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

Carlos Roberto de Souza Camilo

Estudo computacional da interação da curcumina com bicamadas de fosfatidilcolina (POPC): Efeitos da variação da razão curcumina/lipídios

São José do Rio Preto
2022

Carlos Roberto de Souza Camilo

Estudo computacional da interação da curcumina com bicamadas de fosfatidilcolina (POPC): Efeitos da variação da razão curcumina/lipídios

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Suman de Araujo
Coorientador: Prof. Dr. José Roberto Ruggiero

São José do Rio Preto
2022

C183e

Camilo, Carlos Roberto de Souza

Estudo computacional da interação da curcumina com bicamadas de fosfatidilcolina (POPC) : efeitos da variação da razão curcumina/lipídios / Carlos Roberto de Souza Camilo. -- São José do Rio Preto, 2022

156 f. : il., tabs.

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

Orientador: Alexandre Suman de Araujo

Coorientador: José Roberto Ruggiero

1. Biofísica Molecular. 2. Dinâmica Molecular. 3. Curcumina. 4. Bicamadas fosfolipídicas. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Carlos Roberto de Souza Camilo

Estudo computacional da interação da curcumina com bicamadas de fosfatidilcolina (POPC): Efeitos da variação da razão curcumina/lipídios

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Profª. Drª. Alexandre Suman de Araujo
Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Câmpus de S. J. Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. José Ricardo de Arruda Miranda
Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Câmpus de Botucatu

Prof. Dr. Pedro Geraldo Pascutti
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Prof. Dr. Ronaldo Júnio de Oliveira
Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

Prof.ª Dr.ª Thereza Amélia Soares da Silva
Universidade de São Paulo (USP) – Câmpus de Ribeirão Preto

São José do Rio Preto
28 de julho de 2022

À Adriana, Arthur e Yui, minha família.

AGRADECIMENTOS

Por trás deste trabalho de conclusão de curso está o apoio de muita gente e sem o qual nada disto teria sido possível.

Começo por agradecer ao professor José Roberto Ruggiero, que me acompanhou durante esses anos, contribuindo para o meu crescimento intelectual, e acima de tudo por sua paciência e amizade.

À meu orientador, professor Alexandre Suman de Araujo, pelo apoio, ensinamentos e motivação para o desenvolvimento deste estudo.

À todos os professores do Departamento de Física do IBILCE/UNESP, que contribuíram em minha formação, em especial ao professor Jorge Chahine.

Aos coordenadores, membros e representantes discentes do Conselho do PPG em Biofísica Molecular, em especial à professora Fátima, e ao professor Sidney Jurado Carvalho, sempre disponível para esclarecer e apoiar.

Ao CENAPAD-SP, e sua sempre prestativa equipe, por disponibilizar os recursos computacionais para o desenvolvimento de grande parte das simulações deste trabalho.

Aos meus colegas Josimar, Miriam e Rafael que estiveram comigo nessa caminhada.

À minha família, minha mãe, e à minha mulher Adriana, pela energia que possibilitou que este trabalho fosse levado à frente.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço.

終

RESUMO

A curcumina é um composto ativo da *Curcuma longa*, amplamente utilizada na culinária e medicina asiáticas. Seu espectro de ação terapêutica abrange efeitos antioxidantes, atividades anticancerígenas e antimicrobiana, sendo associada também a processos de apoptose celular. O mecanismo de ação molecular entretanto é pouco conhecido, sendo proposto desde a interação superficial com a região hidratada da membrana celular, até o enterramento de suas moléculas no núcleo hidrofóbico, produzindo alterações nas propriedades da estrutura lipídica. Utilizando simulações por dinâmica molecular de bicamadas fosfolipídicas, este trabalho avalia a interação entre moléculas de curcumina e bicamadas compostas por palmitoiloleilfosfatidilcolina (POPC). As simulações, à volume de água constante, revelam que as moléculas de curcumina, inicialmente inseridas dispersas na fase aquosa, a partir de certa razão curcumina/lipídio, se agregam e absorvem na bicamada, avançando sobre o núcleo hidrofóbico e estabelecendo uma estrutura transmembrânica. Numa longa dinâmica de interação, o *cluster* perde moléculas, resultando na dispersão da estrutura para a região definida pelo glicerol dos fosfolipídios, com a estabilização da curcumina ocorrendo na interface entre as regiões hidrofóbica e hidrofílica. Este processo resulta na redistribuição das moléculas de curcumina entre as duas monocamadas da estrutura lipídica. Utilizando um método de construção alternativo, com inserção progressiva e gradual de moléculas, é observado que a adsorção e estabilização da curcumina de fato se dá na condição dispersa, mas a continuação do processo com a inserção de cada vez mais moléculas também leva à formação de uma estrutura transmembrânica. Os dois estados de interação são, portanto, possíveis e a transição entre eles depende da razão curcumina/lipídio e do tamanho do *cluster* que as moléculas de curcumina estabelecem, seja na fase aquosa, antes da adsorção, ou a partir da agregação de moléculas já adsorvidas na membrana com novas moléculas sendo internalizadas do meio. Em ambos os estados, a ação da curcumina resulta na perturbação local da estrutura, com diminuição da espessura da bicamada, alterações no ordenamento das caudas dos fosfolipídios, e aumento da permeabilidade da bicamada à moléculas de água. Tais alterações indicam que a curcumina aumenta a fluidez da bicamada, apresentando uma ação muito mais efetiva enquanto estrutura transmembrânica. A saturação temporária de moléculas na bicamada resulta portanto na formação de um microdomínio onde a curcumina assume uma estruturação transmembrânica que consiste também num mecanismo para redistribuição de moléculas entre as duas monocamadas da membrana.

Palavras-chave: Curcumina. POPC. Bicamadas fosfolipídicas. Permeação de moléculas de água. Dinâmica molecular.

ABSTRACT

Curcumin is an active compound from Curcuma longa, an ingredient widely used in Asian cuisine and medicine. Its therapeutic action spectrum includes antioxidant effects, anticancer and antimicrobial activities, and is also associated with cellular apoptosis processes. However, its molecular mechanism of action is poorly known. It has been proposed that curcumin adsorbs onto the hydrated surface of the cytoplasmatic membrane and penetrates its hydrophobic core, causing structural changes. By using molecular dynamics simulations of phospholipid bilayers, in this work, we evaluate the interactions between curcumin and 1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine (POPC) bilayers. The simulations reveal that curcumin molecules initially dispersed in the aqueous phase, from a certain curcumin/lipid ratio, form aggregates that adsorb onto the bilayer, then advances through the hydrophobic core to establish a transmembrane structure. Curcumin aggregates reach a stable arrangement at the hydrophobic core and interact with the hydrophilic interface of the bilayer. This process results in the redistribution of the curcumin ratio between the two leaflets of the bilayer. Using an alternative method, with progressive and gradual insertion of molecules, it is observed that the adsorption and stabilization of curcumin aggregate actually take place in the dispersed condition, but the extension of the process with the insertion of additional molecules also induces a transmembrane structure formation. The two structural arrangement are therefore possible and the transition between them depends on the curcumin/lipid ratio, and on the size of the cluster established, either in the aqueous phase, before the adsorption process, but also by the aggregation of molecules already adsorbed with new molecules being internalized from the aqueous phase. In both states, the action of curcumin results in the local disturbance of the bilayer structure, with thinning of the bilayer, changes in the ordering of the phospholipid tails, and the increase in the permeability of the bilayer. Such changes indicate that curcumin increases the fluidity of the bilayer, showing a more effective action as a transmembrane structure. The temporary saturation of molecules in the leaflet, therefore, induces the formation of a microdomain where the curcumin molecules assume a transmembrane orientation which also consists of a mechanism for redistribution of molecules between the membrane leaflets.

Keywords: *Curcumin. POPC. Phospholipid bilayers. Water permeation. Molecular dynamics.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Todas as figuras sem indicação explícita da fonte foram elaboradas pelo próprio autor.

Figura 1.1 – Modelos propostos para a interação da curcumina com membranas. 17

Figura 2.2 – Estrutura das moléculas de curcumina e POPC. 18

Figura 2.1 – Potenciais harmônicos, potencial torcional e potencial diedral impróprio. 26

Figura 2.2 – Representação de uma molécula de POPC. 27

Figura 2.3 – Esquematização do método *leap-frog*. 31

Figura 2.4 – Condições periódicas de contorno. 34

Figura 2.5 – Modelos de representação para a molécula de água. 37

Figura 2.6 – Representação de uma molécula de curcumina. 46

Figura 3.1 – Definição dos limites e centro geométrico da bicamada 50

Figura 3.2 – Interação entre curcumina e bicamada - simulações 1, 2, 4 e 8 curcuminas. 51

Figura 3.3 – Distância média da curcumina ao centro bicamada. 52

Figura 3.4 – Interação curcumina-bicamada (16Curc). 53

Figura 3.5 – *Frames* extraídos da simulação 16Curc. 55

Figura 3.6 – Perfis de densidade (16Curc). 56

Figura 3.7 – Interação curcumina-bicamada (16Curc_R1 e 16Curc_R2). 58

Figura 3.8 – Perfis de densidade (16Curc_R1 e 16Curc_R2). 60

Figura 3.9 – Representação do método de inserção progressiva de moléculas. 63

Figura 3.10 – Interação curcumina-bicamada - 1~16 moléculas (inserção progressiva). 64

Figura 3.11 – Interação curcumina-bicamada (P16). 66

Figura 3.12 – Evolução temporal dos ângulos θ e φ. 67

Figura 3.13 – Perfis de densidade (P16). 68

Figura 3.14 – Energia de interação (VdW). 69

Figura 3.15 – Energia de interação (Coulomb). 70

Figura 3.16 – Ligações de hidrogênio estabelecidas pela curcumina. 72

Figura 4.1 – Energia de interação na bicamada (Vdw e Coulomb). 75

Figura 4.2 – Função g(r) de grupos característicos dos fosfolipídios. 78

Figura 4.3 – Área por lipídio e espessura da bicamada. 80

Figura 4.4 – Parâmetro de ordem. 85

Figura 4.5 – Espessura bidimensional da bicamada pura. 89

Figura 4.6 – Espessura bidimensional (1, 2, 4 e 8Curc). 90

Figura 4.7 – Espessura bidimensional (16Curc). 91

Figura 4.8 – Espessura bidimensional (P16). 95

Figura 4.9 – Espessura bidimensional (16Curc_R1 e 16Curc_R2). 96

Figura 4.10 – Distribuição da curcumina na bicamada 16Curc e afinamento da espessura. 97

Figura 4.11 – Distribuição da curcumina na bicamada (16Curc_R1 e 16Curc_R2). 100

Figura 4.12 – Enterramento da curcumina em função do tamanho do *cluster*. 103

Figura 4.13 – Inserção progressiva (32 moléculas). 106

Figura 4.14 – Inserção progressiva com adsorção pela mesma monocamada (16 moléculas).. 108

Figura 4.15 – Distribuição da curcumina na bicamada (P24 e P32). 111

Figura 4.16 – Dimensões do cluster em função do número de moléculas de curcumina. 112

Figura 4.17 – Histograma dos ângulos θ e φ em relação à z. 112

Figura 4.18 – Espessura bidimensional (P24, P32, P32-NaCl, P32-320K). 114

Figura 4.19 – Interação e distribuição da curcumina na simulação 16Curc-NaCl. 115

Figura 4.20 – Distribuição da curcumina na bicamada (P32-NaCl e P32-320K). 117

Figura 5.1 – Mapeamento de eventos de permeação de água (bicamada pura e 16Curc). 120

Figura 5.2 – Número acumulado de eventos de permeação. 122

Figura 5.3 – Passagem de moléculas de água por meio da estrutura transmembrânica. 124

Figura 5.4 – Comparação de eventos de permeação e sua projeção sobre o *heatmap*. 125

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Quadro resumo do primeiro conjunto de simulações. 41

Tabela 2.2 – Quadro resumo do segundo conjunto de simulações. 42

Tabela 3.1 – Número médio de ligações de hidrogênio estabelecidas pela curcumina. 71

Tabela 5.1 – Estatísticas dos eventos de permeação e coef. de permeabilidade da bicamada. 120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APL Área por lipídio

ATB *Automated Topology Builder and Repository*

COM *Center of mass* (Centro de massa)

Coul. Potencial de Coulomb

Curc. Curcumina

GROMACS *Groningen Machine for Chemical Simulations*

GROMOS *Groningen Molecular Simulation computer program package*

DMPC Dimiristoilfosfatidilcolina

DOPC Dioleoilfosfatidilcolina

DPPC Dipalmitoilfosfatidilcolina

DPPE Dipalmitoilfosfatidiletanolamina

DSPC Diestearoilfosfatidilcolina

$\mathbf{P_c}$ Coeficiente de permeabilidade

MD *Molecular dynamics* (Dinâmica molecular)

PMF *Potential of mean force* (Potencial de força média)

POPC Palmitoilfosfatidilcolina

POPE Palmitoilfosfatidiletanolamina

POPG Palmitoilfosfatidilglicerol

$\mathbf{P_{ref}}$ Pressão de referência

RDF *Radial distribution function* (Função de distribuição radial de pares)

SPC *Simple Point Charge water model*

$\mathbf{T_m}$ Temperatura de transição de fase

$\mathbf{T_{ref}}$ Temperatura de referência

VdW Potencial de van der Waals

VMD Visual Molecular Dynamics

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Angstrom
bar	bar
C	Carbono
Fe^{3+}	Íon ferro
fs	femtosegundo
H	Hidrogênio
J	Joule
k	kilo
K	Kelvin
kg	quilograma
O	Oxigênio
P	Fósforo
m	Metro
mol	mol
N	Nitrogênio
nm	nanômetro
ns	nanosegundo
s	segundo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

1.1 Objetivos 22

2 METODOLOGIA 23

2.1 Simulações por Dinâmica Molecular 23

2.1.1 Campo de forças 24

2.1.2 Equações de movimento e integração numérica 29

2.1.3 Condições iniciais, minimização e equilibração 31

2.1.4 *Ensemble* 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 Estrutura e topologia das moléculas 37

2.1.9 Pacotes de simulação para dinâmica molecular 38

2.2 Descrição dos Sistemas Simulados 39

2.3 Detalhes Computacionais 43

2.4 Análise das Simulações 44

2.4.1 Propriedades da bicamada 44

2.4.2 Interação e organização das moléculas de curcumina 45

3 PROCESSO DE ADSORÇÃO DA CURCUMINA NA BICAMADA 47

3.1 Interação da Bicamada com Várias Moléculas de Curcumina 49

3.2 Inserção Progressiva de Moléculas 62

4 EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE CURCUMINA SOBRE A ESTRUTURA DA BICAMADA 74

4.1 Ação Sobre as Propriedades da Bicamada 74

4.1.1 Interações energéticas na bicamada 76

4.1.2 Área por lipídio e espessura da bicamada 79

4.1.3 Parâmetro de ordem 84

4.2 Efeitos do *Cluster* Sobre a Bicamada 87

4.2.1 Perturbações locais no plano da bicamada 88

4.2.2 Tamanho do *cluster* e formação da estrutura transmembrânica 101

4.2.3 Análise da estrutura transmembrânica 110

4.2.4 Efeito da presença de sal e aumento da temperatura 116

5 EFEITOS SOBRE A PERMEAÇÃO DE MOLÉCULAS DE ÁGUA 118

6 CONCLUSÕES 127

REFERÊNCIAS 130

ANEXO A - Estrutura e parâmetros de topologia utilizados para a curcumina 137

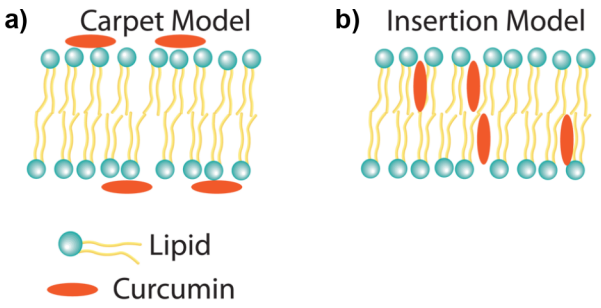
ANEXO B - *A method for detection of water permeation events in Molecular dynamics simulations of lipid bilayers* 143

1 INTRODUÇÃO

Polifenóis são uma classe de moléculas orgânicas caracterizadas pela presença de hidroxilas ligadas a anéis aromáticos. Amplamente encontrados em plantas, são os metabólitos responsáveis por conferir propriedades como cor e sabor a sucos, café e vinho, por exemplo (REIS et al., 2020). O polifenol curcumina é um pigmento amarelo-alaranjado, extraído da planta *Curcuma longa*, largamente utilizado na culinária como um ingrediente do pó de *curry*, sendo também associado ao tratamento de um grande número de doenças na medicina tradicional asiática (MAHESHWARI et al., 2006). Nas últimas décadas, vários trabalhos têm associado a curcumina, e também outros polifenóis, ao tratamento de um amplo espectro de doenças, sendo relatadas atividades anti-inflamatória, anticancerígena e antimutagênica (ANAND et al., 2008; BURGOS‑MORÓN et al., 2010; OBAIDI et al., 2020). Outra atividade terapêutica que merece destaque são suas propriedades antioxidantes, que alçaram a curcumina ao *status* de importante suplemento alimentar para retardar efeitos do envelhecimento e doenças a ele associadas, como o Alzheimer (TEIXEIRA et al., 2005). Sua ação se daria sequestrando radicais livres Fe^{3+} e inibindo o processo de peroxidação dos lipídios de membranas celulares (HAMAGUCHI; ONO; YAMADA, 2010). Mais recentemente, estudos indicaram que a curcumina também apresenta atividade antimicrobiana, podendo atuar como inibidor da ação de peptídeos β-amiloide (Aβ) sobre membranas celulares de neurônios (THAPA et al., 2013), e estar associada a processos de apoptose celular (RAVINDRAN; PRASAD; AGGARWAL, 2009; YUN; LEE, 2016; OBAIDI et al., 2020).

Apesar da grande quantidade de trabalhos buscando caracterizar e avaliar as atividades terapêuticas da curcumina, outros estudos ressaltam que a eficiência e segurança de sua utilização ainda carecem de pesquisa, principalmente face à popularidade que o composto adquiriu (BURGOS‑MORÓN et al., 2010; NELSON et al., 2017). Seu mecanismo de ação molecular ainda é pouco conhecido e, dado o amplo espectro de atividades, pode haver várias vias de ação (INGOLFSSON; KOEPPE; ANDERSEN, 2007). Uma destas vias é sua ação direta sobre as membranas celulares, mas a forma como se dá tal interação ainda é motivo de debate (KUNWAR et al., 2008; ALSOP; DHALIWAL; RHEINSTÄDTER, 2017).

Figura 1.1 – Modelos propostos para a interação da curcumina com membranas.



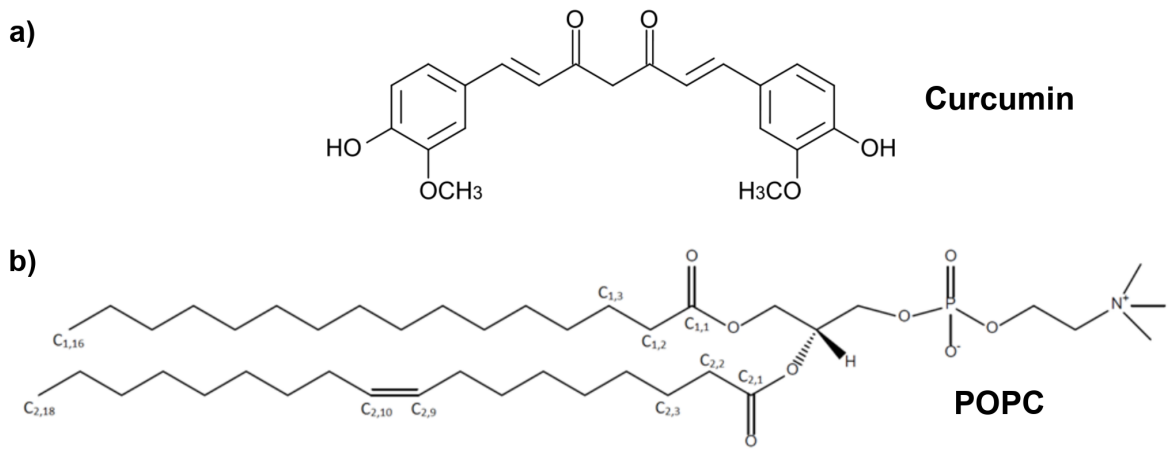
Fonte: Adaptada de: ALSOP; DHALIWAL; RHEINSTÄDTER, 2017.

Num primeiro modelo, ilustrado na Fig. 1.1a, é proposto que a molécula interage com os grupos polares que definem a região hidratada da membrana, as "cabeças" dos fosfolipídios constituintes da estrutura lipídica, atuando assim como uma barreira à interação de outras moléculas com a membrana. Este modelo é utilizado para explicar, por exemplo, a capacidade da curcumina em prevenir interação de peptídeos β-amiloide sobre a membrana (THAPA et al., 2013), assim como sua atividade antioxidante, inibindo o processo de peroxidação oxidativa ao sequestrar radicais livres (HAMAGUCHI; ONO; YAMADA, 2010). Sua atividade, nestes casos, estaria relacionada essencialmente à capacidade de seus grupos fenólicos reativos em se ligar à molécula alvo (STAROK et al., 2015).

Também baseado em dados experimentais, um segundo modelo propõe (Fig. 1.1b), no entanto, que a curcumina se enterra na fase hidrofóbica das membranas. Neste caso, sua ação se daria através da interação com as cadeias apolares (as "caudas") dos fosfolipídios componentes e a consequente modificação das propriedades físicas da membrana (ERLEJMAN et al., 2004; INGOLFSSON; KOEPPE; ANDERSEN, 2007; BARRY et al., 2009). Ao alterar o ordenamento das caudas dos fosfolipídios e a rigidez da estrutura lipídica, a curcumina preveniria a inserção de radicais livres e peptídeos, modificando a barreira de energia à permeação da membrana. Neste segundo modelo, o mecanismo de ação da curcumina seria semelhante ao verificado para o colesterol, que se enterra na fase hidrofóbica modificando o ordenamento e a fluidez da membrana (MOLUGU; BROWN, 2016), mas possivelmente com o efeito oposto, isto é, aumentando a fluidez e a hidratação da estrutura

lipídica (KOTENKOV et al., 2019; ALSOP; DHALIWAL; RHEINSTÄDTER, 2017). Uma abordagem alternativa visa a conciliação dos dois modelos ao propor que o mecanismo de ação da curcumina é dependente de sua concentração. Inicialmente se ligaria à membrana na fase hidratada desta, mas com o aumento de sua concentração, as moléculas gradualmente se inserem na fase hidrofóbica passando a modular as propriedades da membrana (HUNG et al., 2008).

Figura 1.2 – Representação das moléculas de curcumina ($C_{21}H_{20}O_6$) e POPC ($C_{42}H_{82}NO_8P$).



Fonte: Elaborada pelo autor.

A molécula de curcumina (Fig. 1.2a) é essencialmente hidrofóbica com um anel em cada extremidade, ligados por uma cadeia acíclica. Entretanto, ao longo de toda sua estrutura são observados grupos polares, como a hidroxila fenólica em cada um dos anéis e dois grupos carbonila no centro da molécula. Dadas estas particularidades, quando inserida na fase aquosa, as moléculas de curcumina tendem a se agregar numa estrutura que minimize a exposição dos grupos apolares à água, mas ainda assim hidratada de forma a manter a estabilidade de seus grupos polares (HAZRA; ROY; BAGCHI, 2014).

Simulando a interação de uma molécula de curcumina com diversos tipos de bicamadas a 303 K, Lyu e colaboradores (2018) observaram a adsorção do polifenol em todas as bicamadas fluidas. Para a bicamada POPC, os autores verificaram que a molécula de curcumina se estabiliza no interior da estrutura, a 7,0 Å da interface e 11,4 Å do centro da bicamada. Conciliando experimentos de difração de raios-X em vesículas e simulações por

dinâmica molecular de bicamadas dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), Alsop e colaboradores (2017) localizaram o pico da distribuição de curcumina a 8 Å do centro da membrana na abordagem experimental e a 10 Å nas simulações. Ambos os resultados concordam bem com o mínimo que obtiveram para o perfil de energia livre, a 9 Å do centro da estrutura lipídica.

Estes resultados demonstram que a molécula de curcumina particiona na membrana e a localizam em regiões internas à ocupada pelo glicerol dos fosfolipídios (o átomo de carbono do grupo glicerol é o primeiro átomo da cauda). A localização da molécula é dependente da composição lipídica da membrana, com maior enterramento para POPC e dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), e menor para palmitoilfosfatidilglicerol (POPG) e palmitoilfosfatidiletanolamina (POPE) (LYU et al., 2018). A presença de uma molécula de curcumina nas bicamadas resulta em pequenas alterações em algumas propriedades destas. Foram observadas uma redução na área por lipídio na monocamada em que a molécula está presente (a monocamada oposta não é afetada), e um sutil aumento na espessura da bicamada (LYU et al., 2018) mas as variações observadas normalmente estão compreendidas no erro do valor calculado para os sistemas de controle (sem curcumina). Portanto, embora a curcumina possa ser localizada no interior da membrana, as informações obtidas da interação da bicamada com uma (ou duas) moléculas de curcumina nos permitem avançar pouco em relação ao seu mecanismo de ação.

Tais resultados levantam o questionamento de se a ação de várias moléculas de curcumina sobre a bicamada se daria nesta mesma direção, com as moléculas individualmente se estabilizando na região das carbonilas, no limite entre as regiões hidratada e hidrofóbica do sistema, ou se haveria algum tipo de ação cooperativa entre as moléculas do polifenol que resultasse num processo diferente de internalização na bicamada e, talvez, na estabilização em outra região da estrutura. A ação conjunta de várias moléculas de curcumina seria suficiente, por exemplo, para que consigam avançar sobre o núcleo hidrofóbico definido pelas caudas dos fosfolipídios? O colesterol modula as propriedades de uma membrana, mas sua ação resulta na redução da fluidez e aumento na espessura, restringindo a acessibilidade de moléculas de água ao núcleo hidrofóbico. Resultados experimentais indicam que a curcumina também é capaz de modificar propriedades da membrana, com seus efeitos podendo ser opostos ou similares aos do colesterol. Utilizando difração de raios-X, Hung e colaboradores (2008) mediram variações na espessura da membrana de vesículas unilamelares de DOPC e observaram que a curcumina promove alterações significativas na espessura da estrutura

lipídica – um afinamento da ordem de 10 Å, sendo a espessura da membrana ~28,6 Å – apresentando portanto uma ação contrária à do colesterol. É relatado que a curcumina aumenta o ordenamento das caudas dos fosfolipídios em lipossomas de DMPC ou diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) (DUDA; CYGAN; WISNIEWSKA-BECKER, 2020), efeito também observado na ação do colesterol. Mas também, que a curcumina propicia um aumento na hidratação da região hidrofóbica de vesículas (ALSOP; DHALIWAL; RHEINSTÄDTER, 2017; DUDA; CYGAN; WISNIEWSKA-BECKER, 2020), com aumento da fluidez e induzindo, por algum mecanismo, o vazamento de material de seu interior (LEITE et al., 2018).

