alcance são tratadas por métodos baseados em somas de Ewald, sendo o mais comum o PME (*Particle Mesh Ewald*) (Darden e Pedersen, 1993; Essmann et al., 1995), ou por métodos aproximativos como o *Reaction-Field* (Tironi et al., 1995), ou mesmo através de um raio de corte, porém com a precaução de introduzir uma função potencial que faça a energia de interação se anular rapidamente (num segundo raio de corte).

2.1.7 Solvatação e modelos para a molécula de água

Processos biológicos ocorrem na presença de solventes e, buscando uma representação mais realista, simulações por dinâmica molecular normalmente incluem a representação da ação do solvente sobre o sistema (de forma implícita, através de uma constante dielétrica, ou de forma explícita, com a inclusão das moléculas do solvente na caixa de simulação). A água é o principal solvente de sistemas biológicos e consequentemente sua representação adquire um papel crucial. Apesar de sua estrutura simples, a água apresenta dezenas de anomalias, algumas fundamentais em processos biológicos, que dificultam sua caracterização de forma simples (Huang et al., 2009).

Existem diversos modelos para representar a molécula de água: modelos com três sítios, modelos com quatro sítios (um falso átomo é incluído para melhor representar a distribuição eletrostática da molécula; ver Figura 2.6), e também modelos mais complexos com cinco e até seis sítios. Quanto mais complexa a representação, mais complicada é sua implementação, pois as moléculas de água normalmente são o componente majoritário de uma caixa de simulação e os átomos adicionais do modelo também devem ser considerados no cálculo dos pares de interação¹.

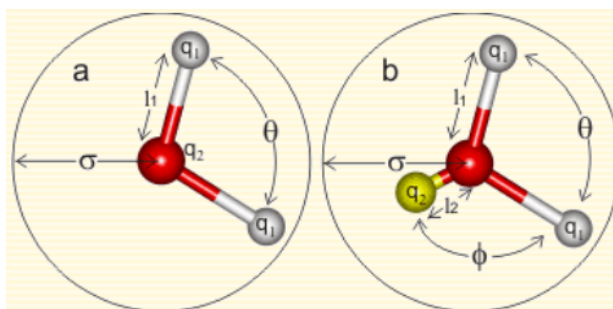


Figura 2.6 – Representação de modelos de moléculas de água de três (a) e de quatro sítios (b). Para o modelo SPC, que é de três sítios, por exemplo, $\sigma = 3,167 \text{ \AA}$, $q_1 = + 0,410$, $q_2 = - 0,820$, $l_1 = 1 \text{ \AA}$ e $\theta = 109,47^\circ$. Fonte: <http://www1.lsbu.ac.uk/water/water_models.html>. Acesso em 03/01/2017.

Alguns modelos simples de três sítios entretanto revelam grande aplicabilidade e satisfatória correspondência com dados experimentais (Zielkiewicz, 2005) e por isso são amplamente utilizados; é o caso dos modelos SPC (Berendsen et al., 1981) e TIP3P (Jorgensen et al., 1983). A Figura 2.7 apresenta o resultado de uma dinâmica de caixas de

¹ Informações e referências sobre dezenas de modelos para a molécula de água e a comparação de propriedades aferidas destes com dados experimentais estão disponíveis no *website* de Martin Chaplin <http://www1.lsbu.ac.uk/water/water_models.html>.

simulação contendo apenas moléculas de água, utilizando os modelos SPC (curva em vermelho) e TIP3P (preto). A figura mostra a ordenação do sistema, verificada através da função de distribuição radial de pares $g(r)$, dada por

$$g(r) = 4\pi r^2 \rho dr, \rho = \frac{N}{V}, \quad (2.14)$$

onde ρ é a densidade de partículas na esfera de raio r . A comparação dos resultados obtidos para os dois modelos com um resultado experimental (destaque no gráfico), revela que ambos reproduzem satisfatoriamente a ordenação da água na fase líquida – neste caso, com vantagem para o modelo SPC, que produziu bons resultados até a 2ª camada de solvatação.

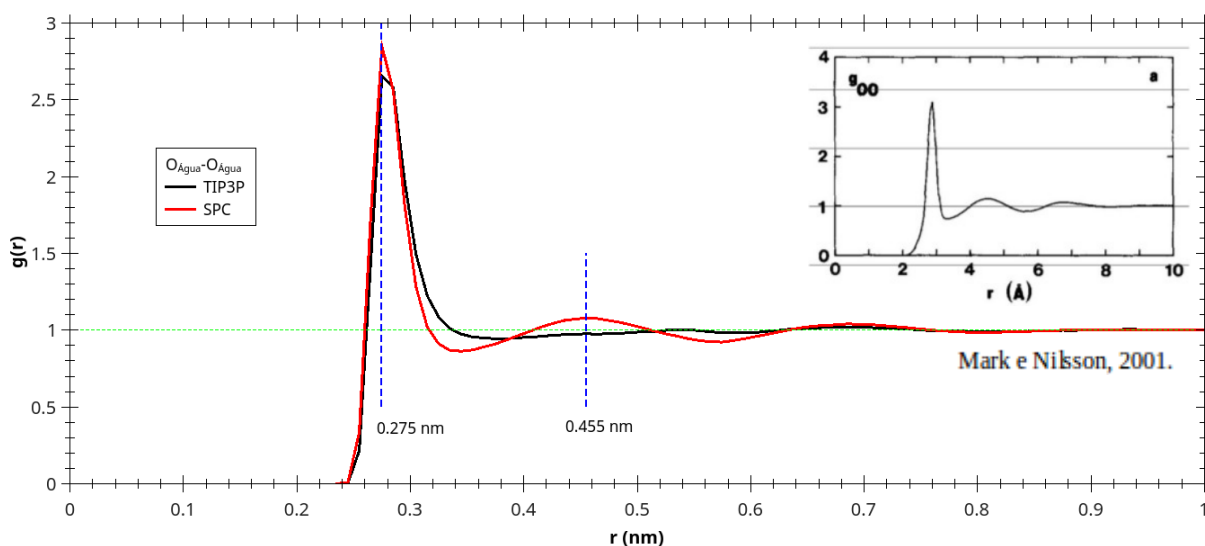


Figura 2.7 – Distribuição radial de pares entre os átomos de oxigênio das moléculas de água. Os resultados referem-se à simulações de 10 ns cada de uma caixa contendo apenas água.

2.1.8 Pacotes de Simulação

Nas seções acima realizou-se um resumo de tópicos fundamentais ao desenvolvimento de simulações por dinâmica molecular. Na prática, este tipo de simulação é realizada através de pacotes de *softwares* amplamente testados e aprimorados, alguns utilizados há décadas, sendo os principais exemplos: GROMACS (*Groningen Machine for Chemical Simulations*) (Abraham et al., 2015), Amber (Case et al., 2014), CHARMM (*Chemestry at Harvard Molecular Mechaniscs*) (Brooks et al., 2009) e NAMD (*Scalable Molecular Dynamics*) (Phillips et al., 2005). Tais pacotes normalmente agregam programas para a construção das caixas de simulação a partir da estrutura e topologia das moléculas a serem estudadas, desenvolvimento da dinâmica propriamente dita, e alguns tipos de análise das trajetórias obtidas.

Na maioria dos casos, pacotes para simulação permitem a implementação de simulações em diversos campos de forças, sendo possível inclusive trabalhar com campo de forças modificados e até mesmo de desenvolvimento próprio.

2.2 Estrutura e Topologia das Moléculas

O campo de forças modela o ambiente físico em que será desenvolvida uma simulação; portanto é necessário que as moléculas a serem simuladas estejam adaptadas a tal ambiente, ou tecnicamente, a representação para a molécula deve estar parametrizada no campo de forças a ser utilizado.

A obtenção da estrutura de uma molécula (uma proteína, por exemplo) normalmente decorre de procedimentos experimentais (como cristalografia, ressonância magnética, etc.) que fornecem a disposição tridimensional dos átomos da molécula – sua estrutura. Entretanto, para que essa representação da molécula seja utilizada numa simulação, são necessários todos os parâmetros de interação dos átomos da própria molécula entre si e como estes interagem com outros tipos de átomos (com a água, por exemplo), ou seja, o campo de forças requer que a molécula seja descrita em termos dos potenciais e constantes relacionados na Seção 2.1.1.

Parametrizar uma molécula é um procedimento complexo e delicado, pois possíveis erros repercutirão nos resultados das simulações (a própria estrutura da molécula pode vir a

ter de ser modificada de acordo com a filosofia do campo de forças – é o que ocorre na representação de átomos unidos, por exemplo). Os valores para as constantes devem ser obtidos experimentalmente ou por cálculos quânticos, mas podem também ser deduzidos a partir de homologia, isto é, através da comparação de grupos funcionais da molécula de interesse com grupos funcionais de outras moléculas já parametrizadas no campo de forças.

A parametrização das moléculas utilizadas nas simulações deste estudo não está incluída no escopo do trabalho; as estruturas e topologias foram obtidas de trabalhos de outros autores:

- Os arquivos contendo a estrutura e a topologia da molécula de POPC utilizados foram obtidos do *website* de Peter Tieleman, <<http://wcm.ucalgary.ca/tieleman>>, que disponibiliza diversos tipos de fosfolipídios na representação dos lipídios de Berger, fornecendo também os arquivos contendo os parâmetros a serem incluídos no campo de forças para que este trabalhe com estes novos tipos de átomos;
- A topologia utilizada para a molécula de colesterol segue a utilizada originalmente em Hötje et al., (2001), e os arquivos utilizados foram gentilmente cedidos por Justin Lemkul;
- A topologia para a molécula de curcumina foi construída através da ferramenta *online Automated Topology Builder and Repository* (ATB) (Malde et al., 2011; Koziara et al., 2014) <<http://atb.uq.edu.au>>, voltada para a parametrização de moléculas em campos de forças da família GROMOS;
- Utilizou-se o modelo SPC para a representação das moléculas de água com os parâmetros originais do campo de forças GROMOS.

2.3 Parâmetros de Simulação

As simulações apresentadas neste estudo, salvo se explicitada alguma observação contrária, foram realizadas sob o seguinte conjunto de parâmetros:

Pacote de simulação: GROMACS, versão 5.1.2 (Abraham et al., 2015);

Campo de forças: GROMOS96 53A6 (van Gunsteren et al., 1996), otimizado com os parâmetros de Berger para lipídios (Berger et al., 1997);

Algoritmo de integração: *Leap-frog* (Hockney e Eastwood, 1974);

Passo de integração: 2 fs, com a trajetória das partículas sendo salva a cada 20 ps, e energias a cada 5 ps;

Condições periódicas de contorno: Tridimensionais;

Tratamento das interações de curto alcance: Raio de corte de 1.2 nm;

Tratamento das interações eletrostáticas: PME (*Particle-mesh Ewald*) (Darden e Pedersen, 1993; Essmann et al., 1995);

Algoritmo para controle do comprimento das ligações: LINCS (Linear Constraint Solver) (Hess et al., 1997);

Controle de temperatura: Termostato de Nosé-Hoover (Nosé, 1984; Hoover, 1985);

Temperatura de referência: $T_{ref} = 310\text{K}$, com uma constante de acoplamento de 2 ps, para dois grupos independentes: solvente (água) e demais moléculas (lipídios e curcumina), o que garante maior precisão nos resultados e evita que a velocidade de todas as partículas seja reescalada por um mesmo fator;

Controle de pressão: Parrinello-Rahman (Parrinello e Rahman, 1981; Nosé e Klein, 1983);

Pressão de referência: $P_{ref} = 1 \text{ bar} = 0,987 \text{ atm}$, com uma constante de acoplamento de 0.8 ps, para dois grupos independentes: solvente (água) e demais moléculas;

Acoplamento de pressão: Semi-isotrópico, com os eixos x e y acoplados;

Minização da energia: Método dos gradientes conjugados;

Equilibração: 1 ns, realizada com os mesmos parâmetros da dinâmica (a equilibração visava apenas avaliar o processo de construção da caixa de simulação, uma vez que o equilíbrio do sistema, e da bicamada, é acompanhado durante a dinâmica).

2.3.1 Construção das caixas de simulação

As caixas de simulação utilizadas neste trabalho, todas paralelepipedicas, foram construídas a partir de programas inclusos no pacote de simulação, GROMACS, ou através da ferramenta *online Membrane Generator* (MemGen) <<http://memgen.uni-goettingen.de>> (Knight e Hub, 2015); a partir de arquivos de estrutura fornecidos pelo usuário, o MemGen alinha as moléculas em relação ao eixo z (a bicamada é construída no plano xy) e as dispõe na quantidade e proporção desejadas, construindo a bicamada como duas faces antiparalelas, e completando a caixa de simulação com a hidratação do sistema.

O alinhamento realizado pelo construtor visa permitir a disposição dos lipídios numa bicamada compacta e consiste num artifício computacional não submetido a um campo de forças (não é uma simulação); por este motivo, o sistema deve ser submetido ao processo de minimização de energia e uma extensa equilibração. O processo de equilibração das simulações deste estudo não compreende apenas o período indicado acima, 1 ns, pois a própria dinâmica consiste num processo de relaxação do sistema e estabilização da bicamada por centenas de nanosegundos, cuja evolução foi acompanhada através de diversas grandezas (isto será abordado no Capítulo 3). As análises apresentadas a partir do próximo capítulo consideram apenas os 100 ns finais de estabilidade de cada simulação. Um resumo de todas as simulações, composição dos sistemas e extensão de cada dinâmica é apresentado no Apêndice.

2.3.2 Análise das trajetórias

As análises das trajetórias obtidas foram realizadas através de programas do pacote de simulação; do programa GridMAT-MD (Allen et al., 2009), para o cálculo da área por lipídio; VMD (Humphrey et al., 1996), para visualização de moléculas e trajetórias, e algumas análises através de seu *plugins*; além de programas e *scripts* desenvolvidos para fins específicos.

A descrição das principais análises realizadas é apresentada no próximo capítulo, antecedendo sua aplicação à simulação utilizada para validação dos parâmetros empregados (simulação de uma bicamada POPC pura).

3. SIMULAÇÃO DE BICAMADAS FOSFOLIPÍDICAS

3.1 Introdução

A idealização da técnica de simulações por dinâmica molecular ocorreu no fim da década de 1950, com Alder e Wainwright (1957) estudando a interação de esferas rígidas; as partículas eram tratadas como bolas de bilhar numa caixa de simulação tridimensional, recocheteando ao esbarrarem nas paredes da caixa. Em 1964, Rahman (1964) desenvolveu a primeira simulação utilizando um potencial de interação realístico: as esferas passaram a assumir as propriedades de átomos de argônio (foram parametrizadas) e algumas propriedades obtidas do sistema, simulado na fase líquida, reproduziam aproximadamente resultados experimentais. A evolução dos modelos para a representação das moléculas e dos potenciais de interação, gradativamente possibilitou a simulação de sistemas mais complexos, como água na fase líquida (Stillinger e Rahman, 1974), uma proteína no vácuo (McCammon et al., 1977), uma bicamada lipídica (van der Ploeg e Berendsen, 1982) – como o sistema era simulado no vácuo, a estrutura era mantida por forças harmônicas representando as interações entre as cabeças dos lipídios e a água¹.

No fim da década de 1990, alguns trabalhos de simulação já abordavam a simulação de lipídios em ambiente aquoso, com as moléculas de água integrando o sistema (solvente explícito), mas o foco ainda era a modelagem e parametrização de ácidos graxos e esteróis (Murzyn e Pasenkiewicz-Gierula, 1999; Hötje et al., 2001). Dada a complexidade dos sistemas, as simulações foram gradativamente sendo aprimoradas para abordar fosfolipídios, micelas, bicamadas puras, bicamadas com mais de um componente lipídico e a interação de bicamadas com outras moléculas (Tieleman et al., 1997; Hirtz et al., 2014).

Apesar do avanço tecnológico de *hardware* e *software* nas últimas duas décadas, a simulação de membranas biológicas permanece fora de alcance com a capacidade computacional disponível – são sistemas excessivamente complexos, com muitos componentes, e, muitas vezes, precisam ser grandes (para garantir que uma proteína não interaja com sua imagem, ou atingir as proporções adequadas de moléculas do sistema a ser simulado). A opção então é recorrer a sistemas mais simples que mimetizem as características

¹ Tentativas de reproduzir o efeito da água sobre o sistema simulado, sem, no entanto, incluir moléculas de água na simulação, são conhecidas como simulações com solvente implícito.

mais importantes das membranas, principalmente o caráter aniônico das membranas de procariontes e *zwitteriônico* das membranas de células de eucariontes.

Embora sejam biologicamente inconsistentes, a simulação de bicamadas puras (constituídas por apenas um tipo de fosfolípido) ainda é muito comum: quando o interesse é observar o efeito da presença ou concentração de determinada molécula no sistema, o ponto de partida frequentemente é uma bicamada pura; estes sistemas servem também como corpo de prova em testes de novos parâmetros ou inovações nos algoritmos.

E, no estudo de bicamadas puras, um grupo de fosfolípidos, as fosfatidilcolinas, sobressaem-se tanto em frequência quanto em proporção; a fundamentação é biológica: as fosfatidilcolinas são o tipo mais comum de fosfolípido, tanto na parede celular de bactérias, quanto nas membranas plasmáticas de organismos superiores, perfazendo 20~50% da composição lipídica das células (Nelson e Cox, 2004).

3.2 POPC

O tipo de fosfatidilcolina predominante em células de organismos eucariotos é a 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC), um fosfolípido *zwitteriônico* de caudas longas. A estrutura de uma molécula de POPC pode ser visualizada na Figura 3.1.

Bicamadas formadas unicamente por moléculas de POPC são um dos sistemas lipídicos mais estudados por simulações por dinâmica molecular e por este motivo, aliado à relativa maior disponibilidade de dados experimentais, simulações de bicamadas puras POPC servem frequentemente de referência para a validação de conjuntos de simulações.

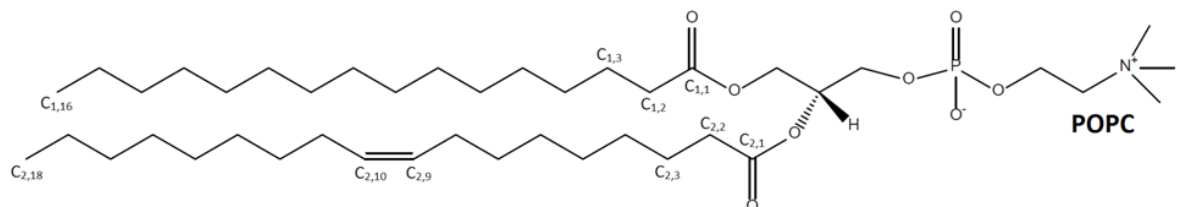


Figura 3.1 – Representação de uma molécula de POPC ($C_{42}H_{82}NO_8P$). A carga positiva do grupo colina compensa a carga negativa do fosfato, tornando a molécula *zwitteriônica*. O fosfolípido apresenta uma cauda saturada (C_1 , ou *sn*-1) com 16 átomos de carbono, e uma cauda insaturada (C_2 , ou *sn*-2), com 18 átomos de carbono.

3.3 Simulação de uma Bicamada POPC Pura

Com a finalidade de validar os parâmetros e modelagem utilizados nas simulações deste trabalho, a seguir faz-se um estudo de uma bicamada pura constituída de 130 moléculas de POPC e 4550 moléculas de água (35 moléculas por lipídio). Os valores de algumas grandezas de interesse são confrontados com dados experimentais disponíveis na literatura, e também referências de outros trabalhos de simulação.

Os parâmetros de simulação utilizados são os apresentados na Seção 2.3 e a bicamada possui faces simétricas (cada monocamada é formada pela mesma quantidade de componentes); nesta, assim como para todas as demais simulações deste trabalho, não é verificada a troca de lipídios entre as faces da bicamada, o chamado *flip-flop*, e, portanto, cada monocamada permanece com a mesma quantidade e composição durante toda a simulação. Embora ocorra naturalmente, o *flip-flop* de um lipídio é um processo energeticamente muito desfavorável, pois envolve a passagem de grupos polares através da região apolar definida pelas caudas de ambas as faces da bicamada; a menos que o processo seja favorecido por algum mecanismo ou perturbação promovida, por exemplo, por proteínas ao se inserirem na membrana, arrastando junto moléculas de lipídio. Biologicamente, verifica-se *flip-flop* de fosfolipídios em escalas de tempo de horas (Nelson e Cox, 2014) – tempos muito superiores aos obtidos em simulações por dinâmica molecular.

3.3.1 Estabilidade do sistema

A técnica de simulação por dinâmica molecular possibilita o estudo da evolução temporal de um sistema; sua dinâmica e estabilidade. No caso de simulações de bicamadas simples, formadas apenas por lipídios, sem proteínas ou outras moléculas que alterem a estrutura da bicamada, o foco é avaliar as propriedades da bicamada em condição estável; a estabilidade do sistema garante que as propriedades observadas sejam de fato características deste, e não devido a algum evento em particular verificável apenas sob certa condição ou intervalo de tempo. As propriedades calculadas devem portanto ser médias sobre períodos de verificada estabilidade do sistema.

Embora seja um dos sistemas miméticos de membrana mais simples possíveis, um sistema de fosfolipídios (POPC) e água não necessariamente apresenta um comportamento elementar – o período de observação do sistema é uma variável fundamental. Atualmente, períodos de análise de dezenas de nanossegundos de estabilidade são um padrão aceitável para estudos de bicamadas (40 ns: Zidar et al., 2009; 60 ns: Capponi et al., 2016; 80 ns: Porasso e Lópes Cascales, 2012; Ferreira et al., 2013; 100 ns: Wennberg et al., 2012); obviamente, quanto mais complexo o sistema, maior será o período de simulação necessário para a observação de um comportamento estável.

O primeiro critério de avaliação da estabilidade do sistema simulado são suas variáveis termodinâmicas: a energia potencial da caixa de simulação e do sistema de interesse apresenta comportamento estável? A temperatura e a pressão, e consequentemente, também o volume, as dimensões da caixa de simulação e a densidade, estão oscilando em torno do valor desejado? As figuras a seguir trazem os gráficos de tais grandezas ao longo dos 100 ns finais da simulação – esta simulação em específico foi desenvolvida por 350 ns, dos quais somente os 100 ns finais são considerados nas análises, salvo se explicitado o contrário. O tamanho do período de análise dos sistemas, os 100 ns finais, leva em consideração não apenas a estabilidade da simulação em questão, mas também a de outras simulações do estudo; é portanto uma questão de padronização para as análises do conjunto de simulações do trabalho.

Em cada gráfico, a linha tracejada indica o valor médio da grandeza ao longo do período considerado. O valor médio e o respectivo desvio padrão também são indicados no corpo dos gráficos.

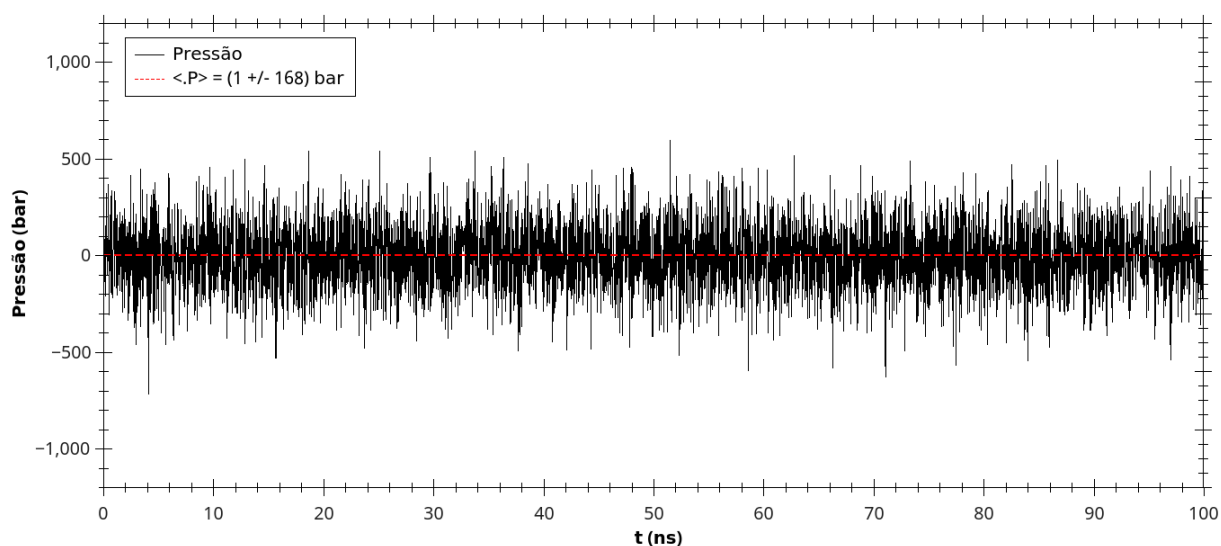


Figura 3.2 – Evolução temporal da pressão da caixa de simulação ao longo dos 100 ns finais da simulação. Os valores oscilam em torno da temperatura de referência, $T_{\text{ref}} = 1 \text{ bar} = 0,987 \text{ atm}$.

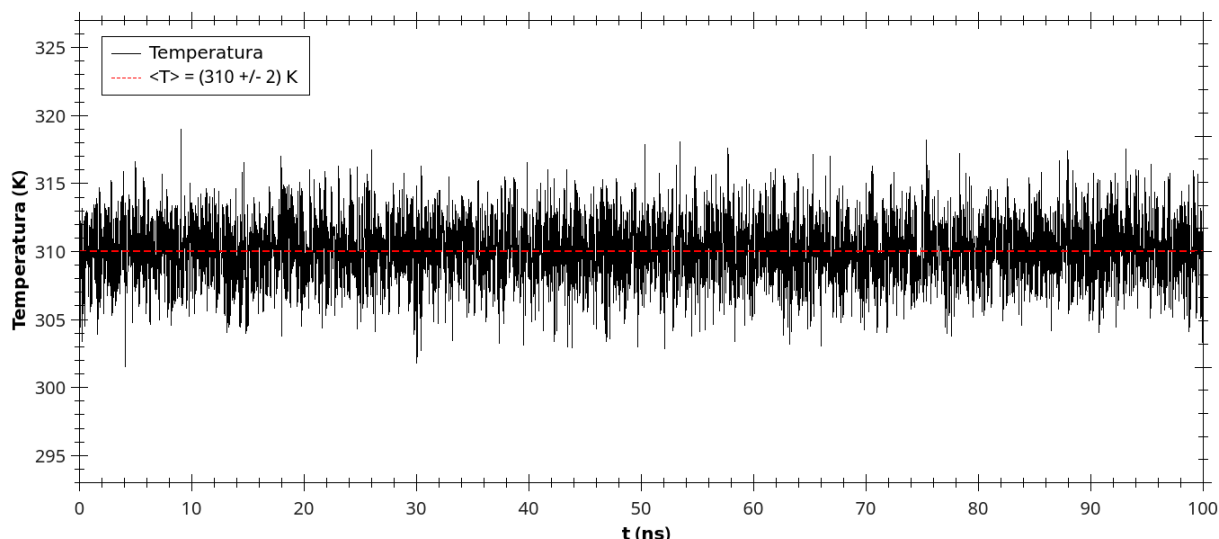


Figura 3.3 – Gráfico da evolução temporal da temperatura da caixa de simulação ao longo dos 100 ns finais da simulação. Os valores oscilam em torno da temperatura de referência, $T_{\text{ref}} = 310\text{K}$.

Os gráficos da pressão (Figura 3.2) e temperatura (Figura 3.3) da caixa de simulação mostram que os valores destas grandezas oscilam em torno dos valores impostos como referência, $T_{\text{ref}} = 310\text{K}$ e $P_{\text{ref}} = 1 \text{ bar} = 0,987 \text{ atm}$, respectivamente², assegurando que os controles de temperatura e pressão estão atuando devidamente e que os valores aferidos para as propriedades da bicamada o serão na temperatura e pressão desejadas.

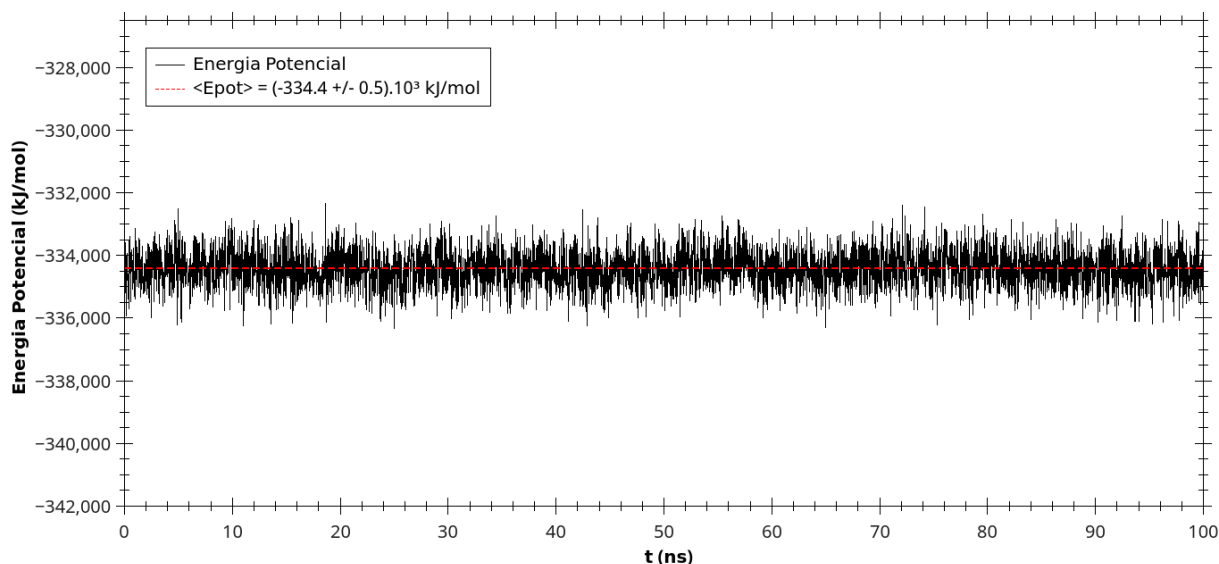


Figura 3.4 – Evolução da energia potencial da caixa de simulação ao longo de seus 100 ns finais.

² Deseja-se estudar a bicamada na fase líquido-cristalina, fase em que é biologicamente ativa. A temperatura escolhida para o estudo dos sistemas, 310K, está bem acima da temperatura de transição de fase gel/líquido-cristalina (transição l_o-l_d), 268K (Pozo-Navas et al., 2004), garantindo que, mesmo com as oscilações na temperatura, o sistema sempre estará na fase de interesse.

O gráfico da energia potencial da caixa de simulação (Figura 3.4) indica um comportamento estável em torno de um valor médio (linha tracejada vermelha). O cálculo de seu coeficiente angular (não mostrado na figura) resulta no valor de $(-6 \pm 3) \cdot 10^{-1}$ kJ/mol.ns, desvio (*drift*) que indica que o sistema está bem equilibrado.

Apesar da verificação da estabilidade do sistema, os valores apresentados para a energia potencial compreendem todos os componentes da caixa de simulação, ou seja, POPC e água, sendo este último predominante – são 35 moléculas de água para cada fosfolípido. Mas o sistema de interesse é na realidade a bicamada e, pode-se questionar, uma relativa instabilidade desta pode estar sendo estatisticamente ocultada. Neste caso, para garantir a estabilidade da bicamada faz-se necessário verificar a interação energética somente das moléculas de fosfolípido.

Os gráficos a seguir mostram as energias de interação na bicamada: a interação das moléculas de POPC entre si (Figura 3.5), e a interação destas com as moléculas de água (Figura 3.6). Ambos indicam comportamento estável, tanto para as interações coulombianas, quanto para as do tipo van der Waals, revelando uma estabilidade dinâmica na interação entre os componentes lipídicos (a bicamada está formada e energeticamente estabilizada), e destes com a fase aquosa (há relativa estabilidade energética na interação entre os fosfolípidos e as moléculas de água), indicativo de que bicamada está estável e adequadamente hidratada.

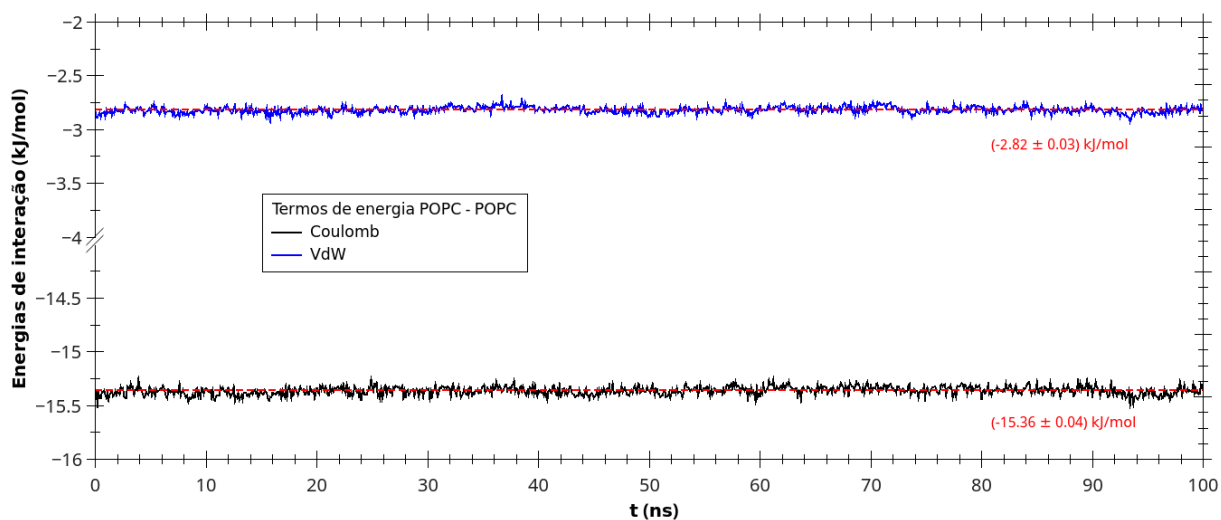


Figura 3.5 – Energia de interação (termos de Coulomb e van der Waals) entre os fosfolípidos da bicamada. Os valores estão normalizados pelo número de pares de interação, isto é, $N_i \cdot (N_i - 1) / 2$, onde N_i é o número de moléculas de lipídio na bicamada. A linha tracejada (em vermelho) indica o valor médio de cada curva no período analisado, valor que também é apresentado no gráfico.

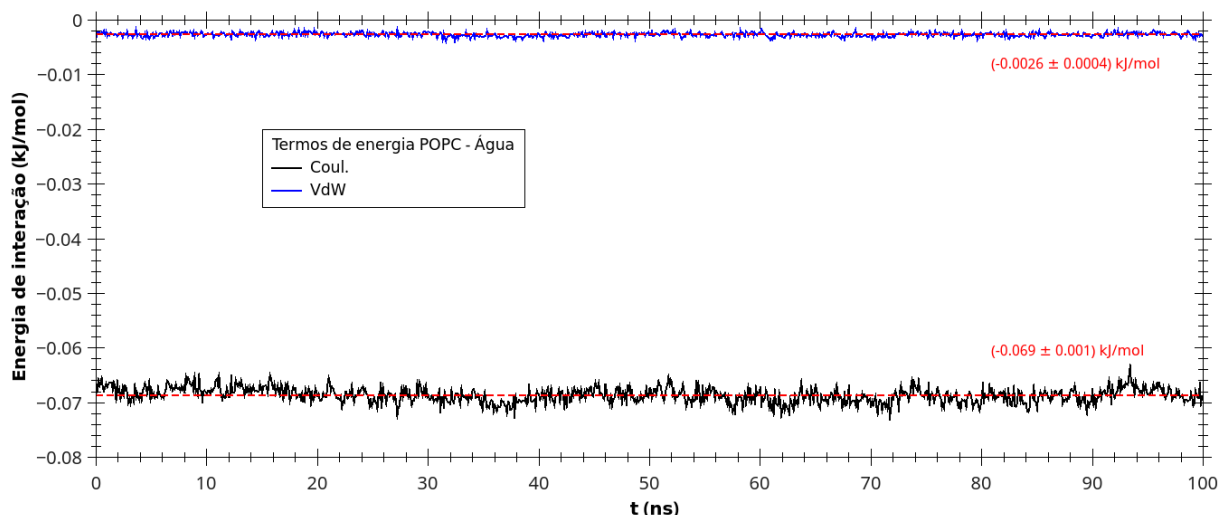


Figura 3.6 – Energia de interação (Coulomb e van der Waals) entre os fosfolípidios e as moléculas de água da caixa de simulação, normalizadas pelo total de pares de interação, ou seja, $N_p = (130 \times 4550) / 2$.

3.4 Análise da Bicamada

Verificada a estabilidade da simulação, passa-se à análise de grandezas de interesse que caracterizem a bicamada para a temperatura e pressão de referência; quando disponíveis, a comparação dos valores obtidos com dados da literatura servirá à validação da simulação, e portanto dos parâmetros nela utilizados.

As propriedades analisadas são dinâmicas e, conseqüentemente, também servirão como verificação da estabilidade (ou não) da bicamada no período considerado.

3.4.1 Área por lipídio

Uma grandeza fundamental no estudo de bicamadas é a sua área por lipídio que, como o nome sugere, quantifica a área média ocupada por cada molécula de fosfolipídio no plano da bicamada. Neste caso, deve-se levar em consideração a constituição da bicamada em duas faces e como os lipídios estão distribuídos entre elas. Como a bicamada em análise é simétrica, as duas faces contêm a mesma quantidade de lipídios, ou seja, cada monocamada é constituída por 65 moléculas de fosfolipídio.

Existem diversas fórmulas para se aferir a área por lipídio de uma bicamada em simulações computacionais, sendo a mais intuitiva a simples divisão da área do plano em que a bicamada está formada pelo número de lipídios em cada face (Zhao et al., 2007). A Figura 3.7 mostra como as dimensões da caixa de simulação flutuam em torno de um valor de equilíbrio sob o controle de pressão semi-isotrópico (as dimensões x e y são acopladas e deformam-se igualmente, produzindo curvas idênticas – curva preta; a dimensão z é independente das demais e seu valor é apresentado na curva verde). As dimensões da caixa de simulação são outra variável de estado importante na avaliação da estabilidade da dinâmica; caso alguma dimensão não estivesse estável, poderia ser um indicativo de mudança na estrutura da bicamada, o que não se verifica na simulação em análise.

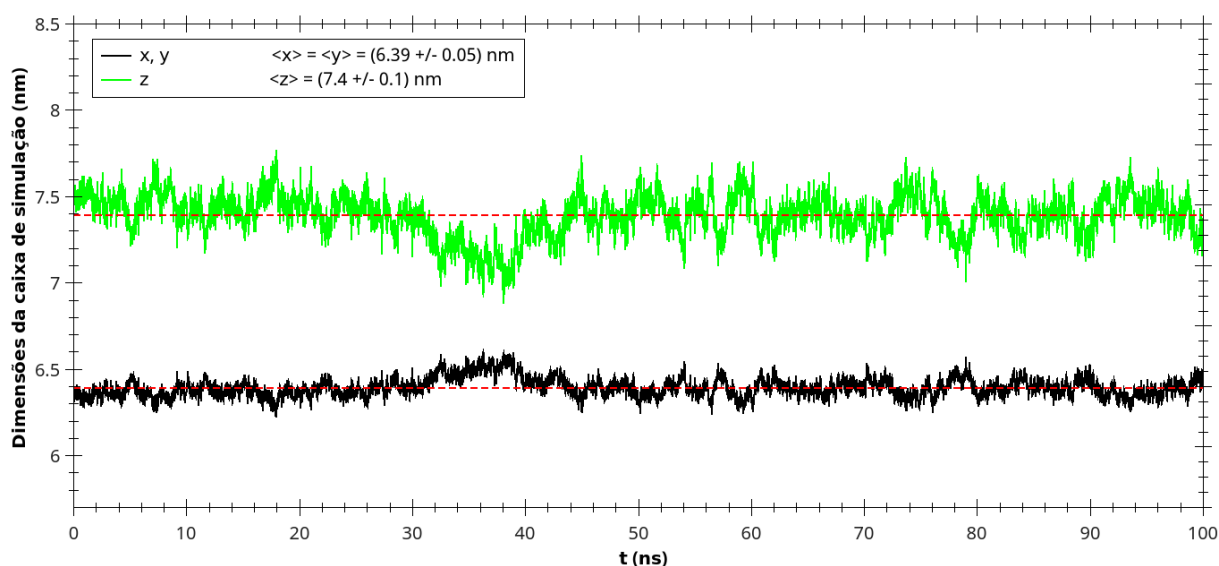


Figura 3.7 – Flutuação das dimensões da caixa de simulação que, sob o controle de pressão, são deformadas para garantir que a pressão do sistema oscile em torno do valor de referência. As linhas tracejadas em vermelho indicam o valor médio das curvas no período (valor que também é apresentado na legenda do gráfico).