Em um trabalho recente, Duda e colaboradores (2020) estudaram a ação da curcumina em membranas de lipossomas por ressonância paramagnética eletrônica (EPR *Spin-label*) e observaram alterações no ordenamento das caudas dos fosfolipídios. Os autores propõem que as moléculas de curcumina agem sobre o núcleo hidrofóbico da bicamada, assumindo uma orientação transmembrânica através da associação de duas moléculas no interior da estrutura lipídica. Estes resultados sugerem uma interação, e também um efeito, essencialmente equivalentes aos produzidos pelo colesterol sobre a membrana. Entretanto, o perfil de polaridade medido por eles revela que a curcumina propicia o aumento na penetração de moléculas de água no centro da bicamada, efeito radicalmente oposto ao verificado para o colesterol.

Estudando o efeito da curcumina em vesículas compostas por POPC, Leite e colaboradores (2018) relatam que ela apresenta atividade membranolítica, induzindo o extravasamento do conteúdo das vesículas. A curcumina particiona na região hidrofóbica da bicamada e por algum processo perturba a estrutura da membrana, possivelmente resultando em perda do material interno da vesícula. Por outro lado, a ação do colesterol resulta em aumento na espessura da bicamada, e também da fase hidrofóbica. Estes dados sugerem que, apesar de ambas as moléculas agirem sobre o núcleo hidrofóbico, a dinâmica de interação do colesterol e da curcumina com a membrana devem ser diferentes.

Simulações computacionais de modelos de membranas biológicas possibilitam estudar a dinâmica de interação entre os lipídios e avaliar mecanismos de ação de moléculas sobre a membrana (TIELEMAN; MARRINK; BERENDSEN, 1997). As bicamadas fosfolipídicas são sistemas modelo construídos de forma a mimetizar as principais características de membranas

biológicas (MARRINK; DE VRIES; TIELEMAN, 2009; POGER; CARON; MARK, 2016). Aliando experimentos em vesículas multilamelares por difração de raios-X a simulações de bicamadas por dinâmica molecular, Alsop e colaboradores (2017) estudaram o efeito da hidratação do sistema sobre a ação da curcumina. Em baixo nível de hidratação (~7 moléculas de água por molécula de lipídio) a curcumina se estabiliza na região hidratada da bicamada, enquanto que em membranas fluidas (~27 moléculas de água por lipídio) sua ação ocorre em regiões mais internas à vesícula/bicamada. Obtendo boa correspondência entre os resultados das abordagens experimental e computacional, e somando-os ao cálculo do perfil de energia livre para a curcumina a partir do potencial de força média (PMF), os autores sugerem que a curcumina apresenta dois estados principais de localização em membranas: um estado metaestável na região das cabeças polares, e um segundo estado na região apolar das caudas – embora suas simulações por dinâmica molecular no equilíbrio (livre), com uma ou duas moléculas de curcumina, não explorem este segundo estado. Os resultados experimentais indicam que o segundo estado é mais favorável no sistema hidratado e o perfil de energia revela mínimos locais na região apolar a 9 Å do centro da bicamada. Os autores propõem então que a interação em dois estados possibilita a unificação dos dois modelos discutidos anteriormente para a ação da curcumina em membranas: dependendo das características do meio em que o estudo é realizado, a molécula seria observada num ou noutro estado.

Em síntese, o mecanismo de ação da curcumina é, portanto, dependente de sua localização na membrana, e esta, por sua vez, é dependente de sua concentração de moléculas no sistema e das propriedades da membrana. Apesar de ser o principal foco de estudos pela abordagem computacional, a interação da curcumina, ou de outros polifenóis, normalmente é avaliada pela ligação de uma única molécula à bicamada (KOPEĆ; TELENIUS; KHANDELIA, 2013; LYU et al., 2018). Além disso, a curcumina apresenta baixa solubilidade em meio aquoso, fruto da presença de diferentes grupos hidrofóbicos, o que leva à formação de agregados cuja dinâmica de ação sobre a membrana pode ocorrer de forma diferente da observada para uma única molécula (HAZRA; ROY; BAGCHI, 2014; KOTENKOV et al., 2019).

1.1 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é investigar o efeito de diferentes razões curcumina/lipídio sobre propriedades estruturais de bicamadas fosfolipídicas de POPC (Fig. 1.2b) por simulações computacionais, com o intuito de determinar aspectos moleculares responsáveis por efeitos relatados deste composto sobre sistemas miméticos de células humanas.

Especificamente, pretende-se caracterizar:

(a) o processo de adsorção das moléculas de curcumina na bicamada por meio da caracterização de sua posição e orientação;
(b) a formação, adsorção e estabilização de *clusters* de moléculas de curcumina;
(c) os efeitos da presença das moléculas de curcumina em propriedades da bicamada, tais como, a área por lipídio, a espessura, o ordenamento das caudas; e
(d) o aumento de permeação de moléculas de água pela bicamada devido a presença das moléculas de curcumina.

2 METODOLOGIA

2.1 Simulações por Dinâmica Molecular

Dinâmica molecular consiste numa técnica de simulação computacional muito versátil, podendo ser aplicada desde ao estudo de macromoléculas de interesse biológico, até à ciência dos materiais. Fundamentadas nos princípios da Mecânica Clássica, simulações por Dinâmica Molecular provêm informações sobre o comportamento dinâmico do sistema de interesse, a nível atômico e em escalas de tempo infinitesimais. Propriedades macroscópicas dos sistemas também podem ser obtidas com a aplicação de formulações de Mecânica Estatística, possibilitando o cálculo de propriedades observáveis (energia potencial, temperatura, pressão, volume, densidade, etc.) a partir do comportamento microscópico do sistema.

Em simulações por dinâmica molecular, as moléculas são tratadas como uma coleção de átomos, mantidos unidos por forças newtonianas harmônicas ou elásticas. O objetivo é descrever a interação entre as unidades atômicas utilizando princípios de Mecânica Clássica. A aproximação de Born-Oppenheimer simplifica o tratamento de sistemas atômicos ao propor que como os núcleos atômicos são muito mais pesados do que os elétrons, os núcleos se movem de forma muito mais lenta. Isto possibilita separar o movimento nuclear do movimento eletrônico no hamiltoniano do sistema, pois pode-se considerar que os elétrons se adaptam instantaneamente a uma nova configuração dos núcleos. De forma a poder representar um sistema macroscópico, ou parte dele, computacionalmente, a interação entre os átomos é descrita a partir de um campo de forças, uma função potencial dada por uma soma de termos que devem ser capazes de descrever satisfatoriamente a interação entre pares de átomos, que podem estar diretamente ligados ou não. Calculada a contribuição de todo o sistema, incluindo as moléculas do solvente, a força sobre cada átomo é obtida a partir da primeira derivada do potencial em relação à posição, fornecendo as equações do movimento, que quando integradas, descrevem como posição e velocidade variam num intervalo Δt. Obtida a nova configuração de todos os átomos, pode-se calcular novamente a energia potencial, dando origem a um processo iterativo que descreve a evolução temporal do sistema.

As seções a seguir apresentam uma breve introdução de tópicos básicos ao desenvolvimento de simulações por dinâmica molecular, dando maior destaque aos métodos utilizados nas simulações deste estudo.

2.1.1 Campo de forças

O conjunto de funções potenciais de interação e os parâmetros nelas definidos constitui um campo de forças. O campo de forças define o ambiente físico do sistema, e portanto deve ser adequado a representar as condições sob as quais se deseja estudá-lo (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 e quando pertencem a moléculas diferentes.

Para assegurar que o campo de forças descreve satisfatoriamente o ambiente em estudo, suas funções potenciais devem ser construídas a partir de dados empíricos e cálculos quânticos, parametrizadas de forma que os resultados obtidos nas simulações sejam comparáveis a 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 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

$$V(\vec{r}) = \sum V_l + \sum V_\theta + \sum V_\varphi + \sum V_\alpha + \sum V_{VdW} + \sum V_{Eletros.}, \qquad (2.1)$$

onde V_l são termos que descrevem a vibração das ligações atômicas em torno do seu valor de equilíbrio, V_θ descreve as variações do ângulo entre duas ligações consecutivas de uma molécula, V_φ descreve a variação dos diedros formados por três ligações consecutivas em torno de um ângulo de equilíbrio, V_α preserva a estrutura tridimensional nas bifurcações da cadeia de átomos com quatro ligações simples, V_{VdW} representa o conjunto de termos que descrevem as interações do tipo van der Waals, e $V_{Eletros.}$ descreve as interações eletrostáticas entre cargas (ver Fig. 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, associadas à ligação química específica (ver Fig. 2.1), e da variação no comprimento l e ângulo θ da ligação, que oscila em torno das posição de equilíbrio l_0 e θ_0:

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

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 a rotação em torno de ligações químicas com liberdade de torção (Fig. 2.1c), descrevendo sua simetria rotacional através de barreiras e mínimos de energia específicas para cada tipo de ligação. Normalmente chamado de potencial diedral próprio, assume a forma:

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

ondeV_né 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 φ = 0.

O potencial diedral impróprio V_α é um potencial incluído em alguns campos de força com o objetivo de manter a estrutura tridimensional, e suas oscilações, de átomos de carbono com duas ligações simples (σ) e uma dupla (π), ou formando quatro ligações simples. Sendo I

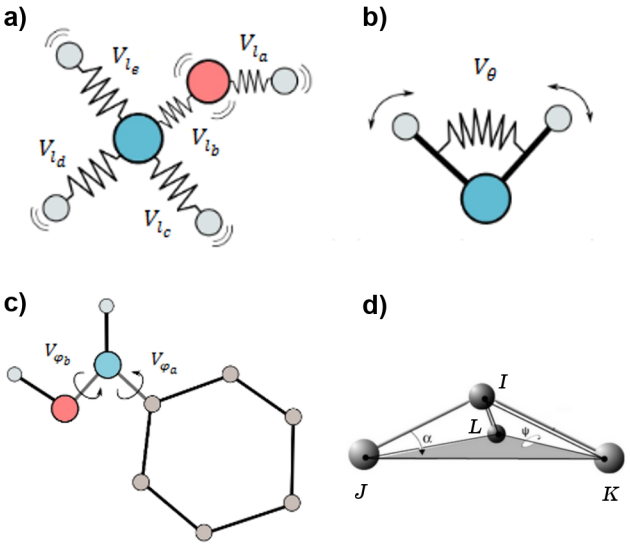
um átomo central ligado a outros três átomos, *J*, *K* e *L* (ver Fig. 2.1d), então α é o ângulo entre os planos *IJK* e *JKL*, e o potencial assume a forma:

$$V_{\alpha} = \frac{k_{\alpha}}{2}\left(\alpha - \alpha_0\right)^2, \tag{2.5}$$

k_α é a constante de restituição ao ângulo de equilíbrio α_0.

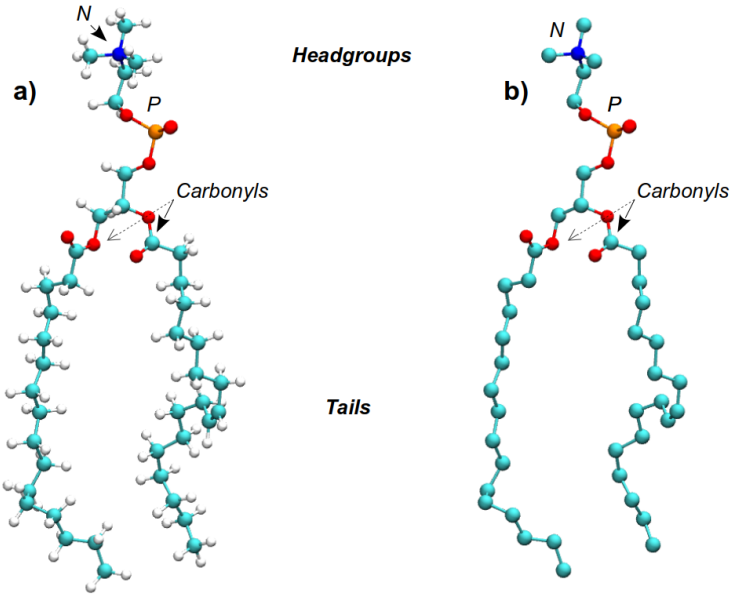
Este potencial harmônico é utilizado para manter a estrutura planar de anéis aromáticos, sendo também particularmente necessário para manter a tetraedricidade dos átomos de carbono quando utilizada a representação de átomos unidos para os grupos CH, CH_2 e CH_3 para átomos de carbono pouco reativos – como será feito neste trabalho. Na representação de átomos unidos, estes grupos de átomos são substituídos por uma nova espécie atômica capaz de representar as propriedades mecânicas moleculares do grupo; os quatro átomos do grupo CH_3, por exemplo, são substituídos por um pseudo-átomo cujas propriedades são equivalentes à do grupo (ver Fig. 2.2).

Figura 2.1 – Idealização dos potenciais harmônicos V_l (a) e V_θ (b), do potencial torcional V_φ (c), e do potencial diedral impróprio V_α (d).



Fonte: a, b, c) Adaptadas de: MARTÍNEZ, 2010.
d) Extraída de: <http://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/namd>. Acesso em: 18 mai. 2022.

Figura 2.2 – Molécula de um fosfolipídio (POPC) nas representações de todos os átomos (a; *all-atoms*) e átomos unidos (b; *united atoms*). O átomo de nitrogênio (N) é mostrado em azul, fósforo (P) em laranja, átomos de oxigênio em vermelho, átomos de carbono em ciano, e átomos de hidrogênio em branco. A redução do número de átomos implica em ganho de tempo computacional.



Fonte: Elaborada pelo autor.

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

$$V_{VdW} = 4\varepsilon_{ij}\left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^{6}\right] \text{ e } V_{Eletros.} = \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r r_{ij}}, \qquad (2.6 \text{ e } 2.7)$$

onde ϵ_{ij} representa a profundidade do poço de potencial e $\sigma_{i,j}$ é a distância para qual o potencial inter-partícula 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.

O potencial de Lennard-Jones é de curto alcance e composto por um termo atrativo ($\sim r^6$), devido a flutuações na distribuição de cargas de um átomo na presença de outro (interação dipolo-dipolo atrativa), e um termo repulsivo ($\sim r^{12}$), representando a repulsão entre

duas esferas atômicas que se aproximam (mimetizando o princípio de exclusão de Pauli). O potencial de Coulomb é de longo alcance e descreve a interação de cargas, originadas por diferenças na eletronegatividade entre o par de átomos de uma ligação química (em sistemas biológicos, o aumento da eletronegatividade dos átomos de H, C, N e O, nesta ordem, é particularmente importante), dando origem à cargas parciais na molécula, ou devido à interação com íons ou grupos ionizáveis com carga líquida. Numa mesma molécula, a interação entre um átomo com aqueles com que estiver ligado, e também com seus segundos vizinhos, é descrita a partir dos potenciais harmônicos (Eq. 2.2 a 2.5), enquanto que a interação com os demais átomos, inclusive os de outras moléculas e os do solvente, é tratada pelos potenciais de van der Waals e eletrostático (Eq. 2.5 e 2.6).

Em todos os potenciais, os parâmetros são constantes, obtidos a partir de cálculos quânticos e resultados experimentais, características para o tipo de átomo ou ligação, sendo também influenciados por sua vizinhança; isto dificulta a generalização dos campos de força, não existindo um campo que descreva satisfatoriamente todas as moléculas em qualquer condição. Outro ponto a ser considerado é que a precisão do campo de forças não deve comprometer sua simplicidade, e consequentemente o desempenho computacional da simulação (PASCUTTI, 2019). Neste caso, a escolha do campo de forças a ser utilizado depende 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; BERENDSEN, 1987; VAN GUNSTEREN et al., 1996), OPLS (JORGENSEN; TIRADO-RIVERS, 1988) , AMBER (CASE et al., 2014) e CHARMM (BROOKS et al., 1983; BROOKS et al., 2009), exemplos bem-sucedidos.

As simulações apresentadas neste trabalho são baseadas no campo de forças GROMOS96 53a6 (OOSTENBRINK et al., 2004), otimizado com os parâmetros dos “lipídios de Berger” (BERGER; EDHOLM; JÄHNIG, 1997), para representação das cadeias de alcanos das caudas dos fosfolipídios. Os chamados “lipídios de Berger” utilizam a representação de átomos unidos para os grupos CH, CH_2 e CH_3 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; PIÑEIRO; KHALID, 2012; MACDERMAID et al., 2015).

2.1.2 Equações de movimento e integração numérica

Uma simulação de Dinâmica Molecular Clássica (onde não há troca de elétrons ou prótons) consiste fundamentalmente na resolução das equações de movimento newtonianas para todos os *i* átomos do sistema em cada instante *t*:

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

Como não existe solução analítica para problemas com muitos corpos, a solução precisa ser obtida a partir de métodos numéricos.

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

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

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

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). Como o movimento molecular mais rápido é o período de vibração dos átomos de hidrogênio, que é da ordem de 5,0 x 10^{-16} segundos, este em princípio é o maior passo de integração a ser utilizado em simulações de sistemas moleculares. Mas a restrição aplicada aos comprimentos e ângulos de ligação em suas posições de equilíbrio a partir de potenciais harmônicos possibilita a utilização de passos de integração 4 vezes maiores, ou seja, 2,0 x 10^{-15} s = 2 fs (PASCUTTI, 2019). 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; GOEL; 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:

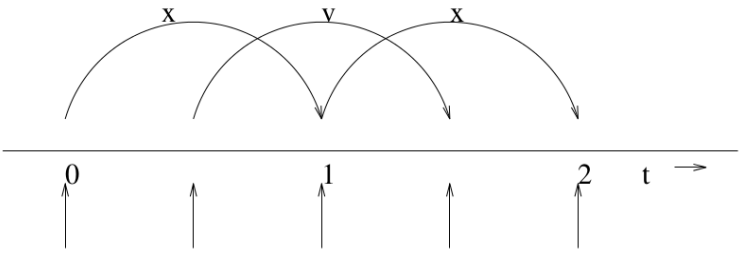
$$\vec{v}\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = \vec{v}\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \frac{\Delta t}{m}\vec{F}(t) \tag{2.10}$$

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \Delta t.\, \vec{v}\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) \tag{2.11}$$

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 Fig. 2.3.

O algoritmo *leap-frog* é uma modificação do algoritmo de Verlet, em que o fato de posição e velocidade serem intercaladas reduz a ocorrência de erros numéricos, fazendo com que as posições variem suavemente com o tempo. Ele é dito ser de terceira ordem em *r*, pois trunca os termos da série de Taylor (de onde são derivadas as Equações 2.9 e 2.10) no termo de quarta potência, $O(\Delta t^4)$ (VAN DER SPOEL et al., 2010).

Figura 2.3 – Esquematização do método *leap-frog*. Posições e velocidades são atualizadas de forma intercalada, em meio passos, como os saltos de um sapo ao andar.



Fonte: Extraída de VAN DER SPOEL et al., 2010.

2.1.3 Condições iniciais, minimização e equilibração

A utilização de um campo de forças permite o cálculo da energia potencial o que, em conjunto com a resolução das equações de movimento a partir de métodos numéricos, possibilita com que a energia potencial seja uma função contínua da posição e velocidade das partículas. Um requisito para a aplicação dos algoritmos numéricos, entretanto, são as condições iniciais do sistema, ou seja, a posição e a velocidade de cada partícula no instante $t = 0$. A distribuição das posições iniciais deve ser feita de forma a se evitar a ocorrência de aproximações indevidas entre átomos, podendo ser utilizados algoritmos que otimizam a geometria da distribuição inicial alterando a posição de partículas de forma a minimizar a energia potencial do sistema. Este processo, conhecido como minimização da energia consiste em ajustar as posições atômicas de forma a relaxar comprimentos ou ângulos de ligações químicas, evitando possíveis distorções nos potenciais harmônicos, e também evitar contatos indevidos entre pares de átomos, que causariam valores espurios no potencial de van der Waals.

De modo geral, os algoritmos para minimização de energia avaliam a superfície de energia potencial do sistema calculando a força resultante sobre cada átomo pelo gradiente da energia potencial e aplicando pequenas modificações às posições atômicas na direção de um mínimo, num processo iterativo que é repetido até que a diferença de energia entre dois passos atinja determinado valor de convergência. Os algoritmos de minimização de energia mais utilizados são o método *steepest descent*, que é muito eficiente para configurações distantes do mínimo, mas converge lentamente quando o sistema estiver nas proximidades de

um mínimo, e o método dos gradientes conjugados, mais sofisticado e custoso computacionalmente, apresentando uma convergência mais rápida nas proximidades do mínimo.

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. O sistema obtido nas condições iniciais entretanto não estará em equilíbrio termodinâmico, por isso é comum desprezar os passos iniciais de uma simulação, de forma a evitar saltos nas propriedades físicas, ou então realizar o aquecimento em incrementos pequenos da temperatura. Este período é chamado de equilibração do sistema sua duração 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 do sistema simulado 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 empregados 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 constantes), o canônico, ou *NVT* (número de partículas, volume e temperatura são constantes), e o isotérmico-isobárico, ou *NPT* (número de partículas, pressão e temperatura são constantes) (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008).

Embora fisicamente seja interessante poder controlar a energia de um sistema, de maneira geral simulações precisam fornecer resultados passíveis de serem comparados a medições experimentais, onde é difícil assegurar a conservação da energia do sistema. Pressão, temperatura e quantidade/concentração de reagentes, por outro lado, são grandezas frequentemente controladas em técnicas 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 feito através do reescalonamento 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; DONADIO; PARRINELLO, 2007) e Nosé-Hoover (HOOVER, 1985; NOSÉ, 1984). Controlar as velocidades dos átomos significa controlar diretamente a energia cinética do sistema, mas como a variação das posições depende das velocidades, e a energia potencial por sua vez é função das posições, o banho térmico implica no controle também da energia potencial, e consequentemente da energia total do sistema simulado (PASCUTTI, 2019).

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 neste caso, reescalonando as coordenadas e as dimensões da caixa de simulação, de forma a manter um volume de referência. Os algoritmos que implementam este processo são chamados de barostatos e os métodos mais comuns são os barostatos de Berendsen (BERENDSEN et al., 1984) e o de Parrinello-Rahman (NOSÉ; KLEIN, 1983; PARRINELLO; RAHMAN, 1981).

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, quantidades praticamente insignificantes se comparadas ao número de átomos em sistemas macroscópicos (~10^{23} partículas), o que torna necessário um tratamento para que não haja influência de efeitos de borda 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 Fig. 2.4). Matematicamente, as condições periódicas de contorno são aplicadas pela correção no descolamentoΔr_n que será aplicado à posição do átomo *i*:

$$\Delta r_{n_i} = \Delta r_{n_i} - L_n, \text{ se } \Delta r_{n_i} > \frac{L_n}{2} \qquad (2.12)$$

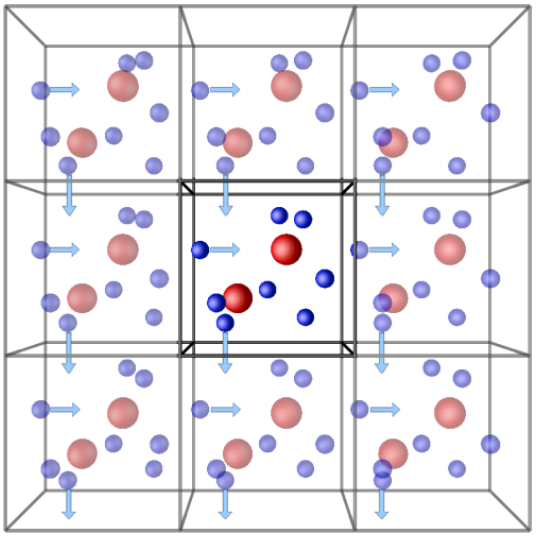
$$\Delta r_{n_i} = \Delta r_{n_i} + L_n, \text{ se } \Delta r_{n_i} < \frac{-L_n}{2},$$

com $n = x, y, z$ e L indicando o tamanho da caixa de simulação.

Este tratamento faz com que os átomos do sistema nunca enxerguem uma borda e garante que o número total de partículas na caixa de simulação seja sempre o mesmo (fica então assegurada a conversação 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 próprio 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 2.4 – Idealização das condições periódicas de contorno: a caixa de simulação onde o sistema de interesse foi construído (célula central) é replicada num número infinito de réplicas, nas três direções.



Fonte: <isaacs.sourceforge.net/phys/pbc.html>. Acesso em 23/06/2022.

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, a caixa de simulação é deformada 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, implicando portanto numa soma de infinitos termos. 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 cada dimensão da caixa seja, no mínimo, igual ao respectivo tamanho 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 às interações de curto alcance pois estas decaem com $\sim r^6$. 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

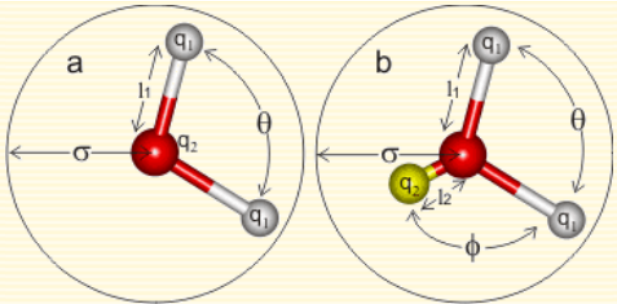
somas de Ewald, sendo o mais comum o PME (*Particle Mesh Ewald*) (DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993; ESSMANN et al., 1995), ou por métodos aproximativos como o *Reaction-Field* (TIRONI et al., 1995) , ou mesmo através de um raio de corte, porém com a precaução de introduzir uma função potencial que faça a 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 biológicos e, buscando representar uma situação realista, simulações por Dinâmica Molecular devem incluir a representação da ação do solvente sobre o sistema (de forma implícita, através de uma constante dielétrica, ou de forma explícita, com a inclusão propriamente dos átomos 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, a molécula de H_2O propriamente, modelos com quatro sítios (um falso átomo é incluído para melhor representar a distribuição eletrostática da molécula; ver Fig. 2.5), 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 interação. 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).