Embora prático, a divisão da área do plano da bicamada por metade do número de lipídios da caixa de simulação pode produzir erros por tratar de forma equivalente todos os lipídios. A Figura 3.8 mostra a projeção da posição dos átomos de fósforo de cada fosfolipídio em determinado instante da simulação. Pela posição destes, fica evidente que os fosfolipídios estão distribuídos essencialmente em duas regiões no eixo z , estabelecendo as duas faces da bicamada, mas esta distribuição está longe de ser planar – os fosfolipídios podem ocupar posições mais internas ou externas ao plano médio. Ao dividir a área do plano xy da caixa de simulação pelo número de lipídios da face, é atribuída a mesma participação no plano a cada fosfolipídio – o que não é rigorosamente correto. Algumas moléculas, por estarem mais

internas ao “plano” da bicamada (mais “enterradas” na estrutura), ocuparão uma área menor na interface, enquanto que as mais proeminentes participarão com uma área maior.

Outra forma de calcular a área por lipídio de uma bicamada consiste na decomposição dos “planos” estabelecidos pelos lipídios em diagramas de Voronoi (Shinoda e Okazaki, 1998). Neste caso, a posição de cada átomo de fosfolípido considerado constitui uma *semente* e o plano será descomposto num número de células equivalente ao número de lipídios constituintes da face; um ponto i do plano pertencerá à célula definida pelo átomo de fósforo P_i se, e somente se, a distância de i a P_i for menor do que sua distância à todas as demais sementes do plano. Tal método produz diagramas como o apresentado na Figura 3.9.

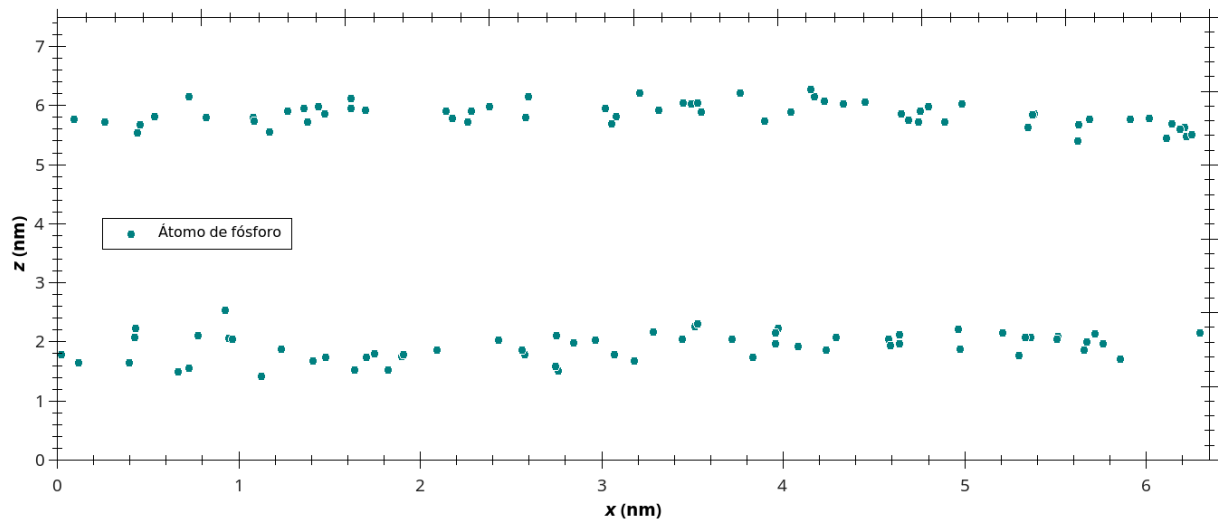


Figura 3.8 – Projeção da posição dos átomos de fósforo das moléculas de POPC no plano xz num instante qualquer da simulação. Os 65 fosfolipídios de cada monocamada definem um “plano” (ilustrado pela posição de um dos átomos da cabeça do fosfolípido), mas há diferenças individuais na disposição dos lipídios em relação ao eixo z , e consequentemente, a área ocupada por cada molécula na interface depende da posição do fosfolípido em relação ao plano médio.

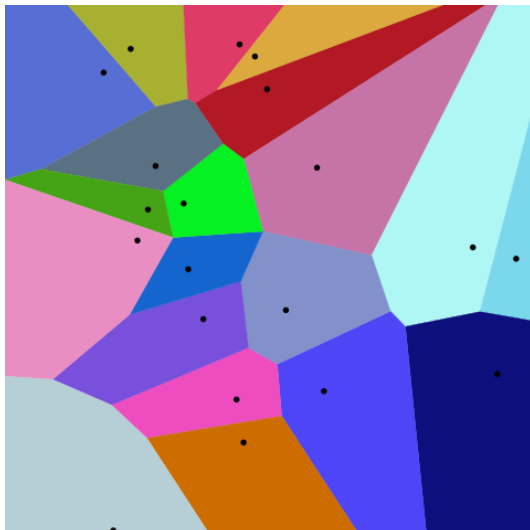


Figura 3.9 – Decomposição de um plano em diagramas de Voronoi. Cada ponto do plano é atribuído à *semente* (em preto) que estiver mais próxima; o que resulta na segmentação do plano em tantos polígonos quanto forem as *sementes*.

Atenção, o plano da bicamada ocorre no plano xy e sua decomposição ocorre de maneira semelhante à mostrada na figura ao lado; entretanto, para mostrar que a distribuição dos lipídios no eixo perpendicular ao plano da bicamada (eixo z) não é regular, na Figura 3.8 é mostrada a projeção dos átomos de fósforo no plano xz – não é plano da bicamada, portanto.

Imagem extraída de:
en.wikipedia.org/wiki/Voronoi_diagram.

Aplicando o método à bicamada, um fosfolipídio que estiver acima do plano médio (que estiver mais sobressaltado em relação à estrutura) participará com uma área maior no plano da bicamada, pois seu grupo fosfato, ou até mesmo o glicerol, apresentarão uma seção transversal (um polígono) de maior área – interpretando fisicamente, como o lipídio sobressaltado é mais volumoso naquela região, para evitar impedimentos estéricos, as demais moléculas estarão mais afastadas da molécula considerada e, conseqüentemente, a área ocupada por esta no plano médio será maior. Analogamente, um fosfolipídio que estiver mais “enterrado” na bicamada terá uma menor participação no plano médio desta (definirá um polígono de menor área, pois sua seção transversal será menor) e, por apresentar-se menos volumoso naquela região, possibilita a aproximação de outros fosfolipídios e terá uma menor participação no plano da bicamada.

Assim, no cálculo da área por lipídio através de diagramas de Voronoi cada molécula de fosfolipídio é tratada individualmente e não incorre-se no erro de considerar que cada molécula ocupa a mesma área no plano, não em cada instante.

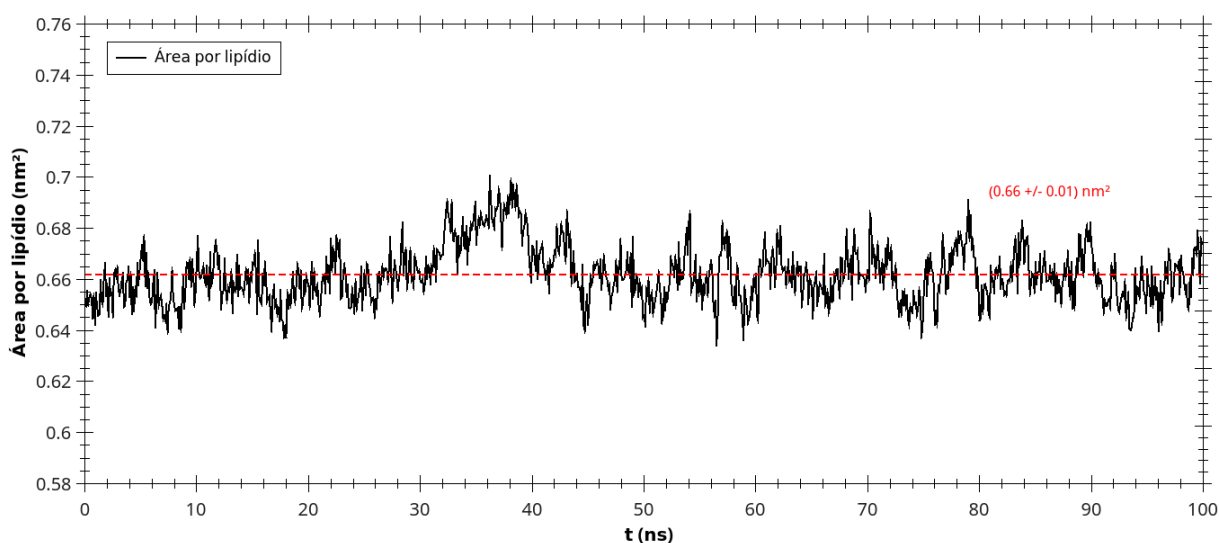


Figura 3.10 – Oscilação da área por lipídio, calculada através de diagramas de Voronoi, ao longo dos 100 ns finais da simulação. Como as monocamadas da estrutura possuem a mesma quantidade de lipídios, e o acoplamento de pressão é semi-isotrópico, a área por lipídio obtida é igual para ambas as faces e estas podem ser tratadas sem distinção, por isso o gráfico apresenta uma única curva.

A implementação do cálculo da área por lipídio através de diagramas de Voronoi foi feita através do *software* GridMAT-MD (Allen et al., 2009) e a variação da área por lipídio ao longo do período de simulação em análise é apresentada no gráfico da Figura 3.10. Observa-se um comportamento relativamente estável (ainda que com um sobressalto entre 30 e 40 ns), com os valores oscilando em torno do valor médio $(0,66 \pm 0,01) \text{ nm}^2$. O *drift* calculado para

os pontos do gráfico (não mostrado neste) é de $(1.4 \pm 1.2) \cdot 10^{-5} \text{ nm}^2/\text{ns}$, outro indicativo de estabilidade.

A comparação do valor obtido, $(0,66 \pm 0,01) \text{ nm}^2$, com outros relatados em trabalhos de simulação por dinâmica molecular a 310K: $(0,659 \pm 0,009) \text{ nm}^2$ (Zhao et al., 2007), utilizando GROMOS96 modificado com parâmetros de Berger, $(0,645 \pm 0,02) \text{ nm}^2$ (Canto et al., 2011), utilizando GROMOS87; ou à 300K: $(0,646 \pm 0,01) \text{ nm}^2$ (Capponi et al., 2016), utilizando CHARMM36, revela boa concordância entre este estudo e a literatura; o que também se verifica se observadas medições experimentais para a área por lipídio de filmes (monocamadas) de POPC sob pressão, $0,63 \sim 0,66 \text{ nm}^2$ (Smaby et al., 1997; Hyslop et al., 1990) e espalhamento de raios-X à 303K, $(0,643 \pm 0,013) \text{ nm}^2$ (Kučerka et al., 2011).

3.4.2 Análise da estrutura da bicamada

Análises da estrutura de bicamadas são realizadas através de gráficos de perfis de densidade (de massa ou eletrônica) no eixo perpendicular ao plano da membrana. Este tipo de gráfico consiste no resultado da varredura, ao longo de determinado eixo, para o grupo de átomos ou moléculas desejado, durante o período considerado; os valores obtidos são médias sobre o número de átomos ou moléculas e também médias sobre a quantidade de estruturas (*frames*) analisadas. Como os *frames* de uma dinâmica possuem correlação entre si, um *frame* é a evolução do anterior para determinado Δt , perfis de densidade são também médias temporais e servem ao propósito de revelar a estrutura formada, e a estabilidade desta, ao longo do eixo considerado.

Bicamadas são estruturas ordenadas que promovem inclusive separação de fase no sistema (ver Figura 3.11). Por serem aproximadamente planares, a análise do perfil de densidade no eixo perpendicular ao plano ocupado pela bicamada é uma análise quantitativa da estrutura formada: ao longo do eixo, aonde o átomo ou molécula estiver presente, esta será quantificada; por outro lado, uma densidade nula indica a ausência daquele tipo de átomo ou molécula na região. Um perfil médio sobre diversos frames indicará a permanência ou não da estrutura formada – é uma análise quantitativa da estabilidade.

Como o número de partículas numa caixa de simulação é sempre conservado, a soma dos valores para determinado átomo ou molécula deve ser o mesmo em cada frame e quanto maior for o pico observado, maior será o ordenamento do grupo considerado. A Figura 3.12

mostra o perfil de densidade de massa, no eixo perpendicular ao plano da bicamada (eixo z), para a bicamada POPC pura; fica evidenciada a estruturação da bicamada (a análise quantitativa da estrutura observada na Figura 3.11 – que apresenta apenas um *frame*) e a separação de fases promovida pela bicamada: nos extremos da caixa de simulação, o sistema é composto unicamente por moléculas de água; no centro, apenas por fosfolipídios (região das caudas apolares), e numa região intermediária coexistem moléculas água e fosfolipídio (região hidratada da bicamada, definida pelas cabeças polares).

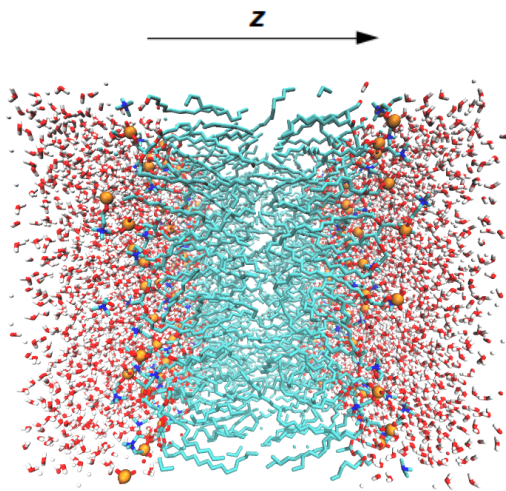


Figura 3.11 – Visualização ortogonal da configuração do sistema em determinado instante da simulação: água (vermelho e branco) e fosfolipídios (ciano), com destaque para os átomos de fósforo destes (esferas em laranja).

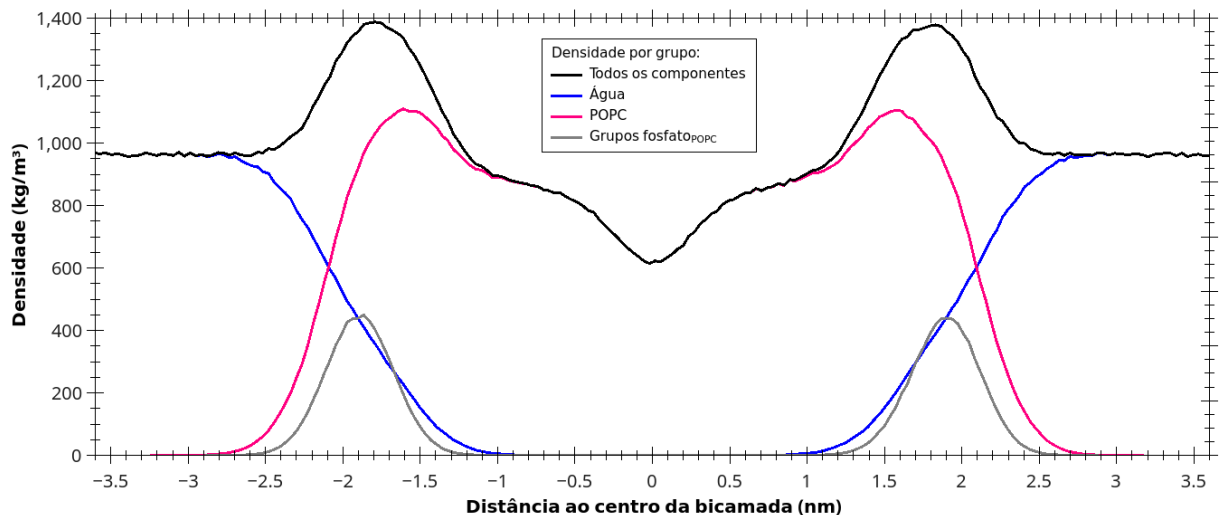


Figura 3.12 – Perfil de densidade dos componentes da caixa de simulação: água e fosfolipídios (também é destacada a distribuição dos grupos fosfato das moléculas de fosfolipídio) ao longo do eixo perpendicular ao plano definido pela bicamada (eixo z). As curvas mostradas são médias para os 100 ns finais da simulação e comprovam a estabilidade da estrutura no período (não há perturbação aparente da bicamada, nem translação significativa dos componentes – o que “deformaria” as curvas).

Perfis de densidade ao longo dos eixos paralelos ao plano da bicamada (eixos x e y) não possuem significado prático, pois não revelam nenhuma estruturação do sistema.

Gráficos de perfis de densidade aplicados ao estudo de bicamadas normalmente possuem o eixo centralizado no centro da bicamada, facilitando a comparação entre os trechos referentes a cada face desta. Para uma bicamada simples (sem proteínas ou outras moléculas que a perturbem), e de mesma quantidade de lipídios em cada monocamada, o centro da estrutura normalmente corresponderá ao centro da curva das moléculas de POPC (o mínimo que ocorre entre os dois picos da curva rosa no gráfico anterior), que corresponde à região de acoplamento entre as duas monocamadas (ver Seção 3.4.5). Entretanto, este critério de definição do centro da bicamada não é adequado, pois não pode ser aplicado à sistemas em qualquer condição – a região de acoplamento entre as faces da bicamada é sensível à composição desta e à presença de outras moléculas, como peptídeos, proteínas e flavonoides).

Um critério alternativo, que é adotado neste trabalho, é definir o centro da bicamada na metade da distância entre os picos do perfil de densidade dos átomos de fósforo/grupos fosfato. Obviamente as cabeças dos fosfolipídios também podem ser perturbadas pela presença de outras moléculas no sistema, mas isto ocorre essencialmente no plano da bicamada e não traz modificações no eixo perpendicular ao plano; a exceção é quando uma molécula perturba a bicamada a tal ponto que “arrasta” lipídios para o interior da membrana.

3.4.3 Espessura da bicamada

Outra grandeza importante no estudo de bicamadas é sua espessura. Intuitivamente, a espessura de uma bicamada consiste na distância, ao longo do eixo normal ao plano da bicamada, entre certa região de uma face e a região correspondente na outra face. Novamente, são os átomos de fósforo/grupos fosfato da cabeça dos fosfolipídios são escolhidos como representativos (Zhao et al., 2009). É importante salientar que a espessura da bicamada não corresponde à espessura da fase hidrofóbica (a região das caudas onde estatisticamente não se verifica a presença de moléculas de água); na espessura da bicamada estão compreendidas a fase hidrofóbica e um trecho de região hidratada em cada face, como pode ser observado na Figura 3.12. Para calcular especificamente a espessura da região hidrofóbica, o mais correto é considerar a distância entre as carbonilas das moléculas de fosfolipídio de uma face e as da outra face (ver Seção 4.3.5).

A Figura 3.13 traz o perfil de densidade dos átomos de fósforo, e também dos grupos fosfato, das moléculas de fosfolipídio para a bicamada em análise. Observe a correspondência

entre os picos das duas curvas: os máximos para os dois grupos sempre ocorrem aproximadamente nos mesmos valores (afinal, os átomos de fósforo coincidem aproximadamente com o centro de massa do grupo fosfato) e é por este motivo que normalmente a espessura de uma bicamada é considerada como a distância, ao longo do eixo normal ao plano da bicamada, entre os átomos de fósforo dos lipídios de uma face e os da outra face, também conhecida por distância P–P.

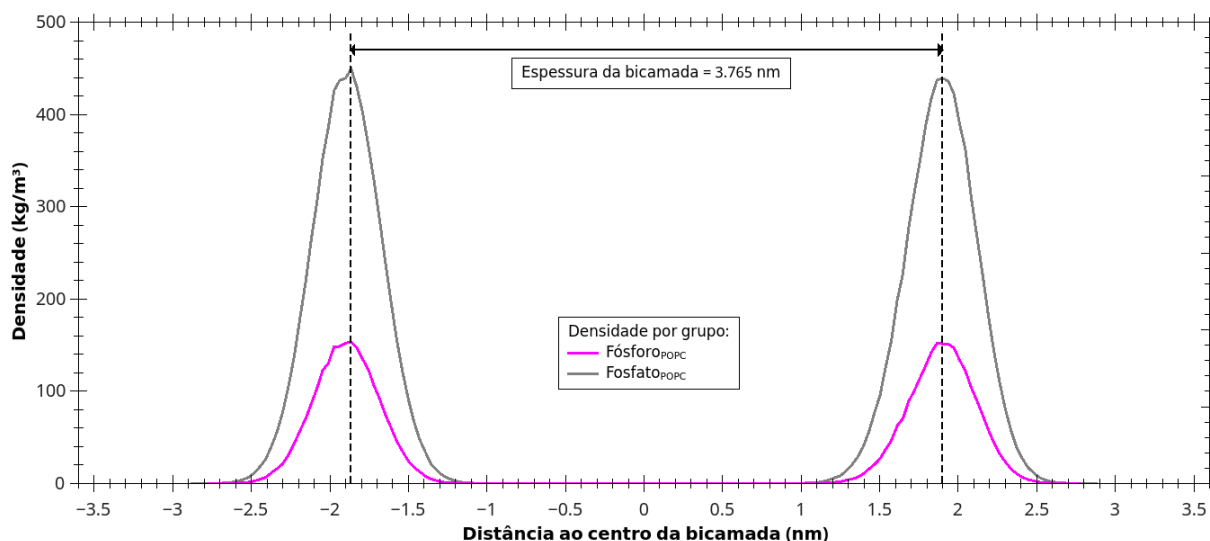


Figura 3.13 – Perfil de densidade para os átomos de fósforo e grupos fosfato das moléculas de POPC. A distância entre os picos fornece a espessura da bicamada. As curvas de ambas as faces possuem a mesma área (pois as faces possuem quantidades iguais de lipídios), mas observa-se que a altura do pico da face superior (dir.) é ligeiramente menor, uma vez que os átomos de fósforo desta apresentam uma distribuição relativamente mais ampla. Isto não afeta a forma de cálculo da espessura da bicamada, que ainda será a distância entre os máximos das duas curvas, e também não implica que a distribuição da face como um todo é assimétrica, como será visto na Figura 3.16.

A espessura de uma bicamada pode ser aferida a partir de gráficos como o mostrado na figura acima, que para a bicamada em análise fornece uma espessura de 3,765 nm. Entretanto, ao tratar apenas a curva média resultante de todos os *frames* analisados, a informação sobre a oscilação da espessura ao longo da simulação é perdida e também fica complicado estimar o erro no valor obtido para a grandeza. Uma alternativa é calcular a espessura em cada *frame* da simulação, ou seja, calcular a distância P–P instantânea repetidas vezes ao longo do período de análise. O resultado é mostrado na Figura 3.14, que revela a flutuação da espessura da bicamada no período analisado. Novamente observa-se um comportamento estável – a espessura não sofre grandes oscilações ao longo da simulação – indicativo de uma estrutura estável, com valores oscilando em torno de um valor médio de $(3,88 \pm 0,14)$ nm.

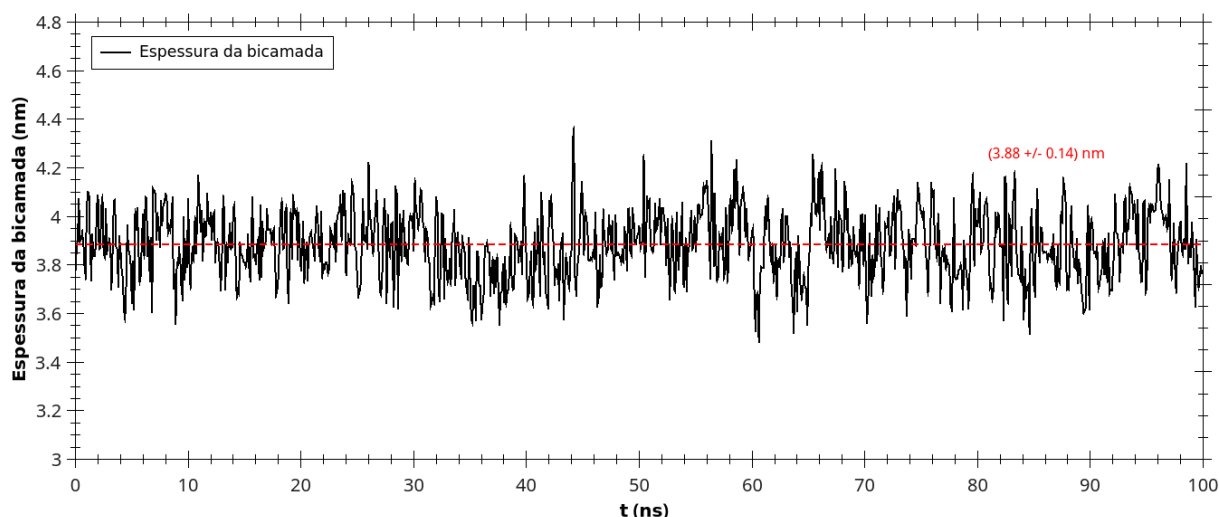


Figura 3.14 – Flutuação da espessura da bicamada, calculada a partir de perfis de densidade como o da Figura 3.13. A linha tracejada em vermelho indica o valor médio obtido, que também é apresentado no gráfico.

A comparação do valor obtido para a espessura da bicamada revela plena concordância com valores relatados em trabalhos de simulação por dinâmica molecular à 310K: $(3,8 \pm 0,1)$ nm (Pasenkiewicz-Gierula et al., 2000) e $(3,82 \pm 0,13)$ nm (Canto et al., 2011), utilizando GROMOS87, e à 300K, $(3,89 \pm 0,31)$ nm (Capponi et al., 2016), utilizando CHARMM36; o valor também é compatível com medições experimentais: 3,5~4,1 nm (Rand e Parsegian, 1989) e $(3,91 \pm 0,078)$ nm (Kučerka et al., 2011).

3.4.4 Parâmetros de ordem

Área por lipídio e espessura são propriedades médias da bicamada que trazem informações sobre sua estrutura, embora não revelem detalhes sobre a organização do sistema a nível atômico. Mas a robustez da dinâmica molecular reside justamente na possibilidade de avaliar propriedades médias e de possibilitar a qualquer instante a análise da organização atômica do sistema estudado. As análises tratadas a seguir exploram esta segunda característica da técnica.

Um conjunto de informações importantes em simulações de bicamadas é a organização das cadeias de carbono – as caudas dos fosfolipídios. A orientação dos átomos de carbono das caudas pode ser estudada ao longo da simulação através dos chamados parâmetros de ordem deuterados (S_{CD}), obtidos para cada grupo CH_2 a partir da equação

$$S_{CD} = \frac{1}{2}(3\langle \cos \theta \rangle - 1) \quad , \quad (3.1)$$

onde θ é o ângulo entre o vetor C-H e o eixo normal ao plano da bicamada (eixo z); os colchetes da expressão indicam que o valor calculado é uma média sobre as configurações e também uma média temporal (Yang et al., 2016).

A Figura 3.15 apresenta os valores dos parâmetros de ordem deuterados para os átomos de carbono das caudas saturadas da bicamada em análise; quanto maior o valor de $-S_{CD}$, maior é a ordenação da cauda e mais próxima a ligação entre os átomos de carbono C_{n-1} e C_{n+1} da cadeia está da perpendicular ao plano da bicamada. Rigorosamente, os parâmetros de ordem deuterados são valores discretos calculados para cada átomo de carbono das caudas (exceto o primeiro e o último carbonos, que não são grupos CH_2); a apresentação na forma de pontos unidos por uma curva, como no gráfico abaixo, é um critério estético utilizado para passar a ideia da ligação entre os átomos de carbono de uma mesma cauda.

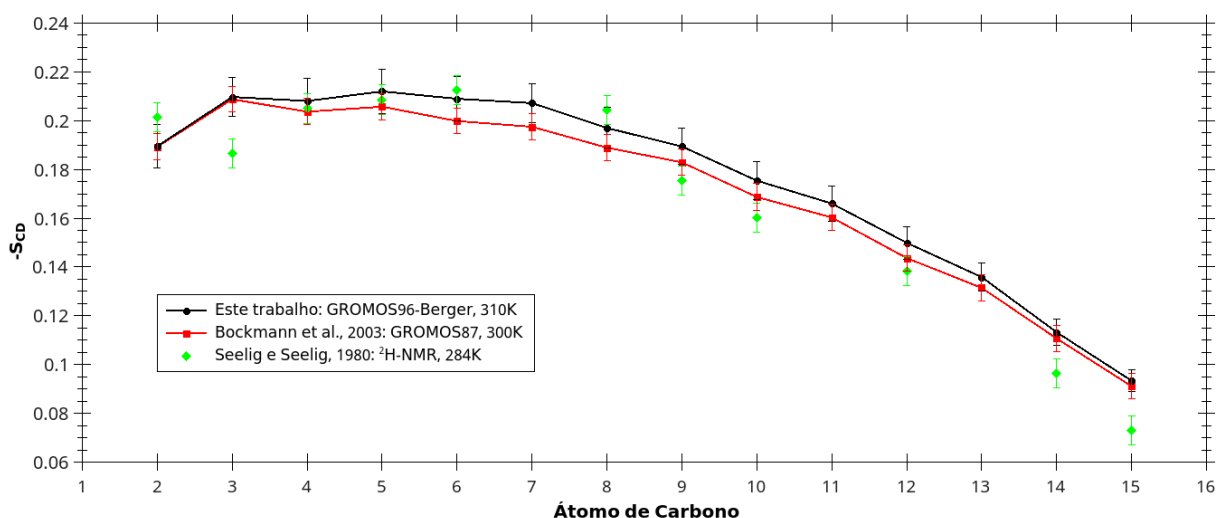


Figura 3.15 – Parâmetros de ordem obtidos a partir da Equação 3.1. O parâmetro não está definido para o primeiro e o último átomo de carbono da cadeia, por isso, seguindo a nomenclatura da Figura 3.1, o primeiro valor das curvas refere-se ao segundo átomo de carbono da cadeia saturada (C_1 ou $sn-1$), ou seja, ao átomo $C_{1,2}$; o segundo valor, ao átomo $C_{1,3}$ e assim por diante. No gráfico são apresentados os parâmetros obtidos para a bicamada em análise (preto), e os de duas referências (vermelho e verde).

A análise da figura acima revela boa concordância entre os parâmetros calculados para a bicamada POPC em análise (pontos em preto) e os valores apresentados em dois trabalhos de referência; um de simulação por dinâmica molecular (vermelho) e outro experimental, de ressonância magnética nuclear (2H -NMR, em verde).

3.4.5 Acoplamento entre as faces da bicamada

Uma questão interessante no estudo membranas é qual a relevância da interação, essencialmente do tipo van der Waals, estabelecida entre as duas faces que constituem uma membrana (Schmidt, C. F. et al., 1978; Düzgünes et al., 1988). Com a hipótese da complementariedade entre os lipídios de face opostas (fosfolipídios de caudas longas de uma face tenderiam a emparelhar com lipídios de caudas menores da outra face, e vice-versa) e sua possível influência nos chamados *lipid rafts*, possivelmente devido ao ordenamento promovido por moléculas de colesterol, esfingomielina e proteínas (Simons e Gerl, 2010; Zhang et al., 2005a; Zhang et al., 2005b; Collins e Keller, 2008), informações sobre a interação entre as faces de uma bicamada e como esta é modificada pela presença de outras moléculas constituem uma frente atual de estudos (Capponi et al., 2016).

Ainda não existem abordagens específicas para tratar o acoplamento entre as faces de uma bicamada (Putzel et al., 2011), mas formas indiretas podem trazer informações sobre como se dá tal interação. Se o alvo é a interação entre as duas faces de uma bicamada, uma abordagem possível é verificar o efeito de tal interação na região dos fosfolipídios provavelmente mais afetada pela ação das moléculas da face oposta: os extremos das caudas dos fosfolipídios – os chamados CH₃ terminais (que na representação de átomos unidos é uma única partícula, um pseudo-átomo que reproduz as características do grupo).

A análise da distribuição dos átomos destes grupos através de perfis de densidade ao longo do eixo perpendicular ao plano da bicamada traz informações sobre como ocorre a interação – a interdigitação – entre os fosfolipídios das duas monocamadas. As imagens a seguir mostram perfis de densidade dos grupos CH₃ terminais visando a avaliação da interação entre as faces da bicamada em análise e a influência da diferença entre as caudas saturadas e insaturadas nesta interdigitação/acoplamento. Os gráficos possuem caráter duplo: introdutório, pois trazem uma primeira visão sobre o tema, e serão reapresentados mais à frente no estudo do efeito do colesterol sobre a bicamada; e de validação, pois visam reproduzir os resultados apresentados em Capponi et al. (2016), num trabalho onde, além de outros tipos de bicamadas puras, é tratada uma bicamada POPC simulada sob outro campo de forças e num pacote de *softwares* diferente do utilizado neste estudo (a saber, *software* NAMD e campo de forças CHARMM36, com modelo TIP3P para as moléculas de água).

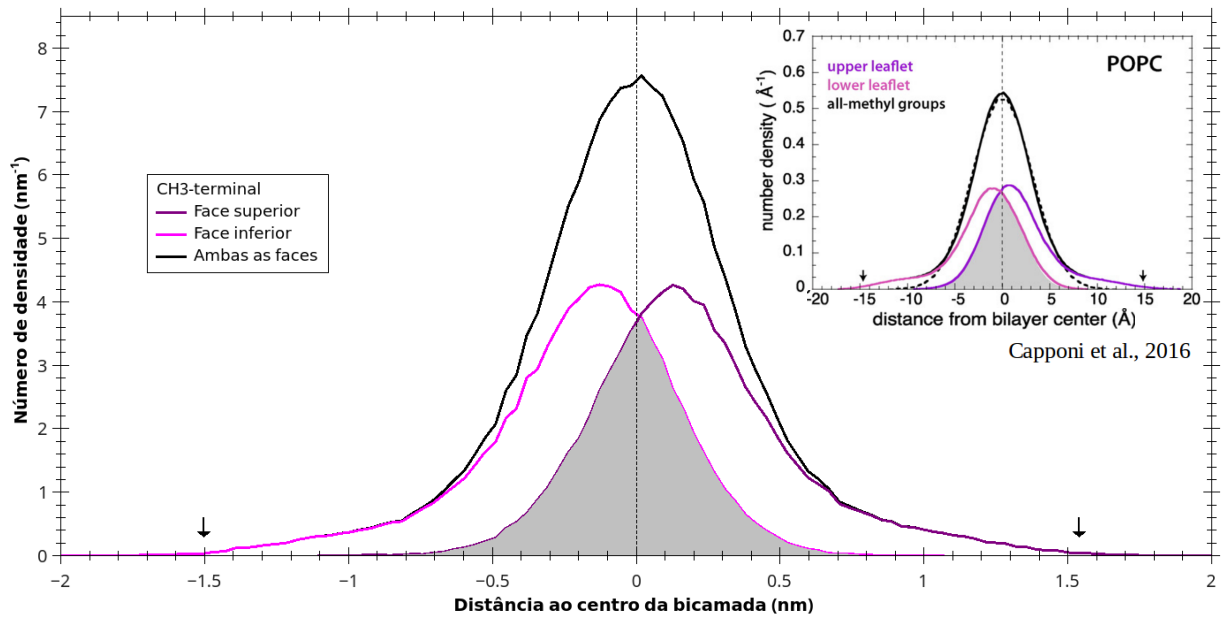


Figura 3.16 – Perfil de densidade dos grupos CH_3 terminais de ambas as caudas do fosfolípido; o gráfico mostra a distribuição de tais grupos em relação ao centro da bicamada. São apresentadas as distribuições dos CH_3 terminais somente dos fosfolípidos da face superior da bicamada (roxo), somente da face inferior (lilás), e a soma destas duas distribuições (preto). A região de interseção entre as curvas constitui medida do grau de acoplamento entre as monocamadas. Para comparação, o destaque no gráfico apresenta os resultados de um trabalho de referência. As setas indicam a posição do pico das carbonilas das moléculas de POPC que, como será abordado no próximo capítulo, são um indicativo da posição limítrofe da região hidratada da bicamada.

A Imagem 3.16 mostra os perfis de densidade dos grupos CH_3 terminais (ambos os tipos de caudas) segundo a face que seus lipídios constituem. Fica evidenciado que há uma região de interdigitação entre as duas faces da bicamada, onde coexistem átomos de ambas as monocamadas (região hachurada). Os valores são médias sobre os 100 ns finais da simulação e revelam que parte significativa dos grupos CH_3 terminais ficam distribuídos na região onde se verifica a interação entre as faces (uma região de aproximadamente 1,4 nm), mas possuem ampla liberdade de distribuição, com probabilidade não nula numa região de cerca de 3,0 nm (a bicamada possui 3,88 nm de espessura). Outra informação evidenciada pelo gráfico é a simetria estrutural das duas monocamadas – a interseção entre a distribuição dos CH_3 terminais das duas faces ocorre aproximadamente no centro da bicamada (existe um deslocamento mínimo, também observado por Capponi et. al. (2016), mas há de se considerar que o erro da medida não é apresentado).

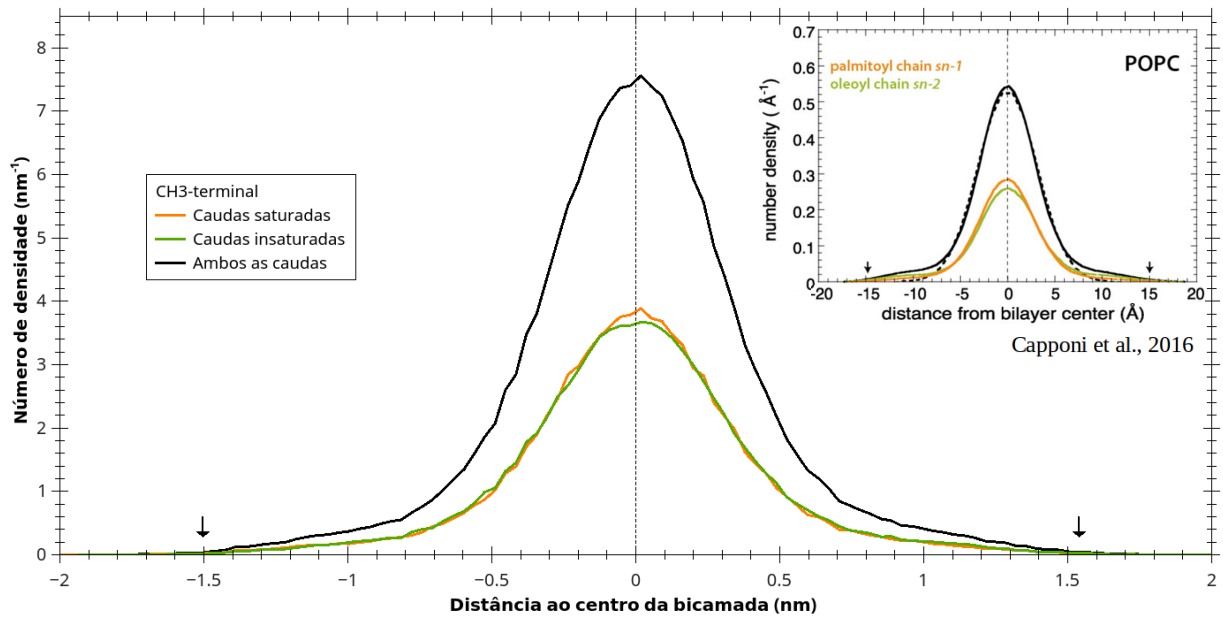


Figura 3.17 – Perfil de densidade dos grupos CH₃ terminais de ambas as faces da bicamada, em relação ao centro da estrutura, no eixo perpendicular ao plano da bicamada. Os grupos estão individualizados em relação ao tipo de cauda que constituem: CH₃ terminais de caudas saturadas (laranja), de caudas insaturadas (verde), e a soma das duas distribuições (preto). Em destaque, são apresentados os resultados de um trabalho de referência para comparação.

A Figura 3.17 mostra os perfis de densidade dos grupos CH₃ terminais de ambas as faces, agora diferenciados em relação ao tipo de cauda a que pertencem, e sugere que as caudas apresentam distribuições ligeiramente diferentes, com uma distribuição mais ampla para os átomos das caudas insaturadas (como ambas as caudas possuem exatamente a mesma quantidade de grupos CH₃ terminais, a altura dos picos deveria ser a mesma, que não é o observado).

A fim de garantir que esta diferença se deve de fato ao tipo de cauda e que não seja influência dos fosfolípidios de ambas as faces terem sido considerados sem distinção no cálculo (ou ao fato de não haver uma barra de erros associada à medida), a Figura 3.18 apresenta a distribuição dos grupos CH₃ terminais, segundo o tipo de cauda a que pertencem, em uma face específica (a monocamada superior). Neste, fica evidente que há uma diferença na distribuição em relação ao tipo de cauda: os grupos do extremo das cadeias insaturadas apresentam probabilidade mais significativa de povoarem regiões mais internas à própria monocamada, afastando-se do centro da bicamada (o pico da curva verde está deslocado para direita, na direção das cabeças polares da respectiva monocamada).

Obviamente este fenômeno pode ter relação com o menor ordenamento das caudas insaturadas, mas no caso das moléculas de POPC, as caudas insaturadas são maiores do que as saturadas – uma cauda de comprimento maior, com uma distribuição dos átomos de sua ponta

mais interna à face, é um indicativo de que as caudas insaturadas apresentam uma conformação de “gancho” (isto será explorado no próximo capítulo). As caudas saturadas, entretanto, são mais ordenadas e, apesar de não possuírem a restrição de uma dupla ligação, apresentam uma distribuição mais restrita, na direção do centro da bicamada.

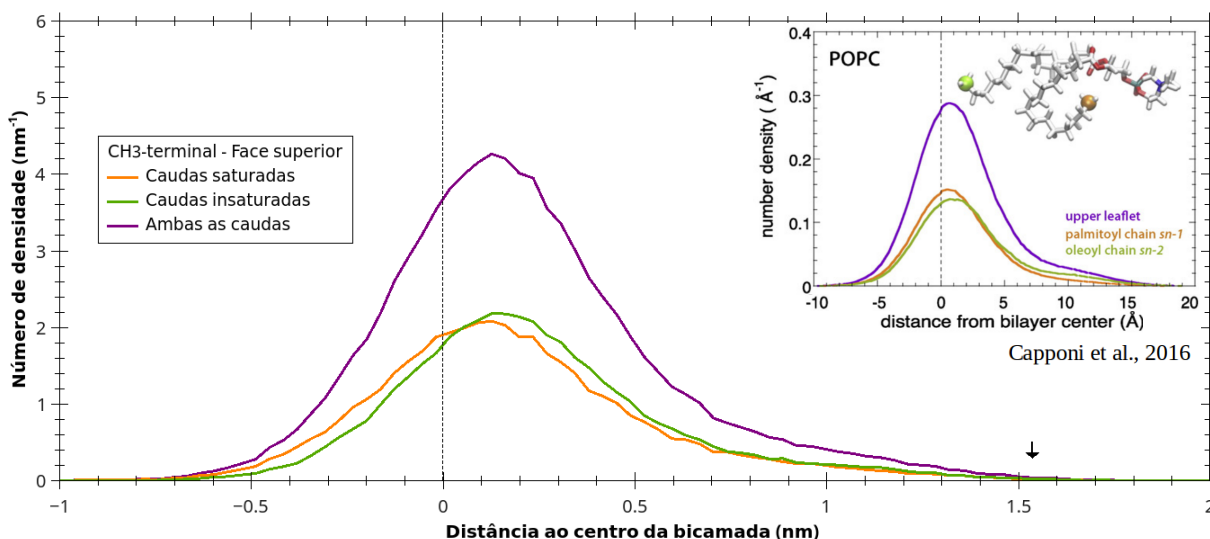


Figura 3.18 – Perfil de densidade dos grupos CH₃ terminais de uma mesma face, discriminados em relação ao tipo de cauda que constituem: caudas saturadas (laranja) e insaturadas (verde); a soma das duas curvas também é apresentada (roxo). No destaque do gráfico, são apresentados os resultados obtidos num trabalho de referência.

Os três gráficos desta seção são comparáveis aos obtidos por White e colaboradores (Capponi et al., 2016), revelando os mesmos padrões (os valores de densidade não são equivalentes porque o número de lipídios deste trabalho, 65 por face, difere do número usado na referência, 36 por face). Esta comparação positiva possuiu grande significado pois os trabalhos diferem na quantidade de moléculas de fosfolipídios, de moléculas de água, na modelagem destas moléculas (aqui, átomos unidos; lá, todos os átomos), no modelo para a representação das moléculas de água, no campo de forças e no pacote de *softwares* utilizado, e ainda sim, revelam boa congruência de resultados aplicados a análises muito sensíveis como a distribuição de pequenos grupos de átomos em relação ao centro da bicamada.

3.5 Conclusão

Pelos resultados apresentados, verificou-se a estabilidade da bicamada POPC pura simulada segundo os parâmetros apresentados na Seção 2.3. A comparação dos valores obtidos para área por lipídio e espessura da bicamada apresentou boa correspondência tanto com dados de outros trabalhos de simulação, quanto com resultados experimentais. Cálculos da distribuição dos grupos CH₃ terminais das caudas dos fosfolipídios em relação ao centro da bicamada revelaram plena correspondência com os apresentados em outro trabalho (Capponi et al, 2016), também de simulação por dinâmica molecular, mas realizado sob uma filosofia muito diferente da empregada neste.

A partir dos dados expostos, a validação da bicamada simulada sob o campo de forças GROMOS96 53A6, modificado com parâmetros de Berger para fosfolipídios, implica na afirmação de que o campo de forças reproduz satisfatoriamente o sistema físico de interesse – uma bicamada POPC pura – que, embora simples, servirá de base de comparação para os sistemas mais complexos abordados nos próximos capítulos.

4. AÇÃO DO COLESTEROL EM BICAMADAS FOSFOLIPÍDICAS

4.1 Introdução

Uma das maiores vantagens da técnica de simulação por dinâmica molecular é a perspectiva de poder aplicá-la virtualmente a qualquer sistema: os únicos requisitos são conhecer um campo de forças adequado ao sistema que se deseja simular e parametrizar as moléculas de interesse para o campo de forças (além de ter ao recurso computacional necessário, claro). No caso de sistemas biológicos, e mais especificamente dos sistemas miméticos de membranas, esta vantagem é concretizada na possibilidade de se avaliar a interação de diversos tipos de componentes lipídicos, e também a interação destes com outras moléculas de interesse (Tieleman et al., 1997).

Partindo-se de um sistema simples e bem caracterizado (a bicamada POPC pura do capítulo anterior, por exemplo), é possível ir inserindo ou substituindo componentes do sistema de forma a se obter uma composição que represente melhor as características da membrana biológica de interesse. Obviamente este recurso têm um preço (além do computacional): o sistema pode tornar-se tão complexo a ponto de não ser possível analisar os resultados obtidos e compreender sua dinâmica. A alternativa mais comum então é aumentar a complexidade do sistema gradativamente, inserindo um novo componente e estudando seu efeito, para só depois avançar para outro componente (Berkowitz, 2009; Pasenkiewicz-Gierula et al., 2000).

Infelizmente, a implementação da ideia é bem mais complicada do que estas linhas podem ter sugerido, e a caracterização da ação de um componente pode levar anos de trabalho. O estudo do colesterol e sua ação sobre as bicamadas é um bom exemplo pois, apesar de ser uma molécula simples, simulações de bicamadas contendo colesterol vêm sendo desenvolvidas há mais de duas décadas e ainda há questões a serem exploradas (Yesylevskyy e Demchenko, 2015).

4.2 Simulações de Bicamadas Contendo Colesterol

O colesterol é um dos componentes lipídios mais importantes das membranas biológicas, principalmente para os organismos eucariotos, onde a divisão e especialização das células depende da presença deste esterol (Falck et al., 2004). Ele age sobre as membranas modificando suas propriedades locais, afetando a fluidez da membrana e atuando sobre *rafts*, proteínas integrais (Cantor, 1999) e possivelmente sobre processos de sinalização através da membrana (Mihailescu et al., 2011).

Por alterar as propriedades das bicamadas e participar de muitos processos biológicos, além de ser um componente significativo de muitas membranas, o colesterol têm sido amplamente estudado em simulações computacionais. A molécula de colesterol é formada por 74 átomos (29, na representação de átomos unidos), apresentando uma hidroxila num dos extremos da molécula (ver Figura 4.1) e uma cadeia acíclica no outro; o corpo da molécula é formado por anéis que lhe conferem certa rigidez. Assim como as moléculas de fosfolipídio, o colesterol também é anfipático, com a hidroxila solúvel em água e o resto da molécula apresentando característica hidrofóbica (numa bicamada, o OH do colesterol sempre fica voltado para a região hidratada da bicamada e, como será abordado neste estudo, interagindo com moléculas de água).

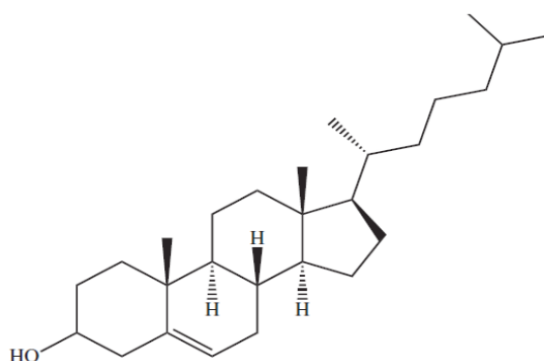


Figura 4.1 – Estrutura da molécula de colesterol ($C_{27}H_{46}O$). Extraída de Höltje et al., 2001.

Os primeiros trabalhos de simulação, muitos conciliando Monte Carlo e dinâmica molecular, envolvendo o colesterol consistiram em tentativas de modelar a molécula aos campos de forças existentes, ou em criar campos que a descrevessem satisfatoriamente (Edholm e Nyberg, 1992; Höltje et al., 2001). Os modelos decorrentes destes estudos

objetivavam “trabalhar com o mínimo de informações necessárias para que a física do sistema fosse satisfatoriamente descrita” (Nielsen et al., 1999) e seu refinamento conduziu às primeiras simulações com detalhamento a nível atômico de misturas lipídicas contendo colesterol no início dos anos 2000 (Tieleman et al., 1997; Berkowitz et al., 2006). Tais simulações obtiveram sucesso em reproduzir algumas propriedades das bicamadas e mostraram que estas são fortemente dependentes da concentração de colesterol (Chiu et al., 2002), observando que o colesterol induzia a condensação da bicamada, alterando suas propriedades (estes aspectos também serão abordados neste trabalho). Os avanços na modelagem das moléculas possibilitaram o estudo de diversos sistemas binários contendo colesterol e um tipo de fosfolípido (Hofsäß et al., 2003), e em diferentes concentrações destes. O principal fator limitante nestes trabalhos foi computacional, pois a capacidade de processamento dos computadores à época possibilitava a produção de simulações de picosegundos (10^{-12} s) até alguns nanosegundos (10^{-9} s) (Murzyn et al., 2005).

Foi somente com a melhoria da capacidade de processamento que os tempos de simulação puderam ser estendidos à dezenas de nanosegundos e dados obtidos das simulações, como a área por lipídio ou o parâmetro de ordem para os átomos das caudas, passaram a reproduzir medições experimentais e também a convergir com resultados de simulações utilizando outros modelos. A extensão das simulações à centenas de nanosegundos passou a possibilitar a comparação de resultados obtidos em campos de forças diferentes (Piggot et al., 2012; MacDermaid et al., 2015). Embora já existam trabalhos com simulações que alcancem a escala dos microsegundos (10^{-6} s), simulações de algumas dezenas ou centenas de nanosegundos ainda são o padrão atual¹; isto, é claro, considerando-se somente o período de estabilidade da simulação.

No estudo de bicamadas, recentemente a assimetria das membranas passou a atrair atenção e os efeitos de tais diferenças de composição das faces é uma frente atual de estudos (Yesylevskyy e Demchenko, 2015; Nickels et al., 2015; Tian et al., 2016). A formação de *lipid rafts* e a possibilidade de haver relação entre o acoplamento das duas faces de uma bicamada e a passagem de informação através de uma membrana, também são foco de grande interesse (Marsh 2009; Capponi et al., 2016).

1 A extensão indefinida de uma simulação não necessariamente implica em resultados melhores, como verificaram Wang e colaboradores (Hong et al., 2014), que desenvolveram simulações de bicamadas POPC, POPC/Colesterol e POPC/POPE até a ordem dos microsegundos e não observaram modificações de interesse além da centena de nanosegundos – fato que obviamente vai depender da composição do sistema e de se se parte de uma distribuição inicial próxima da natural ou não.

A evolução dos estudos de sistemas biológicos através de simulações por dinâmica molecular pode sugerir que os avanços ocorrem numa única direção; isto não é verdade. Muitos temas já abordados são constantemente revisitados com dinâmicas de maior escala de tempo ou com a produção de novos modelos que possibilitem melhor reprodução de dados empíricos ou a redução do custo computacional (Baoukina e Tieleman, 2015; MacDermaid et al., 2015).

4.3 Efeitos da Concentração de Colesterol em Bicamadas POPC

Neste trabalho, será avaliado o efeito da concentração de colesterol sobre as propriedades de uma bicamada fosfolipídica; o que é feito através da comparação das propriedades de bicamadas POPC contendo três concentrações diferentes de colesterol: 0, 20 e 40%. A bicamada POPC pura (0% colesterol) e suas propriedades foram abordadas no capítulo anterior, enquanto que as bicamadas mistas (20 e 40%) são obtidas pela troca da respectiva porcentagem de moléculas do fosfolipídio por moléculas de colesterol; as três bicamadas possuem portanto a mesma quantidade de componentes lipídicos.

As bicamadas que fazem parte deste estudo são simétricas – as duas faces de cada bicamada possuem iguais quantidades de lipídios e em igual concentração – e são formadas por 130 moléculas de lipídios (POPC e colesterol são ambos componentes estruturais das membranas) e 4550 moléculas de água (35 moléculas por fosfolipídio); a construção das caixas de simulação foi realizada através da ferramenta *online* MemGen (Knight e Hub, 2015) e os parâmetros utilizados nas simulações são os apresentados na Seção 2.3. À critério de ilustração, a Figura 4.2 traz a representação da bicamada mista contendo 20% de moléculas de colesterol.

Todas as simulações foram desenvolvidas por 350 ns, mas por padronização, as análises apresentadas, salvo se explicitado o contrário, correspondem aos 100 ns finais da simulação – período contínuo de verificada estabilidade. Esta medida foi adotada porque o tempo necessário para a estabilização do sistema depende da composição da bicamada e eventualmente das condições iniciais impostas (como poderá ser observado, quanto maior a concentração de colesterol, menores são as flutuações nas propriedades da bicamada), e ao fato de algumas análises serem computacionalmente dispendiosas para serem aplicadas a períodos maiores do que 100 ns – testes mostraram que tal período de análise era suficiente

para amostrar estes sistemas em específico, não sendo observadas alterações significativas nos valores médios, e respectivo desvio padrão, se tomado um período maior (de 200 ns, por exemplo).

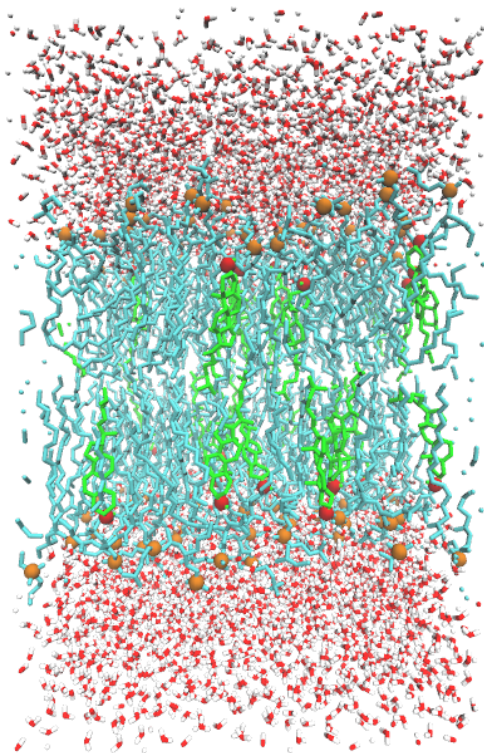


Figura 4.2 – Representação da bicamada mista contendo 130 lipídios, dos quais 20% são colesterol. As moléculas de POPC são apresentadas em ciano e seu átomo de fósforo está destacado como uma esfera laranja; já as moléculas de colesterol são apresentadas em verde, tendo seu átomo de oxigênio destacado como uma esfera vermelha.

4.3.1 Estabilidade das bicamadas

A verificação da estabilidade das simulações apresentadas segue o protocolo utilizado para a bicamada POPC pura (Seção 3.3.1): pressão e temperatura oscilando em torno dos valores de referência, $P_{\text{ref}} = 1 \text{ bar} = 0,987 \text{ atm}$ e $T_{\text{ref}} = 310\text{K}$, variáveis termodinâmicas dependentes (dimensões da caixa de simulação, volume, densidade) oscilando em torno de um valor de equilíbrio, e energia potencial do sistema (todos os componentes) estável e com um *drift* razoável no coeficiente angular de seu gráfico (os *drifts* verificados para as simulações com 0, 20 e 40% colesterol foram, respectivamente, $(-6 \pm 3) \cdot 10^{-1} \text{ kJ/mol.ns}$, $(-10 \pm 3) \cdot 10^{-1} \text{ kJ/mol.ns}$ e $(3 \pm 3) \cdot 10^{-1} \text{ kJ/mol.ns}$). Para simplificar o texto, tais gráficos não são apresentados.

Com a finalidade de verificar a estabilidade das bicamadas em si (e não do sistema como um todo), os gráficos a seguir trazem as energias de interação coulombiana (Figura 4.3) e do tipo van der Waals (Figura 4.4) entre os lipídios constituintes da bicamada (sem distinção quanto ao tipo de lipídio). Em ambos os gráficos, observa-se um comportamento estável, com valores oscilando em torno de um valor médio (linhas tracejadas em azul), indicativo da estabilidade da interação entre os componentes lipídicos e consequentemente da própria bicamada.

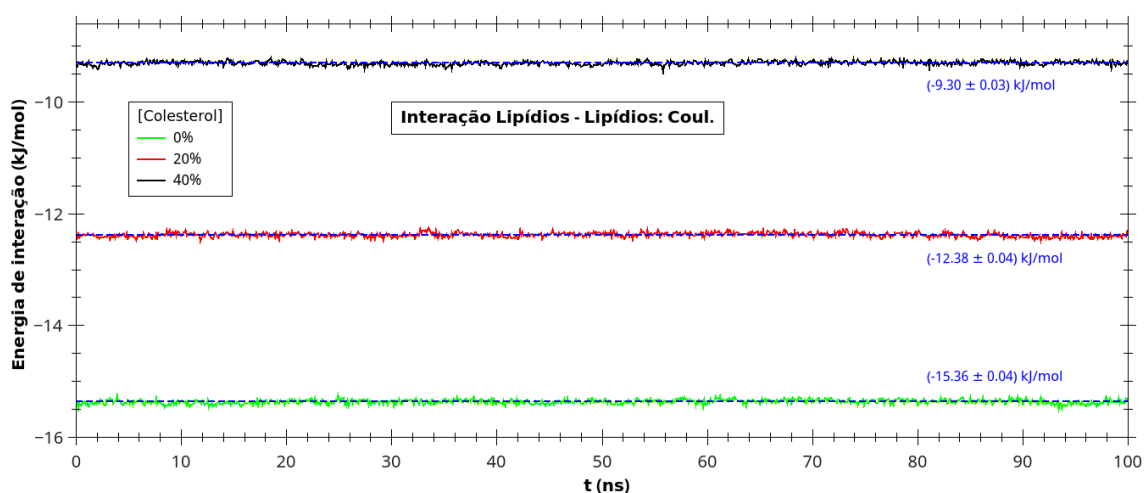


Figura 4.3 – Energia de interação do tipo Coulomb entre os lipídios (POPC e colesterol) constituintes das bicamadas, normalizada pelo número de pares (como as três bicamadas possuem o mesmo número de lipídios – o que varia é a concentração de colesterol – para todas, $N_p = (130 \times 129 / 2)$). As linhas tracejadas (em azul) indicam os valores médios em cada caso, sendo estes também apresentados como destaque no gráfico.

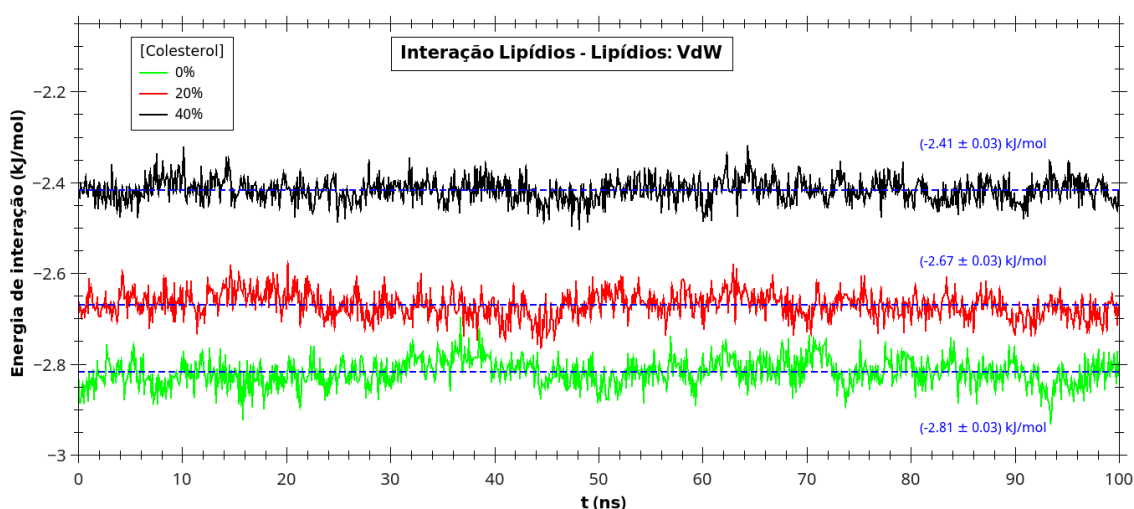


Figura 4.4 – Energia de interação do tipo van der Waals, entre os lipídios constituintes das bicamadas. Os valores estão normalizados pelo número de pares de interação e as linhas tracejadas (em azul) indicam os valores médio de cada curva no período.

A estabilidade das bicamadas também está relacionada a uma interação estável com as moléculas de água do sistema; os gráficos a seguir mostram a variação da energia de interação entre os lipídios e as moléculas de água. O comportamento de relativa estabilidade, com valores oscilando em torno do valor médio (linhas tracejadas em azul), é observado tanto para as interações coulombianas (Figura 4.5) quanto para as interações apolares (Figura 4.6), e é indicativo de que as bicamadas estão adequadamente hidratadas.

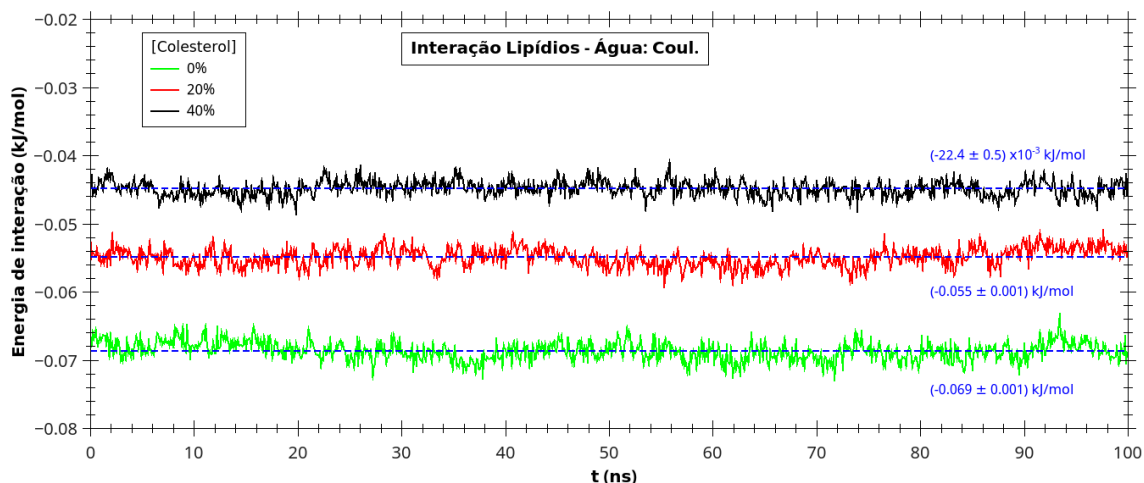


Figura 4.5 – Energia de interação (Coulomb), entre os lipídios constituintes das bicamadas e as moléculas de água da caixa de simulação. Os valores estão normalizados pelo número de pares; como as caixas contém a mesma quantidade de lipídios e também de moléculas de água, $N_p = (130 \times 4550)$ para todas as simulações. Em azul, são indicados o valor médio de cada curva no período considerado.

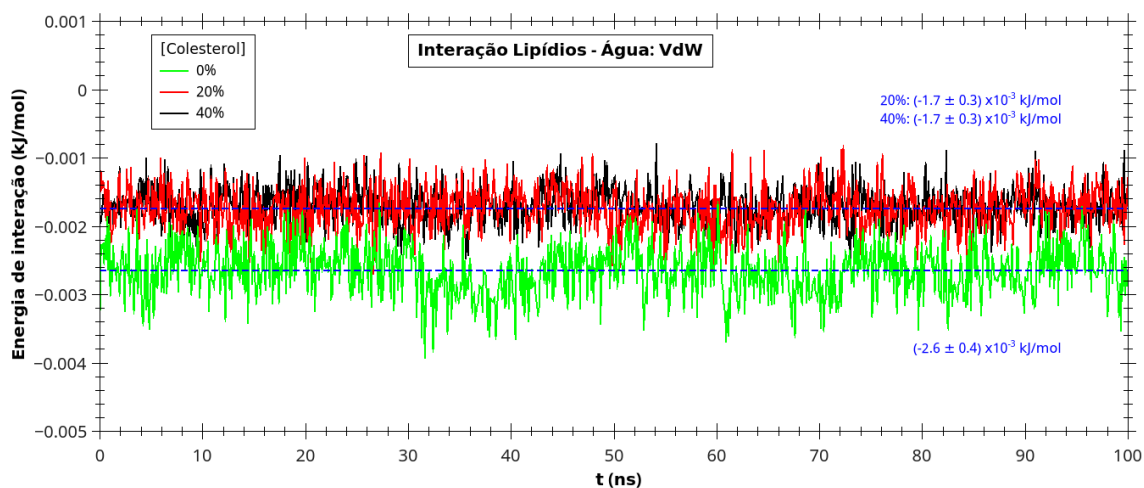


Figura 4.6 – Energia de interação (van der Waals) entre os lipídios constituintes das bicamadas e as moléculas de água da caixa de simulação; os valores estão normalizados pelo número de pares de interação e as linhas tracejadas (em azul) indicam os valores médios para cada curva ao longo dos 100 ns analisados.

As figuras anteriores atestam que as três bicamadas estão estáveis no período considerado; os termos de energia interna da bicamada (interação entre os lipídios) apresentam um comportamento estável, com valores oscilando em torno de um valor médio, e o mesmo se verifica para a interação entre lipídios e as moléculas de água. Portanto, as bicamadas estão estáveis e adequadamente hidratadas no período, o que possibilita a análise de suas propriedades e a comparação entre os sistemas. E, a partir desta comparação, avaliar os efeitos da concentração de colesterol sobre as propriedades das bicamadas.

4.3.2 Estruturação das bicamadas

A Figura 4.7 apresenta o perfil de densidade dos componentes das caixas de simulação (água, POPC e colesterol) com as bicamadas contendo 0, 20 e 40% colesterol; os valores são médias sobre os componentes e também sobre a quantidade de estruturas avaliadas no intervalo de análise (100 ns). A figura constitui uma verificação da estabilidade e estruturação das bicamadas e revela que nas bicamadas que contêm colesterol, as hidroxilas das moléculas de colesterol (no gráfico é apresentada a distribuição para o átomo de oxigênio das hidroxilas, em ciano) permanecem orientadas para o lado externo das faces da bicamada, numa região interna à ocupada pelo átomo de fósforo dos fosfolipídios (em magenta) – os valores calculados para distância $P_{POPC} - O_{Col}$ (média sobre as duas monocamadas) são $(0,54 \pm 0,09)$ nm para 20% colesterol e $(0,39 \pm 0,10)$ nm para 40%.

Ainda pela figura, identifica-se que a região das cabeças polares é hidratada e é nesta região que se distribuem as hidroxilas das moléculas de colesterol. As carbonilas dos fosfolipídios (em roxo) são o início das cadeias acíclicas que formam as caudas apolares e pode-se observar nos três casos que, embora a distribuição das moléculas de água comece a decair já com os primeiros átomos do fosfolipídio (curva em rosa para os fosfolipídios, e em azul para a água), é na região ocupada pelas carbonilas que a presença de água se torna desprezível, indicando o início do núcleo hidrofóbico da bicamada.

Além do aumento da dimensão da estrutura lipídica no eixo das abscissas, eixo z , (que consiste no aumento da espessura da bicamada, como será abordado a seguir), é possível observar que o aumento da concentração de colesterol altera significativamente as distribuições na região central da bicamada ($z = 0$), e isto ocorre tanto no perfil das moléculas de POPC (rosa) quanto para o colesterol (laranja). Como será tratado mais adiante, o colesterol afeta o acoplamento existente entre as faces (ou monocamadas) da estrutura.

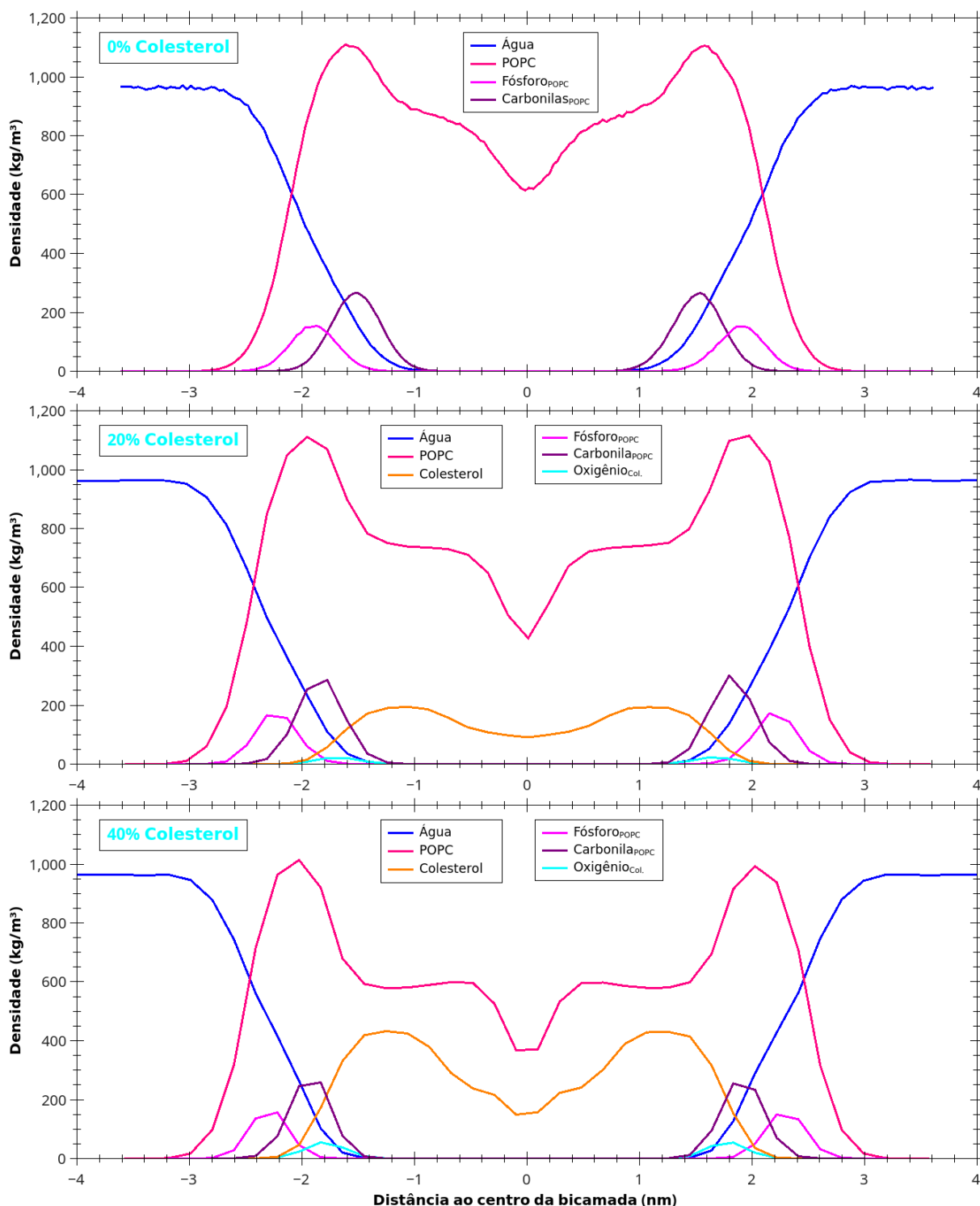


Figura 4.7 – Perfil de densidade dos componentes das caixas de simulação (água, POPC e colesterol), para os sistemas contendo 0 (em cima), 20 (meio) e 40% (embaixo) colesterol, em relação ao eixo perpendicular ao plano da bicamada. Estão discriminadas também a distribuição de posições de certos grupos de interesse para o estudo das bicamadas, como o átomo de fósforo (cabeça dos fosfolipídios) e as carbonilas (início das caudas) das moléculas de POPC e o átomo de oxigênio das moléculas de colesterol. Para a bicamada pura (0% colesterol), a curva referente à distribuição das moléculas de água (azul) não ocupa todo o eixo das abscissas (eixo z da caixa de simulação; ver Figura 3.11) pois, como será tratado a seguir, o plano definido pela bicamada sem colesterol (plano xy) é maior, e consequente a área por lipídio também é maior, do que nas demais simulações; como a área da seção é maior, a coluna de água é menor – em todas as simulações, a quantidade de moléculas de água é a mesma (35 por lipídio).

4.3.3 Área por lipídio, espessura da bicamada e parâmetro de ordem

Os gráficos a seguir trazem resultados de propriedades estruturais de interesse. A metodologia de cálculo destas propriedades foi discutida no capítulo anterior e por isso não será abordada novamente.

A primeira propriedade avaliada é a área por lipídio, a área média ocupada por cada molécula de lipídio no plano definido pela bicamada (plano xy). Aqui, tanto as moléculas de fosfolipídio quanto as de colesterol, são constituintes da bicamada e indistintamente consideradas no cálculo. A Figura 4.8 mostra a variação da área por lipídio ao longo do período de análise para as bicamadas com diferentes concentrações de colesterol; as linhas tracejadas (em azul) indicam o valor médio para cada curva, que junto com seu respectivo desvio padrão, também é apresentado no gráfico.

Pela figura, observa-se que o aumento da concentração de colesterol reduz a área por lipídio, sugerindo que as moléculas de colesterol promovem uma maior coesão no plano da bicamada: a redução é de aproximadamente 19,9% da bicamada pura para a contendo 20% de moléculas de colesterol, e de 30,1% para a contendo 40% de colesterol.

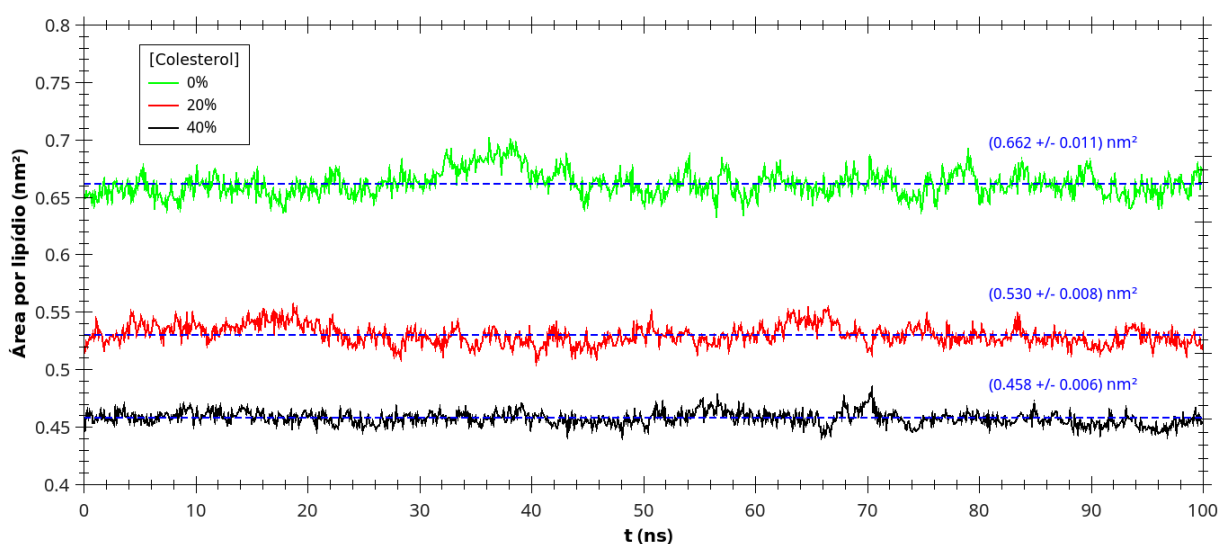


Figura 4.8 – Área por lipídio em função do tempo. O comportamento oscilatório em torno de um valor médio² (linhas tracejadas em azul) também consiste numa verificação da estabilidade das simulações.

² Os valores médios calculados estão em acordo com os obtidos por Fiorin e colaboradores (MacDermaid et al., 2015) utilizando o campo de forças CHARMM36: $(0,650 \pm 0,015) \text{ nm}^2$ para uma bicamada POPC pura, $(0,548 \pm 0,015) \text{ nm}^2$ para uma bicamada POPC/Col. contendo 20% colesterol e $(0,453 \pm 0,015) \text{ nm}^2$ para 40% de colesterol. São comparáveis também aos obtidos por Hub e colaboradores (Wennberg et al., 2012) utilizando GROMOS, modificado com parâmetros de Berger para fosfolipídios, e o modelo TIP4P para as moléculas de água: $(0,634 \pm 0,11) \text{ nm}^2$, para a bicamada pura, $0,526 \text{ nm}^2$, para 20% colesterol, e $0,445 \text{ nm}^2$, para 40%.

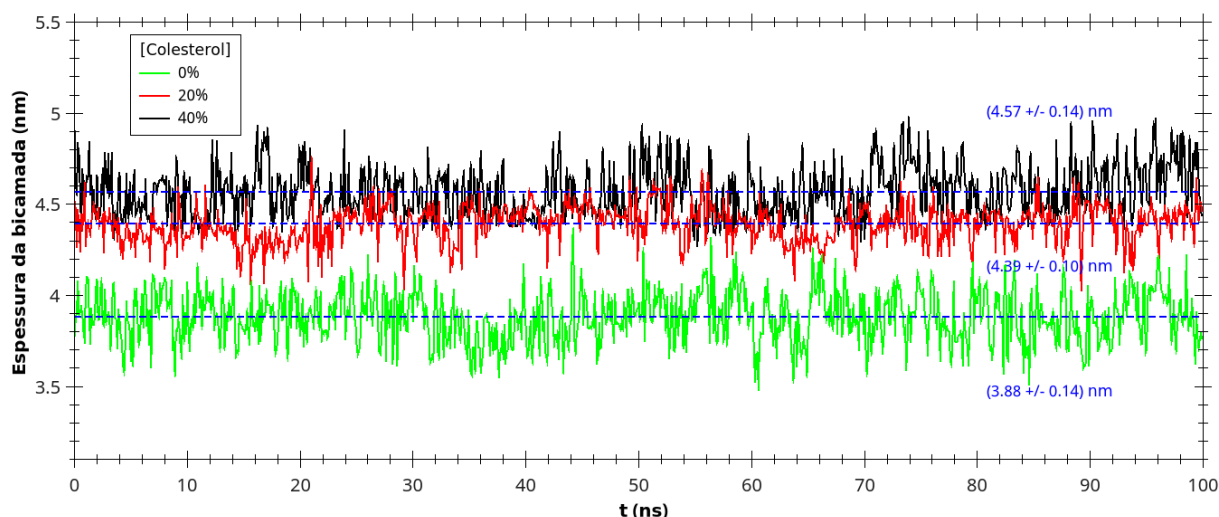


Figura 4.9 – Flutuação da espessura das bicamadas; as linhas tracejadas (em azul) indicam os valores médios calculados para cada curva; valores médios que, junto a seu respectivo desvio padrão, também são apresentados no gráfico³.

A figura acima mostra que a espessura da bicamada também é uma propriedade sensível à concentração de colesterol (Figura 4.9): quanto maior a concentração do estero, maior a espessura da bicamada. Comparando-se à bicamada pura, o aumento é de 13,1% para a bicamada com 20% de colesterol, e de 17,8% para a com 40%.