Figura 2.5 – 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, $\sigma = 3{,}167$ Å, $q_1 = +0{,}410$, $q_2 = -0{,}820$, $l_1 = 1$ Å e $\theta = 109{,}47°$.



Fonte: <http://www1.lsbu.ac.uk/water/water_models.html>. Acesso em 26/06/2022.

2.1.8 Estrutura e topologia das moléculas

Como comentado anteriormente, o campo de forças define o ambiente físico em que será desenvolvida uma simulação. Faz-se necessário portanto 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. Em algumas situações, 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 semi-empíricos, 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 anteriormente parametrizadas com sucesso no campo de forças.

2.1.9 Pacotes de simulação para dinâmica molecular

Nas seções acima realizou-se um breve resumo de tópicos fundamentais ao desenvolvimento de simulações por dinâmica molecular. Na prática, as simulações são desenvolvidas 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 (*Chemistry at Harvard Molecular Mechanics*) (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 de uma estrutura e topologia fornecida para as 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 campos de forças modificados e até mesmo de desenvolvimento próprio.

2.2 Descrição dos Sistemas Simulados

Os sistemas simulados neste estudo consistem de caixas de simulação, todas paralelepipédicas, contendo uma bicamada POPC de 130 lipídios (65 por monocamada) e aproximadamente 4600 moléculas de água (~35 por lipídio). A simulação de controle consiste de uma bicamada pura, somente lipídios e água, desenvolvida por 1500 ns e validada a partir de resultados experimentais (RAND; PARSEGIAN, 1989; HYSLOP; MOREL; SAUERHEBER, 1990; SMABY et al., 1997; KUČERKA; NIEH; KATSARAS, 2011) e de simulações (ZHAO et al., 2007; DO CANTO et al., 2011; MACDERMAID et al., 2015; CAPPONI et al., 2016) apresentados na literatura. As propriedades calculadas para a bicamada pura serão utilizadas como parâmetro de referência para avaliar a ação da curcumina sobre o sistema.

No primeiro conjunto de simulações, partindo de uma bicamada pura estabilizada (configuração extraída da simulação de controle), 1, 2, 4, 8 ou 16 moléculas de curcumina foram inseridas aleatoriamente na fase aquosa da caixa de simulação, variando a concentração de curcumina por meio da razão curcumina/lipídio. A distância mínima inicial entre as moléculas de curcumina foi de 12 Å, sendo também respeitada uma distância de pelo menos 10 Å entre cada molécula de polifenol e a bicamada, de forma a evitar que a disposição inicial das moléculas induzisse sua agregação ou sua interação prévia com a bicamada. Para relaxar conflitos estéricos decorrentes da construção do sistema, as caixas de simulação foram submetidas a um processo de minimização de energia, alternando passos de *steepest descent* e gradientes conjugados até ser obtido valor de convergência de 200 kJ/mol/nm, passando então por uma dinâmica de equilibração de 2 ns, sendo o primeiro ns com a posição das moléculas de lipídio e curcumina restringidas de forma a garantir uma solvatação adequada. Uma subsequente dinâmica de produção foi desenvolvida para observar a interação e estabilização da curcumina na bicamada. O tamanho destas simulações, e também de suas réplicas, varia de um sistema para outro, sendo essencialmente proporcional ao número de moléculas de curcumina na caixa de simulação (ver Tabelas 2.1 e 2.2). Foram desenvolvidas réplicas (variando a distribuição de velocidades) para os sistemas com 1, 8 e 16 moléculas. As réplicas de 16 moléculas apresentam um tempo de simulação menor do que a simulação principal, sendo desenvolvidas até que os resultados das análises aplicadas (ver Seção 2.4) indicassem que o processo de adsorção e estabilização da curcumina na bicamada eram equivalentes ao

verificado na dinâmica principal, isto é, qualitativamente repetindo o processo de adsorção e dispersão já descrito na simulação mais longa.

Num segundo conjunto de simulações, a inserção da curcumina na fase aquosa foi realizada de forma progressiva, uma molécula por vez. Neste caso, uma molécula é inserida na fase aquosa e a simulação é desenvolvida por 100 ns, período no qual ocorre sua adsorção na bicamada. A partir da configuração final desta janela, uma nova caixa de simulação foi construída com a inserção de uma nova molécula de curcumina, sempre na fase aquosa. O protocolo utilizado na construção das janelas (distância mínima em relação à bicamada, minimização e equilibração do sistema) é o mesmo descrito anteriormente. A inserção da molécula adicional de curcumina na fase aquosa pode requerer a deleção de moléculas água que estiverem muito próximas à molécula alvo inserida, e/ou o aumento da coluna de água (eixo *z* da caixa de simulação), e recentralização da bicamada na caixa de simulação, mas sem realizar modificações nas moléculas de água que estão hidratando a bicamada ou próximas desta, e sem alterar as dimensões do plano da bicamada (plano *xy*). Alternando deleção e aumento da coluna de água foi mantida a proporção de ~35 moléculas de água por lipídio na caixa.

Pelo método de inserção progressiva, na *n*-ésima janela tem-se uma bicamada contendo $(n - 1)$ moléculas de curcumina adsorvidas e uma molécula adicional de polifenol na fase aquosa. Foram produzidas 32 janelas, amostrando portanto sistemas contendo de 1 a 32 moléculas de curcumina. A partir da configuração final da 16ª janela, uma bicamada com 16 moléculas de curcumina adsorvidas portanto, simulações de extensão foram desenvolvidas, possibilitando a comparação com o sistema equivalente no primeiro conjunto. Na 24ª e 32ª janelas também foram desenvolvidas extensões para avaliar o efeito do acréscimo de moléculas sobre a estrutura por elas formadas no interior da bicamada. Em ambos os conjuntos, simulações contendo 0.15 mol/L de NaCl foram realizadas para avaliar se a presença de sal afetava a dinâmica de interação da curcumina com a bicamada, e também simulações com T_{ref} = 320K, para avaliar possíveis efeitos do aumento da temperatura.

Uma variação do protocolo de inserção progressiva consistiu em selecionar, a partir de réplicas da janela, somente casos em que a molécula adicional de curcumina tivesse adsorvido por uma interface específica, impondo assim que todas se internalizassem pela mesma monocamada, de forma a poder comparar com a inserção livre, sem tal restrição, e na

tentativa de mimetizar a situação real de experimentos de deposição de curcumina na superfície de vesículas.

Tabela 2.1 – Quadro resumo do primeiro conjunto de simulações.

Simulação	**Nro. de moléculas de curcumina**	**Tempo de simulação (ns)**	**Descrição**
Pure	0	1500	Bicamada pura (sistema de controle).
1Curc	1	500	1 curcumina inserida na fase aquosa.
1Curc_R1	1	500	Réplica de 1Curc.
1Curc_R2	1	500	Réplica de 1Curc.
2Curc	2	500	2 moléculas de curcumina aleatoriamente inseridas na fase aquosa.
4Curc	4	500	4 moléculas de curcumina aleatoriamente inseridas na fase aquosa.
8Curc	8	1000	8 moléculas de curcumina aleatoriamente inseridas na fase aquosa.
8Curc_R1	8	1000	Réplica de 8Curc.
8Curc_R2	8	1000	Réplica de 8Curc.
16Curc	16	6000	16 moléculas de curcumina aleatoriamente inseridas na fase aquosa.
16Curc_R1	16	1500	Réplica de 16Curc.
16Curc_R2	16	1500	Réplica de 16Curc.
16Curc-NaCl	16	3000	16 moléculas de curcumina aleatoriamente inseridas na fase aquosa. Adicionado 0.15 mol/L de NaCl à caixa de simulação.

Tabela 2.2 – Quadro resumo do segundo conjunto de simulações.

Simulação	**Nro. de moléculas de curcumina**	**Tempo de simulação (ns)**	**Descrição**
Progressive	1 ~ 32	32 x 100	1 molécula de curcumina inserida na fase aquosa a cada 100 ns. Cada nova janela é construída a partir da configuração final da anterior.
P8	8	500	Extensão da simulação contendo 8 moléculas de curcumina adsorvidas, obtida a partir de inserção progressiva.
P16	16	1900	Extensão da simulação contendo 16 moléculas de curcumina adsorvidas, obtida a partir de inserção progressiva.
P16-NaCl	16	500	Extensão da simulação contendo 16 moléculas de curcumina adsorvidas, obtida a partir de inserção progressiva. Com 0.15 mol/L de NaCl.
P16-320K	16	500	Extensão da simulação contendo 16 moléculas de curcumina adsorvidas, obtida a partir de inserção progressiva. T_{ref} = 320K.
P24	24	500	Extensão da simulação contendo 24 moléculas de curcumina adsorvidas, obtida a partir de inserção progressiva.
P32	32	500	Extensão da simulação contendo 32 moléculas de curcumina adsorvidas, obtida a partir de inserção progressiva.
P32-NaCl	32	500	Extensão da simulação contendo 16 moléculas de curcumina adsorvidas, obtida a partir de inserção progressiva. Com 0.15 mol/L de NaCl.
P32-320K	32	500	Extensão da simulação contendo 16 moléculas de curcumina adsorvidas, obtida a partir de inserção progressiva. T_{ref} = 320K.
Progressive (top_leaflet)	1~16	16 x 100	1 molécula de curcumina adicionada na fase aquosa a cada 100 ns. Cada nova janela é construída a partir da configuração final da anterior, sendo selecionadas (dentre réplicas) somente casos em que a nova molécula de curcumina tenha adsorvido pela monocamada superior.

2.3 Detalhes Computacionais

As simulações por dinâmica molecular deste estudo foram desenvolvidas empregando-se o *suite* de programas para simulação GROMACS (BERENDSEN; VAN DER SPOEL; VAN DRUNEN, 1995; ABRAHAM et al., 2015) e implementadas utilizando o campo de forças GROMOS96 53a6 (OOSTENBRINK et al., 2004), modificado com os parâmetros de Berger (BERGER; EDHOLM; JÄHNIG, 1997) para representação de lipídios (*united atoms*). Neste modelo, uma molécula de POPC, originalmente constituída por 132 átomos, é representada por 52 pseudo-átomos, através da substituição de grupos CH, CH_2 e CH_3 pouco reativos das caudas dos fosfolipídios, e do grupo colina, por um novo tipo de átomo representativo das propriedades do grupo (ver Fig. 2.2). Este modelo híbrido resulta num melhor desempenho computacional, sem perda na qualidade de representação do sistema, conforme mostram estudos de comparação entre o campo de forças utilizado e outros que empregam representação explícita de todos os átomos (*all atoms*) (SAPAY; TIELEMAN, 2008; POGER; CARON; MARK, 2016). A estrutura e topologia utilizada para as moléculas de POPC foi a distribuída por Tieleman (TIELEMAN; BERENDSEN, 1998), enquanto que a topologia da molécula de curcumina foi obtida utilizando o *Automated Topology Builder* (ATB) (MALDE et al., 2011; KOZIARA et al., 2014), ver Anexo A, orientado à parametrização de moléculas nos campos de força GROMOS. Para as moléculas de água, utilizou-se o modelo SPC (BERENDSEN et al., 1981), um modelo de três sítios adequado às simulações no campo de forças empregado.

Para integração das equações de movimento foi utilizado o algoritmo *leap-frog*, com passo de integração de 2 fs. Às simulações foram aplicadas condições periódicas de contorno tridimensionais, sendo utilizado o algoritmo PME (DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993) para tratamento das interações eletrostáticas de longo alcance, e um raio de corte de 12 Å para as interações de curto alcance entre átomos não-ligados. O algoritmo LINCS (HESS et al., 1997) foi utilizado para controle dos comprimentos das ligações atômicas nas moléculas, e o algoritmo SETTLE (MIYAMOTO; KOLLMAN, 1992) para manutenção da geometria das moléculas de água. As simulações foram desenvolvidas no *ensemble* estatístico NPT, com uma temperatura de referência de 310K (37º C), controlada através do termostato de Nosé-Hoover (NOSÉ, 1984; HOOVER, 1985), com acoplamento para dois grupos independentes (água e lipídios/curcumina), enquanto que a pressão de referência de 1 bar (0.987 atm) foi assegurada através do barostato de Parrinello-Rahman (PARRINELLO;

RAHMAN, 1981; NOSÉ; KLEIN, 1983), com acoplamento semi-isotrópico (com o plano da bicamada, *xy* acoplados, mas *z* independente). O valor de referência escolhido para a temperatura do sistema está bem acima da temperatura de transição de fase de bicamadas POPC, 268K (SEELIG; WAESPE-SARCEVIC, 1978; LEEKUMJORN; SUM, 2007), assegurando que os eventos analisados ocorrem com as bicamadas na fase líquido-cristalina, fase em que apresentam atividade biológica.

2.4 Análise das Simulações

As análises aplicadas às simulações foram realizadas utilizando-se *softwares* do próprio pacote de simulação, dos *softwares* GridMAT-MD (ALLEN; LEMKUL; BEVAN, 2009) para cálculo da área por lipídio e o Membplugin (GUIXÀ-GONZÁLEZ et al., 2014) para cálculo da espessura das bicamadas ao longo do plano (espessura bidimensional), VMD (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996), para visualização de moléculas e trajetórias; além de programas e *scripts* próprios desenvolvidos para fins específicos.

2.4.1 Propriedades da bicamada

A espessura de uma bicamada consiste na distância, ao longo do eixo normal ao plano da bicamada (eixo *z*), entre os dois planos médios, um em cada monocamada, estabelecidos pela posição do átomo de fósforo dos fosfolipídios. Definida desta forma, a espessura não corresponde à espessura da fase hidrofóbica da bicamada, estando compreendidas no valor a região hidrofóbica e também a região hidratada de cada monocamada. Uma extensão deste conceito permite calcular a espessura da bicamada ao longo do plano para análise de perturbações locais. Neste caso, o plano *xy* é dividido em um *grid* de pontos e um valor de espessura é calculado em cada. A espessura bidimensional da bicamada será a média temporal do valor obtido para cada ponto do *grid* ao longo do período de simulação analisado (média sobre os *frames*).

O parâmetro de ordem (S_{CD}) permite a análise da organização das cadeias de carbono, que constituem as caudas dos fosfolipídios, em relação ao plano da bicamada. A orientação das caudas é obtida para cada grupo CH_2 a partir da equação:

$$S_{CD} = \frac{1}{2}(3\langle cos\zeta \rangle - 1), \quad (2.13)$$

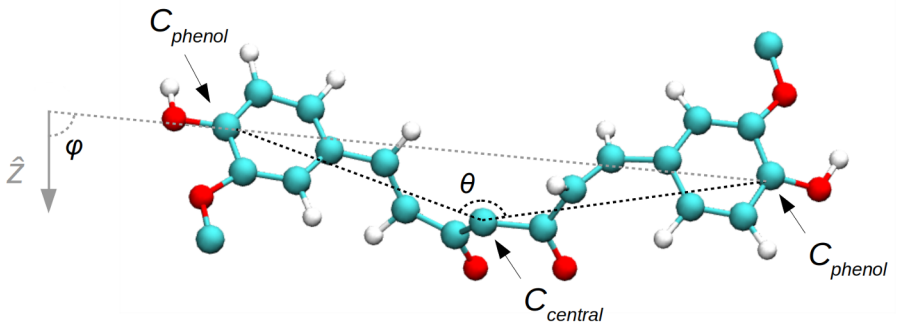
onde ζ é o ângulo entre o vetor C–H e o eixo normal ao plano da bicamada (eixo *z*); os colchetes da expressão indicam que o valor calculado é uma média sobre o espaço de configurações e também uma média temporal (YANG; MARTÍ; CALERO, 2016). Quanto maior o valor do | S_{CD} |, maior é o ordenamento da cauda e mais próxima a ligação entre os átomos de carbono C_{n-1} e C_{n+1} da cadeia está na perpendicular ao plano da bicamada (ver Fig. 2.2).

Um algoritmo específico (CAMILO; RUGGIERO; DE ARAUJO, 2022) foi desenvolvido para a identificação e análise de eventos de permeação de moléculas de água através da estrutura lipídica, o que permite calcular o coeficiente de permeabilidade da bicamada. Modificações no parâmetro de ordem e na permeabilidade da bicamada estão associadas à alterações na fluidez do sistema, e serão avaliadas a partir da comparação com o resultado obtido na bicamada pura.

2.4.2 Interação e organização das moléculas de curcumina

O critério utilizado para a definição de *cluster* foi que duas moléculas diferentes, em um determinado instante, estejam a uma distância menor ou igual ao valor calculado para o primeiro mínimo da função de distribuição radial de pares (RDF), verificado numa simulação de 16 moléculas de curcumina em água. Sendo assim, em um determinado *frame*, duas moléculas de curcumina são ditas estarem no mesmo *cluster* se a distância de pelo menos um par de átomos de moléculas diferentes for inferior a 6,25 Å. Para a análise de *clusters* foram considerados apenas três átomos representativos em cada molécula: os dois átomos de carbono fenólicos, um em cada extremidade da molécula de curcumina, e o átomo de carbono central (ver Fig. 2.6).

Figura 2.6 – Estrutura da molécula de curcumina, na representação de átomos unidos, com destaque para os átomos de carbono fenólicos e no carbono central. Átomos de carbono são mostrados em ciano, de oxigênio em vermelho e de hidrogênio em branco.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O ângulo theta (θ), definido entre os átomos C_{phenol} _ $C_{central}$ - C_{phenol} , indica a conformação da molécula de curcumina, sua abertura, podendo assumir valores entre 0~180º. O ângulo phi (φ) é utilizado para avaliar a orientação da molécula e é definido como o ângulo entre o vetor C_{phenol} - C_{phenol} e o eixo *z*. Considerando a simetria da molécula de curcumina em relação ao átomo de carbono central, phi pode assumir valores entre 0 (a molécula está paralela ao eixo *z* / perpendicular ao plano da bicamada) e 90º (a molécula está perpendicular ao eixo *z* / paralela à bicamada).

3 PROCESSO DE ADSORÇÃO DA CURCUMINA NA BICAMADA

A molécula de curcumina apresenta grupos hidrofóbicos com um anel em cada extremidade, ligados por uma cadeia acíclica (ver Fig. 2.6). Entretanto, ao longo de toda sua estrutura são observados grupos polares, como a hidroxila fenólica (destacada) em cada um dos anéis e dois grupos carbonila no centro da molécula. Quando inserida na fase aquosa, as moléculas de curcumina tendem a se agregar numa estrutura que minimize a exposição dos grupos apolares à água, mas ainda assim hidratada de forma a manter a estabilidade de seus grupos polares (HAZRA; ROY; BAGCHI, 2014; LYU et al., 2018). Utilizando simulações por dinâmica molecular, Lyu e colaboradores (2018), estudaram a interação de uma molécula de curcumina com diversos tipos de bicamadas a 303 K e observaram que sua internalização ocorre em todas as bicamadas, exceto para dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), constituída por fosfolipídios com duas caudas saturadas e que se apresenta na fase gel para à temperatura simulada (T_m = 336K). Suas simulações compreenderam 300~1000 ns e foram desenvolvidas empregando representação explícita para todos os átomos e utilizando campo de forças e modelo de água diferentes dos utilizados neste trabalho. Para a bicamada POPC, os autores verificaram que a molécula de curcumina se estabiliza no interior da estrutura, a 7,0 Å da interface e 11,4 Å do centro da bicamada. Os tempos obtidos para inserção da molécula na bicamada POPC variam entre 4 e 70 ns.

Conciliando experimentos de difração de raios-X em vesículas e simulações por dinâmica molecular de bicamadas DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina), Alsop e colaboradores (2017) localizaram o pico da distribuição de curcumina a 8 Å do centro da membrana na abordagem experimental e a 10 Å nas simulações, resultados que concordam bem com o mínimo que obtiveram para o perfil de energia livre, a 9 Å do centro da estrutura lipídica. Suas simulações de dinâmica molecular consistiram de 200 ns, com duas moléculas de curcumina inseridas inicialmente na fase aquosa. Os parâmetros utilizados são similares aos aqui empregados, mas a uma temperatura diferente, 301K, e utilizando outro tipo de fosfolipídio; o DMPC possui duas caudas saturadas, como o DPPE, mas de cadeias menores, com 14 átomos de carbono (T_m = 290K).

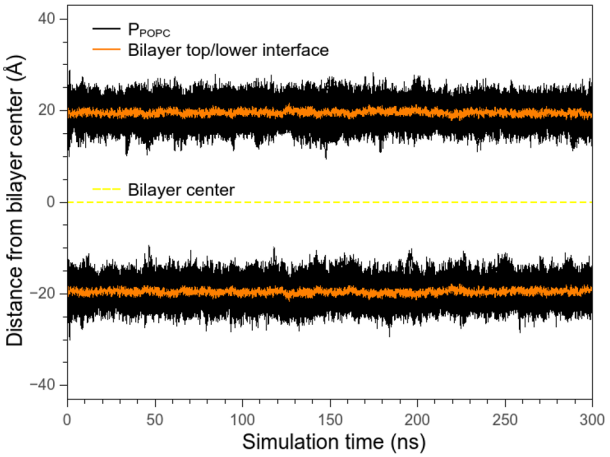
A presença de uma molécula de curcumina nas bicamadas resulta em pequenas alterações em propriedades destas, sendo observada a redução na área por lipídio na monocamada em que a molécula está presente (a monocamada oposta não é afetada), e um sutil aumento na espessura da bicamada (CAMILO, 2017; LYU et al., 2018) mas as variações observadas normalmente estão compreendidas no erro do valor calculado para os sistemas de controle (sem curcumina). Portanto, embora a curcumina seja localizada no interior da membrana, as informações obtidas da interação da bicamada com uma (ou duas) moléculas de curcumina nos permitem avançar pouco em relação ao seu mecanismo de ação. Tais resultados levantam o questionamento de se o efeito conjunto de várias moléculas de curcumina sobre a bicamada ocorre da mesma forma, com as moléculas individualmente se estabilizando no limite entre as regiões hidratada e hidrofóbica do sistema, ou se a interação entre elas produz algum tipo de ação cooperativa, alterando o processo de adsorção e estabilização da curcumina na bicamada.

A inserção de diferentes quantidades de moléculas na fase aquosa do sistema possibilitou estudar o efeito da concentração (variando-se a razão curcumina/lipídios) e avaliar a ação conjunta de várias moléculas, os efeitos da agregação da curcumina na fase aquosa, sua adsorção na bicamada como um *cluster* e a subsequente dinâmica de interação destas moléculas com os lipídios da bicamada. Empregando um método distinto, com a inserção gradual e progressiva de moléculas na caixa de simulação, num protocolo que busca mimetizar um processo de titulação, foi possível analisar a adsorção individualizada na bicamada, uma molécula de curcumina por vez, e avaliar a dinâmica de interação entre as moléculas, com foco em efeitos da possível formação de *clusters* a partir moléculas já no interior da bicamada. A comparação dos resultados obtidos pelos dois protocolos, a partir de sistemas contendo o mesmo número de moléculas de curcumina, possibilitou analisar se o efeito dos *clusters* de curcumina é diferente da ação individual de moléculas dispersas, assim como avaliar a importância da região em que tais agregados (se na fase aquosa, no interior da bicamada), e comparar se, com evolução da interação das moléculas de curcumina com o lipídios, os dois protocolos produzirão resultados equivalentes.

3.1 Interação das Bicamadas com Várias Moléculas de Curcumina

Uma forma de avaliar a interação de um conjunto de moléculas com uma estrutura pré-formada (neste caso, a bicamada) é acompanhar a evolução temporal do centro de massa (COM) em determinada coordenada de reação. Considerando que numa bicamada os lipídios estão dispostos no plano *xy* em duas monocamadas antiparalelas, para avaliar a interação de uma molécula de interesse (a curcumina) com a estrutura lipídica, podemos acompanhar a posição no eixo *z* de átomos da molécula em relação à bicamada. Tipicamente, os átomos de fósforo dos fosfolipídios (ver Fig. 2.2) são tomados como representativos da molécula e os dois planos estabelecidos por estes (um em cada monocamada) são utilizados para definir os limites superior e inferior da estrutura lipídica com a fase aquosa. Desta forma, plotando a projeção em *z* dos átomos de fósforo ao longo do tempo é possível visualizar as oscilações temporais nos limites da bicamada (ver Fig. 3.1). Esta informação pode ser simplificada calculando-se o valor médio para os fosfolipídios componentes de cada monocamada, definindo assim os limites superior e inferior da bicamada em cada instante da simulação (linhas em laranja). Em simulações por dinâmica molecular, a espessura da bicamada é tomada como sendo a distância entre os dois planos médios definidos pelo átomo de fósforo dos fosfolipídios (ZHAO et al., 2007). Portanto, nos gráficos temporais apresentados a seguir, a distância entre as linhas em laranja fornece a espessura da bicamada em cada instante da simulação, enquanto que a média entre elas é o centro geométrico da estrutura (linha em amarelo).