O aumento na espessura é condizente com uma compactação no plano da bicamada, ou seja, com a redução na área por lipídio observada anteriormente; isto porque a maior coesão implica que os lipídios estão mais próximos, e para que isto possa ocorrer sem impedimentos estéricos, as moléculas destes precisam assumir uma orientação mais próxima à perpendicular ao plano da bicamada – em outras palavras, os lipídios, principalmente as caudas das moléculas de POPC, precisam ordenar-se.

Este é justamente o comportamento observado nos gráficos do parâmetro de ordem dos átomos de carbono das caudas do fosfolipídio. As figuras a seguir mostram que tanto as caudas saturadas (Figura 4.10) quanto as caudas insaturadas (Figura 4.11), ordenam-se na presença do colesterol. Este aumento é proporcional à concentração de moléculas de colesterol e ocorre para todos os átomos das cadeias; a Figura 4.11 evidencia que o ordenamento das caudas insaturadas pronuncia o caráter restritivo da dupla ligação existente entre os átomos 9 e 10 destas cadeias. A título de ilustração, é apresentada a visualização de uma molécula de POPC da bicamada pura (Figura 4.12a) e uma da bicamada contendo 40% de colesterol (Figura 4.12b): o ordenamento é evidente para ambas os tipos de caudas, mas a insaturação é um fator limitante.

³ Para Fiorin e colaboradores (MacDermaid et al., 2015), 3,81 nm para a bicamada POPC pura, 4,16 nm para a contendo 20% de moléculas de colesterol, e 4,52 nm, para 40%.

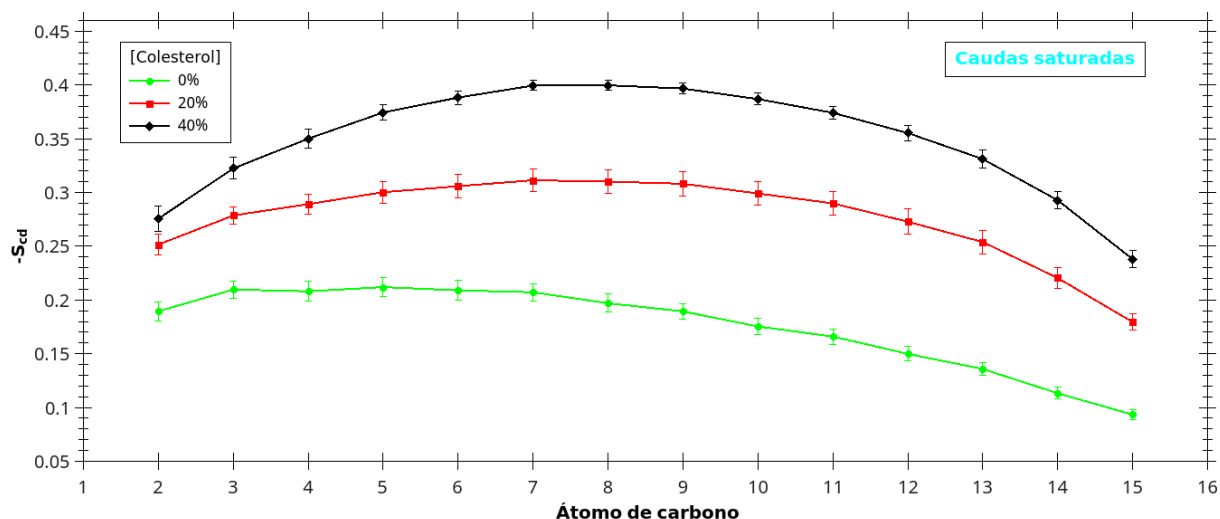


Figura 4.10 – Parâmetro de ordem calculado para os átomos de carbono das caudas saturadas (C_1 ou $sn-1$) das moléculas de POPC. Para o cálculo, o período de 100 ns de análise é segmentado em 10 intervalos iguais e o valor do parâmetro é calculado em cada um; os valores apresentados são médias e as barras verticais indicam o desvio padrão da medida.

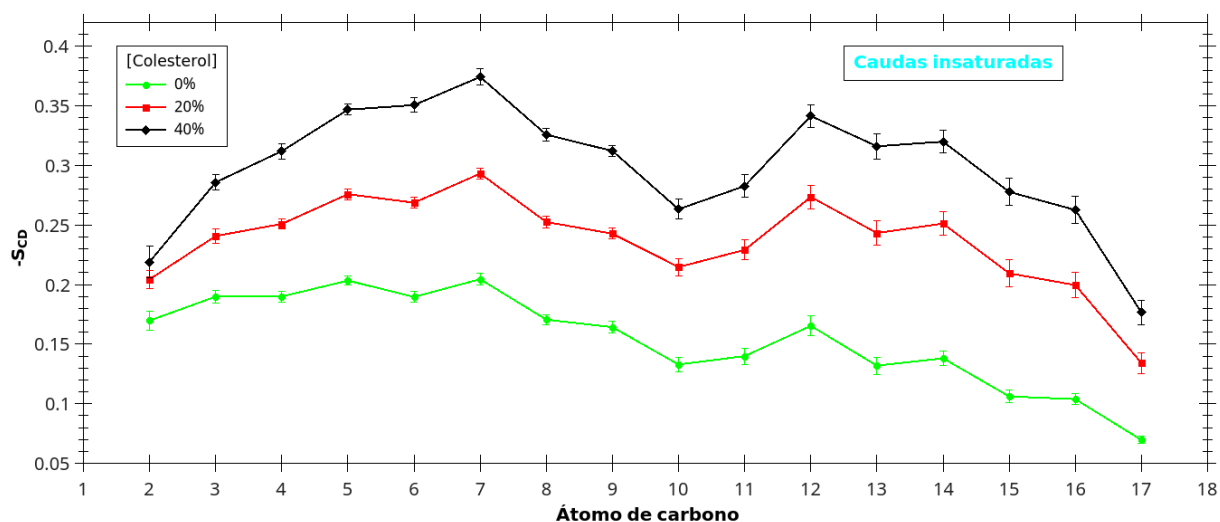


Figura 4.11 – Parâmetro de ordem calculado para as caudas insaturadas (C_2 ou $sn-2$).

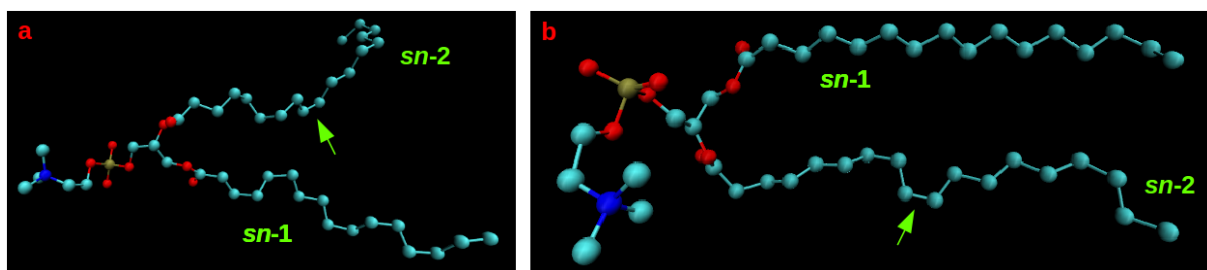


Figura 4.12 – Representação de uma molécula de POPC (a fórmula química foi apresentada na Figura 2.1, pág. 43) extraída da bicamada pura (a) e da bicamada com 40% de colesterol (b). As setas indicam a posição da insaturação.

Observação: as imagens representam uma molécula qualquer das bicamadas em questão, num instante qualquer, e não possuem caráter estatístico.

O aumento da espessura é portanto uma consequência do ordenamento das caudas, que, por sua vez, pode ter origem na compactação dos lipídios no plano da bicamada (plano xy). Mas por que esta ocorre, ou seja, como as moléculas de colesterol agem para compactar a bicamada?

4.3.4 Ação do colesterol sobre as interações energéticas na bicamada

A redução da área por lipídio com o aumento da concentração de colesterol na bicamada ocorre por diversos fatores. O primeiro deles é a redução propriamente da área ocupada pelas moléculas; a molécula de colesterol possui menos átomos e sua estrutura compacta em anéis lhe confere um volume cerca de 30% menor do que o ocupado por uma molécula de POPC⁴ – cálculo realizado com a ferramenta *online 3V Volume Assessor* <<http://3vee.molmovdb.org>> (Voss e Gerstein, 2010) – e consequentemente, aumentando-se a concentração de moléculas de colesterol na bicamada, o volume total ocupado pelos lipídios, cuja quantidade total permanece constante, será menor.

O segundo fator deve-se às modificações nas interações energéticas estabelecidas entre os lipídios na bicamada. As Figuras 4.3 a 4.6 mostraram as interações estabelecidas na bicamada como um todo, e desta com as moléculas de água, mas não revelaram que modificações a presença do colesterol traz. Para isto, é necessário avaliar as interações tratando os lipídios individualmente; as figuras a seguir, todas normalizadas pelo número de pares de interação, possibilitam explorar melhor o assunto⁵.

A Figura 4.13 apresenta indícios de que as interações coulombianas entre moléculas de POPC são favorecidas com a presença do colesterol (isto considerando-se os valores normalizados pela quantidade de pares de interação; a interação total obviamente é reduzida, pois parte das moléculas do fosfolipídio é substituída por colesterol). Pela Figura 4.14, há o indicativo de que as interações do tipo van der Waals entre as moléculas de POPC também

4 Pandit et al. (2007) assinala 26,6% de diferença, também para um modelo estrutural da molécula, enquanto Kučerka et al. (2005) obtém experimentalmente uma diferença de aproximadamente 26,4%.

5 Os valores calculados referem-se à contribuição entálpica na temperatura em que os sistemas foram estudados; a comparação de energias de interação entre sistemas de composição diferente é um procedimento delicado, que exige ressalvas (pelas próprias características dos sistemas, a vizinhança de um lipídio na bicamada pura é diferente da observada na bicamada com 20% colesterol). O cálculo de perfis de energia livre pode ser implementado em simulações por dinâmica molecular, mas requer a utilização de técnicas de elevado esforço computacional (Chipot e Pohorille, 2007), e não é abordado neste trabalho.

são favorecidas, embora por um fator menor: comparando as bicamadas com 0 e 40% colesterol, enquanto a interação coulombiana torna-se mais atrativa em $(-10,18 \pm 0,12)$ kJ/mol, a interação apolar aumenta em $(-0,83 \pm 0,09)$ kJ/mol (ver nota da página anterior). O aumento da concentração de colesterol na bicamada, portanto favorece as interações entre os fosfolipídios, sendo que a modificação aparentemente é mais pronunciada entre seus grupos polares (a cabeça e as carbonilas), do que entre os apolares (as caudas).

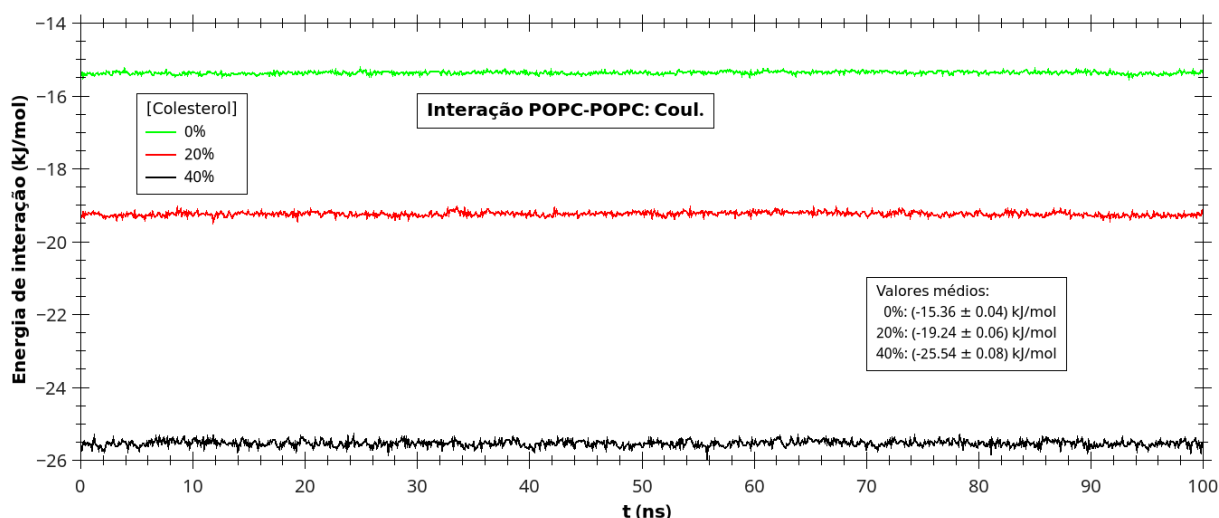


Figura 4.13 – Energia de interação coulombiana entre as moléculas de fosfolipídios, normalizadas pelo número de pares de interação, obtidas para as bicamadas de diferentes concentrações de colesterol. Neste caso, as interações envolvendo moléculas do esterol não estão sendo consideradas.

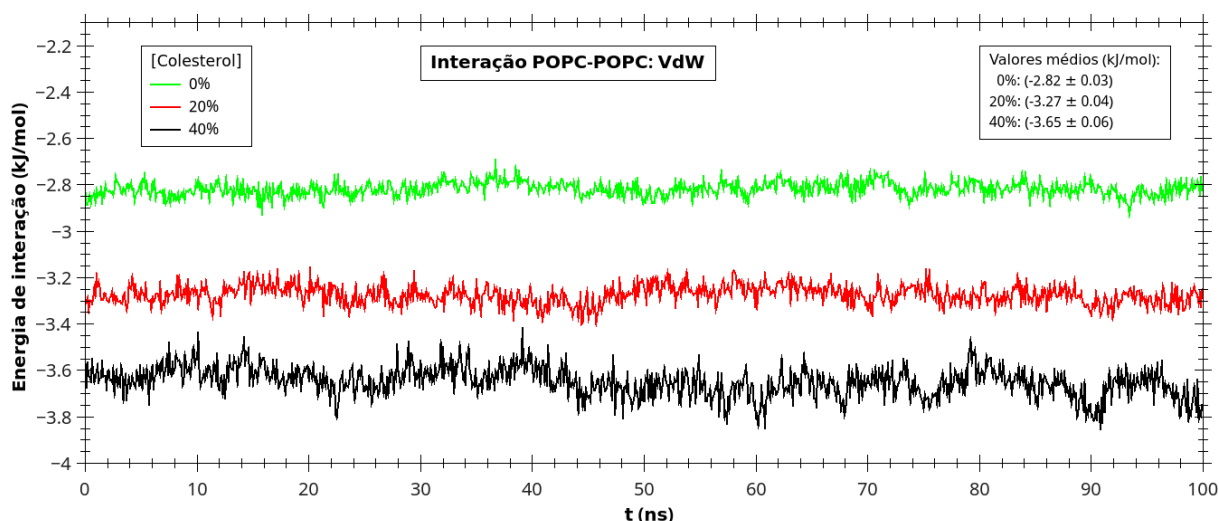


Figura 4.14 – Energia de interação do tipo van der Waals estabelecidas entre pares de moléculas de POPC.

É importante ressaltar que os gráficos desta seção mostram as interações entre os componentes das bicamadas, mas não são considerados como critérios para a avaliação de

estabilidade das estruturas; isto porque um comportamento não estável verificado para determinado par, por exemplo, a interação colesterol-colesterol, pode ser compensando pela variação de outro par, sem que isto implique em instabilidade na energia interna da bicamada ou em sua hidratação (que já foram verificadas nas Figuras 4.3 a 4.6). É por este motivo que os gráficos não trazem a reta média das curvas, embora apresentem o valor médio de cada curva no período considerado com a finalidade de comparar diferentes pares de interações.

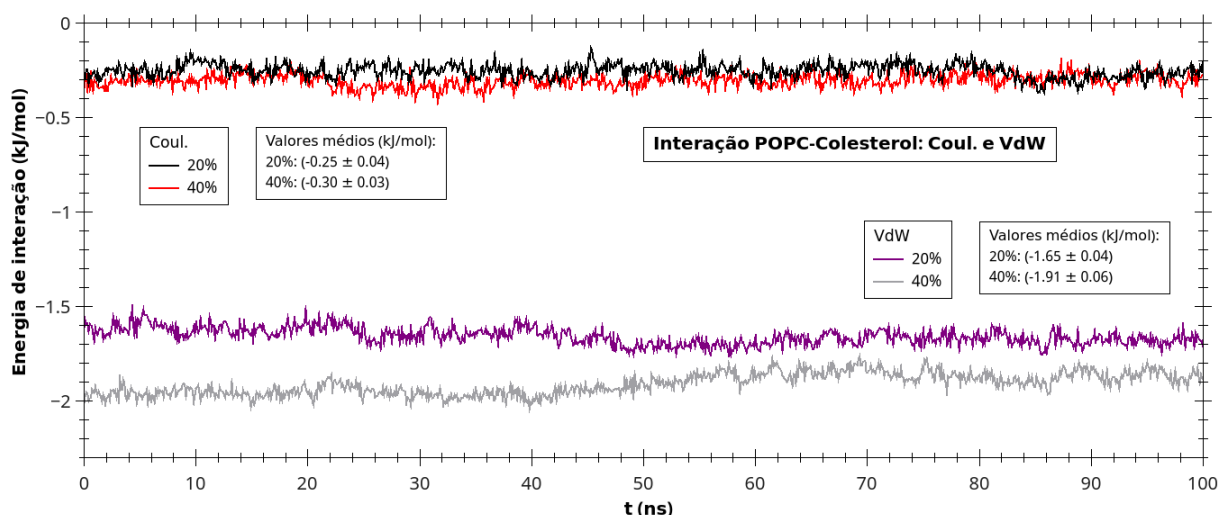


Figura 4.15 – Oscilação das energias de interação (Coulomb e VdW) estabelecidas entre uma molécula de fosfolipídio e uma de colesterol; o aumento da concentração de colesterol favorece as interações do tipo van der Waals, mas as interações coulombianas permanecem estatisticamente constantes. Os valores estão normalizados pelo número de pares de interações.

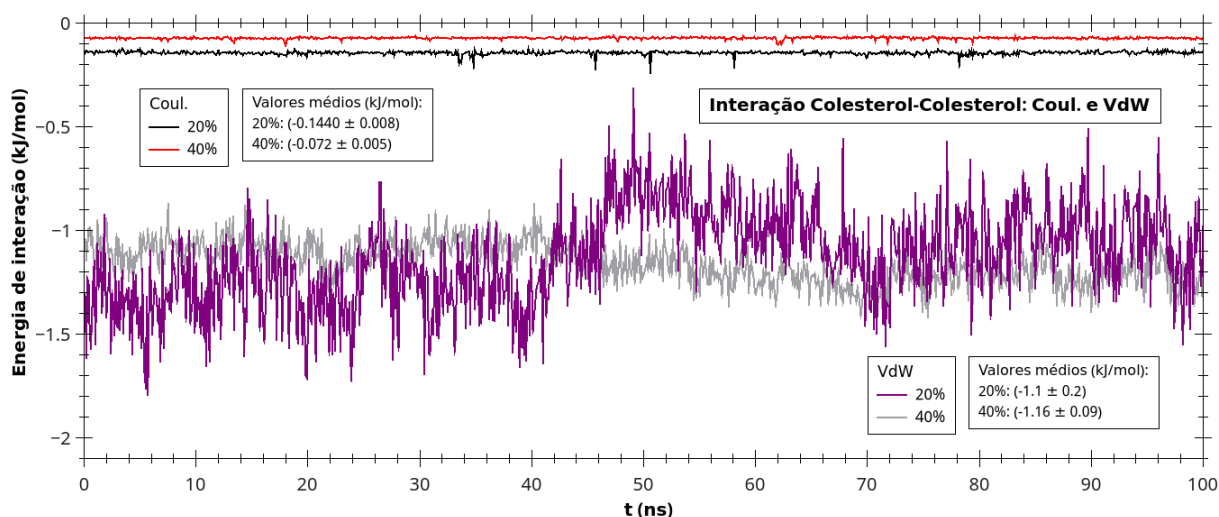


Figura 4.16 – Energias de interação entre duas moléculas de colesterol (VdW e Coulomb), normalizadas pelo número de pares. A interação do tipo Coulomb entre duas moléculas se restringe à interação entre seus grupos OH e por isso apresenta um valor pequeno mas atrativo – valor que é reduzido pela metade com o aumento da concentração de colesterol. Para as interações do tipo van der Waals, estatisticamente não há variação de uma simulação para outra.

O gráfico da energia de interação entre as moléculas de POPC e as de colesterol (Figura 4.15) é indicativo de que a interação apolar (VdW) entre fosfolipídio e esterol também é favorecida com o aumento da concentração de colesterol, $(-0,26 \pm 0,10)$ kJ/mol, na comparação entre as bicamadas de contendo 20 e 40% colesterol (a bicamada pura possui apenas POPC). Já a interação coulombiana permanece estável, com uma variação dentro da barra de erros. No caso da interação entre duas moléculas de colesterol, a Figura 4.16 mostra que, enquanto permanece constante para o termo de van der Waals (considerando-se o valor médio calculado), as interações do tipo Coulomb são desfavorecidas.

A análise do conjunto de gráficos acima revela portanto que o aumento da concentração de colesterol favorece significativamente as interações entre os fosfolipídios da bicamada, com destaque para o aumento na interação coulombiana, e favorece também a interação apolar entre moléculas de fosfolipídio e colesterol – fatores que contribuem para uma maior aproximação dos lipídios e ajudam a explicar a maior coesão das bicamadas na presença de colesterol.

Considerando os valores obtidos para as interações entre duas moléculas de colesterol, e que estas permanecem estatisticamente constantes (VdW) ou são desfavorecidas com o aumento da concentração do esterol, observa-se que na bicamada há uma preferência pela interação POPC-POPC ou POPC-colesterol, em detrimento da interação colesterol-colesterol. O formato compacto da molécula de colesterol, a presença de apenas um grupo polar em sua estrutura, e a decorrente orientação mais enterrada na bicamada, contribuem para que o colesterol seja envolvido pelas caudas das moléculas de fosfolipídio, o que resulta numa menor interação entre duas moléculas de colesterol, quando comparada à interação fosfolipídio-colesterol. Partindo de uma distribuição *clusterizada* de moléculas de colesterol numa bicamada POPC (50% colesterol), Wang e colaboradores (Hong et al., 2014), observaram a difusão do esterol pela estrutura, obtendo em 2 microsegundos uma bicamada com distribuição semelhante à observada no caso em que as moléculas são distribuídas aleatoriamente pela bicamada (como neste trabalho); isto revela que, embora a formação de *clusters* de colesterol possa ser observada, e isto vai depender da concentração do esterol no sistema, a ação da molécula ocorre difundida pela estrutura e não concentrada em determinadas regiões⁶.

⁶ A formação de *lipid rafts* é relacionada à formação de *clusters* de colesterol, estabelecendo microdomínios de propriedades diferentes das do resto da membrana, mas isto normalmente ocorre em associação com outras moléculas, como proteínas e esfingomielina (Berkowitz, 2009).

A íntima associação entre fosfolipídios e colesterol também foi observada em bicamadas de DMPC/colesterol (DMPC possui duas caudas saturadas de 14 carbonos cada – menores do que as do POPC) e DOPC/colesterol (DOPC é semelhante ao POPC, mas suas duas caudas são insaturadas, com 18 carbonos cada) (Róg et al., 2009) e é considerada a principal razão do efeito de condensação da estrutura promovido pelo colesterol.

Tabela 4.1 – Número médio de ligações de hidrogênio e respectivo desvio padrão; os valores estão normalizados pela quantidade de moléculas do lipídio em cada simulação⁷.

[Colesterol]	0%	20%	40%
Lipídio com água (por molécula de lipídio)	6,1 ± 0,1	5,0 ± 0,1	4,2 ± 0,1
Lipídio com lipídio (por molécula de lipídio)	-	0,22 ± 0,02	0,22 ± 0,02
POPC com colesterol (por molécula de POPC)	-	0,27 ± 0,03	0,36 ± 0,04
POPC com colesterol (por molécula de colesterol)	-	1,1 ± 0,1	0,54 ± 0,06
Colesterol com colesterol (por molécula de colesterol)	-	0,000 ± 0,003	0,001 ± 0,005
POPC com água (por molécula de POPC)	6,1 ± 0,1	6,1 ± 0,1	6,4 ± 0,2
Colesterol com água (por molécula de colesterol)	-	0,8 ± 0,1	1,04 ± 0,09

Há ainda um terceiro fator relacionado à ação do colesterol sobre as propriedades de uma membrana, que é o surgimento de um novo tipo de interação entre os componentes das bicamadas: as ligações de hidrogênio. Moléculas de POPC não possuem prótons para doar e consequentemente atuam apenas como aceptores em ligações de hidrogênio (isto também ocorre com DMPC e DOPC, que possuem o mesmo grupo característico na cabeça polar). Assim, na bicamada pura (0% colesterol) não há interações deste tipo entre os lipídios, somente entre lipídios e moléculas de água.

Moléculas de colesterol, por outro lado, apresentam um dipolo permanente em seu grupo hidroxila, o que lhes permite atuar também como doador numa ligação de hidrogênio. Numa mistura de moléculas de POPC e colesterol haverá ligações de hidrogênio estabelecidas

⁷ As ligações de hidrogênio foram analisadas a partir de uma extensão de 10 ns de cada simulação com a trajetória das partículas sendo salva a cada 1 ps, e o critério geométrico utilizado para caracterizar a existência de uma ligação de hidrogênio (H) foi que a distância entre o H doado e seuceptor fosse menor ou igual a 0,35 nm e o ângulo H-doador-aceptor menor ou igual a 30°.

entre as moléculas dos lipídios. A Tabela 4.1 comprova que a adição de moléculas de colesterol propicia a interação entre os lipídios da bicamada através de ligações de hidrogênio; como a interação entre duas moléculas de colesterol é desprezível em todas as simulações, a interação entre os lipídios ocorre pela associação de uma molécula de POPC com uma de colesterol.

Embora a quantidade de ligações entre lipídios seja pequena em ambas as simulações contendo colesterol⁸, este é um novo tipo de interação energética estabelecida entre os componentes da bicamada em decorrência da presença das moléculas de colesterol – estudando sistemas formados por esfingolipídios e colesterol em diversas proporções, inclusive 20 e 40% colesterol, Janežič e colaboradores (Zidar et al., 2009) atribuem um papel de destaque para as ligações de hidrogênio no ordenamento das caudas de tipo de esfingolipídio, que apresenta estrutura similar ao POPC, mas com modificações nas carbonilas que lhes confere maior habilidade em estabelecer ligações de hidrogênio; lá, o número médio de ligações entre esfingolipídio e colesterol, por molécula de colesterol, foi de $(0,49 \pm 0,03)$ para o sistema com 20% colesterol e $(0,39 \pm 0,02)$ para 40%.

Portanto, o menor volume ocupado pelas moléculas de colesterol, em conjunto com o favorecimento das interações entre os fosfolipídios (Coulomb e van der Waals) e também entre fosfolipídios e colesterol (van der Waals), e o estabelecimento de ligações de hidrogênio entre os lipídios da bicamada, são os fatores que promovem uma maior coesão dos componentes das bicamadas, e a consequente redução da área por lipídio com o aumento da concentração de colesterol no sistema.

A Figura 4.8 apresentou os valores calculados para a área por lipídio em cada bicamada; naquele caso, considerando os lipídios indistintamente. Na Tabela 4.2 a seguir são reapresentados tais valores e também a área média por molécula de lipídio, considerando isoladamente as moléculas de POPC e de colesterol⁹; observa-se pela tabela que o efeito de condensação da estrutura promovido pelo colesterol ocorre essencialmente sobre a área ocupada pelas moléculas do fosfolipídio.

⁸ O número médio total de ligações POPC-Colesterol é igual nas simulações com 20 e 40% colesterol – os valores apresentados na tabela estão normalizados; a variação portanto se dá entre a bicamada pura, onde não há interação entre os lipídios via ligação de hidrogênio, e as bicamadas mistas, onde estas ocorrem.

⁹ Cálculo também realizado por diagramas de Voronoi e implementado através do GridMAT-MD.

Tabela 4.2 – Área média ocupada por cada molécula nos planos definidos pela bicamada. Os valores são médias sobre os 100 ns de análise.

[Colesterol]	0%	20%	40%
Área por lipídio (nm ²)	0,662 ± 0,011	0,530 ± 0,008	0,458 ± 0,006
Área por molécula de POPC (nm ²)	0,662 ± 0,011	0,560 ± 0,153	0,486 ± 0,153
Área por molécula de colesterol (nm ²)	-	0,407 ± 0,120	0,413 ± 0,133

Considerando que a área atribuída às moléculas de POPC (A_{POPC}) nas bicamadas mistas é, em ambos os casos, maior do que a área ocupada pelo colesterol ($A_{\text{Col.}}$), pode-se a princípio atribuir a redução da área por lipídio unicamente ao fato das moléculas de colesterol serem menores do que as de POPC (o primeiro fator considerado), e que as modificações energéticas observadas nas bicamadas em função do aumento da concentração de colesterol são um fenômeno de menor relevância; entretanto, a comparação dos valores da tabela anterior revela que, enquanto na bicamada contendo 20% de colesterol, $A_{\text{Col.}}$ é cerca de 27% menor do que A_{POPC} (próximo aos valores discutidos na pág. 75), a razão cai para 15% na bicamada com 40% de esterol – o colesterol de fato condensa a estrutura e este fenômeno está relacionado à compactação da bicamada através do aumento das interações entre os lipídios.

O efeito de redução lateral de uma membrana associado à ação do colesterol traz profundas modificações às características da estrutura; além do ordenamento das caudas dos fosfolipídios, e consequente aumento da espessura da bicamada e redução da área por lipídio, os resultados obtidos indicam que o colesterol modifica as interações estabelecidas entre os lipídios, tanto na região apolar, favorecendo interações do tipo van der Waals, quanto na região polar da bicamada, tornando a interação coulombiana entre os fosfolipídios mais atrativa e promovendo a formação de ligações de hidrogênio entre os lipídios. Estas modificações nas interações energéticas na bicamada resultam no principal efeito modulador atribuído ao colesterol, sua capacidade de alterar fluidez de uma membrana; a trama mais coesa modifica a capacidade dos lipídios se difundirem através da estrutura e também altera a permeabilidade da membrana à outras moléculas, inclusive à água.

4.3.5 Efeitos sobre a hidratação das bicamadas

Os dados da Tabela 4.1 indicam que o número médio de ligações de hidrogênio estabelecidas entre moléculas de lipídio e a água é reduzido com o aumento da concentração de colesterol no sistema. O motivo principal é que uma molécula de POPC pode realizar mais ligações (9) do que uma de colesterol (2), mas o fato de algumas destas possibilidades estarem “ocupadas” por interações entre os lipídios também contribui para esta redução. De qualquer modo, a redução da interação entre lipídios e água decorre da presença do colesterol e é um indicativo de que este último pode ter algum efeito sobre a hidratação da bicamada; este será o foco desta seção.

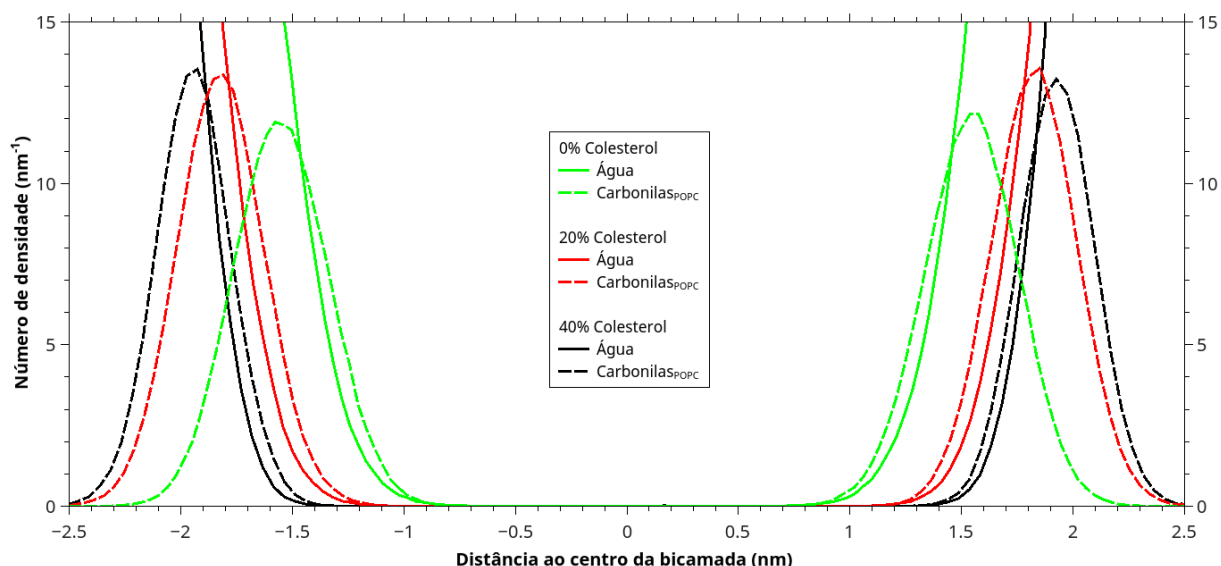


Figura 4.17 – Comparação do perfil de densidade das moléculas de água (linhas sólidas) com os grupos carbonila (linhas pontilhadas) das moléculas de POPC. A distribuição da água é muito ampla e na figura é apresentado um *zoom* na região de interesse.

White colaboradores (Capponi et al., 2016) propõem que o pico da distribuição das carbonilas das moléculas de fosfolipídios podem ser tomados como limítrofe da região que as moléculas de água ocupam na bicamada, ou seja, aproximadamente delimitam a região hidratada da estrutura; a Figura 4.17 mostra que esta consideração é válida para as bicamadas deste estudo. Pela figura, a presença de moléculas de água (linhas pontilhadas) torna-se desprezível numa região muito próxima à da distribuição das carbonilas (linhas sólidas). Assim, os picos da distribuição das carbonilas, que consistem no início das caudas dos

fosfolipídios, são uma boa aproximação para o limite da região hidratada da bicamada, e isto para as três concentrações de colesterol (consideração que será utilizada na próxima seção)¹⁰.

A figura anterior indica que o colesterol de fato afeta a hidratação da bicamada, aumentando seu núcleo hidrofóbico (pela Figura 4.7, também é possível observar tal fenômeno). Os dados da Tabela 4.3 quantificam tal alteração através da distância média entre as carbonilas de uma face e as da outra; de fato, acompanhando o aumento da espessura da bicamada (distância $P_{POPC}-P_{POPC}$, rerepresentada na tabela), o núcleo hidrofóbico também cresce com o aumento da concentração de colesterol no sistema – fato lógico considerando que se as caudas estão mais ordenadas, a região que ocupam será maior. O mesmo padrão é verificado para a distância entre os átomos de nitrogênio do grupo colina dos fosfolipídios (extremo da molécula). O efeito de condensação do colesterol ordena a molécula de POPC como um todo.

Tabela 4.3 – Distâncias médias entre determinados grupos/átomos das moléculas de POPC em cada face.

[Colesterol]	0%	20%	40%
Distância $P_{POPC}-P_{POPC}$ (nm)	$3,88 \pm 0,14$	$4,39 \pm 0,10$	$4,57 \pm 0,14$
Distância Carbonila-Carbonila (nm)	$3,14 \pm 0,10$	$3,67 \pm 0,09$	$3,79 \pm 0,14$
Distância $N_{POPC}-N_{POPC}$ (nm)	$4,09 \pm 0,17$	$4,53 \pm 0,18$	$4,72 \pm 0,18$

O aumento da região apolar da bicamada implica que a fase hidrofóbica do sistema é maior, e o fato de, na presença do esterol, os lipídios interagirem mais fortemente entre si, são indícios de que o colesterol reduz a permeabilidade da estrutura à água (e, consequentemente, à outras moléculas polares), mas não quantificam o fenômeno. A função de distribuição radial de pares, pode fornecer informações sobre a solvatação do sistema; calculada para os átomos de fósforo das moléculas do fosfolipídio e a água (Figura 4.18), comprova que, embora não haja alteração na distância das camadas de solvatação, o número de moléculas de água com que os átomos de fósforo interagem (área sob a curva) é maior na bicamada pura (verde). A diferença entre as bicamadas contendo 20% (vermelho) e 40% (preto) colesterol é mais sutil,

¹⁰ As Figuras 4.7 e 4.17 apresentam unidades diferentes no eixo y; enquanto na primeira o perfil de densidade é função da densidade do grupo de interesse (kg/m^3), aqui, a unidade utilizada é o número de densidade (nm^{-1}) para permitir a comparação com os resultados do capítulo anterior, e deste com os resultados de um trabalho de referência (ver Seção 3.4.5). A comparação das duas figuras em relação aos perfis da água e das carbonilas das moléculas de POPC pode sugerir resultados diferentes; entretanto, deve-se levar em consideração que a Figura 4.17 é uma ampliação de determinada região de gráficos como os da Figura 4.7, o que pode alterar a impressão inicial em relação à posição das curvas. Em segundo lugar, a proposição é que a distribuição das moléculas de água na bicamada aproximadamente acompanha o perfil das carbonilas, ou seja, ambas as curvas (e isto coincide nos dois gráficos) vão a zero em pontos muito próximos.

não sendo possível estabelecer uma relação neste caso (se na bicamada com maior concentração do esterol, a hidratação é menor, por exemplo).

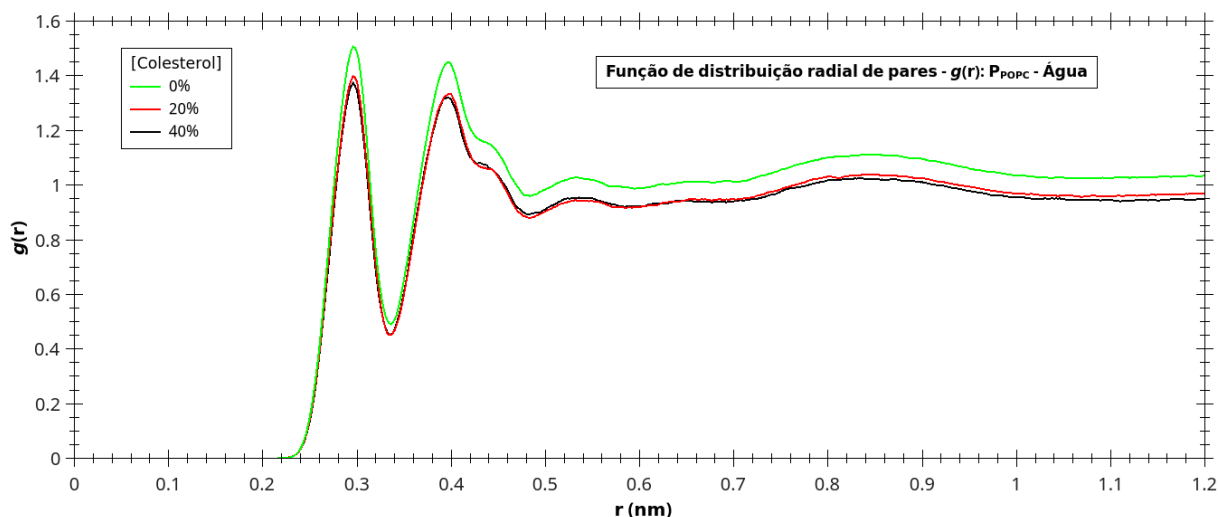


Figura 4.18 – Distribuição radial de pares (suavizada) entre o átomo de fósforo das moléculas de POPC e a água. Nas três bicamadas, a 1ª camada de solvatação é verificada a aproximadamente 0,298 nm, e a 2ª camada a 0,399 nm dos átomos de fósforo.

A ação do colesterol reduz a hidratação da bicamada: mesmo ao se considerar os átomos de fósforo, cujo plano médio é utilizado para a definição da interface entre a bicamada e a fase aquosa, verifica-se que a solvatação é menor nas bicamadas contendo colesterol. Este comportamento repercute na permeabilidade da estrutura; através da contagem dos eventos em que moléculas de água adentram a região hidrofóbica de uma bicamada, Wang e colaboradores (Hong et al., 2014) mostram que a presença de colesterol inibe a observação de moléculas de água na região das caudas. Há de se ressaltar que mesmo numa bicamada pura, a presença de moléculas água no núcleo hidrofóbico é um evento incomum (e não estável), mas se a bicamada contém colesterol, este torna-se ainda mais raro mesmo na escala dos microsegundos! Estudando a solubilidade de compostos em diversas bicamadas contendo um tipo de fosfolípido e colesterol, Hub e colaboradores (Wennberg et al., 2012) verificaram que a ação do colesterol altera o coeficiente de partição das moléculas, reduzindo sua afinidade pela bicamada tanto no caso de moléculas polares (etanol, amônia) quanto apolares (benzeno, propano).

O colesterol portanto pode regular a permeabilidade de uma membrana a outras moléculas através da modificação das propriedades da estrutura. No próximo capítulo, será avaliado o efeito da concentração de colesterol sobre a interação de uma molécula anfipática (curcumina, um flavonoide) com bicamadas puras e contendo colesterol.

4.3.6 Ação sobre o acoplamento entre as faces da bicamada

Uma vez que o colesterol promove a condensação da bicamada e o ordenamento das caudas dos fosfolipídios, pode-se esperar que também induza modificações na região de interação entre as duas faces das bicamadas; os gráficos dos parâmetros de ordem mostraram que a ação do colesterol se aplica a toda cadeia acíclica, mas qual é o efeito sobre a interação estabelecida entre as duas faces (ou monocamadas) da estrutura?

Como tratado no capítulo anterior, uma abordagem possível para se avaliar o acoplamento entre as duas faces de uma bicamada é o estudo dos perfis de densidade dos extremos das caudas dos fosfolipídios – os grupos CH_3 terminais. A primeira avaliação consiste em verificar como se dá a distribuição dos átomos de carbono terminais de uma face em relação aos da outra; o conjunto de gráficos da Figura 4.19 traz os perfis de densidade para os CH_3 terminais da face inferior (lilás) e superior (roxo) e também a soma das duas distribuições (preto). Observa-se que o aumento da concentração de colesterol produz o estreitamento das distribuições, isto é, os grupos CH_3 terminais ocupam uma região mais restrita. Este comportamento deve-se provavelmente ao ordenamento das caudas em razão da presença do colesterol.

A região de interseção das duas curvas coloridas consiste na região de interdigitação das duas monocamadas, ou seja, onde átomos de ambas as faces ocupam uma região comum. A Figura 4.19 sugere uma redução da área de interseção com o aumento da concentração de colesterol na bicamada¹¹; de fato, a integração das curvas mostra que a região de interdigitação corresponde à 28,1% da distribuição total (curva preta) para a bicamada pura. Este valor cai para 17,8%, para a bicamada contendo 20% de colesterol, e chega a 15,4% para a última bicamada. Isto equivale a dizer que, na bicamada pura, aproximadamente 73 dos grupos CH_3 terminais (e consequentemente o extremo da cauda a que estão ligados) invadem a face oposta da bicamada (considerando o centro da bicamada como a divisão exata das faces), mas numa concentração de 40% colesterol a quantidade é reduzida para 24 grupos.

O colesterol portanto promove o desacoplamento das faces da bicamada; o ordenamento das caudas resulta no aumento da espessura, mas a maior coesão dos lipídios na presença do colesterol também tem o efeito de separar as faces da bicamada.

¹¹ As bicamadas deste estudo foram construídas de forma que a quantidade de moléculas de colesterol em cada face fosse a mesma (são bicamadas simétricas); nesta condição, a ação do colesterol é aproximadamente idêntica em cada monocamada, não sendo observada curvatura nas bicamadas em estudo. Esta verificação (não apresentada aqui) garante que informações obtidas dos Gráficos 4.19 a 4.21 são de fato devido à alterações na interação entre as monocamadas e não resultado de encurvamento da estrutura.

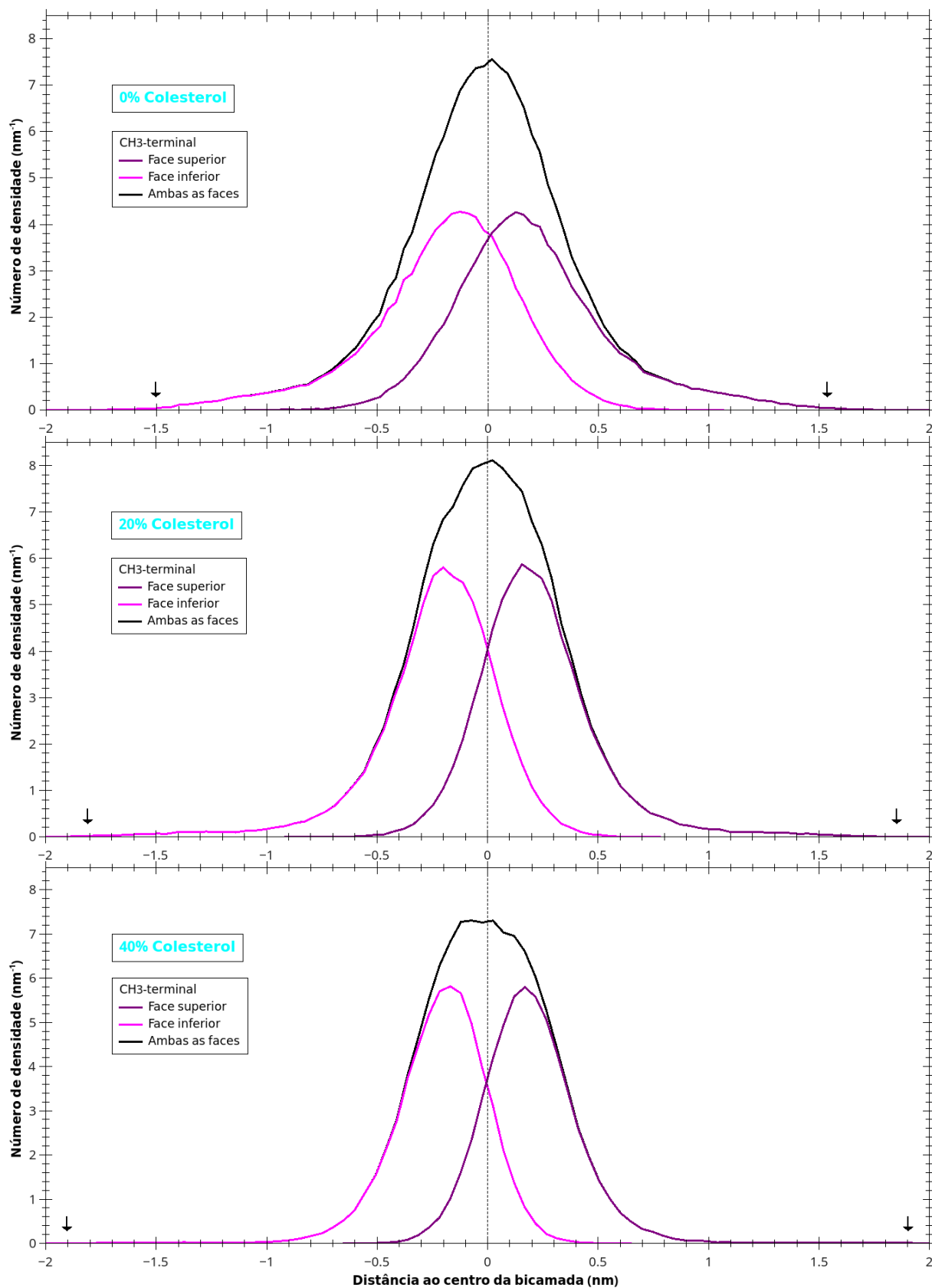


Figura 4.19 – Comparativo do perfil de densidade dos grupos CH₃ terminais das faces inferiores (lilás) e superior (roxo) das bicamadas; a curva em preto indica a soma das distribuições individuais. As setas indicam os picos da distribuição das carbonilas (curvas não apresentadas) em cada simulação.

Na imagem anterior, as setas indicam a posição dos picos das carbonilas (o início das caudas dos fosfolipídios) que, como discutido na seção anterior, aproximadamente correspondem ao limite da região hidratada da bicamada; verifica-se pela Figura 4.19 que a presença do colesterol aumenta o núcleo hidrofóbico da bicamada, afastando as regiões hidratadas do centro da estrutura, e também dos grupos CH_3 terminais. A análise dos gráficos da figura anterior indica também que a presença do colesterol não afeta a simetria das faces da bicamada: as faces, que são simétricas em composição, apresentam uma distribuição muito similar mesmo na região de interação entre as duas monocamadas (os perfis de densidade apresentados na Figura 4.7 já evidenciavam a simetria das faces das bicamadas).

A concentração de colesterol portanto afeta a região de interação entre as monocamadas de uma membrana, mas esta ação ocorre da mesma forma para ambos os tipos de caudas? A Figura 4.20 mostra que não; o efeito é maior sobre as caudas insaturadas.

Na figura abaixo, os grupos CH_3 terminais estão discriminados pelo tipo de cauda a que pertencem, se cauda saturada (laranja) ou insaturada (verde), e não quanto à face; os gráficos mostram também a soma das duas distribuições (preto), que corresponde à mesma soma da imagem anterior (lá, também em preto). Os gráficos do parâmetro de ordem indicaram que o ordenamento das cadeias acíclicas em função da presença das moléculas de colesterol ocorre para todos os átomos de ambas as caudas, mas que seu efeito era menor sobre os átomos das caudas insaturadas (e os CH_3 terminais são justamente os átomos menos ordenados das cadeias). A Figura 4.20 ressalta que já na bicamada pura há uma sutil diferença entre os perfis das caudas saturadas e insaturadas: a distribuição dos CH_3 terminais das caudas com insaturação é mais ampla (por isso seu pico é menor), mesmo na ausência de colesterol. A adição deste intensifica a diferença de comportamento, chegando ao ponto de serem observados dois picos de distribuição na bicamada contendo 40% de colesterol; estes picos evidentemente correspondem às faces superior e inferior da bicamada, ainda que elas não tenham sido discriminadas neste gráfico. Embora a distribuição para as caudas saturadas seja mais concentrada na presença de colesterol (o pico é estreitado), não há alteração no padrão da distribuição e o único pico centralizado no centro da bicamada permanece.

A separação das faces observada anteriormente portanto ocorre predominantemente com as caudas insaturadas: o colesterol induz a coesão dos componentes da bicamada e o consequente ordenamento das caudas com aumento da espessura da membrana; a dupla ligação das caudas insaturadas entretanto impõe uma limitação ao ordenamento destas e o efeito é a redução na interação entre duas faces da bicamada.

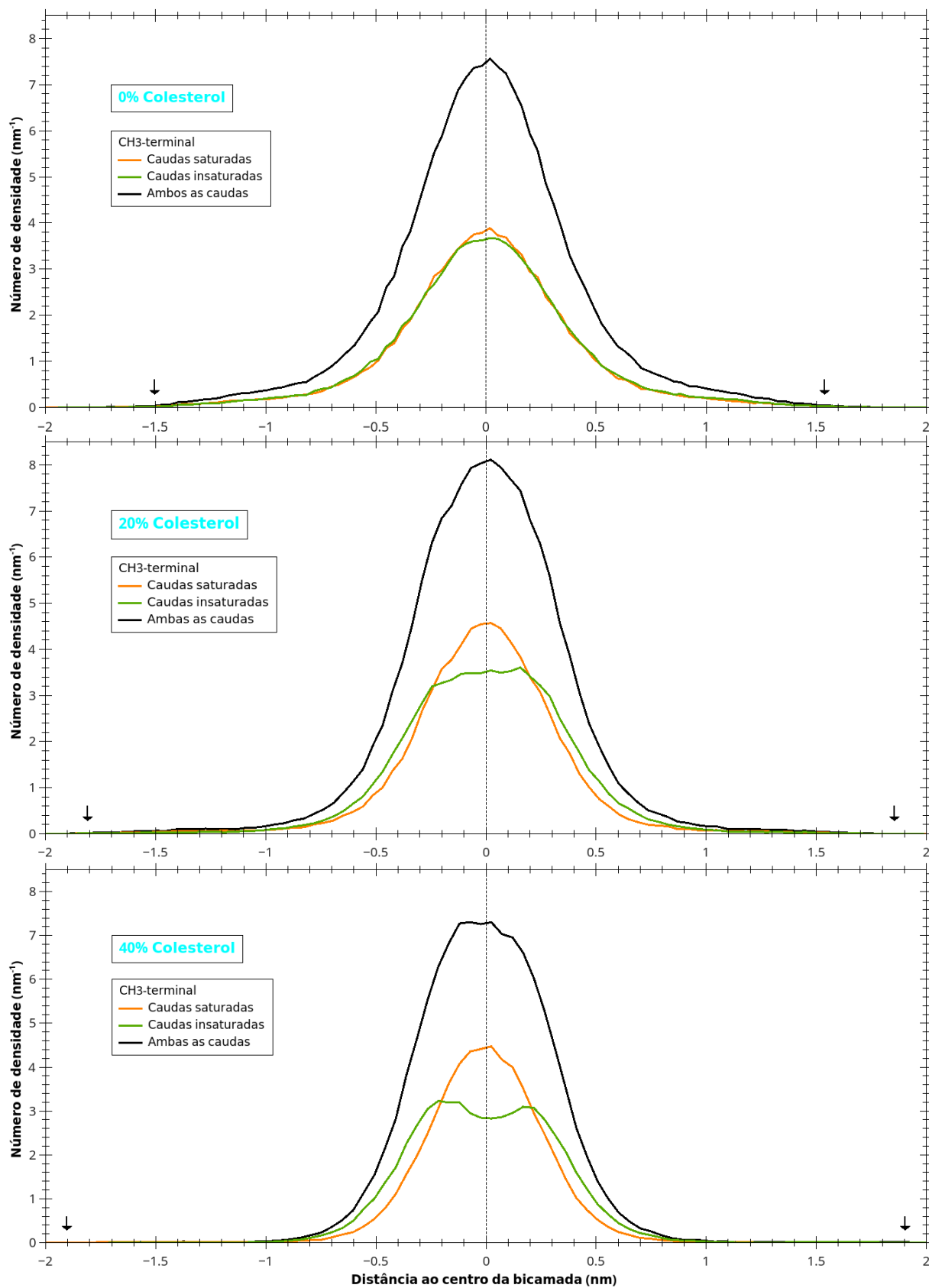


Figura 4.20 – Comparativo do perfil de densidade dos grupos CH_3 terminais segundo o tipo de cauda a que pertencem: caudas saturadas (laranja) ou insaturadas (verde). Os gráficos mostram também a soma destas duas distribuições (preto) e as setas indicam a posição do pico da distribuição das carbonilas das moléculas de POPC.

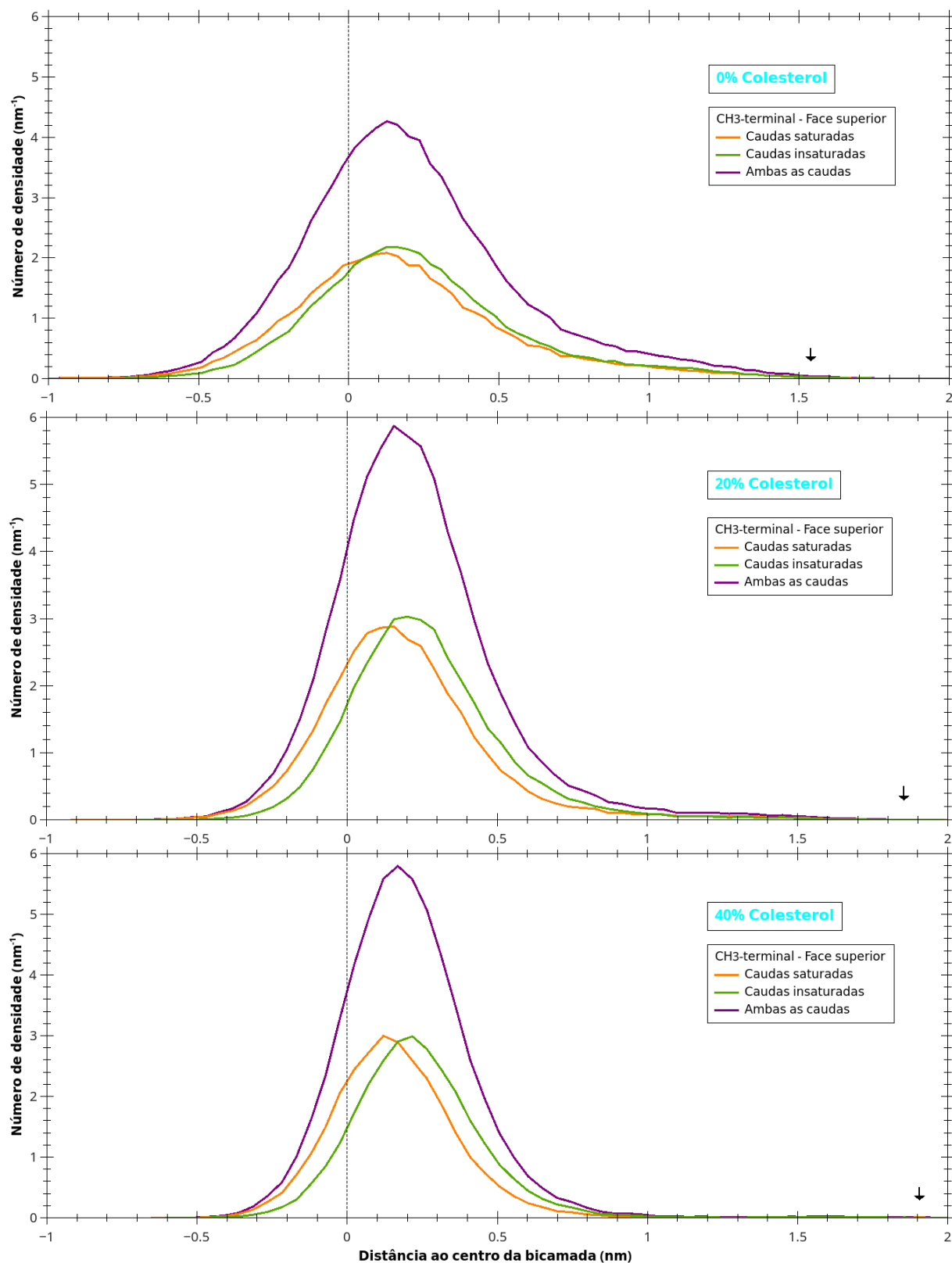


Figura 4.21 – Comparativo do perfil de densidade dos grupos CH_3 terminais segundo o tipo de cauda a que pertencem, em relação à face superior (a outra metade dos grupos, os da face inferior, não é apresentada para permitir uma melhor visualização da ação do colesterol sobre a distribuição das caudas no interior de uma monocamada).

Pela Figura 4.21 é possível visualizar melhor a diferença do efeito do colesterol sobre os dois tipos de caudas. Nela, são apresentados o perfil de densidade dos CH_3 terminais das caudas saturadas (laranja) e insaturadas (verde) de uma face em específico (a superior), além da soma destas duas distribuições (em roxo, já que se trata da curva de mesma cor da Figura 4.20). Os gráficos anteriores indicam que há diferença de distribuição nas posições dependendo do tipo de cauda: os CH_3 terminais das caudas insaturadas apresentam-se deslocados na direção da interface da respectiva monocamada com a água. Tal diferença, que embora sutil, já está presente na bicamada pura, é potencializada com o aumento da concentração de moléculas de colesterol: a distância entre os picos, inicialmente em 0,018 nm, passa a 0,048 nm na bicamada contendo 20% de colesterol e chega a 0,096 nm na de 40%. Isto comprova que o desacoplamento das faces da bicamada se dá principalmente em relação às caudas insaturadas, cuja posição é deslocada no sentido da interface entre lipídios e a água; verificação condizente com o argumento de que a diferença da ação do colesterol em função do tipo de cauda é devido à restrição imposta pela dupla ligação presente nas caudas insaturadas.

À limitação imposta pelas insaturações também pode ser atribuída uma diferença de comportamento estrutural nos fosfolipídios, com a formação de “ganchos” em que o CH_3 terminal das caudas insaturadas fica voltado na direção das cabeças polares da própria face (Capponi et al., 2016); isto pode ser observado na cauda insaturada (*sn*-2) da Figura 4.12a. Uma bicamada é formada por duas faces antiparalelas e portanto é de se esperar que o extremo das caudas de uma monocamada apontem na direção da monocamada oposta, mas a conformação em “gancho” observada para as caudas insaturadas contraria esta suposição. A relevância desta questão reside no fato de que tal conformação possibilita aos CH_3 terminais das caudas insaturadas terem maior acesso à região hidratada da bicamada (Mihailescu et al., 2011; Caponni et al., 2016); na distribuição para a bicamada pura na figura anterior, observa-se que ambas as curvas atingem o limite da região hidratada, representado no gráfico pela seta indicativa da posição do pico da carbonila (para avaliar a relação entre a distribuição das carbonilas dos fosfolipídios e a hidratação da bicamada, ver Figura 4.17)¹². Com a adição de colesterol e o ordenamento das caudas, entretanto, as curvas vão ficando cada vez mais afastadas da região hidratada (isto pode ser observado tanto na Figura 4.20 quanto na 4.21),

12 Em Capponi et al. (2016) é discutido que, para bicamadas puras, a correlação entre os “ganchos” formados nas caudas insaturadas e o acesso à região hidratada é maior para fosfolipídios com insaturação em ambas as caudas (como o DOPC), mas ocorre em menor grau também na bicamada POPC; em acordo com os resultados aqui apresentados.

indicando que o aumento da concentração de colesterol gradativamente limita o acesso dos átomos das caudas à região onde é possível observar a presença de moléculas de água. Porém, como a ação do colesterol é diferente em relação ao tipo de cauda, e a distribuição de posições das cadeias insaturadas é deslocada na direção da interface com a água, é razoável supor que exista uma diferença entre a hidratação das cadeias saturadas e das insaturadas.

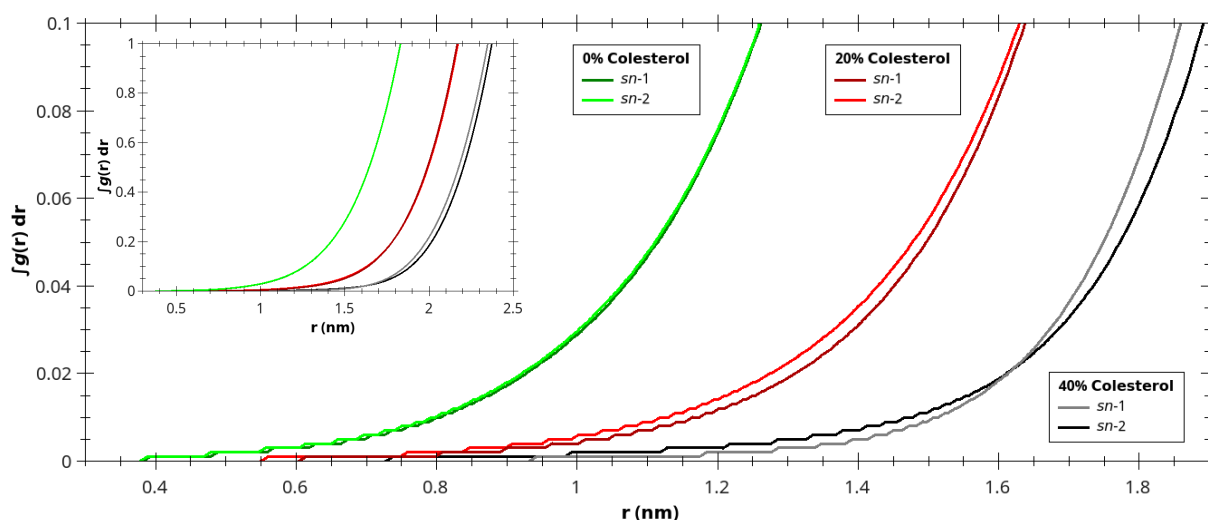


Figura 4.22 – Quantidade de moléculas de água observada a partir dos grupos CH_3 terminais; os resultados são apresentados em função da concentração de colesterol na bicamada e também quanto ao tipo de cauda considerada. No destaque, é apresentado uma ampliação do gráfico para a visualização do comportamento a maiores distâncias dos CH_3 terminais.

A Figura 4.22 apresenta a contagem do número de moléculas de água a partir dos grupos CH_3 terminais das caudas saturadas ou insaturadas; os valores foram calculados a partir da integração da função de distribuição radial de pares entre os grupos CH_3 terminais e as moléculas de água para os 100 ns finais de cada simulação. Uma primeira informação que o gráfico acima revela é que com aumento da concentração de colesterol, a verificação de moléculas de solvente ocorre a distâncias maiores, o que consiste na quantificação do isolamento dos grupos CH_3 terminais em relação à região hidratada da bicamada discutido anteriormente; o gráfico revela também que, enquanto para a bicamada pura não é observada diferença de hidratação em relação ao tipo de cauda (as curvas verdes praticamente coincidem), as modificações promovidas pelo colesterol dão origem a uma diferença de comportamento e as caudas insaturadas ($sn-2$) observam moléculas de água a menores distâncias do que as caudas saturadas ($sn-1$). A ação do colesterol acentua a diferença de comportamento em relação ao tipo de cauda e, como pode ser observado no destaque do gráfico, para a bicamada com maior concentração de colesterol tal diferença permanece

mesmo a distâncias superiores a 2 nm dos grupos CH_3 (mas com a relação entre as caudas invertida a partir de 1,65 nm), enquanto que para a bicamada de 20% colesterol, a diferença entre as caudas já não é mais significativa.

O colesterol portanto reduz o acoplamento entre as faces da bicamada, reduzindo a região de interação entre as monocamadas. Mas a influência do desacoplamento sobre as interações energéticas na bicamada ainda não foi verificada.

A Figura 4.23 apresenta as energias de interação (termos de Coulomb e van der Waals) internas a cada monocamada do sistema contendo 20% colesterol; os valores apresentados referem-se somente às interações estabelecidas entre os lipídios componentes da monocamada superior, ou somente entre os componentes da monocamada inferior. Como a bicamada possui faces simétricas, o gráfico revela que o valor da interação coulombiana total entre os lipídios constituintes da face superior (curva lilás) é equivalente à energia calculada nas interações dos componentes da face inferior (amarelo escuro), com valores médios mutuamente compreendidos nos respectivos desvios padrão. O mesmo ocorre para as interações do tipo van der Waals (curvas laranja e verde escuro), com valores médios das medidas também compreendidas no erro um do outro.

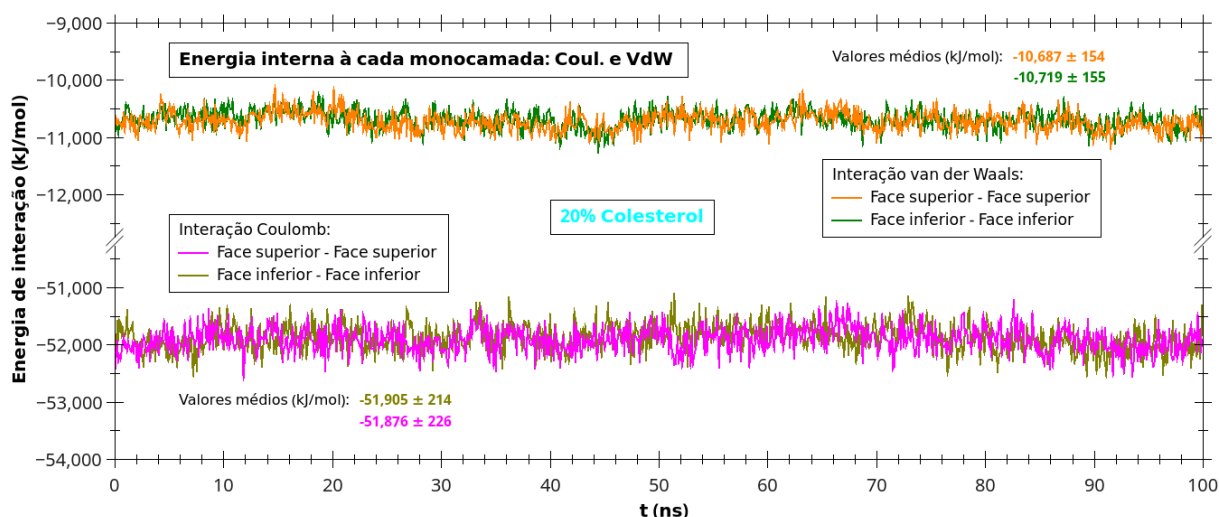


Figura 4.23 – Energia de interação (termos de Coulomb e van der Waals) estabelecidas somente entre os lipídios constituintes da monocamada superior, ou somente entre os que compõem a monocamada inferior. Os valores médios, e respectivo desvio padrão, também são apresentados no gráfico. Os dados apresentados referem-se à bicamada contendo 20% de colesterol.

A figura anterior ilustra o comportamento observado para a bicamada contendo 20% de moléculas de colesterol, mas o padrão é o mesmo na bicamada pura e na de 40% colesterol

(resultados não apresentados aqui). Portanto, a simetria das bicamadas é energética além de estrutural (como observado na Figura 4.19) e a ação do colesterol, em igual concentração em cada face, ocorre de forma equivalente nas duas monocamadas, não alterando o padrão de interação entre os componentes de cada face.

Calculado-se, entretanto, a energia de interação estabelecida entre os lipídios componentes de uma monocamada e os constituintes da monocamada oposta (Figura 4.24), é possível observar o efeito resultante do desacoplamento promovido pela ação do colesterol; a interação entre as duas monocamadas ocorre somente por interações apolares (os grupos polares de cada face estão muito distantes para que seja observada qualquer interação coulombiana; além disso, há o meio apolar existente entre eles), por isso a interação entre as monocamadas ocorre apenas por interações do tipo van der Waals. Pelo gráfico, observa-se que a energia de interação entre as duas monocamadas, inicialmente em (-1615 ± 132) kJ/mol para a bicamada pura, é reduzida em aproximadamente 39% na bicamada contendo 20% de moléculas de colesterol, e em cerca de 51% na contendo 40% colesterol.

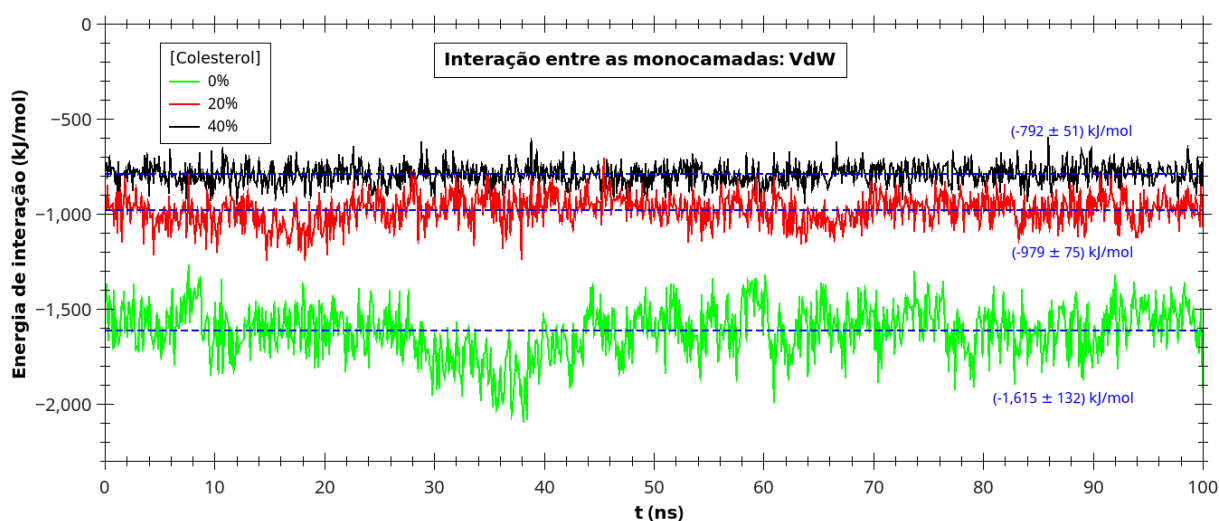


Figura 4.24 – Energia de interação (termos de Coulomb e van der Waals) estabelecidas entre os lipídios constituintes da monocamada superior com os da monocamada inferior. Os valores médios, e respectivo desvio padrão, também são apresentados no gráfico.

O colesterol portanto reduz a interação entre as duas faces da bicamada o que, aliado à redução da interdigitação, a região de interação entre as monocamadas, pode potencializar o caráter de ação independente das faces; partindo da bicamada pura, uma estrutura pouco ordenada na fase líquido-cristalina (l_d), a condensação promovida pelo colesterol e o consequente ordenamento das caudas dos fosfolipídios gradativamente resulta no desacoplamento das monocamadas – de seu contato e interação. Numa concentração maior, a

ação do colesterol produz um comportamento mais ordenado na bicamada, que passa a exibir propriedades de estruturas na fase gel (l_o), e uma das consequências é a redução da interação entre as monocamadas que adquirem maior liberdade para agir independentemente uma da outra. Estudos experimentais indicam que o processo de sinalização através de uma membrana está associado ao contato entre as duas monocamadas (Schmidt et al., 1978; Düzgünes et al., 1988) e a ação do colesterol sobre tal região, reduzindo inclusive a interação energética entre as faces da membrana, pode consistir num dos mecanismos que o esterol emprega para modular a transmissão de informação através da estrutura.

4.4 Conclusão

O estudo do efeito da concentração de moléculas de colesterol sobre uma bicamada possibilitou a verificação de que o colesterol promove a redução lateral (condensação) da estrutura, alterando as propriedades desta. Foram avaliados elementos que indicam que a ação do colesterol se dá:

- a) pela redução do volume ocupado pelos lipídios em função do aumento da concentração de colesterol, pois sua molécula ocupa um volume menor do que a de um fosfolipídio;
- b) o favorecimento das interações energéticas entre os lipídios, intensificando principalmente as interações (Coulomb e VdW) estabelecidas entre os fosfolipídios;
- c) a promoção de ligações de hidrogênio entre os lipídios.

Como consequência da maior coesão dos lipídios, documentou-se a redução da área por lipídio e o ordenamento das caudas dos fosfolipídios; o ordenamento, por sua vez, induz o aumento da espessura da bicamada e de seu núcleo hidrofóbico. As modificações na bicamada promovidas pelo colesterol reduzem a permeabilidade da estrutura à água (um solvente polar). A trama de interações estabelecida entre os lipídios em presença do colesterol também está relacionada à redução da mobilidade dos lipídios – sua difusão através da estrutura – e também de outras moléculas, e a consequente redução da fluidez da membrana.

Quanto à ação sobre a região onde ocorre a interdigitação das caudas de ambas as monocamadas, este estudo mostra que o colesterol gradualmente promove o desacoplamento

das faces da bicamada, com a consequente redução da região de interação entre as duas faces; observa-se também a redução da interação energética (VdW) estabelecidas entre os lipídios de uma monocamada com o da monocamada oposta. A comparação dos resultados obtidos para a bicamada pura e da contendo 40% colesterol, indica que o colesterol induz a transição de fase l_d - l_o , e que o grande ordenamento característico da fase gel implica numa menor interação entre as duas monocamadas da estrutura; como as duas monocamadas interagem menos em contato e energia, elas podem assumir um comportamento mais independente uma da outra. Este pode consistir num dos mecanismos pelos quais o colesterol regula as propriedades de uma membrana, com implicações sobre o processo de sinalização através da estrutura.

Também foi verificado que o colesterol restringe o acesso dos extremos das caudas dos fosfolipídios à região hidratada da bicamada e este efeito é maior sobre as caudas insaturadas (que devido à restrição imposta pela dupla ligação, têm sua distribuição na bicamada mais afetada). Este isolamento dos grupos CH_3 terminais e a perda de seu contato com a região hidratada da membrana também pode ter relação com a ação biológica de transmissão de informação através da estrutura.

Um passo adicional na caracterização da ação do colesterol sobre a interação entre as faces de uma membrana é o estudo de bicamadas assimétricas em proporção de colesterol. Membranas biológicas são assimétricas e as implicações da diferença de composição entre as faces através de simulações computacionais desperta grande interesse (Yesylevskyy e Demchenko, 2015; Lin e London, 2015). A comparação do acoplamento estabelecido em sistemas de mesma quantidade de lipídios, mas dispostos em estruturas simétricas ou assimétricas pode trazer novas informações sobre a ação do colesterol na bicamada e que implicações há sobre as funções biológicas que ele desempenha.

5. Curcumina

5.1 Introdução

Compostos que apresentam propriedades antioxidantes são importantes para a preservação das propriedades de membranas biológicas, pois retardam a ação de radicais livres sobre as insaturações das caudas dos fosfolipídios. A ligação de uma molécula à cauda insaturada é chamada de peroxidação e modifica a estrutura química do lipídio e, consequentemente, também altera as propriedades da membrana podendo levar à degradação desta. Este fenômeno é associado a diversas doenças e ao processo de envelhecimento (Ingolfsson et al., 2007; Košinová et al., 2011). Os flavonoides são polifenóis com grande capacidade antioxidativa.

A compreensão da ação de moléculas sobre uma membrana requer o conhecimento de como estas interagem com a membrana; polifenóis são moléculas anfipáticas (mas não são lipídios) e possivelmente participam da composição de uma membrana. Um passo importante portanto é caracterizar a localização e estabilização destas moléculas em relação à estrutura lipídica, abordagem acessível através de simulações por dinâmica molecular de bicamadas que mimetizem a membrana de interesse.

Esforços têm sido feitos a fim de entender os efeitos terapêuticos de moléculas com ação antioxidante, mas poucos focam na interação destas moléculas com as membranas biológicas e quais alterações elas promovem nas propriedades dinâmicas da estrutura lipídica (Košinová et al., 2011).

Estudos experimentais indicam que a curcumina, um flavonoide com propriedades antioxidantes, pode modular propriedades dinâmicas de bicamadas fosfolipídicas (como espessura, área por lipídio, e fluidez da membrana, por exemplo) (Ingolfsson et al., 2007; Hung et al., 2008), possuindo ação semelhante à observada em alguns peptídeos antimicrobianos. A literatura referente à interação de bicamadas e flavonoides entretanto é muito mais restrita, se comparada à sobre peptídeos antimicrobianos.

Andersen e colaboradores (Ingolfsson et al., 2007, 2014) relataram que em baixas concentrações a curcumina reduz a elasticidade de bicamadas, tornando-as mais rígidas e

modulando a ação de proteínas; como nenhum sítio ativo foi caracterizado, sua ação é atribuída a possíveis alterações que promove na estrutura lipídica.

Huang e colaboradores (Hung et al., 2008) observaram que a curcumina promove pequenas reduções na espessura de bicamadas DOPC – um afinamento da ordem de 1 Å, sendo a espessura da bicamada pura de aproximadamente 26,8 Å – e propõem que sua interação com a bicamada pode ocorrer em dois estados: na região da interface entre os fosfolipídios e a água, e em regiões mais internas à membrana (e consequentemente de característica mais apolar). Outros estudos, entretanto, indicam que a ação de vários fitoquímicos que alteram propriedades de bicamadas se dá essencialmente na região de interface entre as cabeças dos fosfolipídios e a água (Košinová et al., 2011; Kopeć et al., 2013; Ingolfsson et al., 2014).

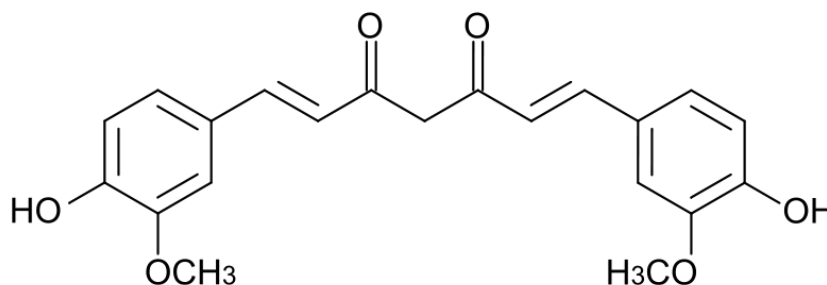


Figura 5.1 – Estrutura da molécula de curcumina. A molécula é anfipática, mas apresenta grupos polares em ambos os anéis, que constituem os extremos da estrutura, e também em sua região acíclica central.

A curcumina é um flavonoide constituído de dois anéis aromáticos, com uma hidroxila associada a cada um (ver Figura 5.1); a ligação entre os dois anéis se dá através de uma cadeia acíclica onde também estão presentes dois grupos carbonila. A molécula de curcumina é simétrica em relação ao grupo (na representação de átomos unidos é um pseudo-átomo) CH₂ que associa as duas carbonilas – o grupo/átomo CH₂ é o eixo de simetria da molécula. A curcumina portanto é um polifenol de duas hidroxilas e fórmula C₂₁H₂₀O₆; é formada por 47 átomos, que na representação de átomos unidos são reduzidos à 39, e, apesar de ser anfipática, apresenta grupos polares tanto nos extremos quanto na região central da molécula – sua estabilização num ambiente de membrana deve ser um processo complexo.