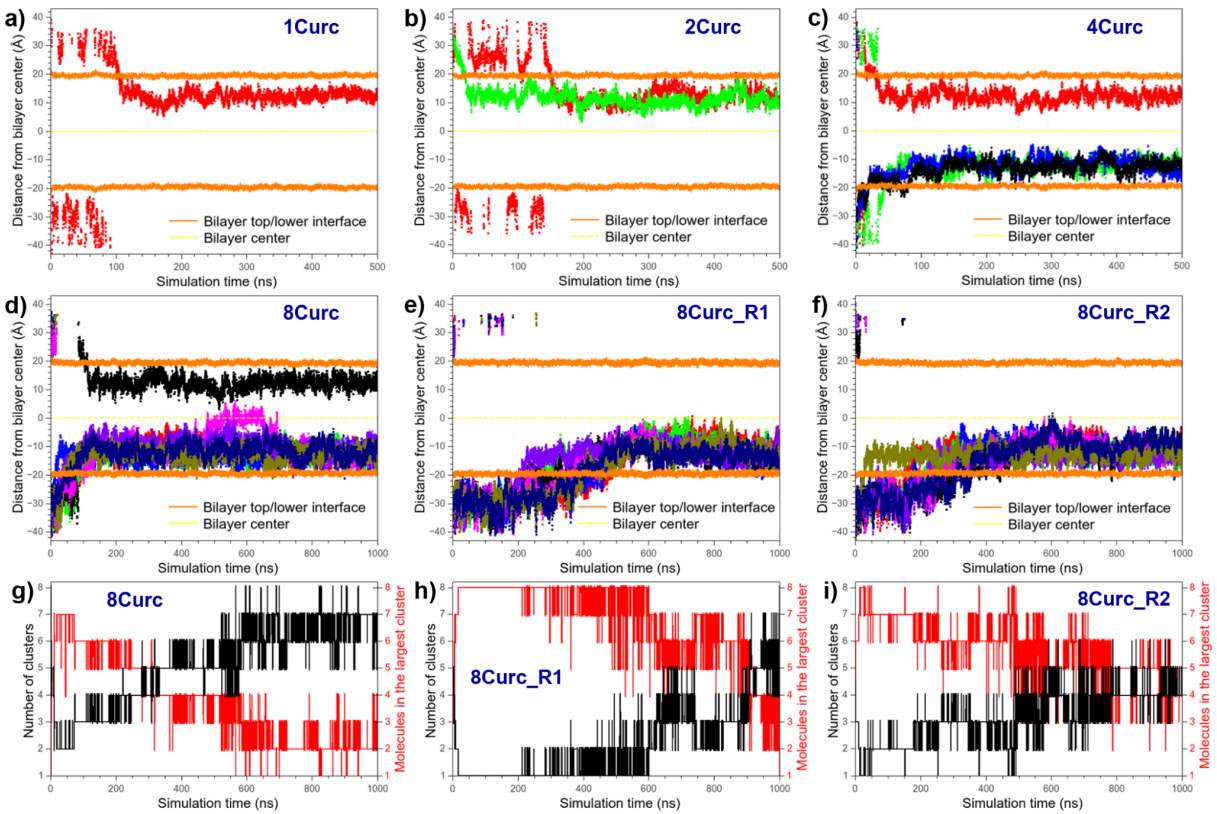
Figura 3.1 – As linhas em preto indicam a componente *z* da posição do átomo de fósforo de cada fosfolipídio da bicamada, em cada instante da simulação. Calculando-se a média para os lipídios componentes de cada monocamada (linhas em laranja) é possível definir os limites superior e inferior da bicamada. O centro da bicamada (linha tracejada em amarelo) é calculado como centro geométrico entre as duas monocamadas e utilizado como parâmetro de normalização.



A evolução da interação de 1, 2, 4 ou 8 moléculas de curcumina com uma bicamada POPC é apresentada na Figura 3.2. Nas figuras, as linhas em laranja indicam os limites da bicamada, enquanto os pontos coloridos mostram a posição do centro de massa (COM). Em todos os sistemas, a curcumina, inicialmente inserida na fase aquosa, interage com a bicamada e adsorve na estrutura, podendo ocorrer internalização por ambas as monocamadas, ou somente por uma delas. A dinâmica observada para os sistemas contendo 1, 2 ou 4 moléculas (Fig. 3.2a-c) é semelhante, com as moléculas predominantemente adsorvendo individualmente na bicamada, sem que haja um processo de agregação da curcumina ainda na fase aquosa. Uma vez no interior da bicamada, embora possam ser estabelecidos dímeros de moléculas (resultado não apresentado), tais *clusters* são temporários e não fornecem nenhuma informação relevante. Na interação de 8 moléculas de curcumina (Fig. 3.2d-f), as moléculas estruturam-se num *cluster* ainda na fase aquosa e posteriormente adsorvem na bicamada. A análise da agregação das moléculas (Fig. 3.2g) mostra que o *cluster* formado concentra praticamente a totalidade das moléculas da caixa de simulação, num processo semelhante ao observado para moléculas de curcumina em água pura (HAZRA; ROY; BAGCHI, 2014; LYU et al., 2018). O agregado se internaliza na bicamada e gradativamente ocorre a dispersão das moléculas, desfazendo o *cluster* – a partir dos 600 ns de simulação, os maiores *clusters* observados possuem 1~3 moléculas, indicando que uma vez no interior da bicamada, as 8 moléculas passam a apresentar uma dinâmica semelhante à observada nos sistemas com 1, 2

ou 4 moléculas de curcumina. Embora a duração do processo de adsorção e a posterior dispersão das moléculas no interior da bicamada varie de uma simulação para outra, a análise das réplicas da simulação com 8 moléculas de curcumina (Fig. 3.2h-i) mostra o processo equivalente ao descrito anteriormente: agregação das moléculas em água, adsorção do *cluster*, e gradativa dispersão das moléculas pela bicamada, com a consequente redução no tamanho do maior *cluster*.

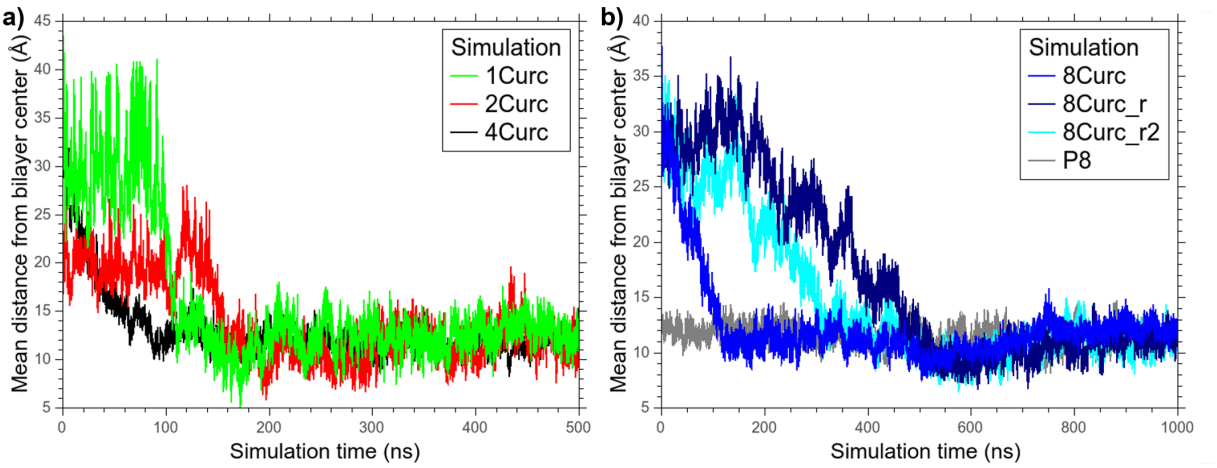
Figura 3.2 – Evolução temporal da interação entre as moléculas de curcumina e uma bicamada POPC para sistemas contendo 1 (a), 2 (b), 4 (c) ou 8 (d, e, f) moléculas de curcumina. A projeção em *z* da posição do centro de massa de cada molécula de curcumina é representada por pontos coloridos, uma cor para cada molécula. As linhas em laranja indicam os limites da bicamada, enquanto que a linha tracejada em amarelo indica o centro da estrutura lipídica. Número de *clusters* (preto) e quantidade de moléculas de curcumina no maior *cluster* (vermelho) para as simulações com 8 moléculas de curcumina (g, h, i).



Uma forma de comparar os sistemas com diferentes concentrações de curcumina é calcular a distância média das moléculas de polifenol (todas) ao centro da bicamada, independentemente da monocamada em que estão. Os valores apresentados para os sistemas contendo 1, 2 ou 4 moléculas (Fig. 3.3a) mostram que, uma vez internalizadas, há pouca

variação na distância ao centro da bicamada, indicativo de estabilidade na interação com os fosfolipídios. A média para os 300 ns finais da simulação com 1 molécula de curcumina é (12,6 ± 1,6) Å, em acordo com o obtido por Lyu e colaboradores (LYU et al., 2018). Os valores para 2 e 4 moléculas são, respectivamente, (11,5 ± 1,8) Å e (11,8 ± 1,0) Å. Para os sistemas contendo 8 moléculas de curcumina (Fig. 3.3b), observa-se que um maior enterramento das moléculas logo após a adsorção do *cluster*, com valores da ordem de 10 Å, mas um afastamento quando ocorre a dispersão das moléculas e a desestruturação do *cluster*. Nos 300 ns finais, as médias calculadas para cada réplica da simulação com 8 moléculas de curcumina são (12,2 ± 0,7) Å, (10,8 ± 1,0) Å e (11,1 ± 1,0) Å.

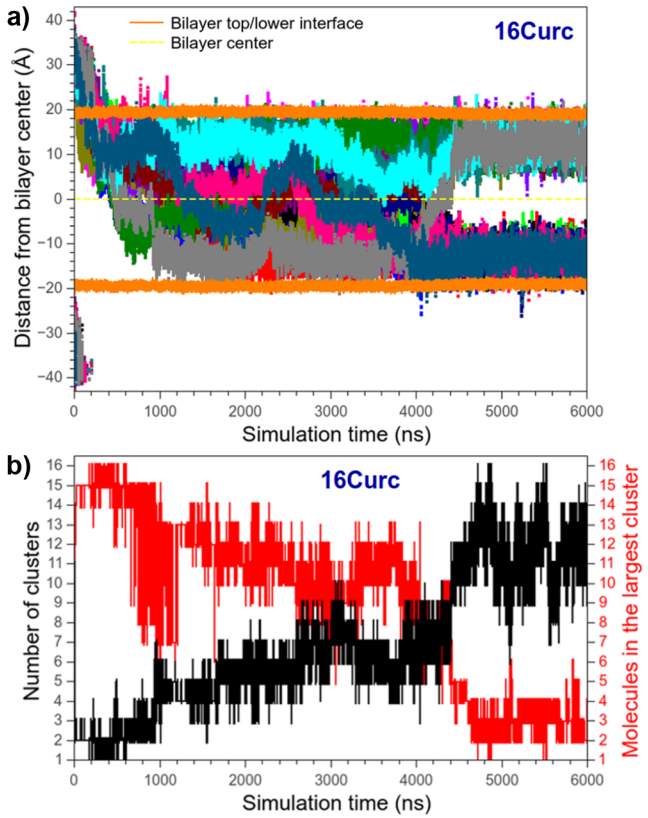
Figura 3.3 – Distância média das moléculas de curcumina (COM) ao centro da bicamada. São mostrados os resultados para as simulações com 1, 2, 4 e 8 moléculas inseridas aleatoriamente na fase aquosa; na simulação P8 também há 8 moléculas de curcumina ligadas na bicamada, mas a inserção das moléculas foi realizada por outro método (ver Seção 3.2).



Os resultados indicam que, após a adsorção e dispersão do *cluster*, a interação entre curcumina e os lipídios da bicamada é equivalente para as diversas concentrações. Entretanto, o processo de adsorção nos casos em que ocorre a prévia formação do *cluster* (8 moléculas de curcumina) é diferente do observado quando as moléculas adsorvem individualmente: durante a internalização de um agregado, as moléculas de curcumina podem se enterrar mais profundamente na estrutura lipídica, chegando a avançar sobre o centro da bicamada (ver Fig. 3.2d). Uma forma de explorar melhor tal fenômeno e analisar possíveis efeitos sobre a bicamada é aumentando a quantidade de moléculas de curcumina. A Figura 3.4a mostra a interação de 16 moléculas de curcumina, inicialmente inseridas dispersas na fase aquosa, e

uma bicamada POPC. Conciliando com a análise de *clusters* (Fig. 3.4b), verificamos que, à exemplo do observado nas simulações com 8 moléculas de curcumina, as moléculas agregam-se essencialmente num único *cluster* (0~50 ns), que interage e adsorve totalmente na bicamada (50~400 ns). Assim como nas simulações anteriores, na presença de uma estrutura lipídica a curcumina particiona na bicamada (HAZRA; ROY; BAGCHI, 2014; LEITE et al., 2018); a dinâmica de inserção e posterior interação com os lipídios componentes da estrutura, entretanto, é um processo a ser explorado. A interação das 16 moléculas de curcumina com a bicamada também pode ser acompanhada a partir de alguns *frames* de simulação selecionados apresentados na Fig. 3.5.

Figura 3.4 – a) Interação entre 16 moléculas de curcumina inicialmente dispostas na fase aquosa e uma bicamada POPC. As linhas em laranja indicam os limites da bicamada e a linha tracejada em amarelo indica o centro da estrutura. A componente *z* da posição do centro de massa (COM) de cada molécula de curcumina é mostrada como pontos coloridos, uma cor diferente para cada molécula. b) Número de *clusters* (preto) e quantidade de moléculas de curcumina no maior *cluster* (vermelho).



A inserção de todo o *cluster* de 16 moléculas agora resulta no avanço sobre o centro da estrutura lipídica, com o agregado de moléculas interagindo com a fase aquosa pelas duas interfaces da bicamada (400~1000 ns), estabelecendo portanto uma estrutura transmembrânica. Assim como observando para 8 moléculas de curcumina, uma vez adsorvido, o grande *cluster* formado na fase aquosa gradativamente começa a perder moléculas (linha em vermelho na Fig. 3.4b), resultando no aumento no número de *clusters* (linha em preto). Este processo para 16 moléculas entretanto é significativamente mais lento, com o *cluster* inicial permanecendo como uma estrutura transmembrânica formada por 10~13 moléculas pela maior parte da simulação (1000~4000 ns). A partir dos 4000 ns os resultados mostram que a dispersão das moléculas se acentua e o *cluster* se desfaz (4000~4500 ns), permanecendo então somente *clusters* menores com 2~4 moléculas, resultado que remete aos dímeros e trímeros de moléculas observados nas simulações de 2, 4 ou 8 moléculas de curcumina. Uma diferença significativa para o caso de 16 moléculas é que elas se dispersam por ambas as monocamadas, isto é, o *cluster* inicial de 14~16 moléculas que havia se formado na fase aquosa e adsorvido na estrutura lipídica pela camada superior (ver Fig. 3.4a), avança sobre o núcleo hidrofóbico da bicamada estabelecendo assim um microdomínio formado por moléculas de curcumina. Esta estrutura não é estável naquele ambiente altamente hidrofóbico e se desfaz conforme ocorre a perda de moléculas do *cluster* inicial, sendo que tal processo se dá por ambas as monocamadas, resultando finalmente na desestruturação do agregado, com parte das moléculas de curcumina (9 moléculas) na monocamada superior, e as demais (7 moléculas) integrando a monocamada inferior - nas simulações apresentadas, não foi observada troca de moléculas de lipídios entre as monocamadas (movimento de *flip-flop*). Por esta perspectiva, a estrutura transmembrânica é um processo que possibilita a redistribuição das moléculas de curcumina entre as monocamadas da estrutura lipídica. Analisando alguns casos específicos é possível observar a mobilidade que o microdomínio transmembrânico traz à curcumina: uma vez adsorvidas na bicamada, há moléculas do *cluster* que sequer ultrapassam o centro da bicamada, permanecendo na monocamada superior por onde adsorveu (ver molécula em ciano na Fig. 3.4a), outras que avançam sobre o núcleo hidrofóbico e se estabilizam na monocamada oposta à que haviam se internalizado (azul escuro e rosa), e inclusive moléculas que chegam a adsorver pela interface superior, avançar pelo núcleo hidrofóbico passando a integrar a monocamada inferior, mas no processo de desestruturação do agregado transmembrânico acaba voltando à interface superior (ver molécula em cinza escuro).

Figura 3.5 – *Frames* extraídos da simulação de uma bicamada POPC e 16 moléculas de curcumina inicialmente inseridas na fase aquosa. Para facilitar a visualização, não são mostradas as moléculas de água, somente as de curcumina (em amarelo) e os lipídios (em cinza), cujos átomos de fósforo estão destacados (em laranja).

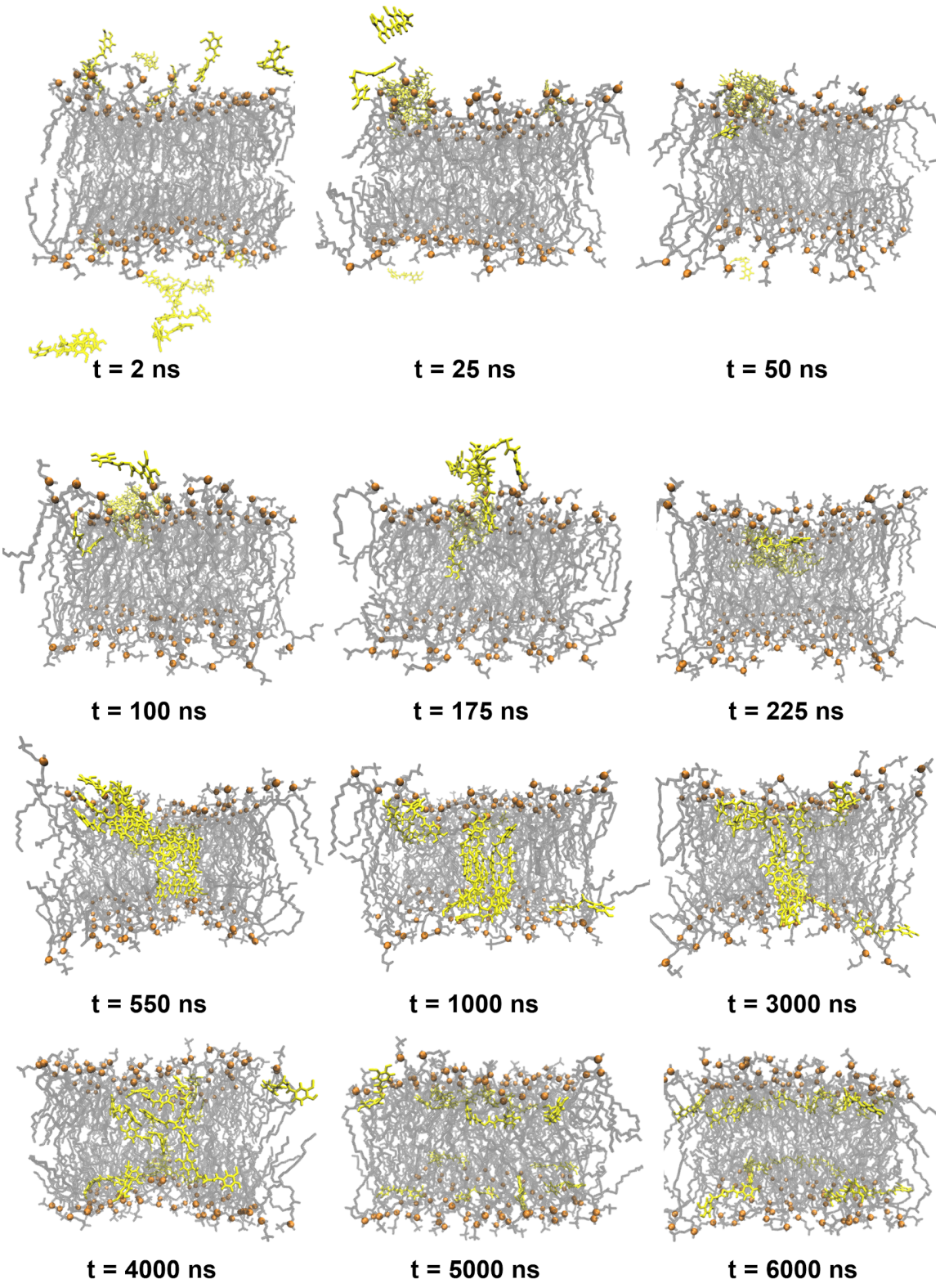
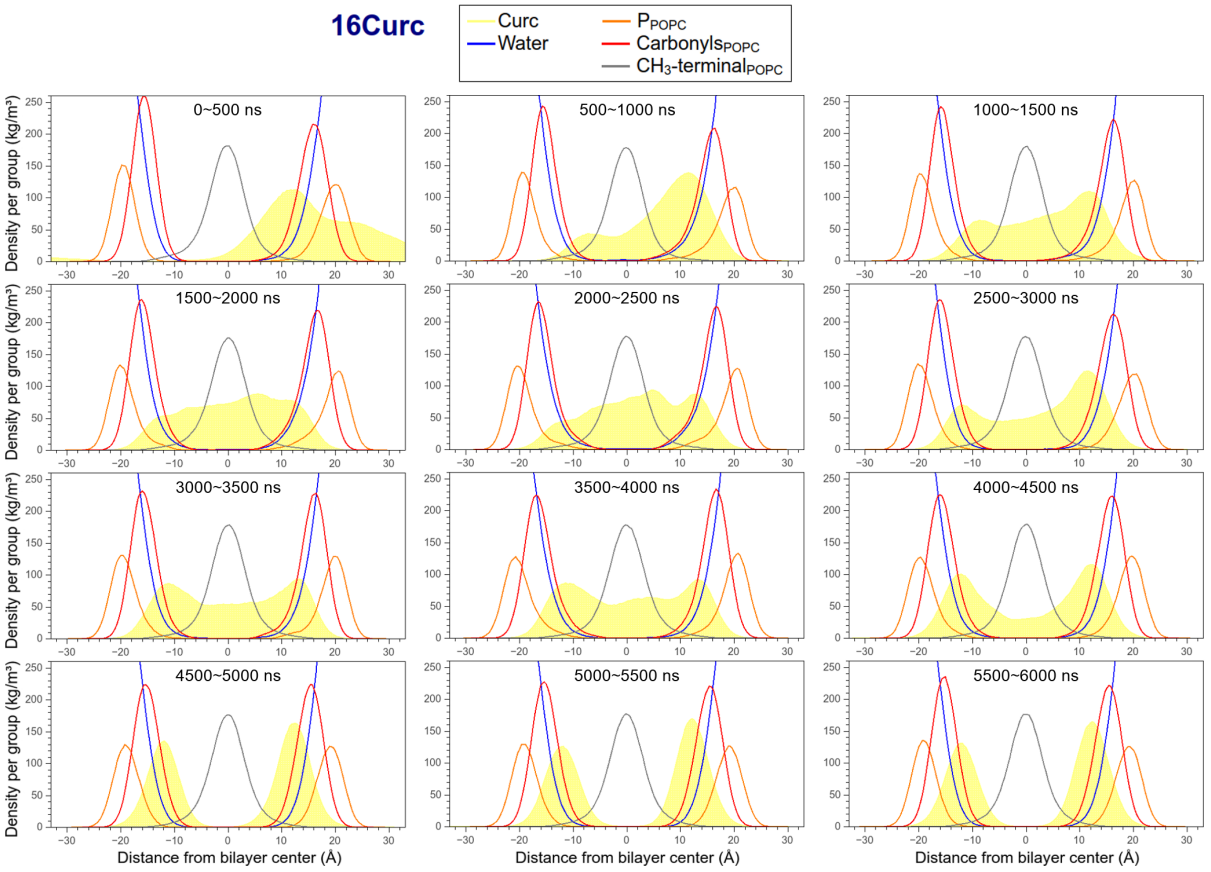


Figura 3.6 – Perfis de densidade para a curcumina (curvas preenchidas em amarelo), água (azul) e grupos de interesse nas moléculas de POPC, na simulação com 16 moléculas de curcumina. Os dados estão normalizados em relação ao centro da bicamada, sendo que os picos da distribuição dos átomos de fósforo (laranja) indicam os limites da bicamada, e portanto a espessura é definida como a distância de um pico ao outro. Cada janela representa a análise num intervalo de 500 ns de simulação.



A partir de experimentos em lipossomas utilizando uma técnica de rotulação de *spin* por ressonância eletrônica paramagnética (EPR *spin labeling*), Duda e colaboradores (2020) sugerem que a curcumina estabelece estruturas transmembrânicas pela associação de duas moléculas em orientação perpendicular ao plano da bicamada (mesmo em forma planar, uma única molécula seria insuficiente para ligar ambas as interfaces). Os resultados aqui apresentados revelam que tal estrutura é mais complexa do que a hipótese de um simples dímero de moléculas de curcumina em orientação perpendicular, interagindo no centro da bicamada através de seus grupos fenólicos em suas extremidades – o avanço de uma molécula individual sobre o centro da estrutura lipídica pode de fato ocorrer, como ilustrado na simulação com 8 moléculas de curcumina (ver Fig. 3.2d; a molécula em magenta sozinha

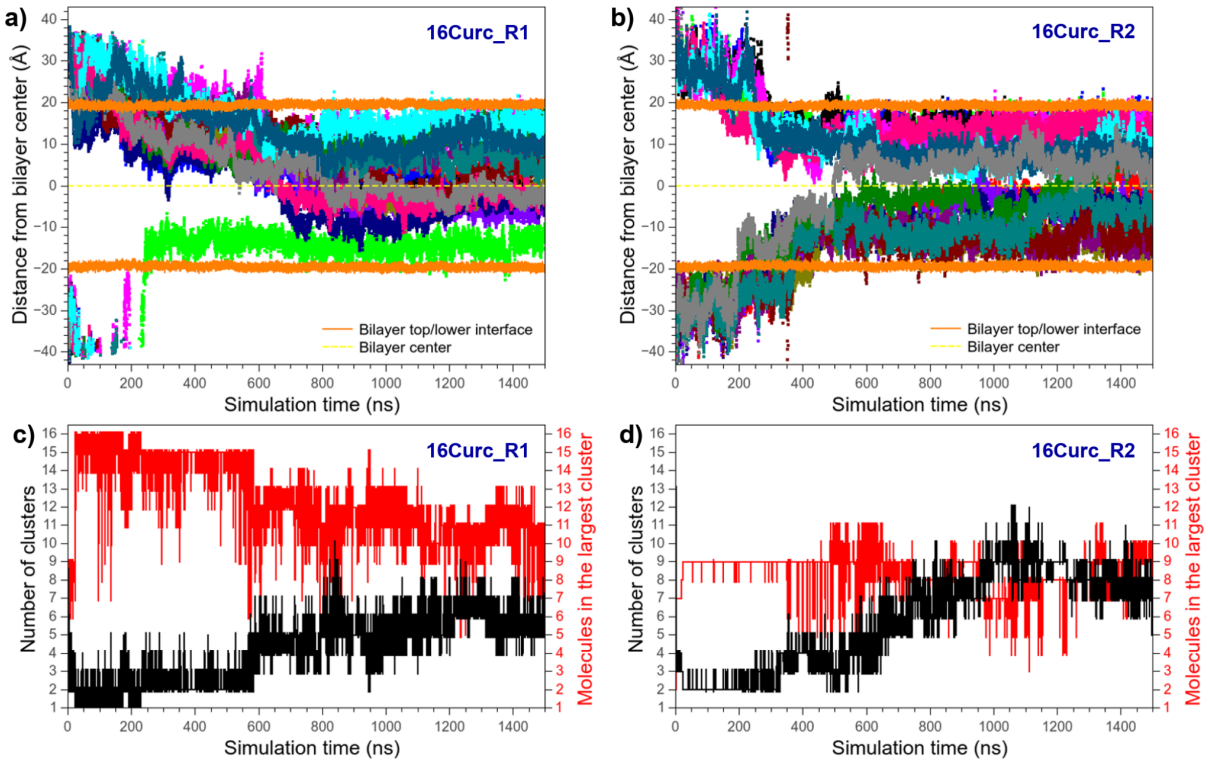
assume uma orientação transmembrânica durante centenas de ns). Mas a formação e estabilização de um agregado de moléculas com grupos polares no núcleo hidrofóbico da bicamada aparentemente é um processo complexo, envolvendo a interação de várias moléculas.