A forma apresentada acima para a molécula de curcumina é chamada ceto-ceto; a molécula possui uma variante tautomérica, a ceto-enol, em que o par de elétrons da dupla ligação de uma das carbonilas é deslocado para o átomo de oxigênio, que adquire carga negativa. Para compensar a carga, ele retira um dos prótons do grupo CH₂ central, estabelecendo um novo grupo hidroxila; o grupo central passa a ser um CH com uma dupla

ligação com a nova hidroxila. A forma ceto-enol não é simétrica, pois na região central, enquanto de um lado há uma carbonila, do outro há uma hidroxila, e é mais rígida devido a dupla ligação adicional.

Atualmente, há poucos trabalhos que abordam a interação e estabilização da curcumina em estruturas lipídicas através do enfoque computacional. Já foram realizados estudos sobre a complexação da curcumina com DNA (neste caso, o interesse é a atividade antimutagênica atribuída à molécula) (Koonammackal et al., 2011); de docking com a proteína MD-2 (relacionada à sinalização por lipopolissacarídeos; neste, com enfoque em sua atividade anti-inflamatória) (Wang et al., 2015).

Bagchi e colaboradores (Hazra et al., 2012) avaliaram a complexação de moléculas de curcumina em água através de dinâmica molecular; partindo de uma distribuição aleatória de moléculas de água e curcumina, observaram a agregação das moléculas (automontagem) numa estrutura com núcleo hidrofóbico onde ocorre a relativa exclusão das moléculas de água, pois as moléculas de curcumina assumem conformações de forma a reduzir o contato da região apolar dos anéis com a água – fenômeno que é mais intenso com o aumento da concentração do flavonoide.

Samanta e Roccatano (2013) estudaram a interação da curcumina com polímeros POE-PPO-POE (óxidos de polietileno e polipropileno) – que em solução aquosa agrupam-se em estruturas semelhantes a micelas – com foco no encapsulamento do flavonoide para uso em fármacos; observaram que as variantes mais hidrofóbicas dos polímeros envolvem os grupos apolares da molécula de curcumina, auxiliando na solvatação e estabilidade da molécula em meio aquoso.

O foco deste trabalho será a interação entre uma molécula de curcumina e bicamadas fosfolipídicas POPC puras ou contendo 20 ou 40% de colesterol – todas simétricas em relação à composição das duas faces. Serão avaliadas a localização e a conformação predominantes para a molécula em cada bicamada, bem como possíveis alterações nas propriedades de tais membranas (em comparação com os valores obtidos no Capítulo 4). Por apresentar uma maior liberdade conformacional e uma região central menos polar (o que possivelmente implica em maior afinidade pela bicamada), a forma ceto-ceto foi a empregada neste estudo – a mostrada na figura anterior.

5.2 Interação da Curcumina com Bicamadas de Diferentes Concentrações de Colesterol

Avaliar a interação entre uma molécula anfipática (outros lipídios, peptídeos, proteínas de membrana, flavonoides, etc.) é, em princípio, um processo simples: basta colocar a molécula de interesse na caixa de simulação junto com a bicamada e avaliar sua interação. Mas esta simplicidade é apenas aparente; numa simulação convencional, não há como garantir que a molécula irá de fato interagir e penetrar a bicamada, ou em quanto tempo de simulação isto virá a acontecer. A verificação empírica de que o fenômeno ocorre e uma adequada parametrização da molécula constituem fortes indícios, mas, mesmo assim, o tempo de simulação pode ser inviável para que este possa ser observado.

Considerando apenas os casos em que de fato a interação ocorre, e numa escala de tempo razoável (dezenas de nanosegundos, por exemplo), ainda sim a caracterização do fenômeno pode não ser satisfatoriamente estabelecida devido a um detalhe incômodo: a interação observada pode ter sido fruto das condições iniciais impostas ao sistema. A posição inicial relativa entre as moléculas pode vir a favorecer a interação entre a bicamada e o alvo e garantir que esta também ocorre sob outras condições iniciais pode requerer a simulação do mesmo sistema partindo de uma distribuição inicial de posições diferente— uma réplica do sistema.

Simular o sistema em diversas condições iniciais possibilita a caracterização da interação entre a molécula de interesse e a bicamada, provendo até dados estatísticos sobre o fenômeno. Entretanto, a simulação de cada réplica pode implicar no mesmo tempo de processamento que a simulação inicial, ou seja, cada condição inicial diferente resulta numa nova simulação e o tempo de processamento será proporcional à quantidade de réplicas – novamente a barreira computacional se faz presente.

Se a caracterização de um fenômeno exige que o sistema seja simulado sob diversas condições iniciais, é conveniente então reduzir o conjunto de réplicas ao estritamente necessário. Trouillas e colaboradores (Košinová et al., 2011) estudaram a estabilização da quercetina (um flavonoide com propriedades antioxidantes) e alguns de seus metabólitos em relação à bicamadas DOPC puras. A alternativa proposta pelos autores para o estudo do sistema sob diferentes situações foi partir de duas condições: (a) adicionar a molécula de interesse na fase aquosa do sistema, distante da bicamada já formada, e (b) inserir o alvo na fase lipídica do sistema, ou seja, partir com a molécula dentro da bicamada.

Estas duas situações iniciais, apesar de apenas duas, varrem um grande conjunto de configurações, pois representam situações muito distintas do sistema: partindo da fase aquosa (a), a molécula anfipática sofrerá mudanças em sua conformação de forma a minimizar a interação dos grupos apolares com a água; este processo pode, ou não, resultar na aproximação e inserção da molécula na bicamada. Em (b), a molécula já está em um ambiente apolar (a região das caudas da bicamada) e pode vir a se estabilizar ou seus grupos polares, buscando contato com a água, podem fazer com ela migre para a região de interface da bicamada com a água, ou até mesmo seja expulsa para a fase aquosa do sistema. Comparando os resultados das duas situações, é possível estabelecer a região e conformação em que a molécula se estabiliza no sistema lipídico.

Neste trabalho, a interação da molécula de curcumina com bicamadas POPC puras ou contendo colesterol será avaliada sob estas duas situações e também partindo-se da automontagem do sistema – condição que favorece a interação entre moléculas anfipáticas e bicamadas pois o sistema parte de uma mistura aleatória e a estabilização da molécula ocorre junto com a formação da bicamada. A seguir, faz-se uma discussão mais detalhada das três condições iniciais avaliadas.

5.2.1 Método A: inserção da curcumina na fase aquosa

A primeira abordagem consiste em colocar a molécula na fase aquosa de uma caixa de simulação contendo uma bicamada já formada e estável. Entrando em detalhes mais técnicos, utilizou-se a configuração final das bicamadas estudadas no Capítulo 4; as moléculas de água da caixa de simulação foram removidas e a molécula de curcumina inserida a no mínimo 2 nm de distância do plano da bicamada; o sistema foi então reidratado¹ e a simulação desenvolvida sob os parâmetros descritos na Seção 2.3. Na reidratação do sistema garantiu-se que as moléculas de água não fossem inseridas na região das caudas dos fosfolipídios, o que poderia desestabilizar a bicamada e comprometer o estudo da interação com o flavonoide. Para garantir uma reidratação suave das cabeças dos fosfolipídios, uma opção é recorrer a uma dinâmica de restrição curta, onde é imposta uma penalidade energética ao movimento

¹ A quantidade de moléculas de água inseridas é a mesma que havia anteriormente na caixa de simulação, de forma a manter a proporção de 35 moléculas de água por lipídio. Para detalhes sobre a composição de cada caixa de simulação, ver Apêndice.

dos lipídios (esta também pode ser imposta à molécula do flavonoide), de forma a garantir que no início da dinâmica propriamente dita a bicamada já esteja adequadamente hidratada.

A Figura 5.2 ilustra o método apresentando, para a bicamada contendo 20% colesterol, um instante próximo ao início da simulação, com a molécula de curcumina (em preto) na fase aquosa do sistema, e final, com o flavonoide ocupando a região hidratada da bicamada.

Uma bicamada é constituída por uma região hidrofóbica central e pela dupla região das cabeças polares, que é hidratada. A imagem mostra, e isto será quantificado mais adiante, que a molécula de curcumina se estabiliza numa região interna à bicamada, ou seja, no interior da região delimitada pelos átomos de fósforo das moléculas de POPC (esferas em laranja).

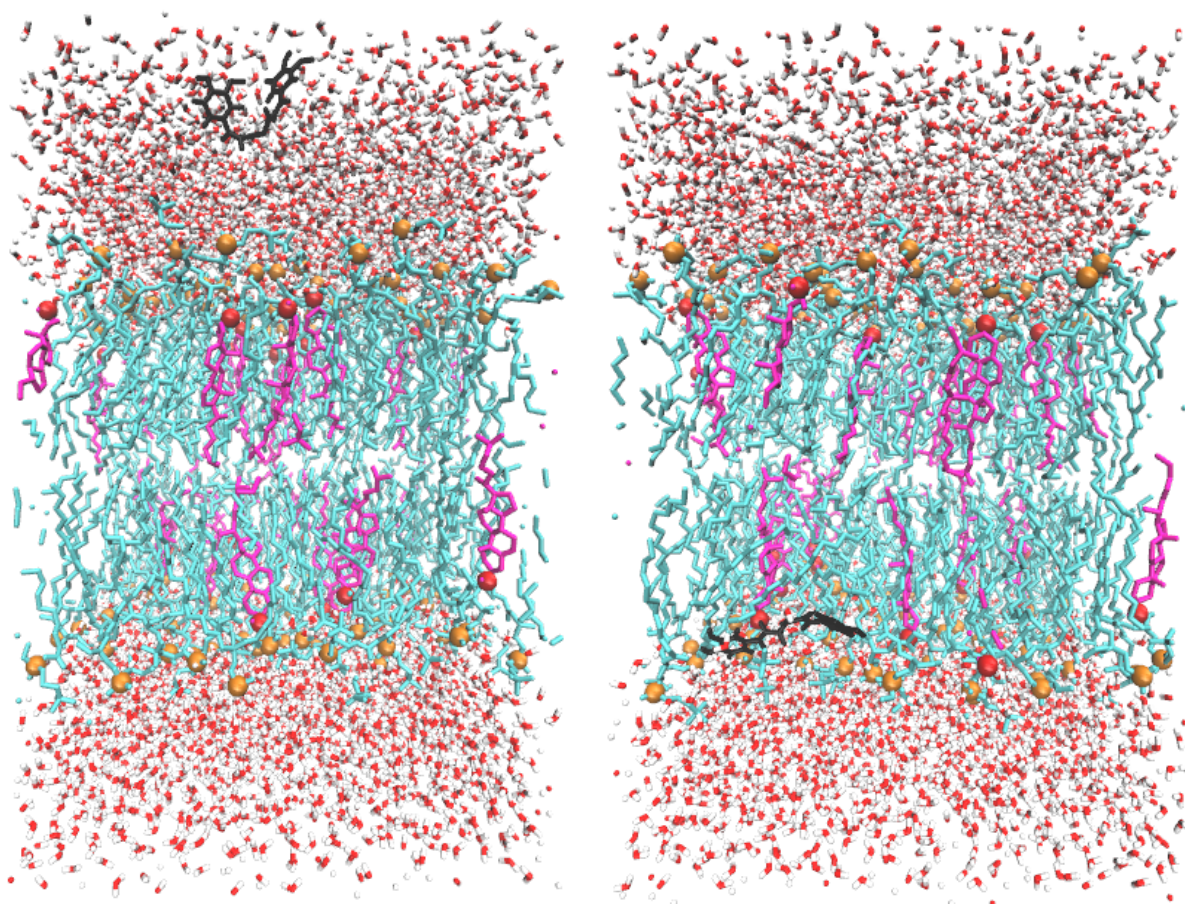


Figura 5.2 – Configuração inicial (esq.) do sistema contendo uma bicamada POPC com 20% de colesterol (POPC em azul, colesterol em rosa e curcumina em preto) e a molécula de curcumina na fase aquosa. À direita, é apresentado o instante final da simulação, mostrando a molécula do flavonoide ocupando a região hidratada da bicamada. Na imagem, estão destacados o átomo de fósforo dos fosfolipídios (esferas em laranja) e o átomo de oxigênio das moléculas de colesterol (esferas em vermelho).

5.2.2 Método B: inserção da curcumina na fase lipídica

Neste segundo caso, a molécula de curcumina é inserida na região das caudas dos fosfolípido, ou seja, dentro da região apolar da bicamada. Isto pode ser feito utilizando-se o programa InflateGRO (Kandt et al., 2007) para expandir a bicamada no plano *xy* (as moléculas de água são removidas e as coordenadas de cada átomo de lipídio são multiplicadas por um fator maior do que 1) e inserir a molécula do flavonoide²; a bicamada é então restituída através de contrações pequenas e sucessivas em suas coordenadas, acompanhadas a cada etapa pela minimização da energia do sistema, até que a bicamada atinja um valor de área por lipídio próximo do verificado antes da inserção da molécula. O sistema é então reidratado seguindo-se as mesmas orientações da seção anterior.

Outra opção é construir a bicamada com a molécula de curcumina em seu interior utilizando a ferramenta *online* MemGen (Knight e Hub, 2015), ajustar as proporções de moléculas (removendo moléculas, se necessário) e ir controlando a evolução inicial do sistema através de dinâmicas de restrição.

A Figura 5.3 mostra o instante inicial (esq.) da simulação em que a molécula de curcumina (em preto) foi inserida no interior de uma bicamada POPC (azul) com 20% colesterol (rosa). Após 200 ns de simulação (dir.), o flavonoide permanece no interior da bicamada, mas migrou para a região de interface da bicamada com a água.

² Expandir a bicamada antes de inserir a molécula garante que a quantidade e proporção de lipídios em cada face seja preservada. Se a inserção for feita primeiro (concatenando as posições da bicamada e da molécula), como comumente ocorre em estudos com proteínas de membrana (que normalmente são muito maiores do que flavonoides), o programa poderá ter que remover lipídios onde houver sobreposição.

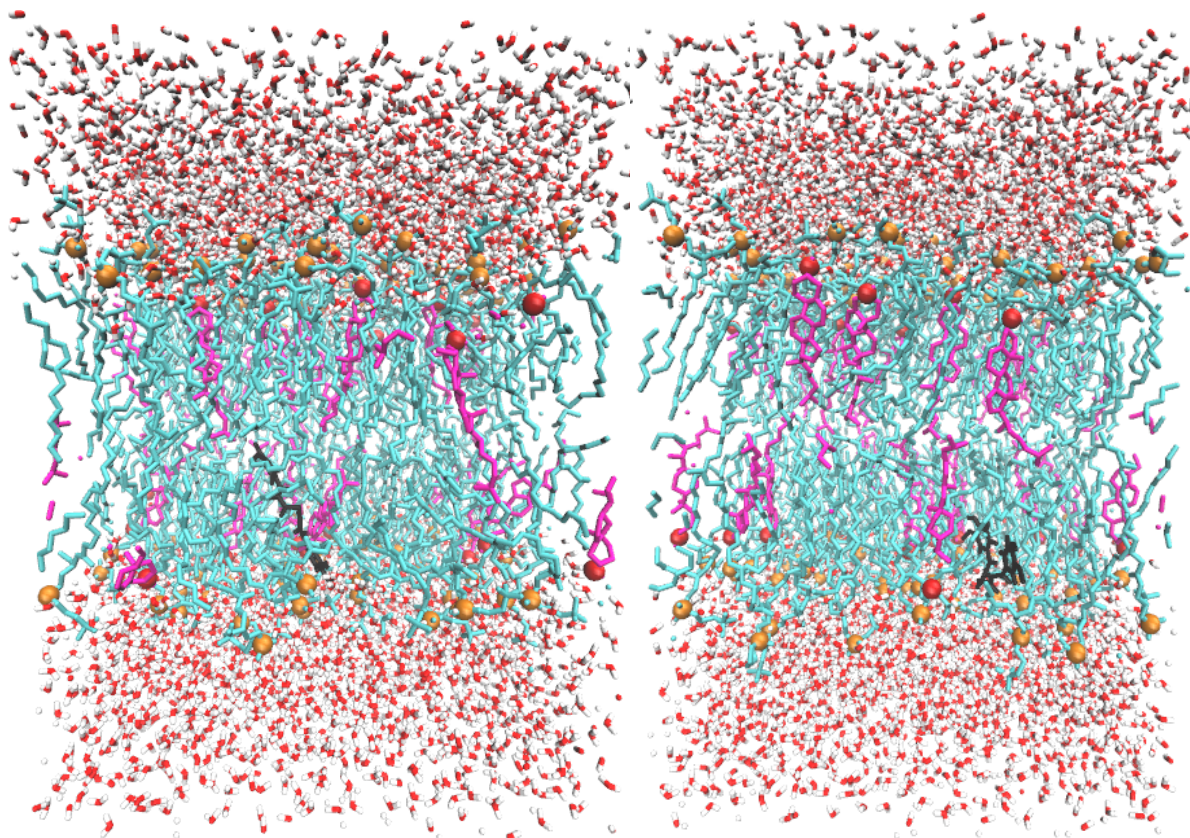


Figura 5.3 – Configurações iniciais (esq.) e final (dir.) do sistema uma bicamada com 20% de colesterol (POPC em azul, colesterol em rosa e curcumina em preto). Neste caso, no início da simulação, a molécula de curcumina já está dentro da bicamada, na região apolar. Átomos de fósforo dos fosfolípidios (esferas laranjas) e oxigênio do colesterol (esferas vermelhas) também estão destacados.

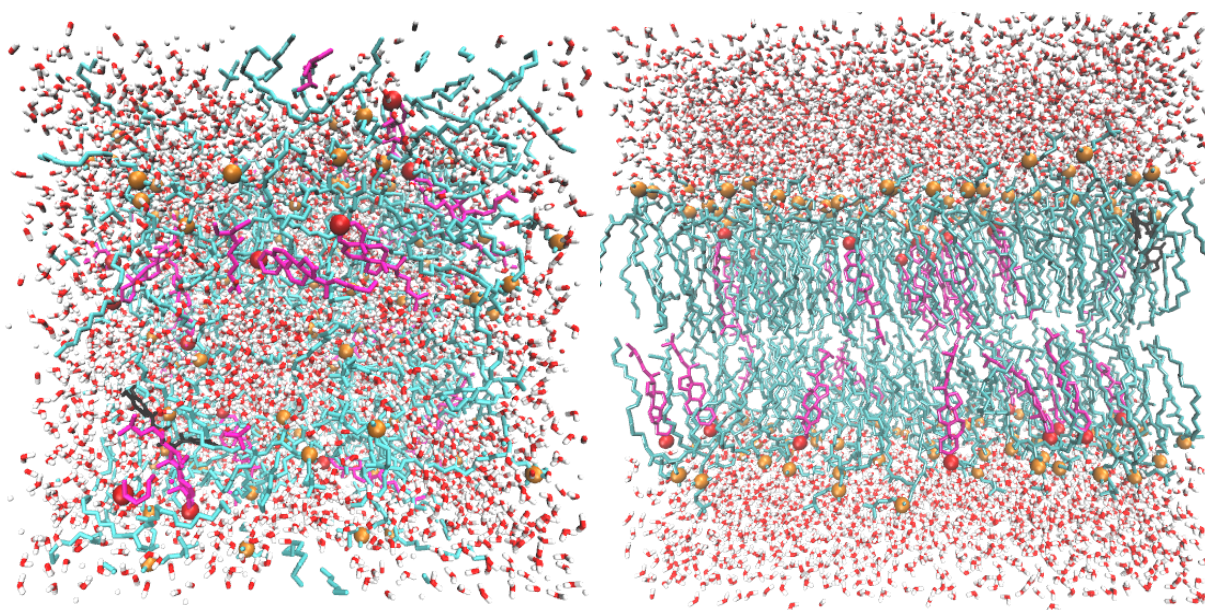


Figura 5.4 – Na automontagem, o sistema parte de uma mistura aleatória de todos os componentes (esq.) e a bicamada se forma com a molécula de curcumina participando do processo (dir.). O código de cores é o mesmo da figura anterior.

5.2.3 Método C: automontagem da bicamada em presença da molécula de curcumina

O processo de automontagem (Esteban-Martín e Salgado, 2007) de uma bicamada explora a tendência natural dos lipídios se agregarem quando em solução aquosa: partindo de uma distribuição aleatória de lipídios, água e outras moléculas de interesse, a partir das interações entre os componentes, observa-se a formação de uma estrutura lipídica – como discutido no Capítulo 1, a presença de fosfolipídios possivelmente fará com que a estrutura formada seja uma bicamada.

O método de automontagem é intuitivo e permite a obtenção de bicamadas puras, compostas e até de sistemas contendo outras moléculas, como proteínas. A construção da célula inicial contendo a mistura aleatória dos componentes é simples e pode ser feita a partir de programas do próprio pacote GROMACS. Uma das principais vantagens do método é, uma vez construída a caixa de simulação, praticamente não requerer qualquer tratamento do sistema (não é preciso se preocupar se as moléculas de água estão próximas das caudas dos lipídios, nem com a posição inicial de cada molécula). Iniciada a simulação, a estrutura formada dependerá unicamente das condições iniciais (posições e velocidades) e das interações entre os componentes; mas esta também é a maior fraqueza do método: como não há controle/interferência sobre a estrutura em formação, não há como garantir qual será a estrutura obtida e quanto tempo será necessário para que seja obtida³; e a interação dos componentes durante o processo de formação normalmente faz com que a bicamada obtida seja assimétrica (a composição e/ou quantidade de lipídios em cada face podem ser diferentes) e o estudo deste tipo de bicamada é bastante complicado, pois qualquer propriedade avaliada pode sofrer alterações devido a assimetria do sistema.

A formação de uma bicamada POPC contendo 20% de colesterol e uma molécula de curcumina é apresentada na Figura 5.4. A bicamada é formada com o flavonoide (em preto) em seu interior. A formação desta mesma bicamada pode ser acompanhada sob outra perspectiva na Figura 5.5; nesta, são mostradas a posição, no eixo perpendicular ao plano onde foi formada a bicamada, de cada átomo de fósforo (em magenta) de POPC e do átomo de oxigênio (em ciano) de cada molécula de colesterol ao longo da simulação. Observa-se que os lipídios inicialmente ocupam toda a caixa de simulação e em menos de 40 ns já estão

³ A automontagem de uma bicamada POPC pura, por exemplo, normalmente não é um processo longo, levando até 100 ns (isto para a formação da estrutura, a estabilização pode requerer outras dezenas de ns); a troca de moléculas de POPC por colesterol torna o sistema ainda mais hidrofóbico, o que resulta na formação da bicamada em tempos de simulação menores.

organizados numa estrutura de duas regiões (os futuros planos das cabeças polares); a organização prossegue e, por volta dos 60 ns, já estão definidas as duas faces antiparalelas da bicamada, com o colesterol ocupando preferencialmente regiões mais internas à membrana – a posição da molécula de curcumina não é apresentada.

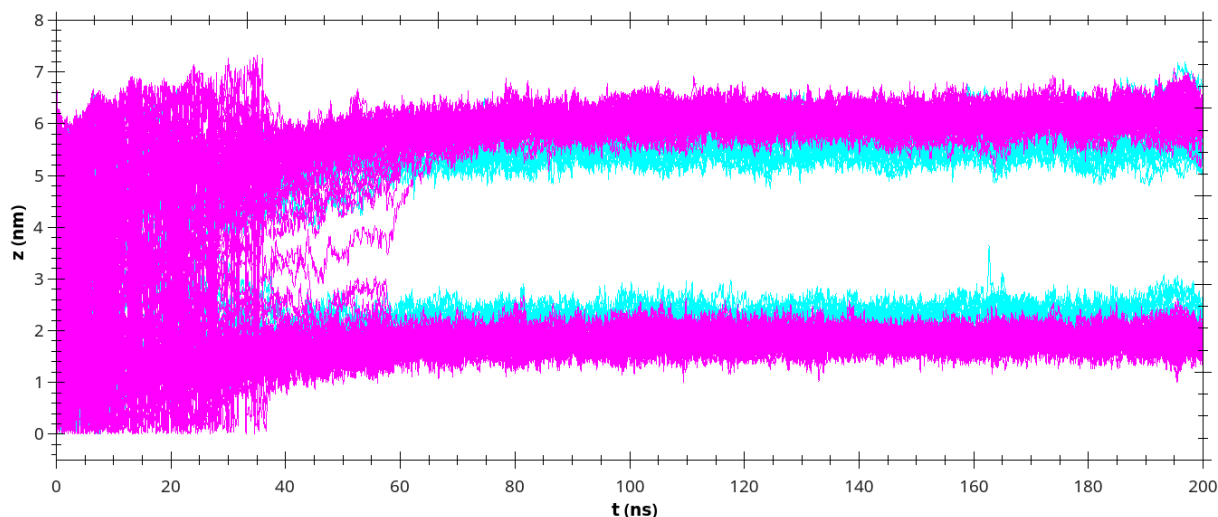


Figura 5.5 – Automontagem da bicamada contendo 20% colesterol (as configurações inicial e final do sistema foram apresentadas na Figura 5.4), acompanhada através da projeção do átomo de fósforo (magenta) das moléculas de POPC e do átomo de oxigênio (ciano) das moléculas de colesterol no eixo perpendicular ao plano em que a bicamada se formou⁴.

5.2.4 Resultados

A seguir, são apresentados os resultados obtidos para a interação da molécula de curcumina com bicamadas POPC contendo 0, 20 ou 40% de colesterol, segundo os métodos de inserção discutidos anteriormente. São gráficos da posição de átomos característicos dos lipídios, e também da molécula curcumina, no eixo perpendicular ao plano da bicamada, e possibilitam acompanhar a evolução temporal da interação do flavonoide com a bicamada.

Como a molécula de curcumina possui grupos polares tanto nos extremos quanto no centro de sua estrutura, optou-se pela marcação de três átomos da molécula: os átomos de oxigênio do grupo fenol (sob a denominação O2, sempre em verde nos gráficos abaixo, e O6, sempre em vermelho) e do pseudo-átomo CH₂ no centro da estrutura (denominado a partir daqui por C11, sempre em preto nos gráficos). A Figura 5.6 traz a molécula de curcumina sob

⁴ Na figura, tal eixo é apresentado como z, indicando que a bicamada se formou no plano xy. Isto é apenas por padronização (que também será utilizada nos demais gráficos do capítulo); numa automontagem, a bicamada pode formar-se em qualquer plano (o xz, por exemplo, com y sendo o eixo perpendicular).

a representação utilizada – comparando com a Figura 5.1, observe que somente os átomos de hidrogênio necessários para a satisfatória representação das características da molécula são explicitados; hidrogênios de grupos CH, CH₂ e CH₃ de carbonos pouco reativos são representados como um único átomo – e destaca como esferas os átomos acompanhados nas análises.

Devido a simetria da molécula, O2 e O6 são átomos equivalentes – quimicamente não há como diferenciá-los – mas estão em extremos opostos da molécula, e possibilitarão uma avaliação da conformação da molécula ao longo da simulação (o flavonoide se estabiliza paralelamente ao plano da bicamada, ou um dos anéis fica mais enterrado na estrutura?); a informação é complementada pelo átomo C11, que é apolar e constitui o eixo de simetria da molécula (representaria o centro da região apolar da molécula, se não estivesse ligado a uma carbonila de cada lado).

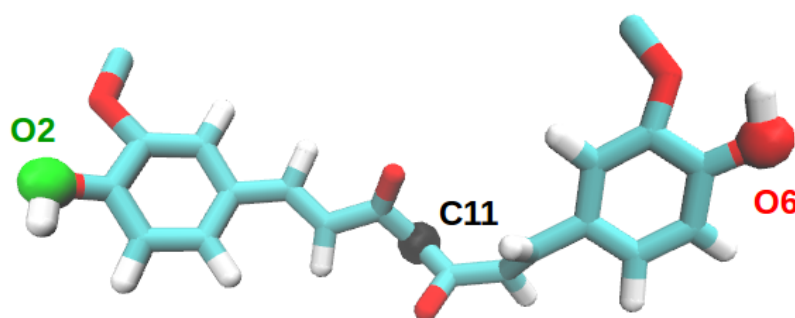


Figura 5.6 – Molécula de curcumina na representação utilizada. Os átomos de carbono estão em azul, hidrogênios em branco e oxigênios em vermelho. Na figura estão destacados como esferas os átomos cuja posição (ou distribuição de posições) será acompanhada nas análises.

Como pode ser observado nos gráficos das figuras a seguir, as simulações possuem durações diferentes; a maioria possui 200 ns, mas em alguns casos, teve que ser estendida pois a estabilização da molécula (ou a formação da bicamada, quando utilizada a automontagem) exigiu mais tempo de simulação. As caixas de simulação em cada proporção de colesterol possuem exatamente a mesma quantidade de componentes, mas as faces das bicamadas podem, ou não, ser simétricas em composição (para mais detalhes sobre a composição, ver Apêndice).

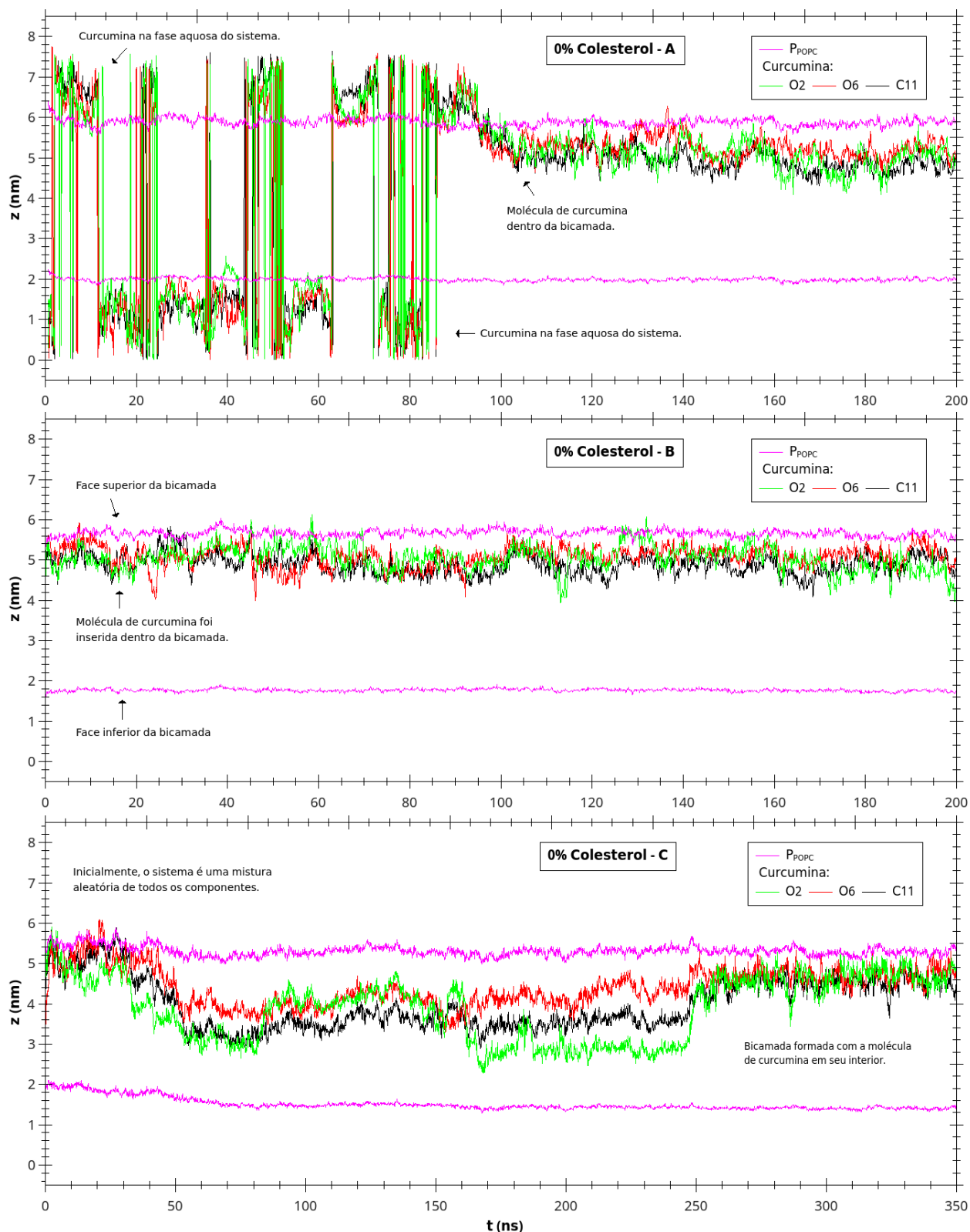


Figura 5.7 – Evolução temporal da interação entre a bicamada e a molécula de curcumina através da projeção de átomos de interesse no eixo perpendicular ao plano da bicamada – A, B e C designam o método utilizado para a inserção da curcumina. São apresentadas a posição média dos átomos de fósforo das moléculas de POPC em cada face (por isso apenas uma curva, em magenta, e não uma para cada átomo, como na Figura 5.5) e a posição dos três átomos marcados na molécula de curcumina. Os saltos bruscos observados em A são fruto da condição periódica de contorno e indicam a entrada e saída dos átomos da molécula da caixa imagem imediatamente acima ou abaixo (ver Seção 2.1.5).

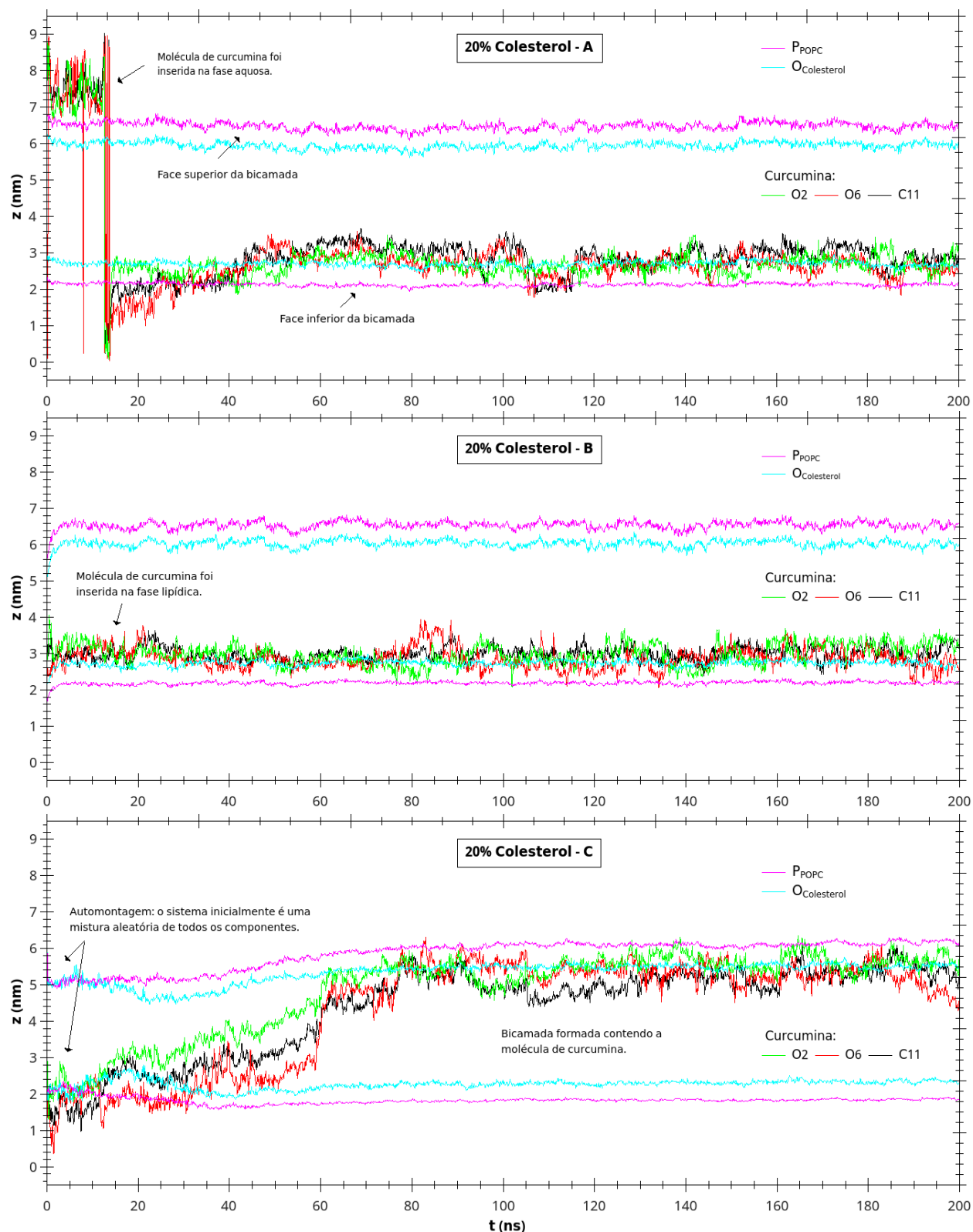


Figura 5.8 – Interação da molécula de curcumina com bicamadas POPC contendo 20% de colesterol. São apresentadas as posições dos três átomos marcados da curcumina (em verde, vermelho e preto) e a posição média em cada face do átomo de fósforo das moléculas de POPC (em magenta) e do átomo de colesterol das moléculas de colesterol (em ciano). As configurações inicial e final das bicamadas contendo 20% colesterol, segundo os três métodos de inserção, foram apresentadas nas Figuras 5.2 a 5.4.

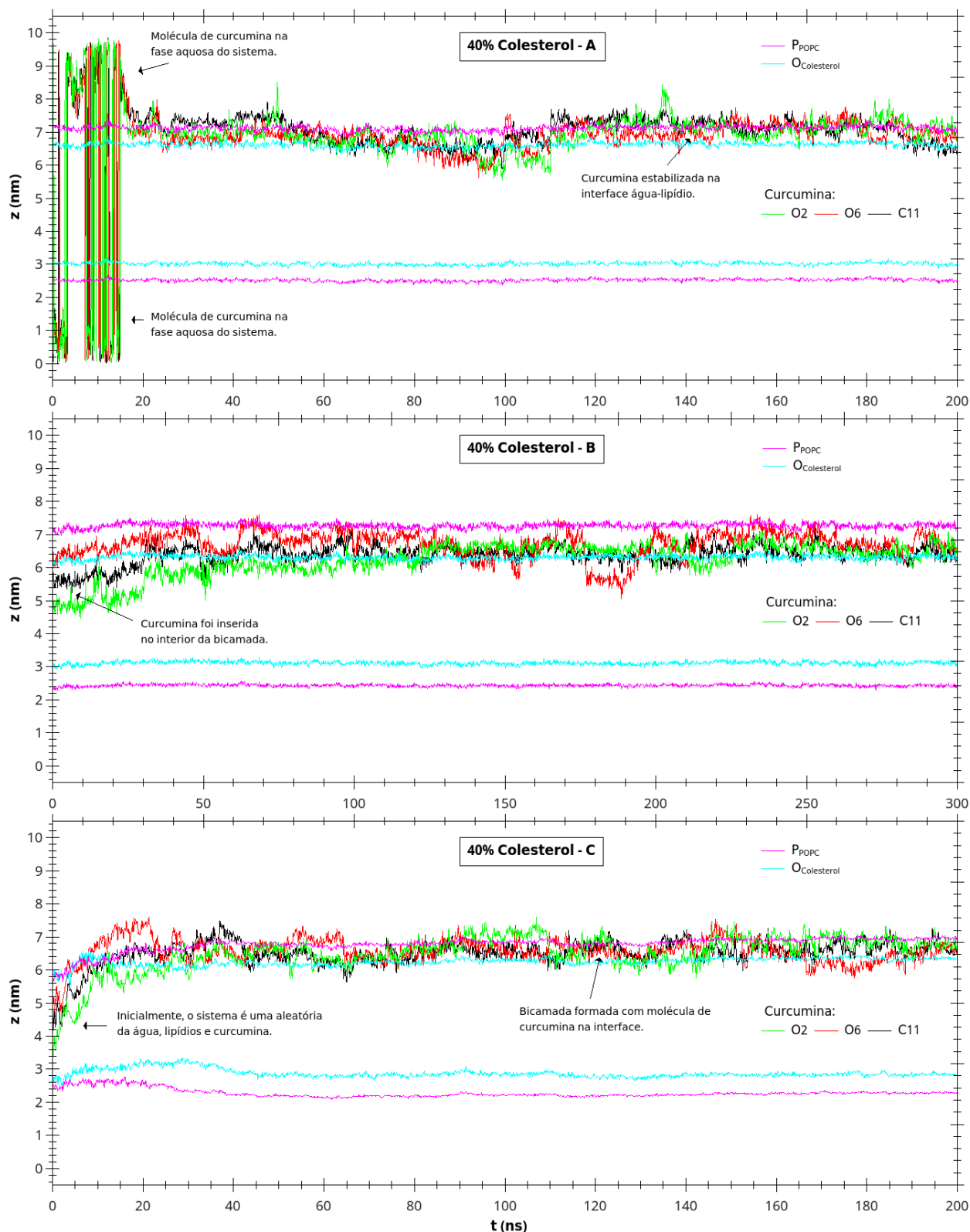


Figura 5.9 – Interação entre a molécula de curcumina e bicamadas POPC com 40% de colesterol. O fato de ser apresentada a posição média para os átomos de fósforo (POPC) e oxigênio (colesterol), faz parecer que em C a bicamada já possui alguma ordenação desde o início da simulação; isto não está correto, é apenas um artifício do cálculo empregado. Em todos os sistemas de automontagem, a posição inicial dos lipídios era aleatória, ocupando praticamente toda a caixa de simulação (a Figura 5.5 representa melhor o processo, pois mostra as coordenadas de todos os átomos de interesse individualmente).