Perfis de densidade são uma forma de analisar a distribuição de determinado átomo ou grupo de átomos em relação a um eixo da caixa de simulação. São médias sobre o espaço de configurações e também temporais, sendo calculadas sobre os *frames* de um intervalo de simulação. Aplicados ao estudo de bicamadas, eles revelam a distribuição dos átomos ou grupos de interesse em relação ao eixo perpendicular à bicamada (eixo *z*), e quando aplicados a intervalos distintos ao longo da simulação possibilitam avaliar a estabilidade (ou não) de determinada estrutura. Os perfis de densidade para a simulação de 16 moléculas de curcumina são apresentados nas Fig. 3.6, sendo cada janela calculada para um intervalo de 500 ns de simulação; eles permitem avaliar portanto como a distribuição da curcumina em relação à bicamada varia a cada 500 ns e oferecem uma representação quantitativa da dinâmica mostrada na Fig. 3.4.

Corroborando com a discussão feita acima, a primeira janela (0~500 ns) mostra a adsorção da curcumina (ver curva em amarelo na Fig. 3.6) na monocamada superior (nesta representação, a monocamada superior fica à direita, com valores positivos), com parte das moléculas ainda na fase aquosa (a curva em laranja é a distribuição para os átomos de fósforo dos lipídios e seu pico é utilizado para definir os limites da bicamada, analogamente ao que havíamos feito para os limites instantâneos da bicamada em gráficos como a Fig. 3.4a). Na janela seguinte (500~1000 ns), é possível observar o avanço da curcumina sobre o núcleo hidrofóbico, com todas as moléculas já adsorvidas e a formação da estrutura transmembrânica; a dinâmica prossegue com a curcumina se redistribuindo entre as duas monocamadas e interagindo com a água (curva em azul) por ambas as interfaces (1000~2500 ns). Uma vez que algumas moléculas de curcumina do *cluster* alcançam a região das carbonilas da monocamada oposta, elas passam a interagir favoravelmente com esses grupos, promovendo a redistribuição das moléculas do *cluster* (3000~4000 ns). A presença de curcumina no centro da estrutura começa então a diminuir (4000~4500 ns) – a análise de *clusters* (Fig. 3.4b) mostrou que é justamente neste intervalo que ocorre acentuada dispersão de moléculas do agregado inicial – vindo a ser estabelecida (4500~6000 ns) então uma distribuição equivalente de moléculas em ambas as monocamadas (7 e 9 moléculas), e baixa

probabilidade de ser observada curcumina no centro. As três últimas janelas mostram a estabilidade da distribuição formada após a desestruturação do *cluster* transmembrânico, sendo observados dois picos de curcumina internos aos das carbonilas (curvas em vermelho). A distribuição dos grupos carbonila coincide aproximadamente com o limite da região hidratada das bicamadas (CAPPONI et al., 2016), e consequentemente, com o início do núcleo hidrofóbico da estrutura (o átomo de carbono de cada carbonila é o primeiro átomo da cauda do fosfolipídio). A curcumina localiza-se portanto na região hidrofóbica da bicamada, mas mantendo contato com a fase hidratada através de seus grupos polares. Este tipo de "ancoragem" também é observada para o colesterol, mas sendo a hidroxila deste seu único grupo polar, a orientação perpendicular que assume é energeticamente muito mais favorável do que para a curcumina, que apresenta grupos polares ao longo de toda a cadeia, sendo provavelmente necessária a interação entre várias de suas moléculas para que assuma uma orientação perpendicular, daí o estabelecimento da estrutura transmembrânica.

Figura 3.7 – a, b) Interação entre 16 moléculas de curcumina inicialmente dispostas na fase aquosa e uma bicamada POPC – réplicas da simulação apresentada na Fig. 3.4. As linhas em laranja indicam os limites da bicamada e a linha tracejada em amarelo indica o centro da estrutura. A projeção em *z* da posição de cada molécula de curcumina (COM) é mostrada como pontos coloridos, uma cor diferente para cada molécula. c, d) Número de *clusters* (preto) e quantidade de moléculas de curcumina no maior *cluster* (vermelho).



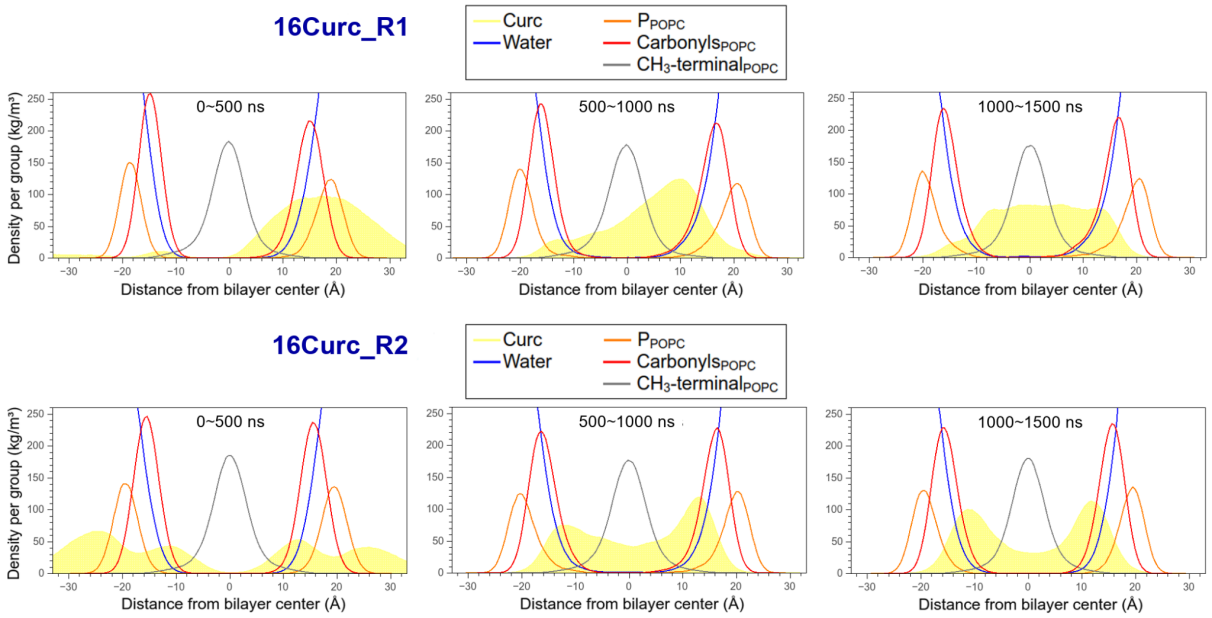
O processo de adsorção das moléculas de curcumina (16 moléculas) foi replicado outras duas vezes. Em função da similaridade dos resultados com a dinâmica discutida acima, apenas aquela já apresentada foi continuada. As Figuras 3.7a e 3.7b mostram resultados correspondentes ao da figura 3.4a para a evolução temporal do componente *z* da posição do COM de cada molécula de curcumina, enquanto nas Figuras 3.7c-d estão aqueles correspondentes à figura 3.4b, para a evolução do número de *clusters* e de moléculas no maior *cluster*. Observa-se que (Fig. 3.7a,b): as moléculas se agregam na fase aquosa e adsorvem na bicamada como um grande *cluster*, que então avança sobre o núcleo hidrofóbico, estabelecendo uma estrutura transmembrânica que provavelmente perdurará enquanto houver moléculas de curcumina o suficiente para estabilizá-la (processo que, como visto anteriormente, pode levar milhares de ns adicionais, e dada a similaridade entre as duas simulações, esta não foi estendida). Dois pontos a serem observados são que a adsorção do *cluster* nesta primeira réplica (16Curc_R1) é mais lenta, assim como o avanço sobre o núcleo hidrofóbico demanda um tempo de simulação maior para ter início (~650 ns), e que uma das moléculas de curcumina, embora inicialmente também interaja com o agregado, acaba por adsorver sozinha pela monocamada inferior, enquanto o *cluster* principal adsorve pela monocamada superior.

Uma segunda réplica (Fig. 3.7b, d) ilustra uma situação diferente, onde as moléculas de curcumina estabelecem dois grandes *clusters*, um (7 moléculas) adsorvendo pela monocamada superior, e o outro (9 moléculas) pela inferior. Considerando se tratar de uma dinâmica livre no equilíbrio, não existe nenhuma imposição ou restrição sobre qual monocamada as moléculas devem interagir, podendo inclusive interagir com ambas – esta é uma limitação da utilização de bicamadas, pois devido às condições periódicas de contorno, não ficam definidas uma interface exterior e outra interior, as duas interfaces de uma bicamada são de fato equivalentes. Apesar da agregação ter ocorrido em dois grandes *clusters*, também nesta réplica (16Curc_R2), as moléculas adsorvem e avançam sobre o núcleo da bicamada, situação equivalente à já observada para 8 moléculas (Fig. 3.2d, f), mas como aqui há um *cluster* em cada monocamada, eles acabam interagindo entre si, também ocorrendo a formação da estrutura transmembrânica – observe que o *cluster* de 9 moléculas adsorve e começa a perder moléculas (ver linha em vermelho na Fig. 3.7d), mas ao interagir com o *cluster* que adsorveu pela monocamada oposta, o maior *cluster* volta a crescer e chega a ter 11 moléculas. Este processo ocorre em paralelo com a dispersão de moléculas pelos *clusters* iniciais, o que pode ser observado pelo progressivo aumento no número de *clusters* (linha em

preto na Fig. 3.7d) quando ocorre a adsorção, mas aparentemente se estabiliza com a formação da estrutura transmembrânica, indicando que mesmo neste caso pode haver troca de moléculas de curcumina entre as monocamadas, o que de fato se verifica (ver por exemplo a molécula em cinza escuro na Fig. 3.7b).

Os perfis de densidade calculados para a primeira réplica (Fig. 3.8), como esperado, indicam uma dinâmica similar à mostrada nas janelas iniciais da Fig. 3.6. Para a outra réplica (16Curc_R2), a primeira janela (0~500 ns) apresenta quantitativamente a interação e início da adsorção por ambas as interfaces da bicamada. A sequência da dinâmica (500~1500 ns) mostra o estabelecimento da estrutura transmembrânica, mas já com os dois picos da distribuição da curcumina definidos na região interna aos picos da carbonila, resultado que também remete ao apresentado na Fig. 3.6 (comparar especialmente com a janela 4000~4500 ns).

Figura 3.8 – Perfis de densidade nas réplicas da simulação com 16 moléculas de curcumina. Os dados estão normalizados em relação ao centro da bicamada, e os picos da distribuição dos átomos de fósforo (laranja) indicam os limites da bicamada, sendo a espessura desta definida como a distância de um pico a outro. Cada janela representa a análise num intervalo de 500 ns de simulação.



Os resultados obtidos para 16 moléculas de curcumina indicam, após a dinâmica de inserção e estabilização, uma interação com a bicamada equivalente à observada para 1, 2, 4 ou 8 moléculas, com a curcumina se estabilizando na região hidrofóbica (sempre interna à carbonila dos fosfolipídios), mas com seus grupos polares próximos à região hidratada. Esta análise remete ao modelo do tipo carpete, em que a curcumina atuaria como barreira à ação de radicais livres, mas numa região mais interna – na região das caudas e não na interface hidratada da bicamada – sem entretanto avançar significativamente sobre o núcleo hidrofóbico. Estes resultados concordam com os obtidos por Alsop e colaboradores (2017) a partir de experimentos com difração de raios-X e cálculo do perfil de energia livre em vesículas/bicamadas de DMPC que, por ambas as técnicas, identificaram picos de distribuição da curcumina no núcleo hidrofóbico da estrutura lipídica ao analisar perfis de densidade eletrônica. O efeito do aumento da concentração de moléculas seria portanto aumentar a amplitude da distribuição, fazendo com que nos sistemas com mais moléculas (8 e 16) a probabilidade de serem observadas moléculas em regiões mais internas do núcleo hidrofóbico seja maior do que em sistemas com menos moléculas (1, 2 ou 4). Por outro lado, as simulações também amostraram a organização em estrutura transmembrânica, proposta por Duda e colaboradores (2020) a partir de experimentos por ressonância paramagnética eletrônica em membranas de lipossomas de DMPC e DSPC. Pelas simulações aqui apresentadas, este outro estado seria transiente e consequência do processo de adsorção das moléculas, sendo observado somente em sistemas onde a curcumina interage como um agregado de moléculas estabelecido ainda na fase aquosa. A análise de *clusters* (número e quantidade de moléculas no maior *cluster*) mostra ainda que a estabilização da curcumina na bicamada compreende a dispersão das moléculas, passando então a serem observados essencialmente *clusters* pequenos de 1~4 moléculas. A estrutura transmembrânica é uma rota pela qual a estabilização das moléculas de curcumina assume uma disposição em carpete.

As simulações trazem portanto dados que possibilitam avaliar a ação da curcumina tanto quando estabelecendo uma estrutura transmembrânica, quanto dispersas na região das caudas e próximas à interface hidratada, duas situações já propostas a partir da interpretação de dados experimentais, e o fato de ocorrerem na mesma simulação serve para exemplificar a dificuldade em se estabelecer o mecanismo de ação da curcumina. É importante considerar, entretanto, que a disposição inicial escolhida, com as moléculas dispersas na fase aquosa, com a possibilidade de se agregarem, pode impactar nos resultados do estudo. Seria interessante então avaliar a disposição e estabilização da curcumina, evitando que a adsorção na bicamada

ocorra em grandes *clusters* (nas simulações de 1, 2 e 4 moléculas de curcumina, a adsorção se deu essencialmente por moléculas individuais) para então comparar com a situação já discutida. A agregação da curcumina também traz dificuldades à realização de experimentos, onde a titulação da solução de vesículas é feita na solução de curcumina com solvente (LEITE et al., 2018), reduzindo assim a formação de precipitados.

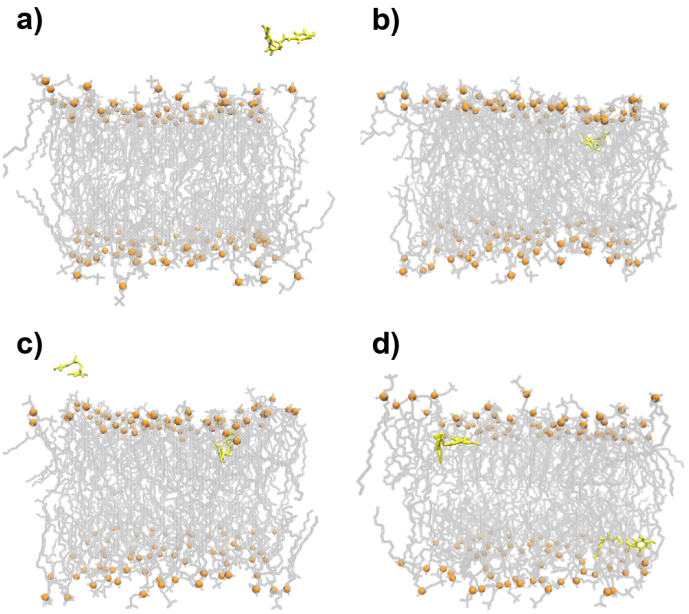
3.2 Inserção Progressiva de Moléculas

Estabelecendo um paralelo com os procedimentos experimentais, um método alternativo para estudar a interação da curcumina com a bicamada consistiria numa inserção gradual e progressiva das moléculas na caixa de simulação, uma molécula por vez, por exemplo. Este método é ilustrado pela Fig. 3.9 e consiste em, na primeira janela, inserir uma única molécula de curcumina numa caixa de simulação contendo a bicamada POPC hidratada (Fig. 3.9a) – exatamente o mesmo procedimento e protocolos (ver seção Detalhes Computacionais) utilizado anteriormente para a simulação com 1 molécula de curcumina (1Curc). A simulação é então executada por 100 ns, tempo suficiente para que ocorra a adsorção da molécula, resultando assim numa bicamada contendo uma molécula de curcumina (Fig. 3.9b), e nenhuma na fase aquosa. Esta configuração final é utilizada então para a construção de uma nova caixa de simulação, com uma molécula de curcumina adicional inserida na fase aquosa, mas com a bicamada agora já contendo a primeira molécula (Fig. 3.9c). A segunda janela também passa por uma dinâmica de 100 ns, resultando agora numa bicamada com duas moléculas de curcumina (Fig. 3.9d). A generalização do método fornece que na *n*-ésima janela, teremos uma bicamada contendo $n - 1$ moléculas, e uma curcumina adicional inserida na fase aquosa.

É importante ressaltar que no método proposto uma nova janela não é a continuação exata da anterior (o número de átomos no sistema não é o mesmo), mas aplicando-se procedimentos de restrição à bicamada, assim como às moléculas de curcumina e também às de água que hidratam a estrutura, e inserindo a molécula de curcumina adicional próxima aos limites da caixa de simulação (aleatoriamente em *x* e *y*, mas distante da bicamada em *z*), é possível minimizar a perturbação à bicamada, assegurando que a estrutura lipídica (POPC, curcumina e água) com a qual a molécula adicional irá interagir na nova janela seja equivalente à obtida na janela anterior. Utilizando esse processo de inserção progressiva é

possível garantir que não haja interação de moléculas de curcumina na fase aquosa, e que portanto a adsorção sempre ocorra como moléculas individuais – em todas as janelas apresentadas, 100 ns de simulação foi tempo suficiente para que ocorresse a adsorção da molécula adicional. A interação entre uma molécula já na bicamada e outra iniciando a internalização, ou entre moléculas de curcumina já adsorvidas é livre e consistirá num ponto de interesse deste estudo.

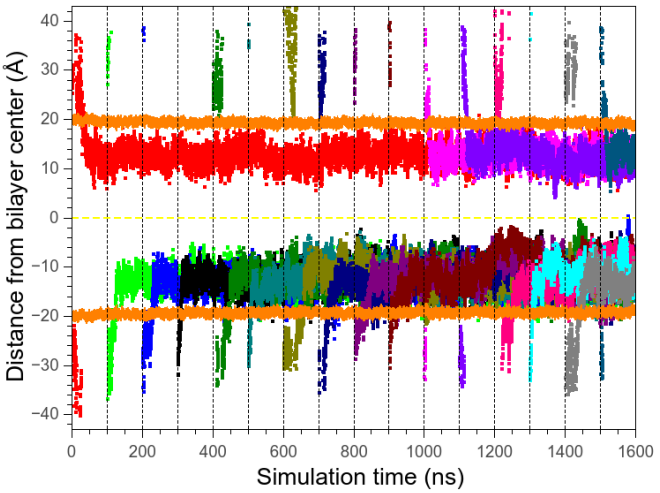
Figura 3.9 – Ilustração do método de inserção progressiva de moléculas. a) Configuração inicial (t = 0) da primeira janela, com uma molécula de curcumina (em amarelo) na fase aquosa de uma caixa de simulação contendo uma bicamada POPC (em cinza). Para facilitar a visualização, as moléculas de água não são mostradas e os átomos de fósforo são destacados (em laranja). Após 100 ns (b), a molécula de curcumina adsorveu na bicamada e a estrutura final desta simulação é utilizada como base para a construção da segunda janela (c; t = 0), com uma molécula de curcumina adicional na fase aquosa. Ao fim da simulação da segunda janela (d; t = 100 ns), é obtida uma bicamada com duas moléculas de curcumina adsorvidas, neste caso, uma em cada monocamada.



A Fig. 3.10 mostra a projeção em z da posição do centro de massa de moléculas de curcumina, uma cor distinta para cada molécula, inseridas progressivamente na fase aquosa. Para facilitar a visualização, as diferentes janelas estão dispostas em sequência, como se fossem a evolução temporal de uma mesma simulação, mas com linhas verticais tracejadas (em preto) discriminando cada janela. Assim, o intervalo de simulação de 0~100 ns refere-se à primeira janela, 100~200 ns à segunda janela, e assim sucessivamente. A posição média dos

átomos de fósforo em cada monocamada é utilizada para definir os limites da bicamada (linhas em laranja), e o centro da bicamada é mostrado como uma linha horizontal tracejada (em amarelo). Note que, assim como ocorria nas simulações com várias moléculas dispersas na água, não foram impostas restrições quanto à interface com que a curcumina interage, sendo que a primeira molécula inserida (pontos em vermelho) adsorve pela monocamada superior, a segunda (em verde) pela inferior, a terceira (em azul) também pela inferior, resultando, após 16 janelas de 100 ns cada, numa bicamada contendo 16 moléculas de curcumina, numa razão de 4/12 moléculas em cada monocamada – a razão obtida para a simulação 16Curc, após a redistribuição das moléculas pela estrutura transmembrânica e sua dispersão pelas monocamadas, foi de 9/7. O gráfico mostra que o propósito de evitar a interação prévia das moléculas de curcumina ainda na fase aquosa, garantindo que a adsorção ocorresse de forma individual foi alcançado.

Figura 3.10 – Construção de uma bicamada contendo 16 moléculas de curcumina a partir da inserção progressiva das moléculas na fase aquosa. Os dados estão normalizados em relação ao centro da bicamada (linha tracejada em amarelo) e a projeção da coordenada z do centro de massa de cada curcumina é mostrada como pontos coloridos, uma cor distinta para cada molécula; os limites instantâneos da bicamada (linha em laranja) foram calculados a partir da posição dos átomos de fósforo. Cada janela foi simulada por 100 ns e consistem na realidade em simulações distintas (as linhas verticais tracejadas delimitam as janelas), mas são apresentadas juntas para facilitar a visualização da dinâmica.



Partindo da configuração final da 16ª janela da simulação apresentada na Fig. 3.10, que consiste numa bicamada POPC com 16 moléculas de curcumina já adsorvidas, uma extensão (esta sim uma continuação exata) foi desenvolvida por 1900 ns. Esta nova simulação

(P16) de uma bicamada contendo 16 moléculas de curcumina, mas obtida a partir da inserção progressiva, será utilizada para comparação com os resultados discutidos para a simulação em que todas as moléculas de curcumina foram inseridas aleatoriamente na água (16Curc). A coordenada *z* do COM de cada molécula de curcumina em função do tempo para a simulação P16 é apresentada na Fig. 3.11a com o mesmo padrão de cores da Fig. 3.10. Observa-se que embora ocorra de moléculas de curcumina se enterrarem mais profundamente na estrutura lipídica a comparar com as simulações com menor concentração de curcumina (Fig. 3.2), principalmente na monocamada inferior em que há mais moléculas, não chega a ser estabelecida uma estrutura transmembrânica. A análise de *clusters* (Fig. 3.11b) mostra oscilações na estruturação das moléculas, com a redução no número de *clusters* (linha em preto) coincidindo com o aumento no número de moléculas no maior *cluster* (em vermelho). Estes resultados indicam um processo de agregação ocorrendo no interior da bicamada, mas aparentemente não é estável (ou não atinge um número de moléculas suficiente para que se estabilize por um tempo maior e as moléculas estabeleçam uma estrutura transmembrânica), e as moléculas voltam a se dispersar. Os valores calculados para os 1900 ns de simulação indicam que há em média (13,9 ± 1,4) *clusters*, tendo o maior deles em média (2,5 ± 0,9) moléculas; as médias calculadas para os 1500 ns finais (4500~6000 ns) da simulação onde as 16 moléculas de curcumina adsorveram como um grande agregado e posteriormente se dispersaram (16Curc) são (11,4 ± 1,1) *clusters*, tendo o maior deles em média (3,2 ± 0,6) moléculas. A estruturação da curcumina como moléculas dispersas ou formando pequenos agregados (dímeros ou trímeros) é essencialmente equivalente nas duas simulações.

O cálculo do ângulo theta fornece informação sobre a conformação assumida pelas moléculas (ver Fig. 2.6), sendo que um valor de 180º implicaria numa molécula completamente distendida. A evolução temporal do valor médio de theta sobre todas as moléculas de curcumina em cada instante é apresentada na Fig. 3.12a, e revela não haver variação significativa na conformação média das moléculas ao longo das simulações (tanto em 16Curc, linha em preto, como em P16, em vermelho), com as moléculas de curcumina permanecendo essencialmente abertas com o theta em torno de 120º. Para os 1900 ns da P16 o valor encontrado é (120,9 ± 6,7)º enquanto para os 1500 ns finais da 16Curc é (121,7 ± 6,9)º. O cálculo do ângulo phi (Fig. 3.12b), por outro lado, mostra que a dinâmica de interação entre o *cluster* inicial estabelecido na simulação 16Curc (linha em preto) e a bicamada é acompanhada por grandes modificações na orientação das moléculas. Sendo calculado entre os átomos de carbono fenólicos o eixo *z* (C_{phenol} - C_{phenol} - $\hat{z}$), um valor de phi igual à 0º

indicaria uma molécula perfeitamente perpendicular à bicamada, e com 90º a molécula estaria disposta paralelamente à bicamada (paralela ao plano *xy*). Atendo-se ao trecho final da simulação (a dinâmica do agregado será discutida na seção 4.2), observa-se que as moléculas atingem a estabilidade numa orientação essencialmente paralela ao plano da bicamada, com o valor médio de phi igual a (74,0 ± 2,9)º, condição equivalente à observada ao longo de toda a simulação P16 com phi igual a (72,4 ± 3,3)º. Estes resultados, aliados à análise de *clusters*, mostram que a curcumina apresenta uma estruturação equivalente nos dois casos, indicando que a condição dispersa, numa conformação aberta e paralela ao plano da bicamada, é a condição/configuração de estabilidade da curcumina na bicamada.

Figura 3.11 – a) Interação de 16 moléculas de curcumina adsorvidas numa bicamada POPC. A projeção em *z* de cada curcumina (COM) é mostrada como pontos coloridos, uma cor distinta para cada molécula, mas seguindo o mesmo padrão de cores da inserção em janelas, de onde foi obtida (Fig. 3.10). Os dados estão normalizados em relação ao centro da bicamada (linha tracejada em amarelo) enquanto as linhas em laranja definem os limites da bicamada calculados em cada *frame*. b) Evolução do número de *clusters* (preto) e quantidade de moléculas de curcumina no maior *cluster* (vermelho).

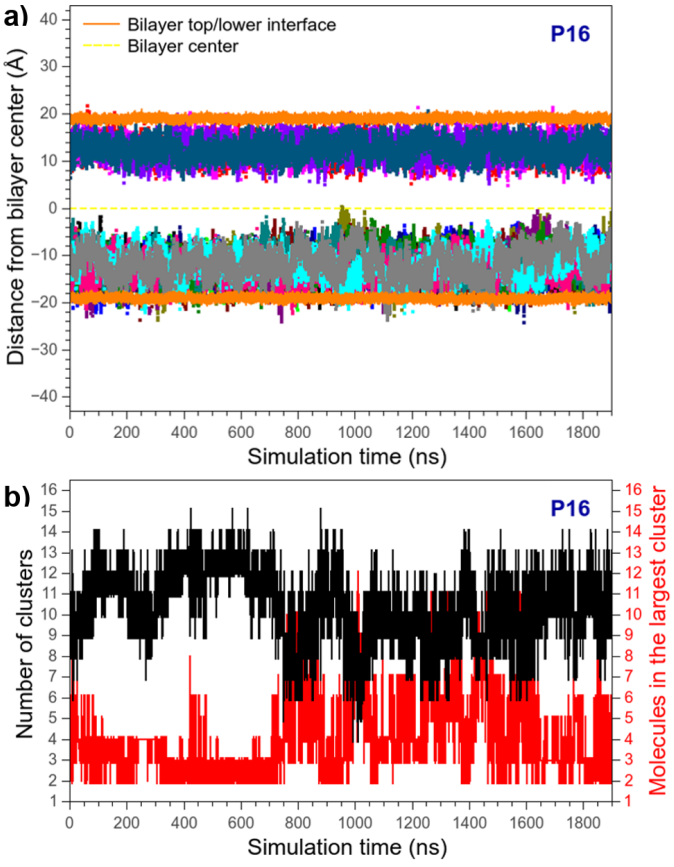
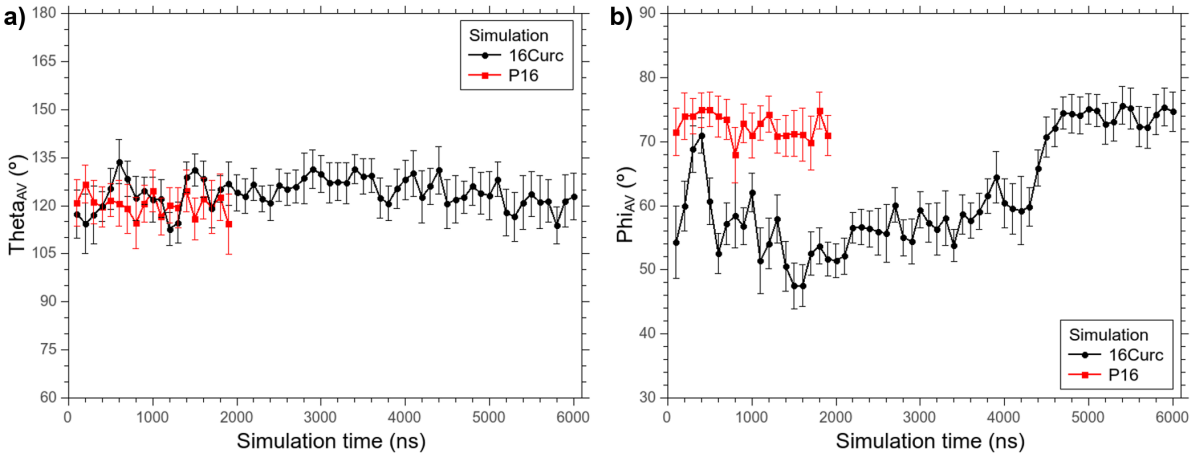
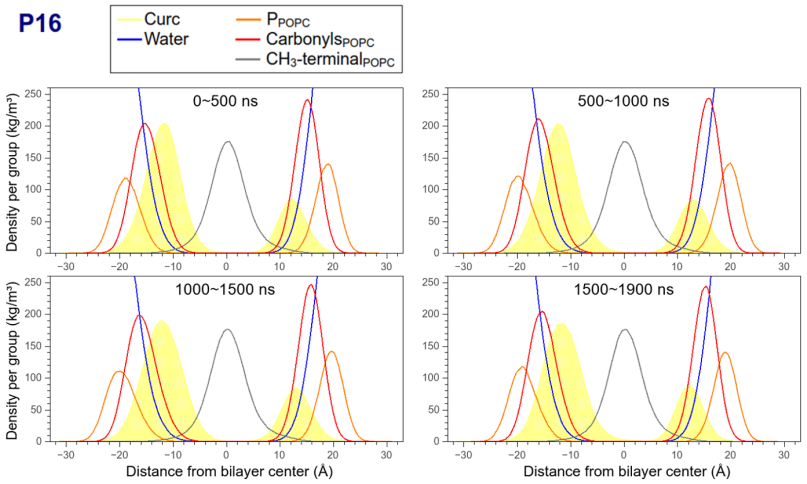


Figura 3.12 – Evolução temporal do ângulo médio das moléculas de curcumina: Theta (a) indica a abertura da molécula (ver seção Detalhes Computacionais), isto é, a conformação média assumida pelas 16 moléculas, enquanto phi (b) revela a orientação médias das molécula em relação à *z*. Cada ponto mostra o valor médio calculado no intervalo de 100 ns e seu respectivo desvio padrão (barras verticais).



Os perfis de densidade para a simulação P16 são apresentados na Fig. 3.13, onde cada janela consiste na análise aplicada a um intervalo de 500 ns, corroboram tal avaliação. O primeiro ponto a ser destacado é o fato de não haver variação significativa em nenhuma das curvas de um gráfico para outro, indicativo de estabilidade da bicamada com as moléculas de curcumina adsorvidas progressivamente (em que não há a formação prévia de um *cluster* na fase aquosa). A comparação com as três últimas janelas da Fig. 3.6, confirma que as simulações P16 e 16Curc (4500~6000 ns) são estruturalmente equivalentes, ambas apresentando a curcumina distribuída nas duas monocamadas, com picos de distribuição sempre internos aos picos dos grupos carbonilas. A curcumina distribui-se na região hidrofóbica da bicamada, estando à (12,2 ± 0,6) Å do centro da bicamada em P16 (média calculada sobre as duas monocamadas para os 1900 ns de simulação) e (12,1 ± 0,3) Å em 16Curc (cálculo sobre as duas monocamadas para o intervalo 4500~6000 ns da simulação); a equivalência entre as duas simulações também é observada quando calculado o enterramento em relação à interface com a fase aquosa: (7,1 ± 0,4) Å em P16 e (7,0 ± 0,4) Å em 16Curc.

Figura 3.13 – Perfis de densidade para a curcumina (curvas preenchidas em amarelo), água (azul) e grupos de interesse nas moléculas de POPC, na simulação com 16 moléculas de curcumina obtida a partir da inserção progressiva. Os dados estão normalizados em relação ao centro da bicamada, sendo que os picos da distribuição dos átomos de fósforo (laranja) indicam os limites da bicamada. Cada janela apresenta a análise num intervalo de 500 ns de simulação.



A análise das energias de interação entre curcumina, água e lipídios é outro critério para comparar as duas simulações. As figuras a seguir mostram a evolução temporal das interações energéticas por pares, termos de van der Waals (Fig. 3.14) e Coulomb (Fig. 3.15), entre as moléculas de curcumina, curcumina e água, curcumina e fosfolipídios (segmentados em cabeças polares, glicerol e caudas apolares). Cada ponto mostrado nos gráficos é o valor médio calculado num intervalo de 100 ns enquanto as flutuações nos valores são representadas pelo desvio padrão (barras verticais) calculado no respectivo intervalo. Os gráficos à esquerda (linhas em preto) trazem a evolução das interações energéticas para a simulação 16Curc, amostrando desde a agregação da curcumina ainda na fase aquosa, adsorção na bicamada, avanço sobre o núcleo hidrofóbico e redistribuição das moléculas entre as monocamadas, e posterior dispersão e estabilização da curcumina na região hidrofóbica próxima aos grupos carbonila dos fosfolipídios (ver Figs. 3.4 a 3.6). Os gráficos à direita (linhas em vermelho) mostram as mesmas interações na simulação P16, em que desde o início as moléculas de curcumina já estão distribuídas pelas monocamadas. Analisando os gráficos, fica evidente a significativa variação nas interações energéticas durante o processo de adsorção e redistribuição da curcumina pelas monocamadas (16Curc), mas ao considerarmos somente o intervalo 4500~6000 ns não é observada variação estatística para nenhum par nos termos de van der Waals; a oscilação nas médias é maior para a interação coulombiana,

principalmente para Curc.-Curc. e Curc.-Glycerol, mas também nestas os pontos estão sempre compreendidos pelo menos nos limites das barras de erro. Estes resultados são outro indicativo de que a distribuição alcançada pela curcumina nos 1500 ns finais da simulação 16Curc é estável. As mesmas considerações valem para toda extensão da simulação P16.

Figura 3.14 – Energia de interação do tipo van der Waals estabelecida entre as moléculas de curcumina, com a água e com os fosfolipídios (segmentados em cabeça polar, glicerol e caudas apolares). Cada ponto mostra o valor médio calculado no intervalo de 100 ns e seu respectivo desvio padrão (barras verticais). A coluna da esquerda (linhas em preto) refere-se à simulação onde as 16 moléculas de curcumina foram inseridas dispersas na fase aquosa (16Curc), enquanto a coluna à direita (em vermelho) apresenta os resultados da simulação P16, em que as moléculas de curcumina estão adsorvidas e já distribuídas pelas duas monocamadas da estrutura (obtida a partir de inserção progressiva).

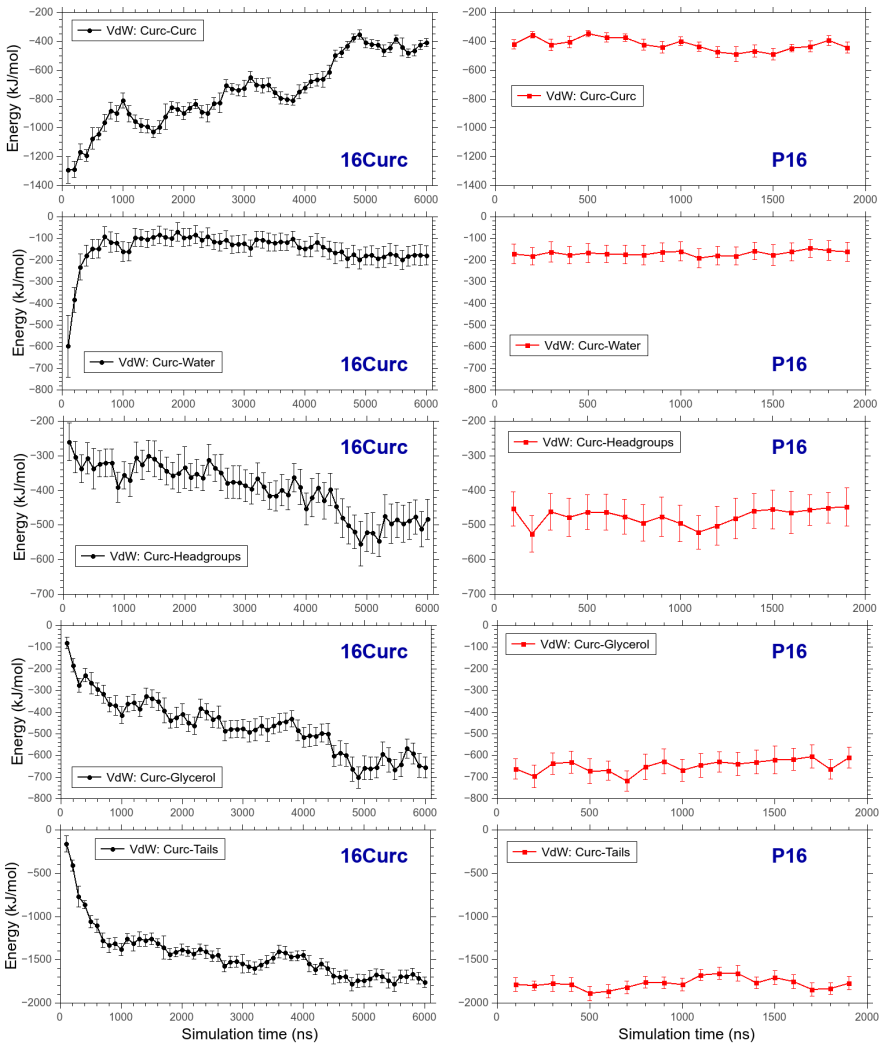
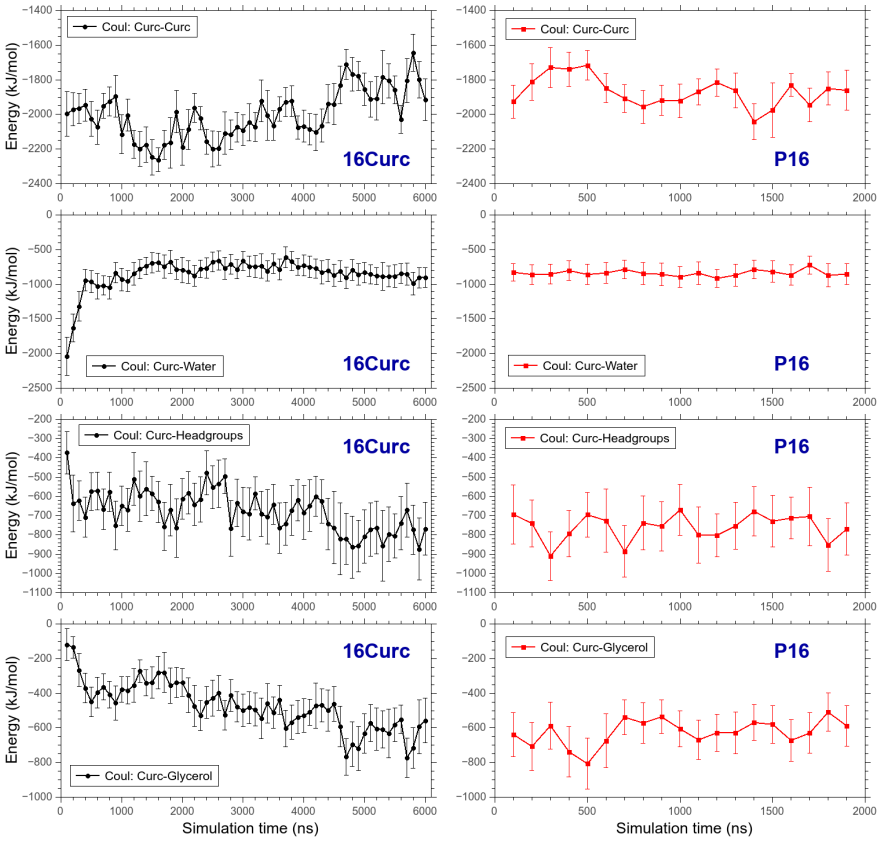


Figura 3.15 – Energia de interação do tipo Coulomb estabelecida entre as moléculas de curcumina, com a água e com os fosfolipídios (segmentados em cabeça polar e glicerol). Na segmentação utilizada, a carbonila dos fosfolipídios, que é parte estrutural do grupo glicerol, mas também contém o primeiro átomo de carbono das cauda, foi atribuída ao glicerol, restando para a cauda somente grupos apolares (C e H), e por isso não é mostrada interação coulombiana com as caudas. Cada ponto mostra o valor médio calculado no intervalo de 100 ns e seu respectivo desvio padrão (barras verticais).



A Fig. 3.16 mostra o número médio de ligações de hidrogênio estabelecidas entre moléculas de curcumina, curcumina com a água, e curcumina com fosfolipídios (cabeças polares e glicerol). A apresentação é a mesma utilizada para os termos de energia, com cada ponto indicando média e desvio padrão (barras verticais) calculados no respectivo intervalo de 100 ns, gráficos à esquerda (linhas em preto) para a simulação 16Curc, e à direita (em vermelho) para P16. Apesar de menos pronunciadas, também são observadas variações nas ligações de hidrogênio durante a dinâmica inicial da simulação 16Curc (0~4500 ns), mas atendo-se ao período de estabilidade em discussão (a análise da adsorção será retomada no próximo capítulo), não se verifica variação estatística nas ligações de hidrogênio no intervalo

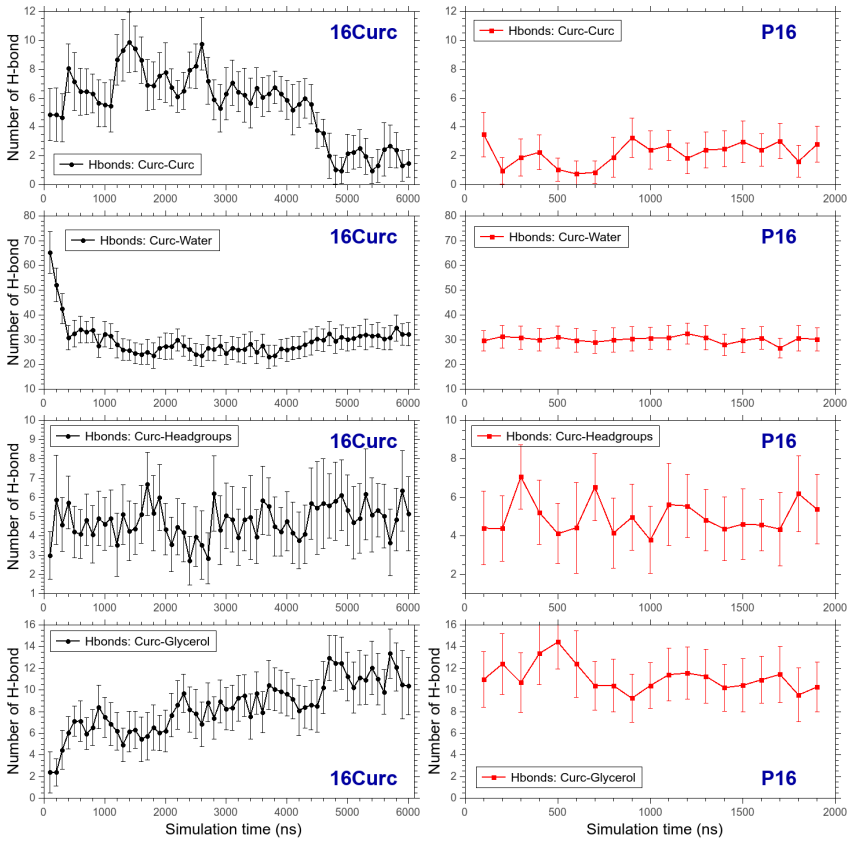
4500~6000 ns, o mesmo vale para a simulação P16, sendo novamente observada a equivalência entre as duas simulações.

Tabela 3.1 – Número médio de ligações de hidrogênio, por molécula, estabelecida pela curcumina.

Simulação	Moléculas de curcumina	Ligações de hidrogênio por molécula de curcumina		
		Curc-Water	Curc-Headgroups	Curc-Glycerol
Ref. (Lyu et al., 2018)	1	1,8 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1
1Curc (200~500 ns)	1	1,9 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,7 ± 0,5
16Curc (4500~6000 ns)	16	2,0 ± 0,3	0,3 ± 0,1	0,7 ± 0,2
P16	16	1,9 ± 0,3	0,3 ± 0,1	0,7 ± 0,2

A comparação do resultado obtido por Lyu e colaboradores (2018) para as ligações de hidrogênio da curcumina com a água e fosfolipídios (cabeças polares e glicerol) na interação de uma única molécula de curcumina e uma bicamada POPC com a simulação equivalente realizada neste estudo (1Curc) é apresentada na Tabela 3.1 e mostra boa concordância de valores. Normalizando o número médio de ligações de hidrogênio pelo número de moléculas de curcumina nas simulações 16Curc e P16, observa-se que o padrão de interação é essencialmente equivalente ao obtido para 1 curcumina, mantendo a preferência de estabelecer mais ligações de hidrogênio com a água do que com os lipídios. Este resultado é outro indicativo de que uma vez alcançada a estabilidade, com as moléculas distribuídas na região hidrofóbica, mas próximas à fase hidratada, as moléculas de curcumina tendem a interagir de forma análoga a uma molécula individual (o tamanho do maior *cluster* cair a 1~4 moléculas sugeria este comportamento).

Figura 3.16 – Número médio de ligações de hidrogênio estabelecidas entre as moléculas de curcumina, com a água e com os fosfolipídios (segmentados em cabeça polar e glicerol). Cada ponto mostra o valor médio calculado no intervalo de 100 ns e seu respectivo desvio padrão (barras verticais). O critério geométrico utilizado para caracterizar a existência de uma ligação de hidrogênio foi que a distância entre o H doado e seu aceptor fosse menor ou igual a 3,5 Å e o ângulo doador-aceptor-H menor ou igual a 30°.



Pelos resultados apresentados, é possível estabelecer que as simulações 16Curc (4500~6000 ns) e P16 são estrutural (pelo padrão de agregação, conformação e orientação assumida pelas moléculas, assim como pelos perfis de densidade calculados) e energeticamente (interações de VdW e Coulomb, e também ligações de hidrogênio) equivalentes. Após uma longa dinâmica de adsorção e redistribuição das moléculas entre as monocamadas, nos últimos 1500 ns é observada a estabilidade na simulação 16Curc, indicando que a interação da curcumina na bicamada é mais favorável na condição dispersa pela região hidrofóbica, interna à carbonila dos fosfolipídios, mas próxima à região hidratada para estabilização de seus grupos polares – os termos de energia para interação curcumina-água também mostram estabilidade no trecho final da simulação, sendo a interação

mais favorável neste período do que quando as moléculas de curcumina apresentavam-se como uma estrutura transmembrânica (1000~4500ns), ver Figs. 3.14 e 3.15. Tais resultados são confirmados pela simulação P16, onde a estabilidade foi obtida a partir da construção do sistema (bicamada com curcumina já adsorvida) por um método alternativo, com a inserção progressiva das moléculas, evitando assim a prévia agregação da curcumina em água, e, pelos dados apresentados, encurtando o tempo de simulação necessário para ser observada a estabilidade. Na condição de estabilidade assumida pelas moléculas, próxima ao modelo do tipo carpete, a curcumina apresenta-se essencialmente dispersa, numa conformação aberta (~120º) e paralela ao plano da bicamada, estruturando-se em *clusters* pequenos e temporários com 1~4 moléculas (resultado também observado nas simulações com 1, 2, 4 e 8 moléculas de curcumina), e favorecendo a interação com o glicerol dos fosfolipídios, em detrimento da interação entre moléculas de curcumina (Figs. 3.14 a 3.16). Comparando os diferentes sistemas, os resultados sugerem que o aumento da razão curcumina/lipídio produz o acúmulo de moléculas na mesma monocamada, podendo ocorrer a formação de uma estrutura transmembrânica que, entre outros efeitos sobre a bicamada, possibilita a redistribuição de moléculas entre as duas monocamadas, favorecendo a posterior estabilização da curcumina num modelo do tipo carpete.

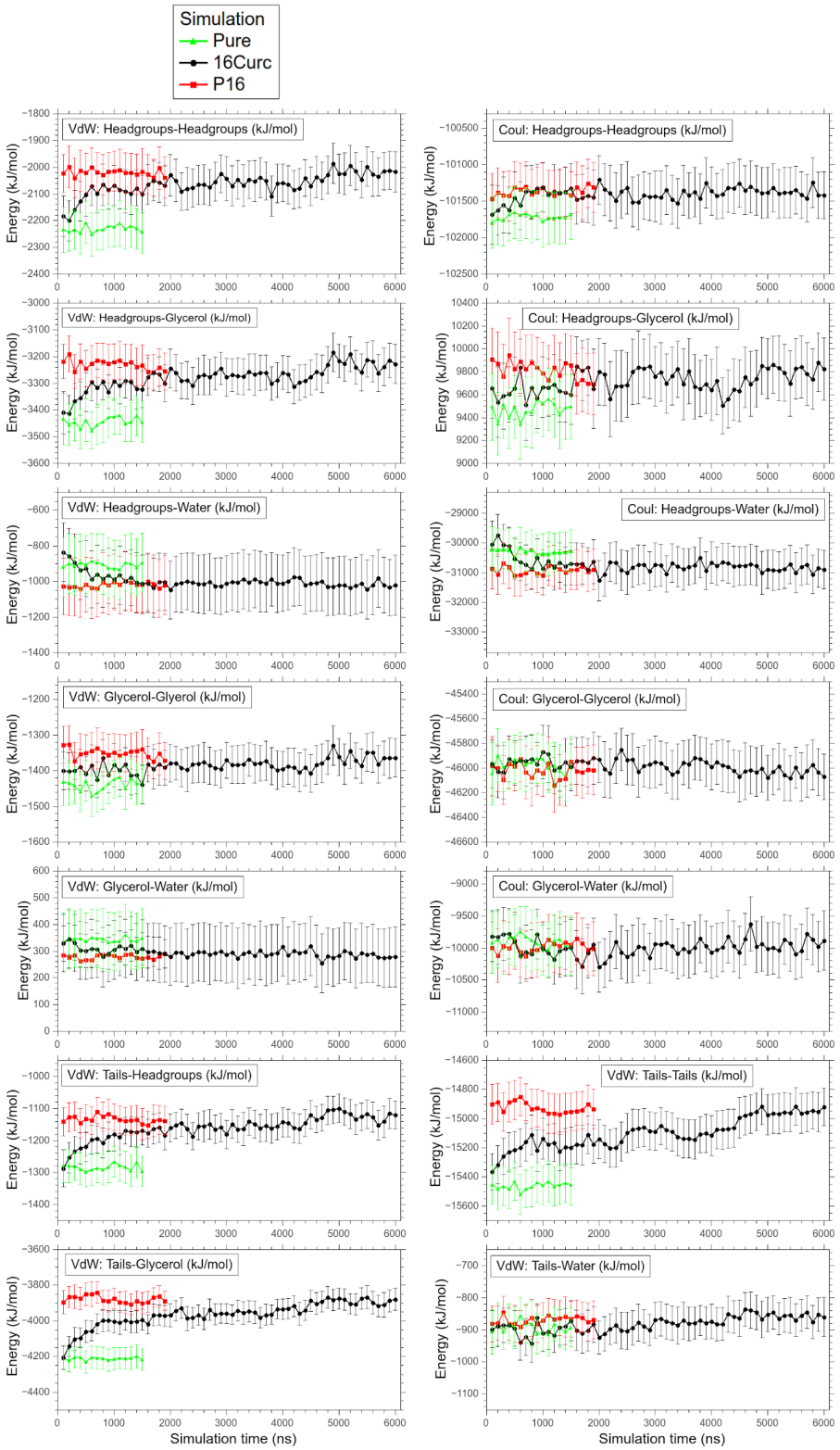
4 EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE CURCUMINA SOBRE A ESTRUTURA DA BICAMADA

4.1 Ação Sobre as Propriedades da Bicamada

Um ponto importante a ser analisado são possíveis modificações estruturais que a ação da curcumina produz na membrana, pois além de poder fornecer informações sobre o mecanismo de ação da molécula, os resultados existentes na literatura propõem modelos de interação bem diferentes para a interação curcumina-bicamada. Enquanto no modelo carpete, a curcumina estaria distribuída na bicamada, próxima ou na própria região hidratada, atuando essencialmente ao oferecer seus grupos fenólicos para reagir com radicais livre (THAPA et al., 2013; STAROK et al., 2015), o outro modelo propõe que a curcumina se enterra profundamente no núcleo hidrofóbico e que a ação da molécula se daria justamente pela modificação de propriedades da membrana (ERLEJMAN et al., 2004; INGOLFSSON; KOEPPE; ANDERSEN, 2007; BARRY et al., 2009).