A análise dos gráficos das figuras anteriores mostra que, independentemente da composição da bicamada, a molécula de curcumina interage e penetra na estrutura (A); permanece dentro da bicamada, mas migra para a região das cabeças dos fosfolipídios (B); ou interage com a bicamada em formação, integrando a estrutura (C). Em todos os casos, os gráficos indicam que molécula ocupa a região das cabeças polares, ou seja, a fase hidratada da bicamada, evidenciando ainda que o aumento da concentração de colesterol faz com que o flavonoide passe a ocupar regiões mais distantes do centro da bicamada; o que sugere a questão: o colesterol é uma barreira à penetração da molécula? Isto será discutido mais adiante.

5.3 Efeitos da Curcumina sobre as Propriedades da Bicamada

Embora as simulações tenham sido realizadas com uma única molécula, com uma baixa concentração de curcumina no sistema⁵, é conveniente avaliar se há alguma alteração nas propriedades das bicamadas em função da presença do flavonoide. Isto será feito através da comparação com os valores obtidos no Capítulo 4; lá, entretanto, as faces das bicamadas eram simétricas em composição, enquanto que no atual conjunto há casos de bicamadas simétricas e assimétricas – a comparação deve ser feita levando isto em consideração.

Os critérios para verificação da estabilidade das simulações foram os mesmos empregados nos capítulos anteriores, compreendendo a verificação da estabilidade das variáveis macroscópicas do sistema, energia de interação dos componentes da bicamada (como um todo) entre si e também com as moléculas de água e, finalmente, verificação da estabilidade de propriedades dinâmicas da bicamada, como área por lipídio e espessura da bicamada. Todas as análises apresentadas a seguir, salvo se explicitado o contrário, compreendem os 100 ns finais de cada simulação, independentemente da duração total desta.

A Tabela 5.1 apresenta os valores médios, e respectivo desvio padrão, calculados para a área por lipídio e espessura da bicamada em cada simulação. Também são apresentados os valores obtidos para as bicamadas sem curcumina. A área por lipídio é dependente da quantidade de componentes na face e a presença da molécula de curcumina (que não é um lipídio) não é levada em consideração; assim, para cada sistema contendo curcumina são

⁵ A razão entre flavonoide e lipídio é de 1/130 em todos os sistemas.

apresentados dois valores diferentes para a área por lipídio: um para a face livre de curcumina e constituída apenas por lipídios, outro para a face atacada pelo flavonoide.

Tabela 5.1 – Área por lipídio e espessura da bicamada, calculadas para os sistemas contendo 0, 20 ou 40% colesterol, com a molécula de curcumina inserida segundo os métodos A, B ou C. Os valores de referência para a bicamada sem curcumina são os mesmos das Figuras 4.7 e 4.8.

Bicamada	Área por lipídio (nm ²)		Espessura da bicamada (nm)
	Face sem curcumina	Face com curcumina	
0% Colesterol – sem curcumina	0,662 ± 0,011		3,88 ± 0,14
0% Colesterol – com curcumina - A	0,663 ± 0,010	0,654 ± 0,014	3,90 ± 0,14
0% Colesterol – com curcumina - B	0,660 ± 0,010	0,644 ± 0,016	3,92 ± 0,14
0% Colesterol – com curcumina - C*	0,660 ± 0,016	0,652 ± 0,011	3,89 ± 0,14
20% Colesterol – sem curcumina	0,530 ± 0,008		4,39 ± 0,10
20% Colesterol – com curcumina - A	0,532 ± 0,008	0,507 ± 0,011	4,39 ± 0,12
20% Colesterol – com curcumina - B	0,534 ± 0,010	0,525 ± 0,012	4,36 ± 0,10
20% Colesterol – com curcumina - C*	0,583 ± 0,006	0,492 ± 0,008	4,28 ± 0,14
40% Colesterol – sem curcumina	0,458 ± 0,006		4,57 ± 0,14
40% Colesterol – com curcumina - A	0,456 ± 0,005	0,433 ± 0,006	4,55 ± 0,12
40% Colesterol – com curcumina - B* ⁶	0,459 ± 0,005	0,432 ± 0,006	4,61 ± 0,10
40% Colesterol – com curcumina - C*	0,472 ± 0,006	0,418 ± 0,006	4,67 ± 0,20

* Bicamada de faces assimétricas.

Começando pela espessura da bicamada, a análise dos dados indica haver pouca influência da curcumina sobre a distância entre os planos estabelecidos pelos átomos de fósforo das duas faces da bicamada. Os valores obtidos para cada proporção de colesterol são próximos e na maioria dos casos mutuamente compreendidos na barra de erro um do outro. A molécula de curcumina, na concentração utilizada, não afeta a espessura da bicamada.

Para a área por lipídio, por outro lado, é possível estabelecer correspondência, para todas as concentrações de colesterol, entre o valor obtido para a bicamada sem curcumina e os casos em que o flavonoide foi inserido no sistema pelos métodos A e B. Isto considerando-se a face não afetada pelo flavonoide.

⁶ Uma falha no processo de inserção da molécula de curcumina no interior da bicamada resultou numa bicamada assimétrica (fenômeno normalmente associado somente à automontagem). A bicamada em questão é simétrica em quantidade de lipídios (cada monocamada possui 65), mas assimétrica em composição: enquanto a face superior possui duas moléculas de colesterol a mais do que a outra monocamada, a inferior possui duas moléculas de POPC a mais.

A comparação dos valores calculados para as faces sem e com curcumina revela que a presença desta reduz a área por lipídio da face em que a molécula está presente; isto é verificado para todas as simulações e é um fenômeno esperado, pois a área ocupada pelo flavonoide é desconsiderada no cálculo⁷, restando uma área menor, se comparada à face livre, para a divisão entre os lipídios. Considerando as bicamadas onde é possível estabelecer a correlação (para a face livre) com os valores de referência, a redução média para a área por lipídio é de 0,011 nm² para as bicamadas puras, 0,017 para as contendo 20% colesterol e 0,025 para as de 40% colesterol. Avaliando-se o efeito de uma única molécula de curcumina, não é possível estabelecer se a redução da área por lipídio é devido apenas à exclusão da área ocupada pelo flavonoide (que não necessariamente é a mesma em cada simulação pois, como será abordado mais adiante, a conformação preferencial da molécula muda com o aumento da concentração de colesterol), ou se de fato há um efeito de condensação, como ocorre para o colesterol.

As bicamadas com 20 e 40% colesterol obtidas pela automontagem apresentam grandes discrepâncias em relação aos valores de referência para a área por lipídio (também são os casos em que foram obtidas as maiores diferenças para a espessura da bicamada). Tais bicamadas são altamente assimétricas, razão das diferenças observadas – a bicamada de 40%, por exemplo, possui 8 lipídios a mais na face superior, que é a afetada pela curcumina, em relação à sua face inferior, e por isso apresenta o menor valor para a área por lipídio⁸; o Apêndice traz detalhes quanto à composição de cada sistema e sobre a distribuição dos lipídios entre as faces. Há ainda duas outras bicamadas assimétricas no conjunto, mas estas possuem diferenças de apenas 2 lipídios entre as faces, motivo pelo qual suas propriedades apresentaram boa correspondência com os valores de referência.

As Figuras 5.10 e 5.11 mostram, respectivamente, o parâmetro de ordem dos átomos das caudas saturadas e insaturadas das bicamadas contendo 20% colesterol; para fim de comparação, também são mostrados os valores de referência obtidos das bicamadas sem curcumina. Os gráficos evidenciam não haver diferença significativa no ordenamento das

⁷ O algoritmo foi ajustado para o GridMAT-MD considerar qualquer átomo de curcumina a menos de 1,3 nm de qualquer átomo representativo dos lipídios da bicamada (fósforo do POPC e oxigênio do colesterol) como competindo pela área do plano da bicamada (xy). Assim, quanto mais átomos de curcumina estiverem dentro do raio, e quanto mais próximos estiverem do plano da bicamada, maior será a sua seção transversal no plano da bicamada, e maior será a área atribuída ao flavonoide. Considera-se que átomos que estejam a mais de 1,3 nm não afetam a bicamada e consequentemente não influenciam no cálculo da área por lipídio.

⁸ Bicamadas automontadas contendo colesterol podem apresentar faces diferentes tanto em relação à quantidade de moléculas de fosfolipídio quanto de colesterol, o que pode resultar em sistemas altamente assimétricos.

caudas dos fosfolipídios em presença ou não da molécula de curcumina; os valores calculados para os três métodos de inserção são bastante próximos entre si e do valor de referência para a concentração de 20%. Novamente, os valores que mais destoam do conjunto são os obtidos para a bicamada automontada (C).

A mesma correspondência de valores verificada para as bicamadas contendo 20% colesterol também ocorre nas concentrações de 0 e 40% colesterol (valores não apresentados), o que possibilita concluir que a curcumina não afeta a ordenação das caudas dos fosfolipídios, comportamento condizente com uma molécula que ocupa essencialmente a região das cabeças dos fosfolipídios.

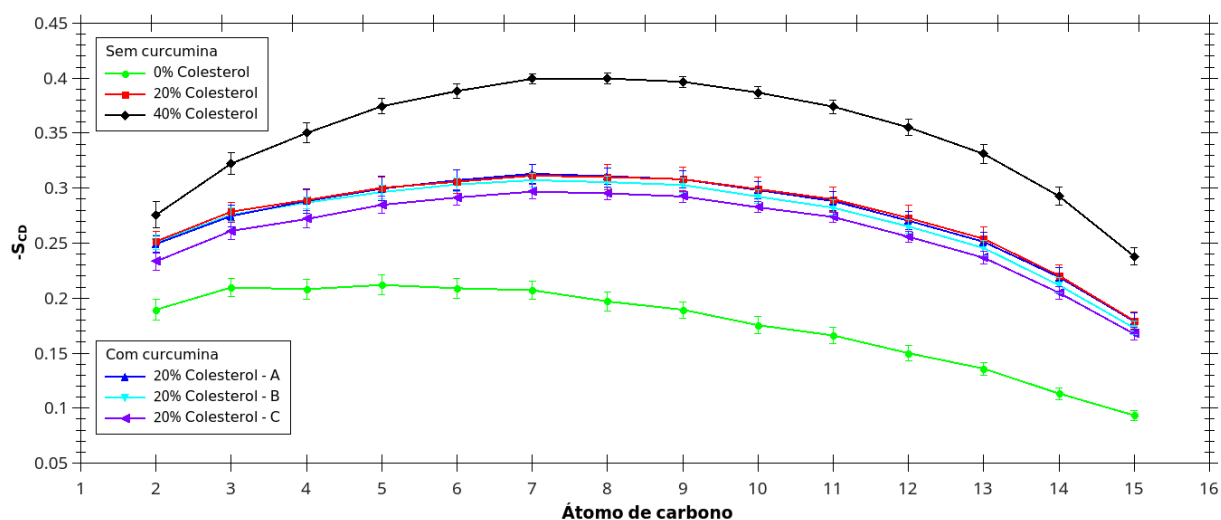


Figura 5.10 – Parâmetro de ordem dos átomos de carbono das caudas saturadas dos fosfolipídios. São apresentados os valores para as bicamadas de 20% de colesterol com curcumina e também os valores de referência, já apresentados na Figura 4.9, para bicamadas sem o flavonoide.

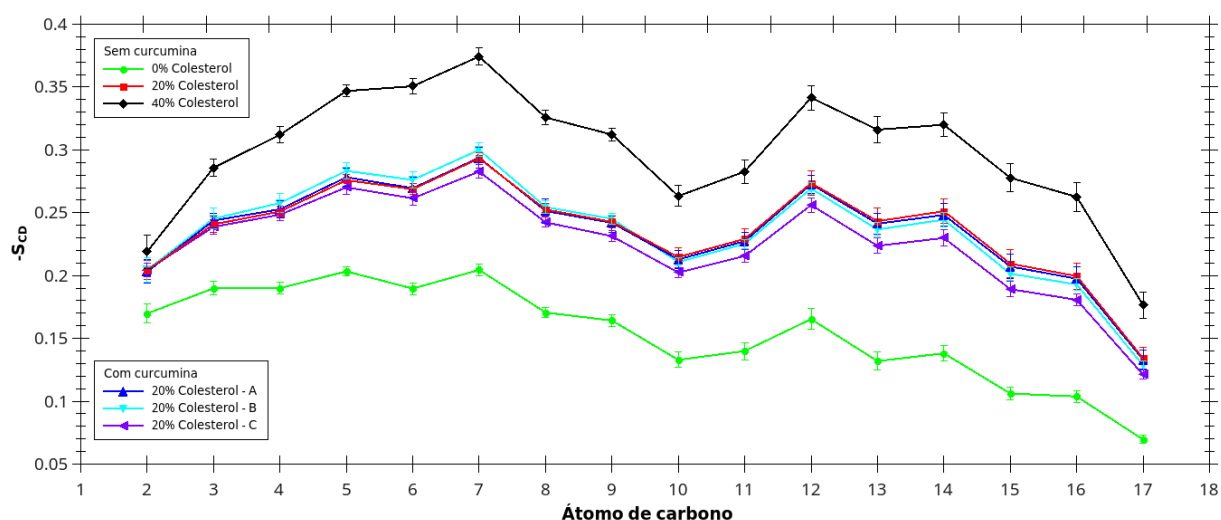


Figura 5.11 – Parâmetro de ordem dos átomos de carbono das caudas insaturadas dos fosfolipídios para as bicamadas contendo 20% colesterol.

Análises da distribuição dos grupos CH_3 terminais das cadeias acíclicas dos fosfolipídios não revelaram diferenças significativas em relação aos resultados obtidos para as bicamadas sem curcumina. Os perfis de densidade em função da distância ao centro da bicamada para os métodos A e B são simétricos, como os obtidos no Capítulo 4 (sem curcumina), o que, aliada à verificação de que a curcumina não ordena as caudas dos fosfolipídios, revela que a presença da curcumina na bicamada influencia pouco a dinâmica das cadeias acíclicas. Para o método C, com automontagem, a distribuição de fosfolipídios e moléculas de colesterol não é simétrica em cada monocamada e por isso os perfis de densidade obtidos não são simétricos, mas isto é efeito do método e não da presença da curcumina. Estes resultados, que não são aqui apresentados, revelam que a curcumina não afeta o acoplamento entre as faces da bicamada.

Das propriedades analisadas, a única que apresentou modificações em função da presença de curcumina foi a área por lipídio da face da bicamada onde a molécula está presente. Espessura, parâmetro de ordem e acoplamento entre as faces são propriedades relacionadas principalmente à região apolar da bicamada; alterações na região das cabeças polares, como a troca de parte dos fosfolipídios de um tipo pelos de outro (em bicamadas POPC/POPG ou POPC/POPE, por exemplo), podem resultar em modificações em tais propriedades (Murzyn et al., 2005; Leftin et al., 2014)⁹, mas este não é o caso para uma única molécula de curcumina¹⁰. Portanto, a única alteração observada foi numa propriedade fortemente dependente de alterações na região das cabeças dos fosfolipídios, justamente a região que as Figuras 5. 7 a 5.9 indicaram que a molécula ocupa.

A ação da curcumina, na concentração estudada, se restringe portanto à região polar da bicamada, onde se verifica a presença da molécula. Mas a curcumina de fato se estabiliza nesta região; e qual a influência, se há, da concentração de colesterol na interação entre a molécula e a bicamada?

9 A diferença entre moléculas de POPC, POPE e POPG está unicamente no grupo característico do fosfolipídio; as caudas são idênticas (ver Seção 1.3). Portanto, diferenças de espessura observadas entre uma bicamada POPC pura e uma POPC/POPG, por exemplo, se devem à interações estabelecidas na região das cabeças dos fosfolipídios.

10 Trouillas e colaboradores (Košinová et al., 2011) também não verificaram alterações significativas nas propriedades de bicamadas puras DOPC em função da presença de uma única molécula de quercetina.

5.4 Estabilização da Molécula de Curcumina

A Figura 5.12 apresenta o perfil de densidade dos componentes do sistema contendo 40% de colesterol (método B) e exemplifica a estrutura de uma bicamada com a curcumina interna à estrutura. Como o perfil é uma média temporal, ele mostra que a molécula do flavonoide encontra-se estabilizada na região hidratada da bicamada, localizando-se dentro da distribuição obtida para as carbonilas das caudas do POPC, com uma curva muito semelhante à observada para o oxigênio da hidroxila do colesterol.

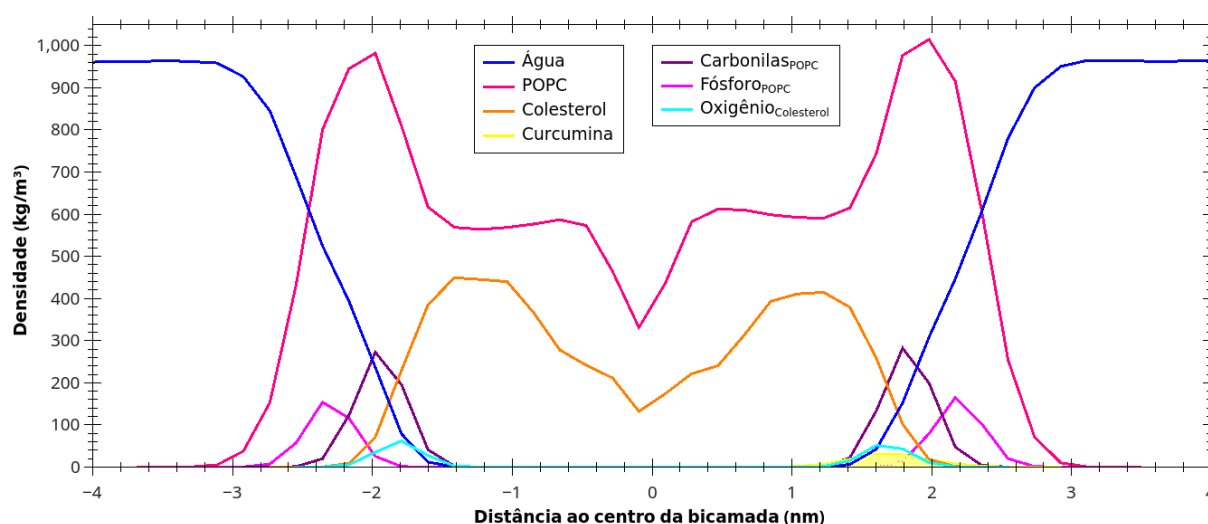


Figura 5.12 – Perfil de densidade dos componentes de uma bicamada contendo 40% colesterol (método B) e curcumina. São apresentadas as distribuições da água (azul) e dos componentes da bicamada: POPC (rosa), colesterol (laranja) e curcumina (amarelo, com a área sob curva preenchida para destacar a distribuição). Para possibilitar a localização da molécula no interior da bicamada, são apresentadas as distribuições para o átomo de fósforo (magenta) e das carbonilas dos fosfolipídios (roxo), e também do átomo de oxigênio do colesterol (ciano). As duas faces não são simétricas em relação ao centro da bicamada devido ao fato das faces não possuírem as mesmas quantidades de componentes.

O critério utilizado para avaliar se a curcumina está dentro ou não da bicamada, como evidenciado nas Figuras 5.7 a 5.9, é posição dos átomos de fósforo das moléculas de POPC em cada face, pois são eles que definem o plano da bicamada. Assim, se a molécula ocupa posições internas ao pico da distribuição dos átomos de fósforo, ela integra a bicamada. A distância entre o pico do perfil de densidade da curcumina e o dos átomos de fósforo portanto foi usado como parâmetro para se avaliar quanto a molécula se internaliza à estrutura (a distância em relação ao centro da bicamada também serviria a este propósito, mas em bicamadas assimétricas as distribuições podem não ser equivalentes para as duas

monocamadas). Os dados obtidos para a posição do flavonoide na bicamada são apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Distância entre a molécula de curcumina e o plano da bicamada (posição média dos átomos de fósforo dos fosfolipídios). Também são relacionadas as distâncias em relação aos átomos de oxigênio das moléculas de colesterol. Os valores referem-se aos 100 ns finais de cada simulação.

Bicamada	d(P _{POPC} – Curc.) (nm)	d(P _{POPC} – O _{Colesterol}) (nm)
0% Colesterol - A	0,90 ± 0,08	-
0% Colesterol - B	0,73 ± 0,07	-
0% Colesterol - C	0,75 ± 0,08	-
20% Colesterol - A	0,71 ± 0,09	0,54 ± 0,09
20% Colesterol - B	0,70 ± 0,09	0,53 ± 0,09
20% Colesterol - C	0,70 ± 0,09	0,52 ± 0,09
40% Colesterol - A	0,0 ± 0,1	0,39 ± 0,10
40% Colesterol - B	0,38 ± 0,09	0,57 ± 0,09
40% Colesterol - C	0,0 ± 0,1	0,39 ± 0,10
0% Colesterol - Média	0,79 ± 0,08	-
20% Colesterol - Média	0,70 ± 0,09	0,53 ± 0,09
40% Colesterol - Média	0,13 ± 0,10	0,45 ± 0,10

Na tabela acima, são apresentados os valores médios para a posição da molécula de curcumina em relação à posição dos átomos de fósforo (P) dos fosfolipídios; para efeito de comparação, também são apresentadas as distâncias médias dos átomos de oxigênio das moléculas em relação ao plano da bicamada. Diferentemente do que ocorre com a curcumina, que está presente somente numa das faces, há dois valores para a distância P_{POPC}-O_{Colesterol}, um para cada face da bicamada; os valores apresentados na Tabela 5.2 são a média destes dois valores. As últimas três linhas da tabela apresentam o valor médio obtido sobre os três métodos de inserção (média do calculado em A, B e C, para cada concentração de colesterol).

A análise dos dados da tabela revela que a molécula de curcumina ocupa regiões internas às bicamadas de menores concentração de colesterol, 0 e 20%, enquanto que nas bicamadas contendo 40% colesterol sua posição fica próxima, ou no limite, entre a bicamada e a fase aquosa. Portanto, em todos os casos, a estabilização da curcumina ocorre na região hidratada da bicamada. Os dados mostram também que, apesar de sempre ocupar regiões internas à bicamada, a distribuição de posições da curcumina varia com a concentração de colesterol no sistema: enquanto nas bicamadas puras a molécula estabiliza-se 0,79 nm adentro

da bicamada, este valor cai para 0,70 nm nas bicamadas contendo 20% colesterol, e 0,13 nm nas de 40%. Portanto, a presença do colesterol consiste numa barreira à internalização da molécula do flavonoide à estrutura. Tal fenômeno, pode-se cogitar, consiste apenas numa maior dificuldade em penetrar a estrutura em função da condensação promovida pelo colesterol na bicamada – em tempos de simulação maiores, a molécula poderia atingir a mesma posição de equilíbrio verificada na ausência de colesterol – mas este não é o caso, pois o fenômeno também é verificado nas bicamadas em que a curcumina foi inserida na fase hidrofóbica do sistema (B); o flavonoide ocupa regiões cada vez mais externas à bicamada devido às modificações promovidas pelo colesterol nas propriedades da bicamada (ver Seção 4.3.3).

Tal expulsão da estrutura em função do aumento da concentração de colesterol, é um fenômeno que também ocorre com o próprio colesterol: para a concentração de 20%, os átomos de oxigênio da hidroxila do colesterol estão, em média, 0,53 nm internos ao plano da bicamada, enquanto que nas bicamadas com 40% colesterol o valor é reduzido a 0,45 nm, mais próximos da fase aquosa portanto.

A comparação da distância $P_{\text{POPC}} - O_{\text{Colesterol}}$ com os valores obtidos nas bicamadas sem curcumina, $(0,54 \pm 0,09)$ nm para 20% colesterol e $(0,39 \pm 0,10)$ nm para 40%, revela boa correspondência com as bicamadas com o flavonoide e indica que a curcumina não afeta significativamente a dinâmica das moléculas de colesterol da estrutura.

5.5 Conformação da Molécula no Ambiente de Bicamada

Utilizando-se perfis de densidade para determinados átomos marcados na molécula de curcumina – O2 e O6 são os oxigênios dos grupos fenólicos e encontram-se nos extremos da molécula, e C11 é o grupo CH_2 na região central da molécula – é possível avaliar as conformações que a molécula de curcumina assume dentro da bicamada. As Figuras 5.13 a 5.15 apresentam os perfis de densidade para tais átomos; nelas a distribuição de posições dos átomos de fósforo do POPC e oxigênio do colesterol foi suprimida, sendo mostrada apenas a posição de seus picos através de setas indicativas.

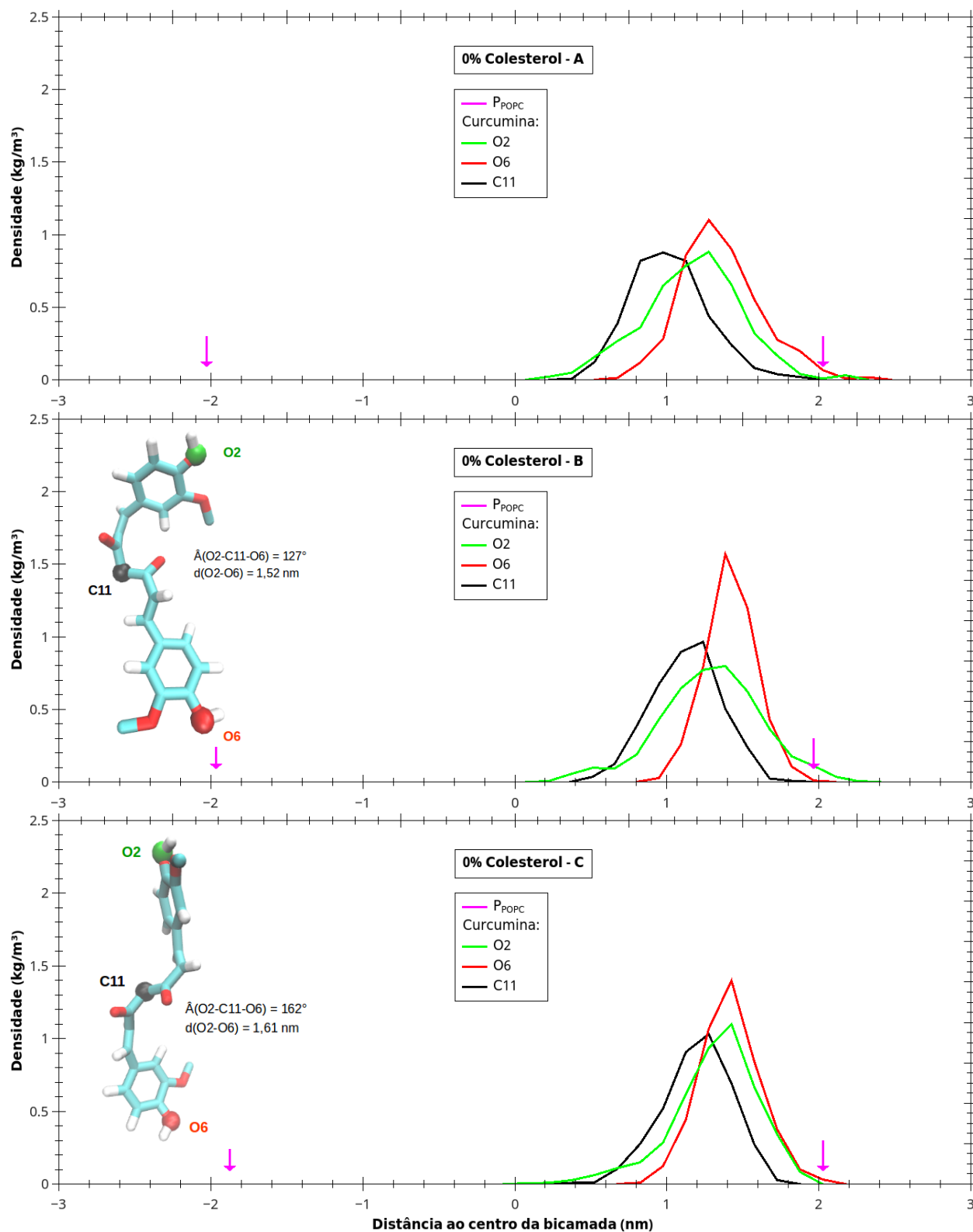


Figura 5.13 – Perfis de densidade de determinados átomos da molécula de curcumina nas bicamadas sem colesterol: O2 (em verde) e O6 (em vermelho) são quimicamente equivalentes e localizam-se em extremos opostos e simétricos da molécula, já C11 está localizado na região central da molécula, que possui caráter mais apolar. Os picos das distribuições dos átomos de fósforo dos fosfolipídios da respectiva bicamada é apresentado através setas (em magenta), com a finalidade de delimitar a região da bicamada.

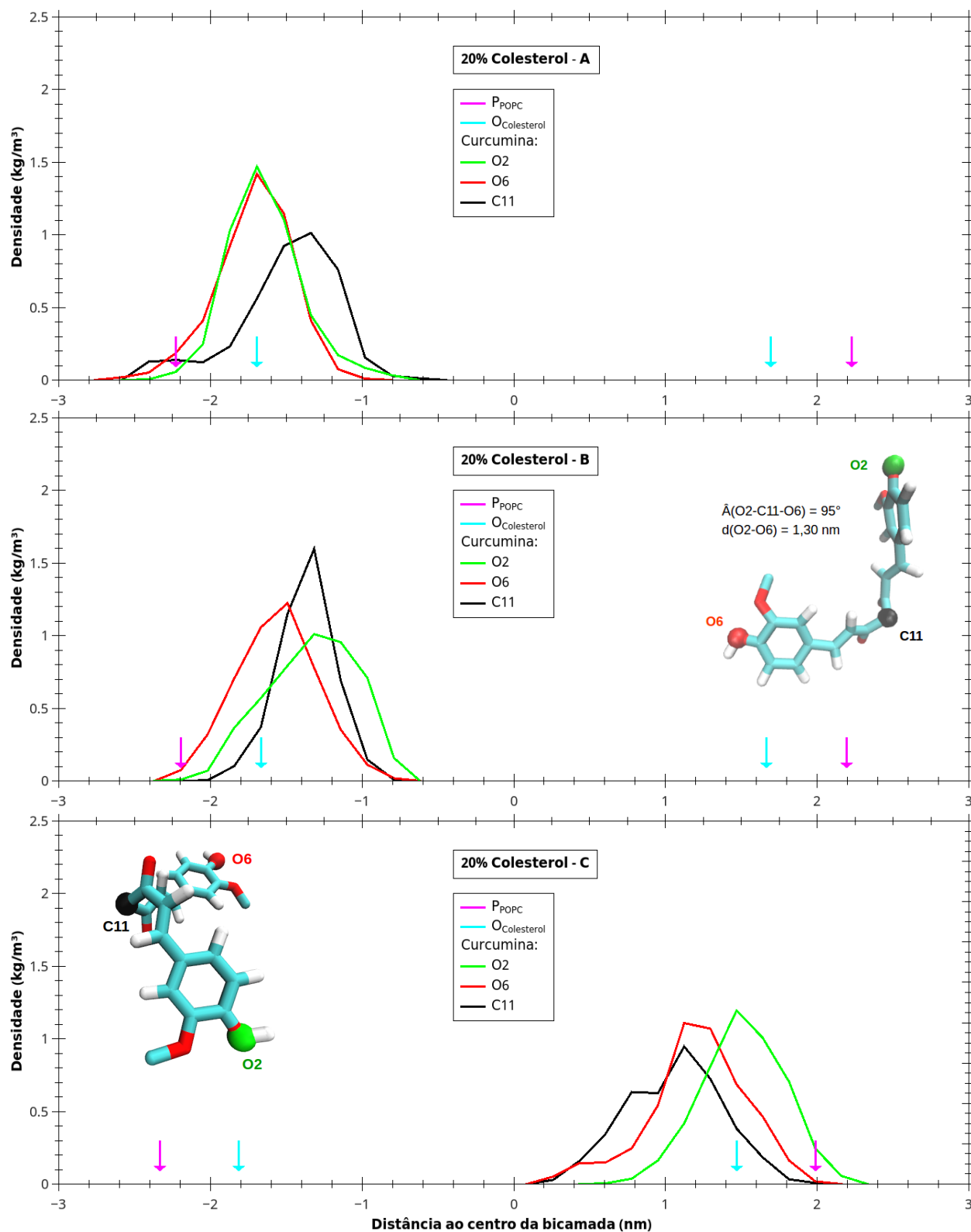


Figura 5.14 – Perfis de densidade para determinados átomos da molécula de curcumina nas bicamadas contendo 20% de colesterol. Os destaques apresentados em alguns gráficos servem apenas para exemplificar possíveis conformações que a molécula assume na bicamada, mas não possuem nenhum caráter estatístico.

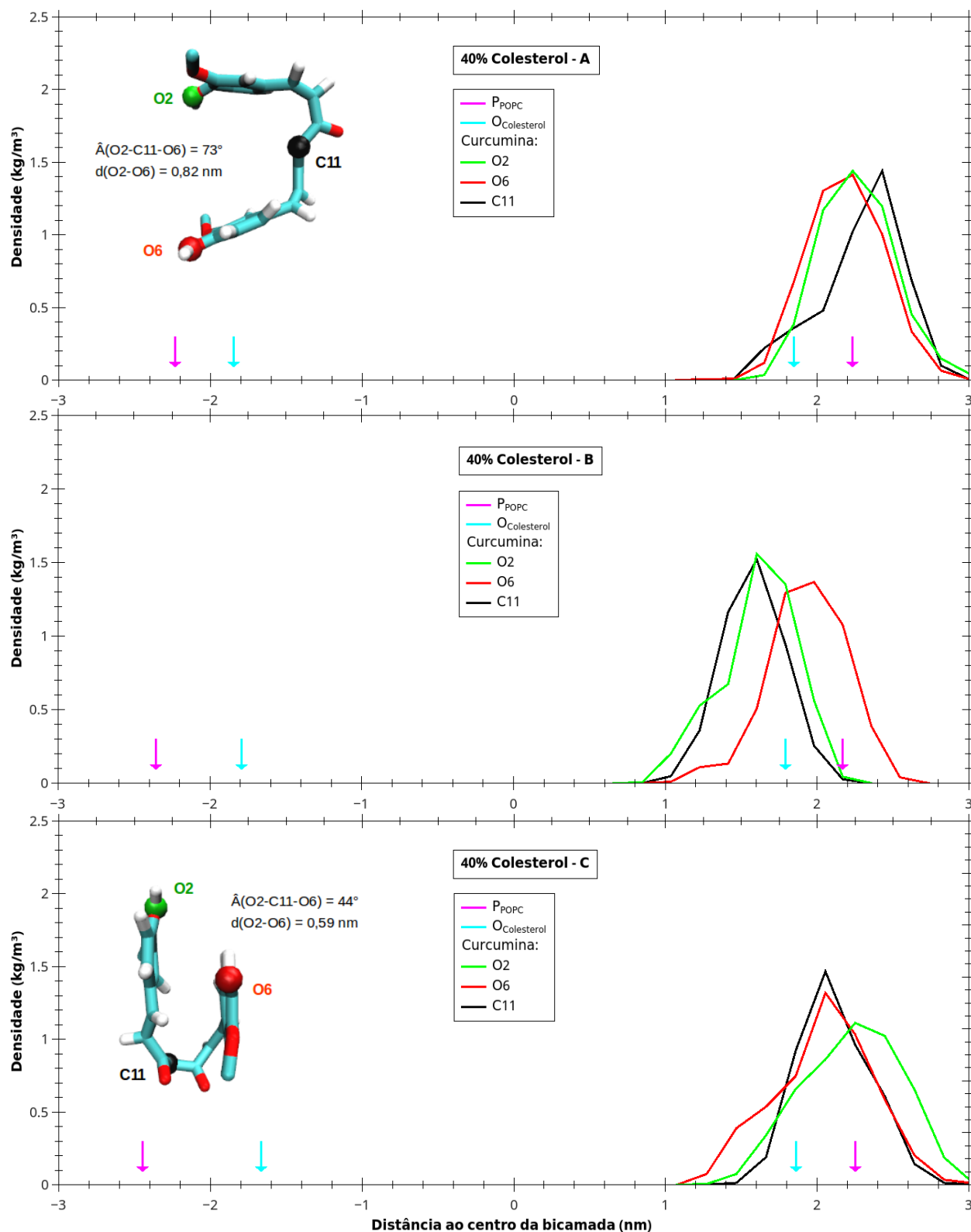


Figura 5.15 – Perfis de densidade de determinados átomos da molécula de curcumina estabilizadas nas bicamadas POPC contendo 40% de colesterol. É importante considerar que O2 e O6 são quimicamente equivalentes, pois a molécula é simétrica; assim, é possível trocar a curva verde pela vermelha, e vice-versa, em qualquer simulação.

A análise dos gráficos das figuras anteriores sugere que há modificação na conformação predominantemente na molécula de curcumina em função do aumento da concentração de colesterol na bicamada. Enquanto nas bicamadas sem colesterol a molécula assume uma conformação em que O2 e O6 estão ambos voltados para interface com a água e C11 permanece mais enterrado na bicamada (uma conformação semelhante a um “V”), nas bicamadas com 20% colesterol a conformação muda para uma estrutura em que somente um dos oxigênios (e consequentemente o anel a que está ligado) está voltado para a fase aquosa, enquanto o outro acompanha a posição de C11, sugerindo uma conformação semelhante a um “L”.

Embora só seja possível estabelecer uma conformação majoritária no caso das bicamadas sem colesterol (nas bicamadas em que há colesterol, nem sempre A, B e C são equivalentes), os gráficos evidenciam que a conformação de estabilidade da molécula do flavonoide é alterada em função da presença de colesterol no sistema, principalmente levando-se em consideração que O2 e O6 são quimicamente equivalentes e que em qualquer gráfico é possível trocar a curva verde pela vermelha, e vice-versa.

Os destaques mostrados nos gráficos possuem apenas caráter ilustrativo, apresentando conformações possíveis para a molécula na respectiva bicamada. Considerando entretanto o ângulo estabelecido entre os átomos O2-C11-O6, é possível quantificar a frequência com que tais conformações ocorrem; a Figura 5.16 traz o histograma da distribuição angular da molécula de curcumina em cada concentração de colesterol (os valores são a média dos obtidos para A, B e C) e mostra que nas bicamadas puras predominam conformações mais abertas, com o ângulo O2-C11-O6 entre 80 e 125°, enquanto que nas bicamadas com 20% colesterol são mais frequentes valores entre 45 e 105°, e para as com 40%, entre 15 e 85°.

O aumento da concentração de colesterol na bicamada portanto induz modificações na conformação de estabilidade da molécula de curcumina: na ausência de colesterol, a molécula assume conformações mais abertas, com os anéis mais distantes um do outro; a condensação da bicamada promovida pelo colesterol gradualmente expulsa o flavonoide para regiões mais externas da bicamada, o que resulta em conformações mais fechadas, com maior proximidade entre os anéis. Este comportamento é condizente com uma maior exposição da molécula ao solvente – a fim de reduzir o contato com a água, a molécula emparelha os anéis diminuindo a superfície de contato.

Na Figura 5.17, o gráfico da distribuição radial de pares entre os átomos de hidrogênio das hidroxilas da curcumina e os átomos de oxigênio das moléculas de água, mostra que, embora não haja mudança significativa na distância das primeiras camadas de solvatação

(aproximadamente a 0,17 e 0,34 nm), o aumento da concentração de colesterol faz com que o flavonoide interaja com um número maior de moléculas de água. A diferença observada entre as curvas acompanha o padrão obtido para distância $P_{POPC}-O_{Colesterol}$, com a molécula mais próxima e mais exposta à fase aquosa em 20% do que em 0%, mas por uma diferença pequena, e uma grande variação para as bicamadas contendo 40% colesterol, caso em que o flavonoide ocupa posições na interface entre a estrutura e a fase aquosa.