As simulações deste estudo indicam que a estabilidade da curcumina na bicamada ocorre numa condição próxima à do primeiro modelo, mas ao longo da dinâmica de inserção das moléculas a configuração observada é na realidade uma estrutura transmembrânica. Ou seja, na maior parte do tempo da simulação 16Curc, a curcumina age sobre o núcleo hidrofóbico (evidenciado também em suas réplicas), sendo interessante, portanto, avaliar como algumas propriedades da bicamada variam ao longo do processo de adsorção e estabilização das moléculas. A comparação será feita com propriedades calculadas ao longo das simulações 16Curc e P16, e também com os valores obtidos para a bicamada pura (simulação de controle), sem curcumina.

Figura 4.1 – Energia de interação (termos de van der Waals e Coulomb) internas de regiões características dos fosfolipídios (cabeças polares, glicerol e caudas apolares) e interação com a água nas simulações com (linhas em preto e vermelho) e sem curcumina (verde). Cada ponto nos gráficos indica valor médio e desvio padrão para o respectivo intervalo de 100 ns. Variações na linha em preto (16Curc) refletem a ação da curcumina.



4.1.1 Interações energéticas na bicamada

Os gráficos da energia de interação, termos de van der Waals e Coulomb, entre regiões de características distintas nos fosfolipídios (cabeças polares, glicerol e caudas apolares), e também destes grupos com a água, são apresentados na Fig. 4.1. Cada ponto representa o valor médio no respectivo intervalo de 100 ns, sendo a variação dos valores no intervalo indicada pelo desvio padrão (barras verticais). Em todos os gráficos fica evidenciado que, antes da adsorção da curcumina, a bicamada da simulação 16Curc (linhas em preto) é equivalente à bicamada pura (em verde). Na parte central dos gráficos, que para a 16Curc corresponde ao período no qual ocorre a adsorção do *cluster*, o seu avanço sobre o centro da bicamada até ser estabelecida a estrutura transmembrânica, e a posterior dispersão das moléculas, observa-se variação para alguns termos, enquanto a oscilação em outros fica compreendida dentro das barras de erro. No trecho final (4500~6000 ns), quando o agregado transmembrânico já se desfez e as moléculas de curcumina estão dispersas pelas duas monocamadas, observa-se a equivalência entre a simulação 16Curc agora com a P16 (em vermelho). A simulação 16Curc portanto começa com um perfil energético característico de uma bicamada pura de POPC, e termina com um perfil energético de uma bicamada contendo 16 moléculas de curcumina ligadas.

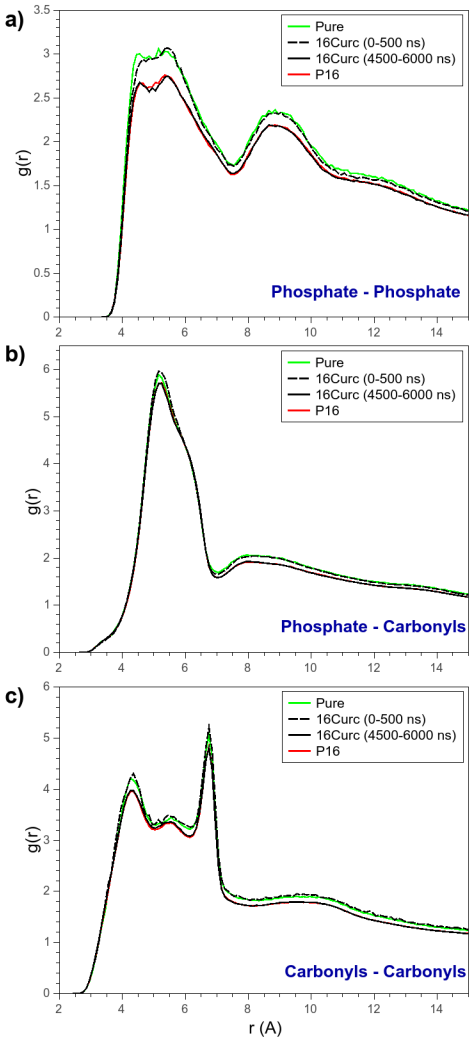
Acompanhando a dispersão do grande *cluster* inicial, as moléculas de curcumina reduzem a interação entre si, passando a interagir mais favoravelmente com os fosfolipídios, com destaque para a variação na interação apolar com as caudas (Fig. 3.14: Curc-Tails) e coulombiana com o glicerol e com as cabeças (Fig. 3.15: Curc-Glycerol e Curc-Headgroups). Esta dinâmica se reflete na interação entre os próprios fosfolipídios componentes da bicamada (Fig. 4.1): para o termo de van der Waals, é observada uma redução significativa na interação entre as cabeças polares, e também das cabeças com glicerol, cabeças com caudas, glicerol com caudas, e caudas com caudas. As interações coulombianas envolvendo cabeças e glicerol também mostram uma tendência de redução, mas menos significativa – como o trecho final da curva em preto irá coincidir com a curva em vermelho, uma forma de avaliar a ação da curcumina é comparar os pontos e as barras de erro da curva verde com a vermelha. Tais resultados sugerem que a presença da curcumina resulta no afastamento dos fosfolipídios, o que pode ser avaliado calculando-se a função de distribuição radial de pares, g(r), para átomos representativos da molécula de fosfolipídio.

A Fig. 4.2a mostra que a distribuição dos átomos de fósforo nas simulações 16Curc (4500~6000 ns) e P16 coincidem (linhas contínuas em preto e vermelho, respectivamente). Antes da adsorção da curcumina, por outro lado, a distribuição dos átomos na bicamada da simulação 16Curc (0~500 ns; linha tracejada em preto), coincide é com a bicamada pura. Ou seja, antes da adsorção da curcumina, 16Curc reproduz a estruturação de uma bicamada pura; mas com as moléculas de curcumina adsorvidas e dispersas pela estrutura lipídica, o padrão de estrutura passa a coincidir com o da simulação P16. A comparação dos dois pares de curvas mostra uma redução na amplitude da distribuição, e integrando da primeira camada (r = 0 ~ 7,55 Å), obtém-se que enquanto na bicamada pura cada átomo de fósforo observa aproximadamente 9,1 vizinhos, nas bicamadas com curcumina este valor cai para 8,2 vizinhos. Tal efeito é equivalente ao que seria obtido se a bicamada fosse simulada a uma temperatura maior, com o consequente afastamento entre os lipídios devido ao aumento da energia cinética, e redução na amplitude da distribuição (menos vizinhos). Portanto, apesar de não ser observado deslocamento relevante na posição dos picos (em r), a comparação das curvas do g(r) indica que a curcumina promove o afastamento entre os fosfolipídios da bicamada. A redução nos picos nas duas primeiras camadas também ocorre entre os átomos de fósforo e os oxigênios das carbonilas do glicerol (Fig. 4.2b), embora menos significativa, indicando não ocorrer um ordenamento relevante das cabeças (afastamento em z). É observado ainda um afastamento entre as carbonilas do glicerol (Fig. 4.2c). Portanto, para todos os pares analisados no gráficos de g(r), antes da adsorção das moléculas de curcumina (0~500 ns), os resultados para 16Curc (linha tracejada em preto) convergem para a bicamada pura, mas no trecho final (4500~6000 ns) coincidem com a distribuição da P16, comprovando que as duas bicamadas com as moléculas de curcumina dispersas são estruturalmente equivalentes.

O afastamento entre os lipídios ocorre portanto essencialmente no plano da bicamada (xy), resultando na redução da interação entre os lipídios, e possivelmente tendo consequências também na hidratação da bicamada. Analisando as interações dos lipídios com a água (Fig. 4.1), os gráficos indicam um aumento na interação das cabeças e o do glicerol com a água nas bicamadas com curcumina, enquanto a interação das caudas com água não é alterada. Estes resultados sugerem um aumento na hidratação, principalmente na região das cabeças, menos expressivo na região do glicerol, e sem variação nas caudas, o que é confirmado pelo cálculo da função g(r) (gráficos não apresentados), sendo observado um aumento na distribuição entre cabeças e água (átomo de fósforo com oxigênio das moléculas

de água) nas bicamadas com curcumina em comparação com o controle, um aumento mais sutil nos picos entre glicerol e água (oxigênios da carbonila com oxigênio da água), e variação inexpressiva entre caudas e água (CH_3-terminal com oxigênio da água). Experimentos em vesículas POPC (LEITE et al., 2018) indicam que a curcumina perturba a estrutura lipídica ao reduzir o empacotamento lipídico das membranas, o que condiz com o afastamento entre os lipídios aqui observado.

Figura 4.2 – Função de distribuição radial de pares g(r) entre os grupos fosfato (átomos de fósforo) (a), fosfato e carbonilas (átomos de fósforo com o de oxigênio dos grupos carbonila do glicerol) (b), e entre os grupos carbonila (entre os átomos de oxigênio dos grupos carbonila) (c). São mostradas duas curvas para a simulação 16Curc: a primeira (linha tracejada em preto) refere-se ao período inicial da simulação (0~500 ns), em que as curcumina ainda não adsorveram completamente na bicamada; a segunda (linha contínua em preto) é calculada no trecho final da simulação (4500~6000 ns) e refere-se ao período de estabilidade, onde a curcumina já se distribuiu pelas duas monocamadas.



4.1.2 Área por lipídio e espessura da bicamada

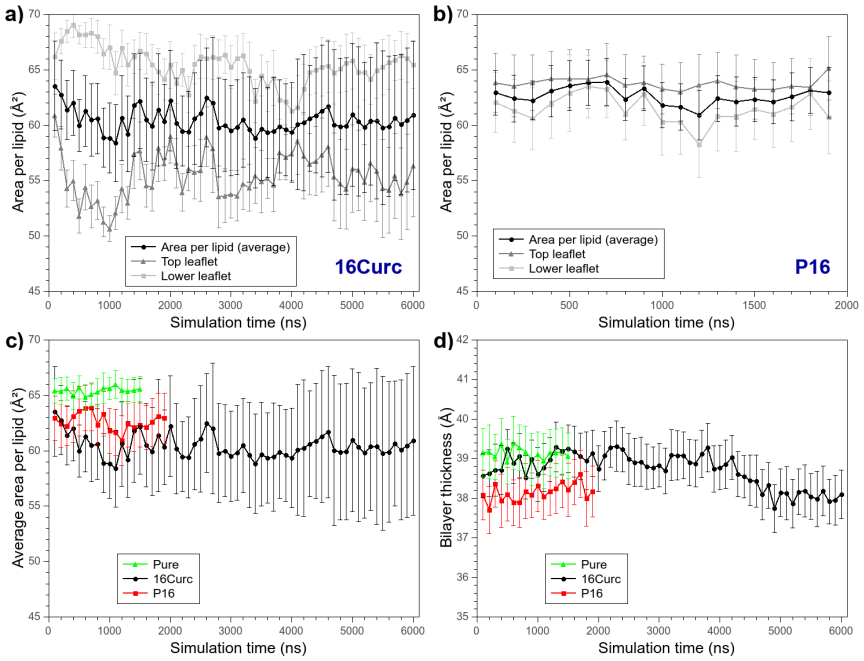
A área por lipídio é uma grandeza estrutural importante no estudo de bicamadas, pois quantifica a área média ocupada por cada molécula de lipídio nos planos (um em cada monocamada) definidos pelos átomos de fósforo. Em bicamadas puras, o cálculo da área por lipídio é feito através da divisão das dimensões da caixa de simulação caixa de simulação pelo número de lipídios (PORASSO; LÓPEZ CASCALES, 2012)

$$APL = \frac{2L_x . L_y}{n_{POPC}} . \quad (4.1)$$

Entretanto, dada a localização da curcumina no interior da bicamada, faz-se necessário tratar individualmente a contribuição de cada lipídio, não sendo adequado, num primeiro momento, utilizar a Eq. 4.1 pois esta leva em consideração apenas a contribuição dos lipídios para a área da interface. Nos resultados apresentados a seguir, utilizou-se a diagramação em polígonos (tesselação) de Voronoi (SHINODA; OKAZAKI, 1998; CAMILO, 2017), que possibilita o cálculo da área ocupada por cada molécula na interface, permitindo assim que a área ocupada por moléculas de curcumina seja excluída (mesmo tratamento que normalmente é aplicado às proteínas de membrana) e que o valor apresentado seja efetivamente a área por molécula de POPC. Considerando que a adsorção da curcumina na bicamada ocorre de forma assimétrica, a área por lipídio da monocamada superior será diferente da inferior, apesar do acoplamento semi-isotrópico aplicado à *x* e *y*. A Fig. 4.3a mostra que na simulação 16Curc, enquanto a área por lipídio oscila pouco para a monocamada inferior (linha em cinza claro), na superior (cinza escuro) ela cai significativamente com a adsorção da curcumina (0~1000 ns; todas as moléculas adsorvem pela interface superior). Com a redistribuição das moléculas a partir da estrutura transmembrânica, a diferença entre a área nas duas monocamadas é reduzida, embora continue existindo. O tamanho das barras de erro evidencia a grande oscilação na grandeza, fruto principalmente da dificuldade em tratar as moléculas de curcumina – após desfeita a estrutura transmembrânica, continuar tratando-as com a exclusão da área ocupada talvez não seja adequado (a barra de erros tende a aumentar conforme a estrutura transmembrânica se desfaz), mas seria igualmente complicado tratar a curcumina como um lipídio estrutural, dado que suas moléculas não assumem tal função, apresentando uma distribuição essencialmente planar. Utilizar a média da área por lipídio entre as duas

monocamadas (em preto) reduz as flutuações e possibilita um tratamento mais simplificado. Para a simulação P16, como a curcumina já se apresenta numa distribuição dispersa pela bicamada, sem ser observado um processo de agregação significativo, praticamente não há variação estatística da área por lipídio (Fig. 4.3b), também sendo possível utilizar o valor médio entre as monocamadas (para a maioria dos pontos, a barra de erro em preto compreende os valores calculados tanto para os pontos em cinza claro quanto cinza escuro).

Figura 4.3 – Evolução da área por lipídio calculada individualmente para as monocamadas superior (cinza escuro) e inferior (cinza claro), e a média destes valores (em preto) para as simulações 16Curc (a) e P16 (b). Comparação da área por lipídio média (c) e espessura da bicamada (d) entre as bicamadas com curcumina e a bicamada pura (em verde). Cada ponto nos gráficos indica valor médio e desvio padrão para o respectivo intervalo de 100 ns.



A comparação entre a área por lipídio (média entre as monocamadas; linha em preto) das simulações com 16 moléculas e também com o obtido na simulação na bicamada POPC pura, é apresentada na Figura 19c. A área por lipídio calculada para a bicamada pura, cuja diferença na caixa de simulação é apenas na ausência das moléculas de curcumina, serve também para validação dos parâmetros utilizados nas simulações, sendo que o valor médio obtido para os 1500 ns de simulação é (65,4 ± 1,1) Å², o que está em pleno acordo com o relatado na literatura para simulações de bicamadas POPC utilizando o mesmo campo de

forças, (65,9 ± 0,9) Å² (ZHAO et al., 2007), (64,6 ± 1,0) Å² (CAPPONI et al., 2016), com campo de forças diferente, (65,0 ± 1,5) Å² (MACDERMAID et al., 2015), e também com resultados experimentais em filmes de POPC, 63~66 Å² (HYSLOP; MOREL; SAUERHEBER, 1990; SMABY et al., 1997) e (64,3 ± 1,3) Å² (KUČERKA; NIEH; KATSARAS, 2011).

Observa-se uma tendência de redução da área por lipídio nas simulações com curcumina, apesar da amplitude do desvio padrão calculado não permitir maiores interpretações. Para o trecho final de estabilidade na distribuição da curcumina em 16Curc (4500~6000 ns), a média da área por lipídio é de (60,3 ± 6,4) Å², enquanto para P16 (0~1900 ns) temos (62,6 ± 2,1) Å². Para ainteração de uma única molécula de curcumina, Lyu e colaboradores (2018) obtiveram, também utilizando tesselação de Voronoi, (63,3 ± 0,5) Å² para a bicamada pura e (64,8 ± 1,0) Å² na bicamada com curcumina, indicando um sutil aumento na área por lipídio; para a simulação equivalente neste estudo (1Curc) o resultado foi (65,9 ± 1,3) Å² para a monocamada com a curcumina ligada, valor que também indica uma tendência de aumento em relação à bicamada pura.

Considerando que os gráficos para a energia de interação e g(r) sugeriram um afastamento entre os lipídios, isto deveria resultar num aumento da área por lipídio, em linha com o observado para uma única molécula de curcumina. A tendência de redução é, portanto, fruto do método escolhido para o cálculo, e a exclusão da área ocupada pelo grande número de moléculas de curcumina, que assumem uma distribuição dispersa (*clusters* pequenos) e aberta (configuração aberta e orientação paralela ao plano da bicamada), não fornece um resultado satisfatório devido à amplitude das barras de erro – aumentar a precisão do método utilizando um *grid* com mais pontos também não foi produtivo. Aplicando diretamente Eq. 4.1, que não leva explicitamente em consideração a presença de curcumina, resulta numa área por lipídio média de (67,1 ± 0,6) Å² para 16Curc (4500~6000 ns) e (67,0 ± 0,5) Å² para P16, refletindo o aumento no plano *xy* em função da adição das moléculas de curcumina.

A espessura da bicamada é outra grandeza importante para caracterizar uma bicamada e consiste na distância, ao longo do eixo normal ao plano da bicamada (eixo *z*), entre duas regiões equivalentes nas duas monocamadas. Tipicamente, a espessura de uma bicamada é calculada pela distância média entre os átomos de fósforo ou grupos fosfato (distância P-P), mas também pode ser aplicada às carbonilas (espessura da fase hidrofóbica), ou entre os

grupos colina. A espessura das bicamadas pode ser obtida nos gráficos de perfis de densidade já apresentados, e sua evolução ao longo das simulações pode ser acompanhada nos gráficos que apresentam a trajetória (projeção em *z*) das moléculas de curcumina (a espessura instantânea é a distância vertical entre as linhas em laranja), nos quais é evidente não haver variação expressiva na espessura média calculada sobre todo o plano da bicamada. Para facilitar a comparação entre as simulações e simplificar a análise, na Fig. 4.3d é mostrada a espessura média , e desvio padrão, calculados para o respectivo intervalo de 100 ns. Os resultados indicam que no trecho inicial da simulação, antes das moléculas de curcumina se internalizarem na bicamada, o valor obtido para a simulação 16Curc (linha em preto) é equivalente ao da bicamada pura (em verde). Tendo início o processo de adsorção, a espessura passa a oscilar, mas no período final da simulação, com a dispersão das moléculas de curcumina pelas duas monocamadas, a espessura atinge a estabilidade num patamar inferior ao da bicamada pura. O valor médio calculado para o intervalo 4500~6000 ns da simulação 16Curc é de (38,1 ± 0,6) Å. Na simulação P16 (em vermelho), a espessura permanece estatisticamente igual ao longo de toda a simulação, sendo o valor médio também (38,1 ± 0,6) Å. Para a bicamada pura, o valor médio obtido é (39,1 ± 0,6) Å, em boa concordância com resultados apresentados em outros trabalhos de simulação de bicamadas POPC utilizando o mesmo campo de forças, (38,2 ± 0,3) Å (DO CANTO et al., 2011), (39,3 ± 0,6) Å (CAPPONI et al., 2016), ou com campo de forças diferente (38,1 ± 0,5) Å (MACDERMAID et al., 2015), e também com resultados experimentais, 35~41 Å (RAND; PARSEGIAN, 1989) e (39,1 ± 0,8) Å (KUČERKA; NIEH; KATSARAS, 2011).

Estudando a ação de uma única molécula de curcumina, Lyu e colaboradores (2018) obtiveram (40,1 ± 0,7) Å para a bicamada POPC pura e (39,1 ± 1,0) Å com a curcumina, o que leva os autores a afirmarem haver um afinamento da espessura, mas “por um valor não significativo”. Tal consideração pode ser imediatamente aplicada também aqui ao compararmos a espessura obtida na simulação 1Curc, (38,7 ± 0,8) Å, com o valor de referência na bicamada pura deste trabalho. A ação de 1 curcumina portanto sugere a tendência de redução da espessura, sendo de fato um afinamento observado (além da barra de erros) nas simulações com 16 moléculas de curcumina.

Tomando a ação da molécula de colesterol sobre bicamadas lipídicas como modelo, observa-se a redução da área por lipídio e aumento da espessura. Para a curcumina, os resultados sugerem que a presença da curcumina resulta no afastamento das moléculas de

lipídio, sendo observada uma sutil redução na espessura da bicamada, resultado que indica uma redução do empacotamento lipídico – ação oposta à do colesterol. É importante também levar em consideração a região em que ocorre a ação das moléculas. Enquanto o colesterol se enterra no núcleo hidrofóbico, numa orientação perpendicular à bicamada, interagindo fortemente com as caudas e aumentando o empacotamento lipídico (redução na área por lipídio), com uma fase hidrofóbica maior (aumento da espessura) e menor fluidez (redução da hidratação) (KOTENKOV et al., 2019; MACDERMAID et al., 2015), a curcumina se estabiliza na região das carbonilas dos fosfolipídios, numa configuração essencialmente aberta e paralela ao plano da bicamada. Pelos resultados apresentados, é possível observar que durante o processo de inserção, quando é estabelecido o *cluster* transmembrânico e parte das moléculas de curcumina está enterrada no núcleo hidrofóbico em orientação perpendicular (situação equivalente à verificada para o colesterol em bicamadas de POPC), é sim observado uma redução significativa da área por lipídio (Fig. 4.3a; ver a monocamada inferior). Portanto, na situação em que a curcumina assume configuração semelhante à do colesterol, seu efeito sobre a bicamada ocorre na mesma direção deste, ainda que menos efetivo – o colesterol é altamente hidrofóbico, e sua geometria planar em anéis conjugados é favorável para interagir com as caudas dos fosfolipídios (apolares, lineares e com grande liberdade conformacional). Porém, os resultados deste trabalho mostram que a estrutura transmembrânica é temporária, provavelmente um estado intermediário (isto será explorado na Seção 4.2) para que ocorra a redistribuição da curcumina entre as monocamadas, sendo que na estabilidade o que se observa são moléculas essencialmente dispersas na região das carbonilas.

A hipótese levantada por alguns autores é que a ação da curcumina está diretamente relacionada a como ocorre sua interação com a estrutura lipídica (ALSOP; DHALIWAL; RHEINSTÄDTER, 2017; KOTENKOV et al., 2019). Se estabilizada na região hidratada da membrana, a curcumina apresentaria ação de ordenamento da estrutura, com o núcleo hidrofóbico sendo afetado em menor escala e sem efeito sobre o extremo da cadeia (BARRY et al., 2009), também sendo observada a redução da hidratação da bicamada. Se inserida na fase hidrofóbica, por outro lado, a ação da molécula resultaria na fluidificação da membrana, com aumento da hidratação do sistema e de fosfolipídios em conformação *gauche*, indicativos de um sistema mais fluido e menos ordenado (ALSOP; DHALIWAL; RHEINSTÄDTER, 2017). Este trabalho mostra que a condição de estabilidade da curcumina ocorre na região hidrofóbica, interna às carbonilas, mas próxima à região hidratada. Uma redução na espessura da bicamada é indicativo de um menor ordenamento nas caudas, sendo importante então

analisar o parâmetro de ordem para uma melhor compreensão da ação da curcumina sobre o núcleo hidrofóbico.