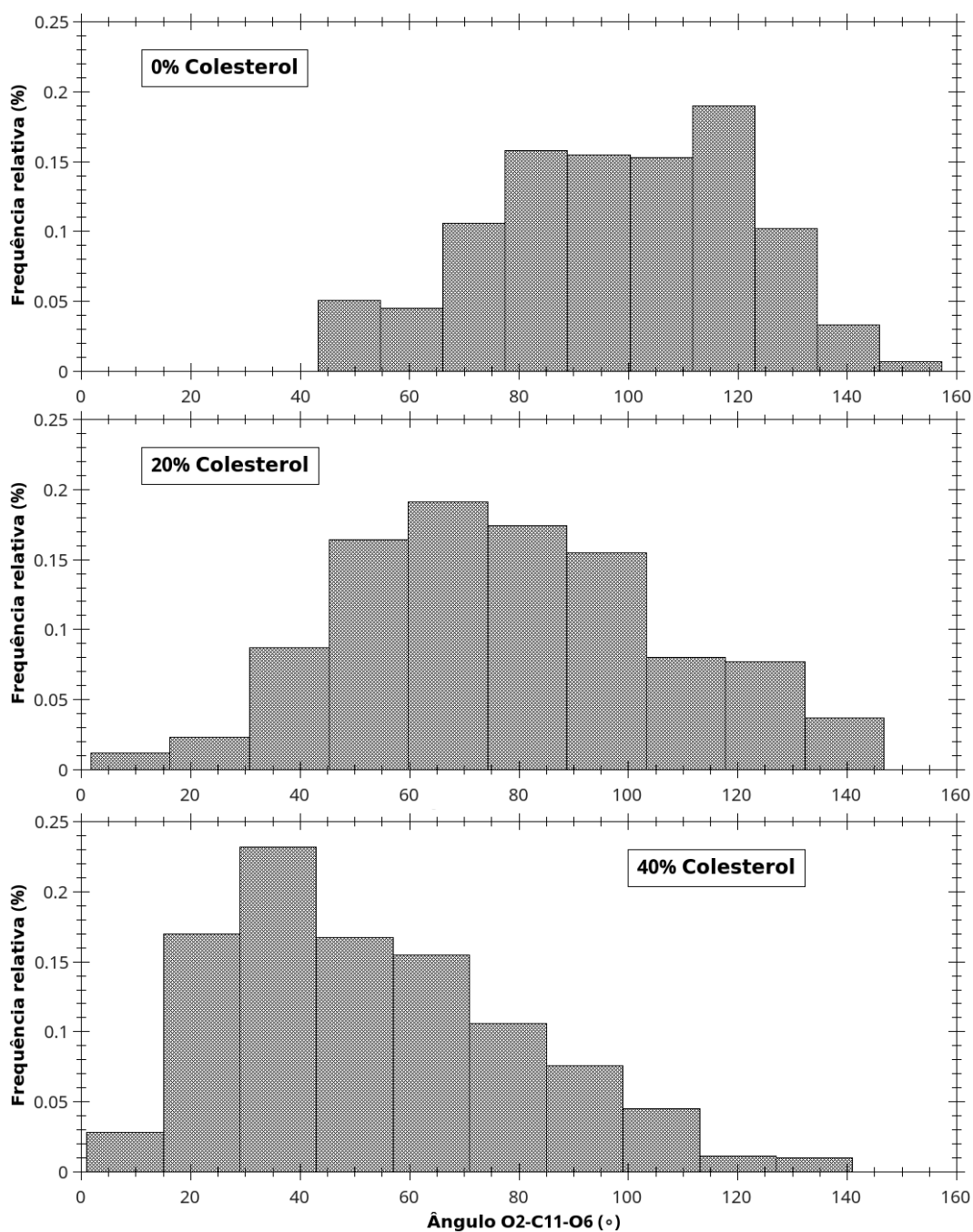


Figura 5.16 – Histogramas para a medida do ângulo O2-C11-O6 da molécula de curcumina em cada composição de bicamada. Os valores apresentados são médias para os 50 ns finais de A, B e C.

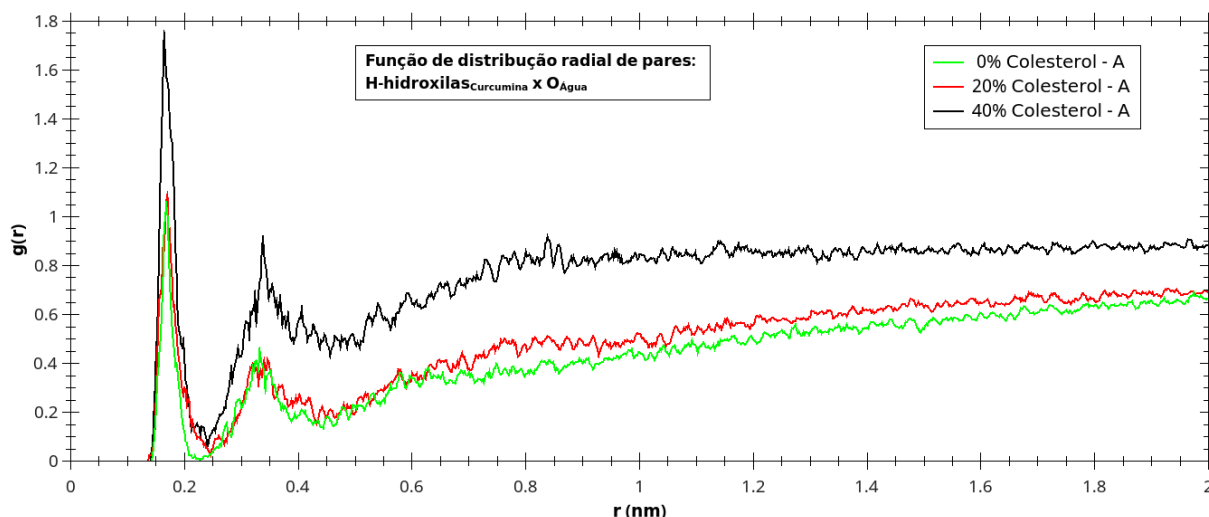


Figura 5.17 – Distribuição radial de pares entre os átomos de hidrogênio das hidroxilas da curcumina e o oxigênio das moléculas de água para as bicamadas do método A (para B e C, os resultados obtidos são semelhantes e não apresentados). A diferença entre as curvas segue o padrão observado para a distância entre a curcumina e o plano da bicamada (Tabela 5.2).

5.6 Interações Energéticas Estabelecidas pela Curcumina

As tabelas a seguir trazem os valores obtidos para as interações energéticas estabelecidas pela curcumina em cada simulação, e também os valores médios calculados para cada concentração de colesterol.

Na Tabela 5.3, são apresentados os valores médios, e respectivo desvio padrão, para a interação total (somas dos termos VdW e Coulomb) entre a curcumina e as moléculas de POPC, colesterol e também com a água (ver nota da pág. 75). Os valores indicam que o aumento da concentração de colesterol favorece a interação entre o flavonoide e os fosfolípídios, com valores de interação (por molécula de POPC) mais favoráveis na presença do esterol; a interação entre curcumina e colesterol, aparentemente é menor no sistema com 40% colesterol, mas neste caso as barras de erro impossibilitam uma conclusão. Quanto à interação com a água, também é observada uma gradual redução em função do aumento da concentração de colesterol, fenômeno possivelmente relacionado às mudanças conformacionais que a curcumina sofre pois, embora esteja mais próxima de um número relativamente maior de moléculas de água, uma conformação fechada (menor ângulo O2-C11-O6) reduz a possibilidade de interação com o solvente¹¹.

¹¹ Os valores obtidos para a interação entre a molécula de curcumina e a água são totalmente dependentes do critério adotado para a normalização. Ainda sim, possibilitam a comparação entre a interação nas diferentes bicamadas.

Tabela 5.3 – Interação energética (Coulomb + VdW) da molécula de curcumina com os demais componentes.

Bicamada	Energia de interação <i>Curcumina</i> – <i>x</i> (kJ/mol.K)		
	POPC (por POPC)	Colesterol (por Colesterol)	Água*
0% Colesterol - A	-2,15 ± 0,34	-	-111 ± 71
0% Colesterol - B	-2,42 ± 0,25	-	-113 ± 52
0% Colesterol - C	-2,23 ± 0,31	-	-139 ± 67
20% Colesterol - A	-2,35 ± 0,38	-0,52 ± 0,50	-93 ± 59
20% Colesterol - B	-2,48 ± 0,30	-0,04 ± 0,08	-94 ± 43
20% Colesterol - C	-2,55 ± 0,32	-0,52 ± 0,35	-116 ± 56
40% Colesterol - A	-2,94 ± 0,64	-0,14 ± 0,13	-129 ± 39
40% Colesterol - B	-3,47 ± 0,59	-0,28 ± 0,21	-66 ± 32
40% Colesterol - C	-3,11 ± 0,52	-0,35 ± 0,23	-71 ± 30
0% Colesterol - Média	-2,27 ± 0,30	-	-111 ± 63
20% Colesterol - Média	-2,46 ± 0,33	-0,36 ± 0,31	-101 ± 53
40% Colesterol - Média	-3,17 ± 0,58	-0,27 ± 0,19	-88 ± 34

Tabela 5.4 – Número médio de ligações de hidrogênio estabelecidas pela curcumina com os demais componentes do sistema.

Bicamada	Número médio de ligações H entre a molécula de curcumina e:			
	POPC (por POPC) x 10 ⁻³	Colesterol (por Colesterol) x 10 ⁻³	Curcumina x 10 ⁻³	Água**
0% Colesterol - A	11 ± 5	-	0 ± 0	1,51 ± 0,58
0% Colesterol - B	5 ± 4	-	2 ± 130	1,53 ± 1,06
0% Colesterol - C	6 ± 5	-	6 ± 5	3,04 ± 1,30
20% Colesterol - A	11 ± 9	0 ± 0	12 ± 108	1,56 ± 1,06
20% Colesterol - B	10 ± 7	0 ± 0	11 ± 106	1,16 ± 0,75
20% Colesterol - C	1 ± 4	17 ± 19	7 ± 82	2,04 ± 0,91
40% Colesterol - A	12 ± 6	9 ± 10	3 ± 59	3,00 ± 1,20
40% Colesterol - B	13 ± 4	0,05 ± 1	2 ± 40	1,72 ± 0,92
40% Colesterol - C	12 ± 7	1 ± 5	10 ± 110	1,90 ± 0,94
0% Colesterol - Média	7 ± 5	-	3 ± 45	2,03 ± 0,98
20% Colesterol - Média	7 ± 7	6 ± 6	10 ± 99	1,59 ± 0,91
40% Colesterol - Média	12 ± 6	3 ± 5	5 ± 70	2,21 ± 1,02

* Valores normalizados pela integração de $g(r)$ até 2ª camada de solvatação em cada caso.

** Valores não normalizados.

A Tabela 5.4 mostra o número médio de ligações de hidrogênio estabelecidas entre a molécula de curcumina com os demais componentes do sistema¹². Os dados sugerem um padrão semelhante ao observado para as interações VdW+Coulomb: o aumento da concentração de colesterol favorece a interação curcumina-POPC também por ligações de hidrogênio; a interação com o colesterol e com água (atenção às escalas) aparentemente permanecem constantes, mas as barras de erro impossibilitam uma conclusão. Pelo mesmo motivo, também não é possível avaliar de forma conclusiva o efeito da composição da bicamada sobre as ligações H intramoleculares, mas os dados sugerem que as mudanças conformacionais verificadas não favorecem ligações entre as duas hidroxilas da molécula, mesmo nas bicamadas de 40% colesterol, onde os anéis estão mais próximos.

5.7 Conclusão

O estudo da interação entre a molécula de curcumina e bicamadas POPC com 0, 20 ou 40% colesterol possibilitou a verificação de que o flavonoide interage com as bicamadas, estabilizando-se na fase hidratada da estrutura, em acordo com o observado com outros fitoquímicos (Košinová et al., 2011; Kopeć et al., 2013; Ingolfsson et al., 2014). Foram utilizados três métodos de inserção da molécula (na fase aquosa do sistema, na fase lipídica apolar, e por automontagem da bicamada em presença da molécula) e em todos os casos a interação ocorreu.

Perfis de densidade da posição da molécula em relação à bicamada mostraram que esta se estabiliza dentro da estrutura lipídica, mas que o aumento da concentração de colesterol gradativamente exclui a molécula para regiões mais próximas à interface com água, aumentando a exposição do flavonoide ao solvente. A fim de proteger a região apolar da molécula, sua conformação muda; das estruturas abertas em forma de “V” com os dois grupos fenólicos voltados para fase aquosa nos sistemas de bicamadas puras, passa a formas em “L” nas bicamadas contendo 20% de moléculas de colesterol, com o ângulo entre os oxigênios das hidroxilas e o grupo CH₃ central apresentando valores próximos a 90 graus e somente um dos anéis voltados para a água. Na concentração de 40% colesterol, a estrutura revela-se ainda

¹² As ligações de hidrogênio foram analisadas a partir de uma extensão de 10 ns de simulação com a trajetória sendo salva a cada 1 ps.

mais fechada, com o empilhamento dos dois anéis, buscando minimizar a quantidade de faces em contato com a água¹³.

A análise das interações energéticas estabelecidas entre a molécula de curcumina e os demais componentes do sistema revela que o aumento da concentração de colesterol favorece a interação entre flavonoide e fosfolípido (VdW + Coulomb, e ligações de hidrogênio); não foi possível avaliar se interação curcumina-colesterol permanece estável ou é reduzida com a maior disponibilidade de moléculas de colesterol no sistema, mas os valores indicam uma clara preferência pela interação curcumina-POPC, também por ligações de hidrogênio.

Em função da baixa concentração (foi utilizada uma única molécula), não foram verificadas mudanças significativas em propriedades estruturais devido a ação da curcumina; espessura da bicamada, parâmetro de ordem e acoplamento entre as faces não foram alterados, se comparados com os resultados obtidos anteriormente para bicamadas sem curcumina. A área por lipídio da face livre de curcumina também não sofreu alterações, mas na face atacada pela molécula observa-se uma redução da área por lipídio, redução que é acentuada pelo aumento da concentração de colesterol. Tal alteração, e o fato da molécula integrar a estrutura em todas as simulações, são indícios de que o flavonoide possui capacidade de localmente modificar as propriedades de uma membrana, principalmente em regiões de baixa concentração de colesterol, ou seja, onde a estrutura é mais fluida.

O avanço no estudo e caracterização das interações da curcumina com uma membrana passa portanto por uma abordagem com uma maior concentração do flavonoide no sistema.

13 Os resultados obtidos, principalmente os sobre a variação conformacional da molécula, referem-se à forma ceto-ceto e não necessariamente podem ser estendidos à forma ceto-enol, que é mais rígida e possivelmente apresenta menor liberdade conformacional.

REFERÊNCIAS

- Abraham, M. J., D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess e the GROMACS development team. **GROMACS user manual**: Version 5.0.7. Uppsala, Sweden: Uppsala University, 2015.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts e P. Walter. **Molecular Biology of the Cell**: Fourth Edition. 4.ed. New York: Garland Science, 2002, p.588-590.
- Alder, B. J. e T. E. Wainwrigth. Phase transition for a hard spheres system. *J. Chem. Phys.* 27:1207-1208, 1957.
- Allen, W. J., J. A. Lemkul, e D. R. Bevan. GridMAT-MD: a grid-based membrane analysis tool for use with molecular dynamics. *J. Comput. Chem.* 30:1952-1958, 2009.
- Averill, B., e P. Eldredge. **Chemistry**: principles, patterns and applications. Prentice Hall, 2007.
- Baoukina, S. e D. P. Tieleman. Computer simulations of phase separation in lipids bilayers and monolayers. Em: **Methods in Lipids Membranes**. 2.ed. New York: Humana Press, 2015, p.307-322.
- Beeman, D. Some multistep methods for use in molecular dynamics calculations. *Journal of Computational Physics* 20(2):130-139, 1976.
- Berendsen, H. J. C., J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, e J. Hermanas. Interaction models for water in relation to protein hydration. Em: **Intermolecular Forces**. Pullman, B. (ed.). Dordrecht, Holland: D. Reidel Publishing Company, 1981, p.331-342.
- Berendsen, H. J. C., J. P. M. Postma, A. DiNola, e J. R. Haak. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.*, 81:3684-3690, 1984.
- Berger, O., O. Edholm, e F. Jähnig. Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophys. J.* 72: 2002-2013, 1997.
- Berkowitz, M. L., D. L. Bostick e S. Pandit. Aqueous solutions next to phospholipid membrane surfaces: insights from simulations. *Chem. Rev.* 106:1527-1539, 2006.
- Berkowitz, M. L. Detailed molecular dynamics simulations of model biological membranes containing cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta* 1788:86-96, 2009.
- Böckmann, R. A., A. Hac, T. Heimburg e H. Grubmüller. Effect of sodium chloride on a lipid bilayer. *Biophys. J.* 85:1647-1655, 2003.
- Brooks, B. R., R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan e M. Karplus. A program for macromolecular energy minimization and calculations. *J. Comp. Chem.* 4:187-217, 1983.
- Brooks, B. R., C. L. Brooks 3rd, A. D. Mackrell Jr, L. Nilsson, R. J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch, A. Caflish, L. Caves, Q. Cui, A. R. Dinner, M. Feig, J. Gao, M. Hodoscek, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. Ma, V. Ovchinnikov, E. Paci, R. W. Pastor, C. B. Post, J. Z. Pu, M. Schaefer, B. Tidor, R. M. Venerable, H. L. Woodcock, X. Wu, W. Yang, D. M. York e M. Karplus. CHARMM: the biomolecular simulation program. *J. Comput. Chem.* 30:1545-1614, 2009.
- Burgos-Morón, E., J. M. Calderón-Montaña, J. Salvador, A. Robies e M. López-Lázaro. The dark side of curcumin. *Int. J. Cancer* 126:1771-1775, 2010.
- Bussi, G., D. Donadio, e M. Parrinello. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* 126:14-101, 2007.

- Canto, A. M. T. M. do, A. J. P. Carvalho, J. P. P. Ramalho, e L. M. S. Loura. Molecular dynamics simulations of T-20 HIV fusion inhibitor interacting with model membranes. *Biophys. Chem.* 159:275-286, 2011.
- Cantor, R. S. Lipid composition and the lateral pressure profile in bilayer. *Biophys. J.* 76(5):2625-2639, 1999.
- Capponi, S., J. A. Freites, D. J. Tobias e S. H. White. Interleaflet mixing and coupling in liquid-disordered phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1858:354-362, 2016.
- Cascella, M. e S. Vanni. Toward accurate coarse-graining approaches for protein and membrane simulations. *Chemical Modelling* 12:1-52, 2015.
- Case, D. A., V. Babin, J. T. Berryman, R. M. Betz, Q. Cai, D. S. Cerutti, T. E. Cheatham III, T. A. Darden, R. E. Duke, H. Gohlke, A. W. Goetz, S. Gusarov, N. Homeyer, P. Janowski, J. Kaus, I. Kolossváry, A. Kovalenko, T. S. Lee, S. LeGrand, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K. M. Merz, F. Paesani, D. R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, R. Salomon-Ferrer, G. Seabra, C. L. Simmerling, W. Smith, J. Swails, R. C. Walker, J. Wang, R. M. Wolf, X. Wu, e P. A. Kollman. **AMBER 14**. San Francisco: University of California, 2014.
- Chippot, C. e A. Pohorille. **Free Energy Calculations: theory and applications in chemistry and biology**. Berlin: Springer-Verlag, 2007, p.25-49.
- Chiu, S. W., E. Jakobsson, R. J. Marsh e H. L. Scott. Cholesterol-induced modifications in lipid bilayers: a simulation study. *Biophys. J.* 83:1842-1853, 2002.
- Collins, M. D. e S. Keller. Tuning lipid mixtures to induce or suppress domain formation across leaflets of unsupported asymmetric bilayers. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 105:124-128, 2008.
- Darden, T., D. York, e L. Pedersen. Particle mesh Ewald: an $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* 98:10089-10092, 1993.
- Düzgünes, N., C. Newton, K. Fisher, J. Fedor e D. Papahadjopoulos. Monolayer coupling in phosphatidylserine bilayers: distinct phase transitions induced by magnesium interacting with one or both monolayers. *Biochim. Biophys. Acta.* 944:391-398, 1988.
- Edholm O., e A. M. Nyberg. Cholesterol in model membranes: a molecular dynamics simulation. *Biophys. J.* 63:1081-1089, 1992.
- Essman, U., L. Perera, M.L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, e L.G. Pedersen. A smooth particle mesh ewald potential. *J. Chem. Phys.* 103:8577-8592, 1995.
- Esteban-Martín, S., e J. Salgado. Self-assembling of peptide/membrane complexes by atomistic molecular dynamics simulations. *Biophys. J.* 92:903-912, 2007.
- Falck, E., M. Patra, M. Karttunen, M. T. Hyvönen e I. Vattulainen. Lessons of slicing membranes: interplay of packing, free area, and lateral diffusion in phospholipid/cholesterol bilayers. *Biophys. J.* 87:1076-1091, 2004.
- Ferreira, T. M., F. Coreta-Gomes, O. H. Samuli Ollila, M. J. Moreno, W. L. C. Vaz e D. Topgaard. Cholesterol and POPC segmental order parameters in lipid membranes: solid state ^1H - ^{13}C NMR and MD simulations studies. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15:1976-1989, 2013.
- Havsteen, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* 96:67-202, 2002.
- Hazra, M., Kumar, S. Roy e B. Bagchi. Hydrophobic hydration driven self-assembly of curcumin in water: similarities to nucleation and growth under large metastability, and an analysis of water dynamics at heterogeneous surfaces. *J. Chem. Phys.* 141:18C501, 2014.
- Hess, B., H. Hekker, H.J.C. Berendsen, e J.G.E.M. Fraaije. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comp. Chem.* 18:1463-1472, 1997.
- Hirtz, M., N. Kumar e L. Chi. Simulation modeling of supported lipid membranes – a review. *Curr. Top. Med. Chem.* 14(5):617-623, 2014.

- Hjort Ipsen, J., G. Karlstrom, O. G. Moutisen, H. Wennerström e M. J. Zuckermann. Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim. Biophys. Acta*. 905:162-172, 1987.
- Hockney, R.W., S.P. Goel, e J. Eastwood. Quiet high resolution computer models of a plasma. *J. Comp. Phys.* 14:148-158, 1974.
- Hofsäβ, C., E. Lindahl e O. Edholm. Molecular dynamics simulations of phospholip bilayers with cholesterol. *Biophys. J.* 84:2192-2206, 2003.
- Holtjē, M., T. Förster, B. Brandt, W. von Rybinski e H. D. Holtjē. Molecular dynamics simulations of stratum corneum lipid models: fatty acids and cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta* 1511:156-167, 2001.
- Hong, C., D. T. Tieleman e Y. Wang. Microsecond molecular dynamics simulations of lipid mixing. *Langmuir* 30(4):11993-12001, 2014
- Hoover, W.G. Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions. *Phys. Rev. A* 31:1695-1697, 1985.
- Huang, C., K. T. Wikfeldt, T. Tokushima, D. Nordlund, Y. Harada, U. Bergmann, M. Niebuh, T. M. Weiss, Y. Horikawa, M. Leetmaa, M. P. Ljungber, O. Takahashi. A. Lenz, L. Ojamae, A. P. Lyubartsev, S. Shin, L. G. M. Pettersson e A. Nilsson. The inhomogeneous structure of water at ambient conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(36):15214-15218, 2009.
- Humphrey, W., A. Dalke e K. Schulten. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics* 14.1:33-38, 1996.
- Hung, W. C., F. Y. Chen, C. C. Lee, Y. Sun, M. T. Lee e H. W. Huang. Membrane-thinning effect of curcumin. *Biophys. J.* 94:4331-4338, 2008.
- Hyslop, P. A., B. Morel, e R. D. Sauerheber. Organization and interaction of cholesterol and phosphatidylcholine in model bilayer membranes. *Biochemistry*. 29:1025-1038, 1990.
- Ingolfsson, H., R. E. Koeppe II e O. S. Andersen. Curcumin is a modulator of bilayer material properties. *Biochemistry* 46: 10384-10391, 2007.
- Ingolfsson, H.I., P. Thakur, K. F. Herold, E. A. Hobart, N.B. Ramsey, X. Periole, D. H. de Jong, M. Zwama, D. Yilmaz, K. Hall, T. Maretzky, H. C. Hemmings Jr., C. Blobel, S. J. Marrink, A. Koçer A, J. T. Sack, O. S. Andersen. Phytochemicals perturb membranes and promiscuously alter protein function. *ACS Chem. Biol.* 9:1788-1798, 2014.
- Jorgensen, W. L., J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey e M. L. Klein. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 79:926-935, 1983.
- Jorgensen, W.L., e J. Tirado-Rivers. The OPLS [optimized potentials for liquids simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and cambrin. *J. Am. Chem. Soc.* 110:1657-1666, 1988.
- Kandt, C., W. L. Ash e D. P. Tieleman. Setting up and running molecular dynamics simulations of membrane proteins. *Methods* 41:475-488, 2007.
- Knight, C. e J. S. Hub. MemGen: a general web server for the setup of lipid membrane simulations systems. *Bioinformatics Advance Access* 31:2897-2899, 2015.
- Koonammackal, M. V., U. V. N. Nellipparambil e C. Sudarsanakumar. Molecular dynamics simulations and binding free energy analysis of DNA minor groove complexes of curcumin. *J. Mol. Model* 17:2805-2816, 2011.
- Kopeć, W., J. Telenius e H. Khandelia. Molecular dynamics simulations of the interactions of medicinal plant extracts and drug with lipid bilayer membranes. *FEBS Journal* 280:2785-2805, 2013.

- Košinová, P., K. Berka, M. Wykes, M. Otyepka e P. Trouillas. Positioning of antioxidant quercetin and its metabolites in lipid bilayer membranes: implication for their lipid-peroxidation. *J. Phys. Chem. B* 116:1309-1318, 2012.
- Koziara, K. B., M. Stroet, A. K. Malde e A. E. Mark. Testing and validation of the Automated Topology Builder (ATB) version 2.0: prediction of hydration free enthalpies. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 28:221-233, 2014.
- Kučerka, N., S. Tristram-Nagle e J. F. Nagle. Structure of fully hydrated fluid phase lipid bilayers with monounsaturated chains. *J. Membr. Biol.* 208:193-202, 2005.
- Kučerka, N., M. P. Nieh e J. Katsaras. Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. *Biochim. Biophys. Acta* 1808:2761-2771, 2011.
- Lecerf, J.M. e M. Lorgetil. Dietary cholesterol: from physiology to cardiovascular risk. *British Journal of Nutrition* 106:6-14, 2011.
- Leftin, A., T. R. Molugu, C. Job, K. Beyer e M. F. Brown. Area per lipid and cholesterol interactions in membranes from separated local-field ^{13}C NMR spectroscopy. *Biophys. J.* 107:2274-2286, 2014.
- Lin, Q. e E. London. Ordered raft domains induced by outer leaflet sphingomyelin in cholesterol-rich asymmetric vesicles. *Biophys. J.* 108:2212-2222, 2015.
- MacDermaid, C. M., H. K. Kashyap, R. H. DeVane, W. Shinoda, J. B. Klauda, M. L. Klein e G. Fiorin. Molecular dynamics simulations of cholesterol-rich membranes using a coarse-grained force field for cyclic alkanes. *J. Chem. Phys.* 143:243144, 2015.
- Malde, A. K., L. Zuo, M. Breeze, M. Stroet, D. Poger, P. C. Nair, C. Ostensbrink e A. E. Mark. An Automated force field Topology Builder (ATB) and repository: version 1.0. *J. Chem. Theory Comput.* 7(12):4026-4037, 2011.
- Mark, P. e L. Nilsson. Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E water models at 298K. *J. Phys. Chem. A* 105:9954-9960, 2001.
- Marrink, S. J., A. H. de Vries e D. P. Tieleman. Lipids on the move: simulations of membrane pores, domains, stalks and curves. *Biochim. Biophys. Acta* 1788:149-168, 2009.
- Marsh, D. Cholesterol-induced fluid membrane domains: a compendium of lipid-raft ternary phase diagrams. *Biochim. Biophys. Acta* 1788:2114-2123, 2009.
- Martínez, L. **Introdução à simulação por Dinâmica Molecular e aplicações**. Petrópolis: LNCC - V Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos, 2010.
- McCammon, J., B. Gelin e M. Karplus. Dynamics of folded proteins. *Nature* 267:585-590, 1977.
- Mihailescu, M., R. G. Vaswani, E. Jardón-Valadez, F. Castro-Román, J. A. Freites, D. L. Worcester, A. R. Chamberlin, D. J. Tobias e S. H. White. Acyl-chain methyl distributions of liquid-ordered and -disordered membranes. *Biophys. J.* 100:1455-1462, 2011.
- Murzyn, K. e M. Pasenkiewicz-Gierula. Construction and optimisation of a computer model for a bacterial membrane. *Acta. Biochim. Pol.* 46(3):631-639, 1999.
- Murzyn, K., T. Róg, e M. Pasenkiewicz-Gierula. Phosphatidylethanolamine-phosphatidylglycerol bilayer as a model of the inner bacterial membrane. *Biophys. J.* 88:1091-1103, 2005.
- Namba, A.M., V.B. da Silva, e C.H.T.P. da Dilva. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Eclética Quím.* 33(4):13-24, 2008.
- Nelson, D. L., e M. M. Cox. **Lehninger - Princípios de Bioquímica**. 4.ed. São Paulo: Artmed, 2004.

- Nickels, J. D., J. C. Smith e X. Cheng. Lateral organization, bilayer asymmetry and inter-leaflet coupling of biological membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* 192:87-99, 2015.
- Nielsen, M., L. Miao, J. H. Ipsen, M. J. Zuckermann, O. G. Mouriscent. Off-lattice model for the phase behavior os lipid-cholesterol bilayer. *Phys. Rev. E*. 59:5790-5803, 1999.
- Niemelä, P. S., M. T. Hyvönen e I. Vattulainen. Atom-scale interactions in lipid raft mixtures. *Biochim. Biophys. Acta*. 1788:122-135, 2009.
- Nosé, S., e M.L. Klein. Constant pressure molecular dynamics for molecular systems. *Mol. Phys.* 50:1055-1076, 1983.
- Nosé, S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Mol. Phys.* 52:255-268, 1984.
- Ohvo-Rekilä, H., B. Ramstedt, P. Leppimäki e J. P. Slotte. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid Research* 41:66-97, 2002.
- Pandit, S. A., S. W. Chiu, E. Jakobsson, A. Grama e H. L. Scott. Cholesterol surrogates: a comparison of cholesterol and 16:0 ceramide in POPC bilayers. *Biophys. J.* 92:920-927, 2007.
- Papahadjopoulos, D., K. Jacobson, S. Nir e I. Isac. Phase transitions in phospholipid vesicles fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta*. 311:330-348, 1973.
- Parrinello, M., e A. Rahman. Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method, *J. Appl. Phys.* 52: 7182-7190, 1981.
- Pasenkiewicz-Gierula, M., K. Murzyn, T. Róg, e C. Czaplewski. Molecular dynamics simulation studies of lipid bilayer system. *Acta Biochim. Polon.* 47:601-611, 2000.
- Phillips, J., R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R.D. Skeel, L. Kalé, e K. Schulten. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comp. Chem.* 26:1781:1802, 2005.
- Piggot, T. J., A. Piñeiro e S. Khalid. Molecular dynamics simulations of phosphatidylcholine membranes: a comparative force field study. *J. Chem. Theory Comput.* 8(11):4593-4609, 2012.
- Porasso, R. D. e J. J. López Cascales. A criterion to identify the equilibration time in lipid bilayers simulations. *Papers in Physics* v.4 art. 04005, 2012.
- Pozo-Navas, B., K. Lohner, G. Deutsch, E. Sevcsik, K. A. Riske, R. Dimova, P. Garidel, e G. Pabst. Compositions dependence os vesicle morphology and mixing properties in a bacterial model membrane system. *Biochim. Biophys. Acta*. 1716:40-48, 2004.
- Putzel, G. G., M. J. Uline, I. Szleifer e M. Schick. Interleaflet coupling and domain registry in phase-separated lipid bilayer. *Biophys. J.* 100:996-1004, 2011.
- Rahman, A. Correlations in the motion of atoms in liquid argon. *Phys. Rev.* 136:A405, 1964.
- Rand, R. P. e V. A. Parsegian. Hydration forces between phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*. 988:351-376, 1989.
- Rikans, L. E. e K. R. Hornbrook. Lipid peroxidation antioxidant protection and aging. 1997. *Biochim. Biophys. Acta*. 1362:116-127, 1997.
- Róg, T., M. Pasenkiewicz-Gierula, I. Vattulainen e M. Karttunen. Ordering effects of cholesterol and its analogues. *Biochim. Biophys. Acta*. 1788:97-121, 2009.
- Samanta, S. e D. Raccatano. Interaction of curcumin with PEO-POP-PEO block copolymers: a molecular study. *J. Phys. Chem. B* 117:3250-3257, 2013.
- Schmidt, C. F., Y. Barenholz, C. Huang e T. E. Thompson. Monolayer coupling in sphingomyelin bilayer systems. *Nature* 271(5647):775-777, 1978.

- Seeling J. e A. Seelig. Lipid conformation in model membranes and biological membranes. *Quarterly Reviews of Biophysics* 13:19-61, 1980.
- Shinoda, W., e S. Okazaki. A Voronoi analysis of lipid area fluctuation in a bilayer. *J. Chem. Phys.* 109:1517-1521, 1998.
- Simons, K., M. J. Gerl. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 11:688, 2010.
- Smaby, J. M., M. Momsen, H. L. Brockman, e R. E. Brown. Phosphatidylcholine acyl unsaturation modulates the decrease in interfacial elasticity induced by cholesterol. *Biophys. J.* 73:1492–1505, 1997.
- Stillinger, F. e A. Rahman. Improved simulation of liquid water by molecular-dynamics. *J. Chem. Phys.* 60:1545-1557, 1974.
- Swope, W.C., H. C. Andersen, P. H. Berens, e K. R. Wilson. A computer-simulation method for the calculation of equilibrium-constants for the formations of physical clusters of molecules: applications to small water clusters. *J. Chem. Phys.* 76:637-649, 1982.
- Tian, J., J. D. Nickels, J. Katsaras e X. Cheng. The behavior of bilayer leaflets in asymmetric model membranes: atomistic simulation studies. *J. Phys. Chem. B* 120:8438-8448, 2016.
- Tieleman, D. P., S. J. Marrink e H. J. C. Berendsen. A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1331:235-270, 1997.
- Tironi, I. G., R. Sperb, P. E. Smith e W. F. van Gunsteren. A generalized reaction field method for molecular dynamics simulation. *J. Chem. Phys.* 102:5451-5459, 1995.
- Trouillas, P., P. Marsal, D. Siri, R. Lazzaroni e J. L. Duroux. A DFT study of the reactivity of OH groups in quercetin and taxifolin antioxidants: the specificity of the 3-OH site. *Food Chemistry* 97:679-688, 2006.
- van der Ploeg, P. e H. Berendsen. Molecular-dynamics simulation of a bilayer-membrane. *J. Chem. Phys.* 76:3271-3276, 1982.
- van der Spoel, D., E. Lindahl, B. Hess, A. R. van Burren, E. Apol, P. J. Meulenhoff, D. P. Tieleman, A. L. T. Sijbers, K. A. Feenstra, R. van Drunen, e H. J. C. Berendsen. **GROMACS user manual**: Version 4.5.4. Uppsala, Sweden: Uppsala University, 2010.
- van Gunsteren, W. F., e H. J. C. Berendsen. **Gromos-87 manual**. Biomos BV Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands, 1987.
- van Gunsteren, W. F., S. R. Billeter, A. A. Eising, P. H. Hünenberger, P. Krüger, A. E. Mark, W. R. P. Scott, e I. G. Tironi. **Biomolecular Simulations**: the GROMOS96 manual and user guide. Zürich, Switzerland: Hochschulverlag AG an der ETH Zürich, 1996.
- Voss, N. R. e M. Gerstein. 3V: cavity, channel and cleft volume calculator and extractor. *Nucleic Acid Res.* 38:W555-W562, 2010.
- Wang, Z., G. Chen, L. Chen, X. Liu, W. Fu, Y. Zhang, C. Li, G. Liang e Y. Cai. Insights into the binding mode of curcumin to MD-2: studies from molecular docking, molecular dynamics simulations and experimental assessments. *Mol. Biosyst.* 11:1933-1938, 2015.
- Wennberg, C. L., D. van der Spoel e J. S. Hub. Large influence of cholesterol on solute partitioning into lipid membranes. *Journal of the American Chemical Society* 134:5351-5361, 2012.
- Yang, J., J. Martí e C. Calero. Pair interactions among ternary DPPC/POPC/cholesterol mixtures in liquid-ordered and liquid-disordered phases. *Soft Matter* 12:4557-4561, 2016.

Yesylevskyy, S. O. e A. P. Demchenko. Cholesterol behavior in asymmetric lipid bilayers: insights from molecular dynamics simulations. Em: **Methods in Lipids Membranes**. 2.ed. New York: Humana Press, 291-306, 2015.

Zhang, J., B. Jing, S. L. Regen. Transbilayer complementarity of phospholipids: proof of principle. *Langmuir* 21(20):8983-8996, 2005a.

Zhang, J., B. Jing, N. Tokutake e S. L. Regen. Transbilayer complementarity of phospholipids in cholesterol-rich membranes. *Biochemistry* 44:3598-3603, 2005b.

Zhao, W., T. Róg, A. A. Gurtovenko, I. Vattulainen, e M. Karttunen. Atomic-scale structure and electrostatics of anionic palmitoyl-oleoyl-phosphatidylglycerol lipid bilayer with Na⁺ counterions. *Biophys. J.* 92:1114-1124, 2007.

Zidar, J., F. Merzel, M. Hodošček, K. Rebolj, K. Sepić, P. Maček e D. Janežič. Liquid-ordered phase formation in cholesterol/sphingomyelin bilayers: all-atom molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem.* 113:15795-15802, 2009.

Zielkiewicz, J. Structural properties of water: comparison of the SPC, SPCE, TIP4P and TIP5P models of water. *J. Phys. Chem.* 123:104501, 2005.

APÊNDICE

Tabela A1 – Quadro-resumo das simulações: composição das caixas e tempo total de simulação.

Simulação	Descrição	Composição				Tempo de simulação (ns)
		POPC	Col.	Curc.	Água	
Bicamada pura / 0% Colesterol	Bicamada POPC pura (0% colesterol)	130	-	-	4550	350
20% Colesterol	Bicamada POPC com 20% Colesterol	104	26	-	4550	350
40% Colesterol	Bicamada POPC com 40% Colesterol	78	52	-	4550	350
0% Colesterol – A	Bicamada POPC pura (0% colesterol) e curcumina inicialmente inserida na fase aquosa do sistema	130	-	1	4550	200
0% Colesterol – B	Bicamada POPC pura (0% colesterol) e curcumina inicialmente inserida dentro da bicamada	130	-	1	4550	200
0% Colesterol – C	Bicamada POPC pura (0% colesterol) e curcumina automontada	130	-	1	4550	350
20% Colesterol – A	Bicamada POPC com 20% colesterol e curcumina inicialmente inserida na fase aquosa do sistema	104	26	1	4550	200
20% Colesterol – B	Bicamada POPC com 20% colesterol e curcumina inicialmente inserida dentro da bicamada	104	26	1	4550	200
20% Colesterol – C	Bicamada automontada POPC com 20% colesterol e curcumina	104	26	1	4550	200
40% Colesterol – A	Bicamada POPC com 40% colesterol e curcumina inicialmente inserida na fase aquosa do sistema	78	52	1	4550	200
40% Colesterol – B	Bicamada POPC com 40% colesterol e curcumina inicialmente inserida dentro da bicamada	78	52	1	4550	300
40% Colesterol – C	Bicamada automontada POPC com 40% colesterol e curcumina	78	52	1	4550	200

Tabela A2 – Constituição das bicamadas em relação à composição de suas faces.

Simulação	Constituição das monocamadas	Face inferior		Face superior	
		POPC	Colesterol	POPC	Colesterol
Bicamada pura	Simétrica	65	-	65	-
20% Colesterol	Simétrica	52	13	52	13
40% Colesterol	Simétrica	39	26	39	26
Colesterol – A	Simétrica	65	-	65	-
0% Colesterol – B	Simétrica	65	-	65	-
0% Colesterol – C	Assimétrica	66	-	64	-
20% Colesterol – A	Simétrica	52	13	52	13
20% Colesterol – B	Simétrica	52	13	52	13
20% Colesterol – C	Assimétrica	49	12	55	14
40% Colesterol – A	Simétrica	39	26	39	26
40% Colesterol – B	Assimétrica	38	27	40	25
40% Colesterol – C	Assimétrica	40	23	48	29