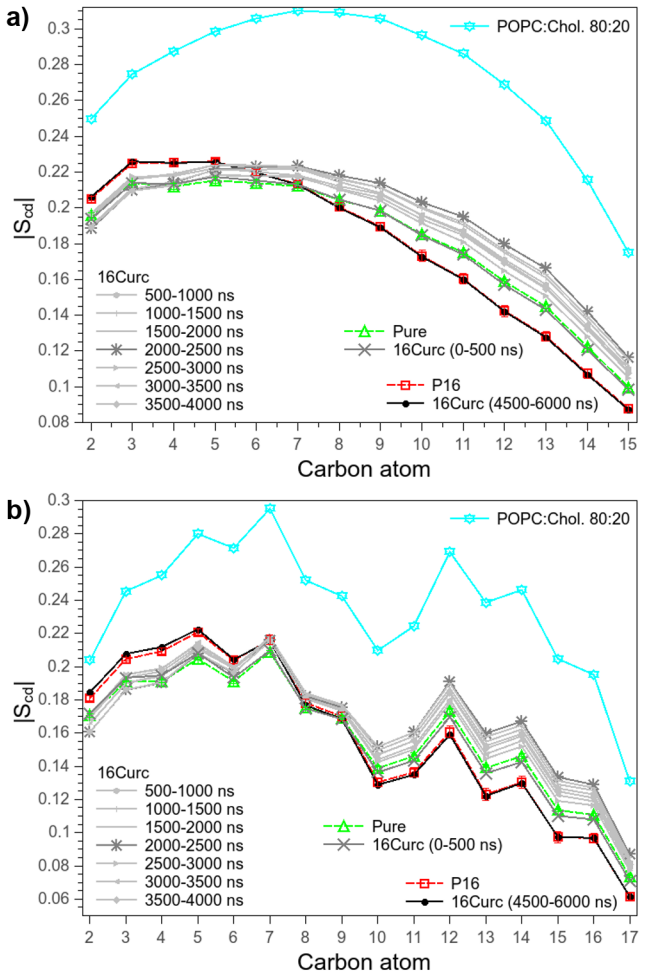
4.1.3 Parâmetro de ordem

Diferentemente da área por lipídio e da espessura da bicamada, que são propriedades estruturais médias, o parâmetro de ordem aplicado às caudas dos fosfolipídios fornece informações sobre a organização do sistema em nível atômico. A Fig. 4.4 mostra o parâmetro de ordem calculado para a bicamada pura (em verde), P16 (em vermelho) e para o período final de estabilidade da simulação 16Curc (em preto); para esta última simulação, são apresentados também o valores obtidos em intervalos de 500 ns (linhas em cinza), que serão utilizados para analisar a dinâmica durante o processo de adsorção das moléculas de curcumina.

Para ambas as cadeias, os resultados do parâmetro de ordem mostram que os fosfolipídios na simulação 16Curc, antes da internalização da curcumina (0~500 ns), apresentam uma estruturação equivalente à da bicamada pura (em verde), com os pontos (em cinza escuro) contidos na barra de erros desta. A evolução do processo de adsorção, com formação da estrutura transmembrânica, produz significativa perturbação nas caudas (linhas em cinza claro), ocorrendo o aumento do ordenamento das cadeias, com o maior valor sendo obtido no intervalo 2000~2500 ns (cinza escuro), a partir do qual passa a ser observado o processo inverso, num progressivo desordenamento das caudas. Os gráficos de perfis de densidade, calculados a cada 500 ns (ver Fig. 3.6), indicam que no intervalo 2000~2500 ns ocorre o fim da dinâmica de avanço sobre o núcleo hidrofóbico, com as moléculas de curcumina apresentando-se no maior enterramento dentre todas janelas; a partir da janela seguinte, 2500~3000 ns, já são observados os dois picos, um em cada monocamada, que serão característicos da distribuição da curcumina no período de estabilidade (4500~6000 ns), ou seja, passa a haver moléculas de curcumina se dispersando pela região do glicerol por ambas as monocamadas, processo que concluirá a redistribuição das moléculas e resultará na desestruturação do *cluster* inicial. Portanto, o maior ordenamento das caudas é observado no intervalo em que há mais moléculas de curcumina enterradas no núcleo hidrofóbico – tanto nos intervalos anteriores quanto nos posteriores a curva de probabilidade para a curcumina no centro da bicamada é menor. O efeito do colesterol sobre uma bicamada produz o aumento do

empacotamento lipídico e consequente ordenamento das caudas devido ao efeito estérico. Para auxiliar na comparação do efeito da curcumina, a Fig. 4.4 também apresenta o parâmetro de ordem calculado para uma simulação de bicamada POPC contendo 20% colesterol POPC:Chol. 80:20; em ciano) (CAMILO, 2017), e mostra que enquanto enterrada no núcleo hidrofóbico, a curcumina também produz o aumento no ordenamento das caudas, mas não de forma tão efetiva quanto o colesterol.

Figura 4.4 – Parâmetro de ordem calculado para os átomos de carbono da cauda saturada (a) e insaturada (b). Quanto maior o valor de |Scd|, maior é o ordenamento da cauda.



No período final da simulação (4500~6000 ns), o parâmetro de ordem, para ambas as caudas, é equivalente ao calculado para a simulação P16 (0~1900 ns; com a oscilação nos valores sendo indicada pela barra de erros). Portanto, no período de estabilidade, as bicamadas das simulações 16Curc (em preto) e P16 (em vermelho) são estruturalmente equivalentes. A ação da curcumina, na condição dispersa pelas monocamadas, resulta no ordenamento dos primeiros átomos de carbono (região próxima à das carbonilas, onde estão as moléculas de curcumina), mas numa redução do ordenamento no átomos de carbono centrais e do extremo das caudas, sendo seu efeito mais significativo a partir do C_9 na cauda saturada e a partir da dupla ligação na insaturada (a dupla ligação é entre o C_9 e o C_{10}). O desordenamento é condizente com um afastamento entre os lipídios, indicando que na condição de estabilidade a curcumina reduz o empacotamento lipídico (efeito contrário ao do colesterol), propiciando maior liberdade conformacional às caudas e consequentemente reduzindo a espessura da bicamada. Como isto ocorre somente do centro da cadeia para o extremo, e com ordenamento nos primeiros átomos de carbono, onde as moléculas de curcumina se estabilizaram, o efeito resultante acaba não sendo tão significativo, daí a grande dificuldade em avaliar a ação da curcumina partir de modificações nas propriedades da membrana, seja em simulações ou em experimentos.

4.2 Efeitos do *Cluster* Sobre a Bicamada

A interação e adsorção da curcumina nas bicamadas é um processo da ordem de centenas de nanossegundos em que as moléculas, essencialmente hidrofóbicas, tendo estabelecido ou não agregados na fase aquosa, são segregadas para a membrana. Nas simulações com 8 e 16 moléculas inseridas simultânea e aleatoriamente na água, o processo de adsorção consiste essencialmente na inserção do agregado inicial formado (na simulação 16Curc_R2 são dois agregados), pois embora a dispersão das moléculas de curcumina possa ocorrer já no início do processo de adsorção (assim que as moléculas começam a entrar na bicamada), os resultados sugerem que é energeticamente mais favorável que o *cluster* primeiro seja segregado para a membrana, posteriormente ocorrendo a dispersão de suas moléculas – as simulações com 8 moléculas de curcumina ilustram bem este processo (ver Fig. 3.2), com o número de *clusters* variando assim que ocorre a adesão do agregado à interface da bicamada, mas com o processo sendo acentuado só após a internalização de todas as moléculas de curcumina. A inserção de um grupo volumoso de moléculas na bicamada perturba a estrutura lipídica pré-formada, produzindo alterações energéticas e estruturais na bicamada. Estes resultados foram apresentados na Seção 4.1, mas com o foco sendo na comparação entre o período de estabilidade (após a dispersão das moléculas pelas monocamadas) e a bicamada pura. Considerando a variação nas propriedades da bicamada observada ao longo da evolução temporal da interação com o agregado de moléculas (ver Figs. 4.1 a 4.4), seria interessante explorar mais a fundo a perturbação local causada pelo *cluster* na estrutura lipídica, verificando ainda se é significativamente diferente da observada na condição de estabilidade. Além disso, a estruturação transmembrânica observada também é uma condição relatada experimentalmente (DUDA; CYGAN; WISNIEWSKA-BECKER, 2020), potencialmente consistindo num estado intermediário na interação da curcumina com bicamadas. Nesta avaliação, a simulação 16Curc será o principal objeto de estudo, mas também serão apresentadas comparações com suas réplicas e com outras simulações.

4.2.1 Perturbações locais no plano da bicamada

Durante a dinâmica de adsorção na bicamada da simulação 16Curc, essencialmente todas as moléculas de curcumina participam do *cluster* inicial (ver Fig. 3.4; processo também observado nas réplicas, Fig. 3.7, e nas simulações com 8 moléculas de curcumina, Fig. 3.2), apresentando-se numa conformação aberta (Fig. 3.12a) e sem uma orientação definida em relação à *z* (Fig. 3.12b). O processo de internalização resulta no enterramento das moléculas no núcleo hidrofóbico (Figs. 3.6 e 3.8), estabelecendo assim uma estrutura transmembrânica onde parte das moléculas assume uma orientação perpendicular ao plano da bicamada (plano *xy*) e conformação aberta (o ângulo theta assume valores entre 120 e 135º). Ao estabelecer a conexão entre as duas interfaces, a dispersão das moléculas é acentuada, processo que é acompanhado por um progressivo aumento no ângulo phi, indicando que a orientação das moléculas está mudando de perpendicular para paralela ao plano da bicamada; o *cluster* inicial passa a perder moléculas para ambas as monocamadas, o que acelera sua dissolução e resulta na redistribuição das moléculas entre as monocamadas. No equilíbrio, as moléculas de curcumina estão dispersas numa região interna à do glicerol, apresentando-se em conformação aberta e com orientação paralela ao plano da bicamada.

Os resultados observados para o parâmetro de ordem revelam que a internalização do *cluster* produz significativa perturbação na região das caudas (Fig. 4.4), mas a evolução temporal da espessura da bicamada (Fig. 4.3d) mostrou não haver uma variação significativa na propriedade. Os valores apresentados no entanto são médias obtidas para todo o plano da bicamada e não permitem uma análise do efeito localizado da curcumina na região ocupada pelo *cluster*. Neste caso, o cálculo da espessura bidimensional ao longo do plano da bicamada, obtida segmentando *xy* num *grid* de pontos e calculando o valor da espessura em cada um deles (GUIXÀ-GONZÁLEZ et al., 2014), é mais adequado para revelar possíveis perturbações locais na estrutura. Os histogramas bidimensionais (também conhecidos como *heatmaps*) permitem avaliar a espessura da bicamada ao longo do plano *xy* através de um código de cores – o código é o mesmo para todas as figuras apresentadas neste trabalho. A Fig. 4.5 mostra a espessura bidimensional média calculada a cada 100 ns de simulação para a bicamada POPC pura. Conforme esperado, para a bicamada sem curcumina (Pure), apesar de haver pequenas oscilações, a espessura da bicamada pura reflete essencialmente a média da simulação, cujo valor calculado para os 1500 ns é (39,1 ± 0,6) Å. Como um sistema fluido, a bicamada apresenta flutuações na espessura ao longo do plano e também com o tempo (de

uma janela para outra), esta é uma característica do sistema que também serve para indicar a estabilidade de sua dinâmica – uma região com espessura diferente do resto do plano e constante com o tempo indicaria um microdomínio com propriedades características na bicamada, o que de fato não é esperado para uma bicamada POPC pura.

Figura 4.5 – Espessura bidimensional da bicamada pura. Cada janela mostra a média calculada para um intervalo de 100 ns de simulação, isto é, em cada *frame* analisado, o plano *xy* é segmentado num *grid* e o valor da espessura é calculado em cada ponto, sendo apresentado na imagem a média dos valores obtidos em 100 ns de simulação (uma janela). O valor da espessura em cada ponto do plano é indicado através do código de cores da legenda, cuja variação é de 1 Å de uma cor para outra.

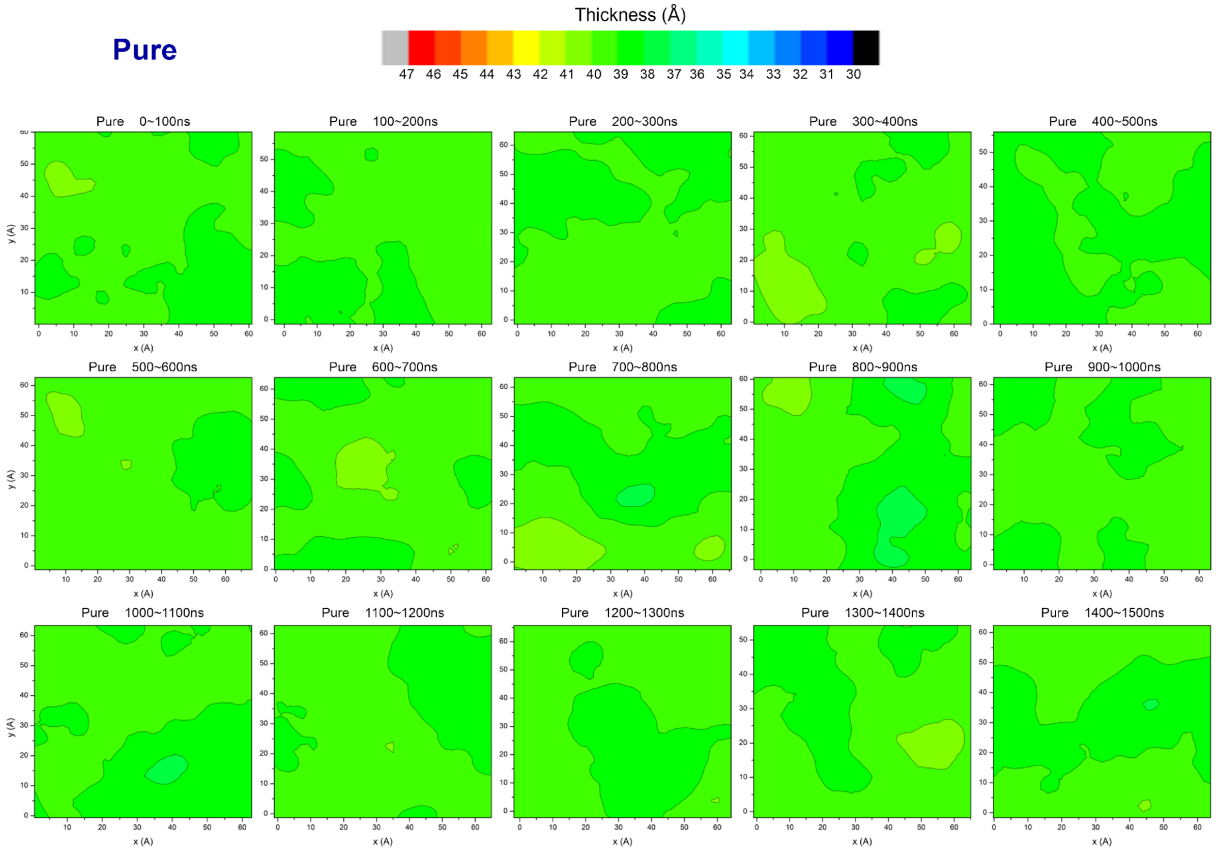


Figura 4.6 – Espessura bidimensional das bicamadas das simulações onde 1, 2, 4 ou 8 moléculas de curcumina foram inicialmente inseridas dispersas na fase aquosa.

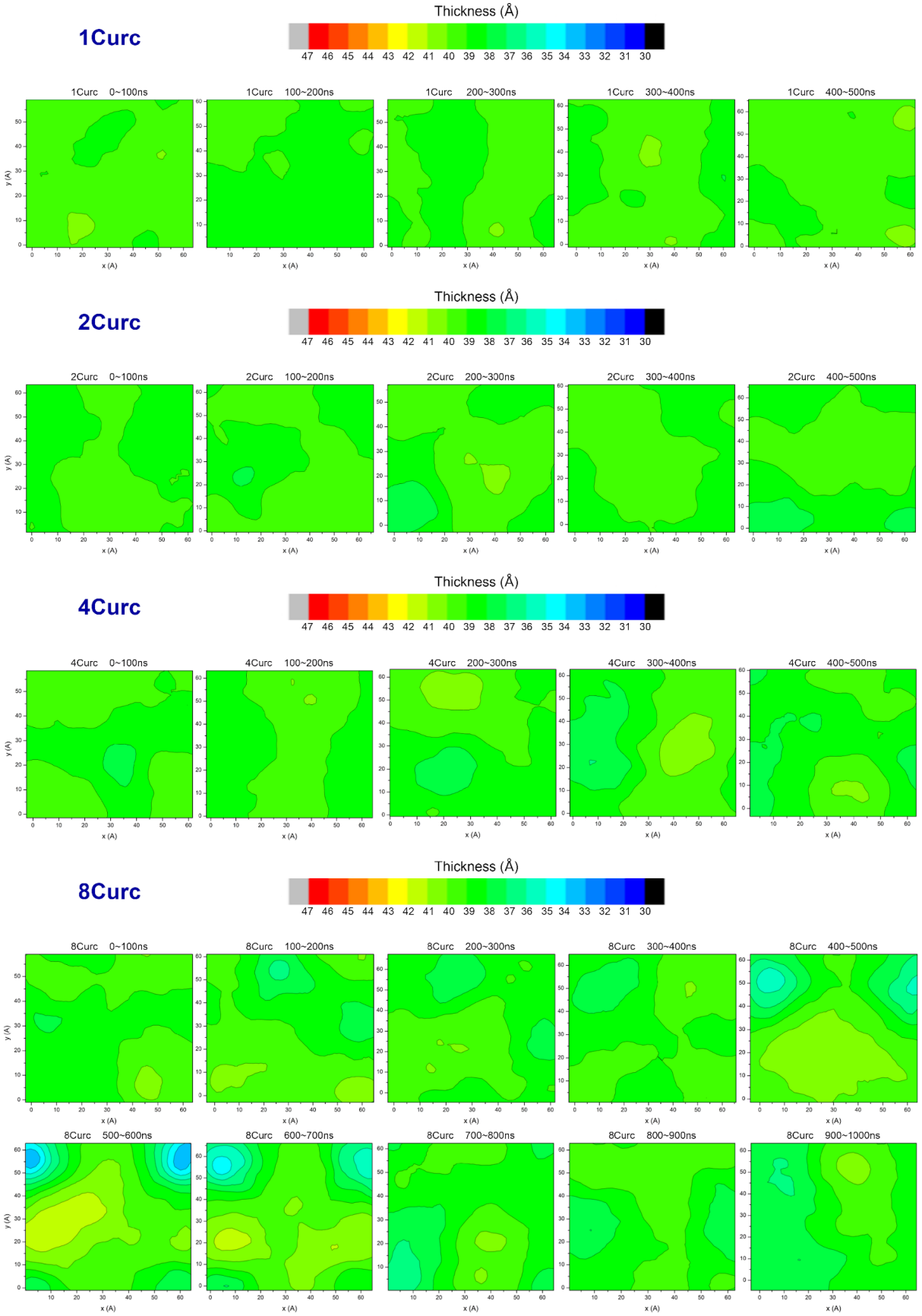


Figura 4.7 – Espessura bidimensional da bicamada na simulação em que 16 moléculas de curcumina foram inseridas dispersas na fase aquosa (16Curc: 0~3000 ns). Cada janela mostra o valor calculado para um intervalo de 100 ns, e a espessura é apresentada através do código de cores. Valores de espessura inferiores à 30 Å são mostrados na cor preta.

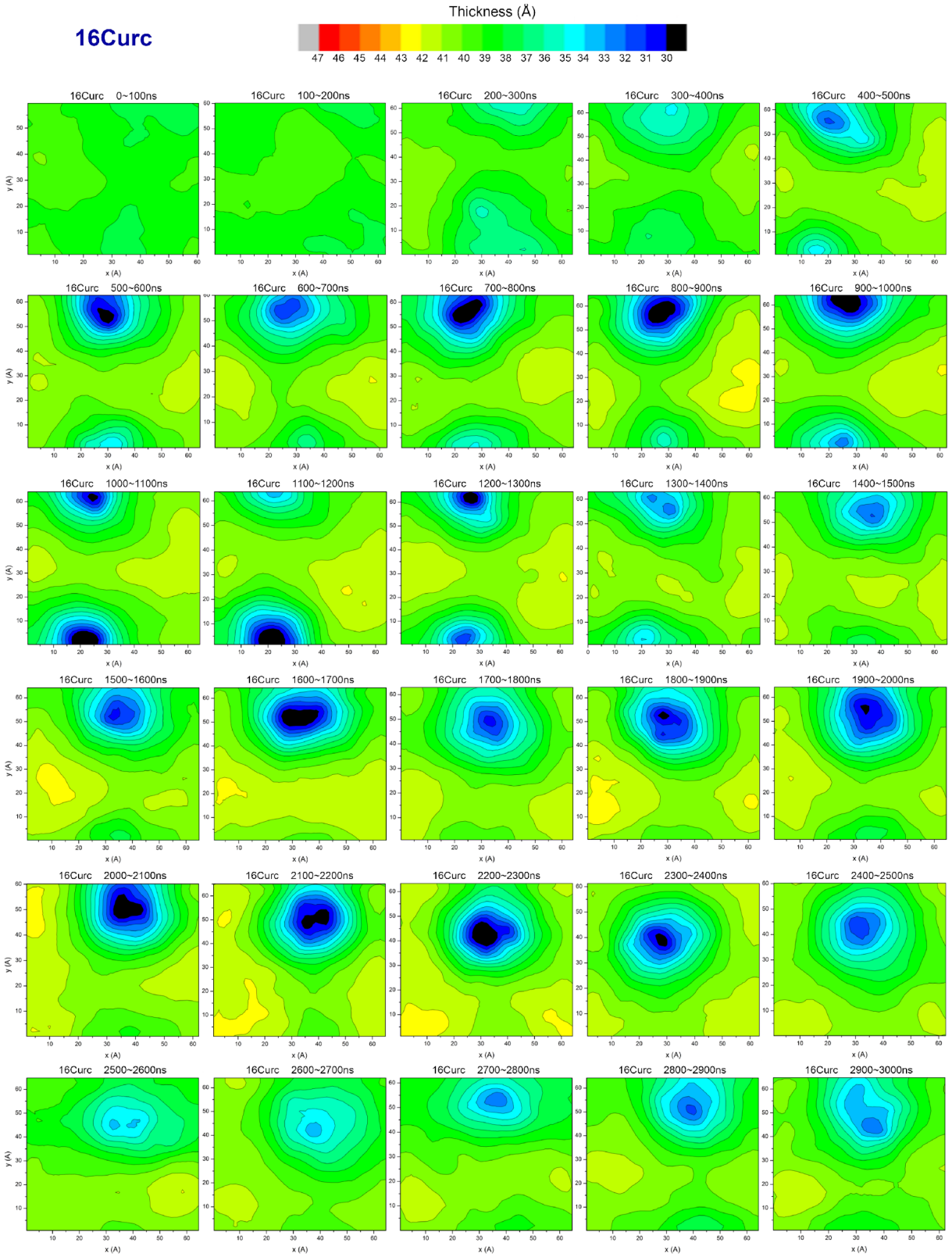
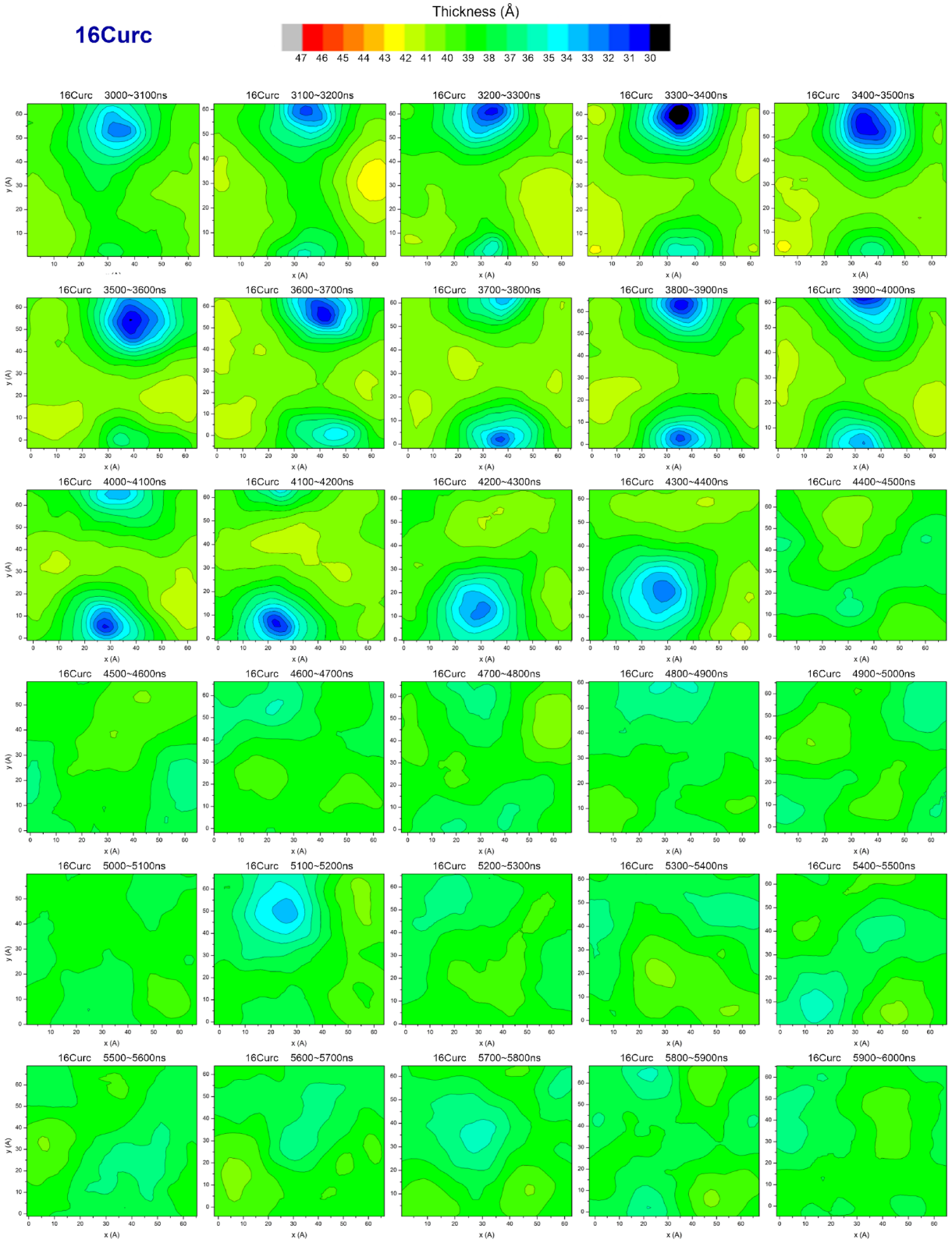


Figura 4.7 (continuação) – Espessura bidimensional da bicamada na simulação 16 Curc: 3000~6000 ns.



A comparação com os sistemas onde moléculas de curcumina foram inicialmente inseridas dispersas na fase aquosa mostra não haver perturbação significativa nas bicamadas com 1, 2 ou 4 moléculas de curcumina adsorvidas (Fig. 4.6). Na simulação com 8 moléculas de curcumina, entretanto, a primeira em que as moléculas adsorvem essencialmente como um *cluster*, observa-se haver afinamentos locais, e regiões em que a espessura chega a ser inferior à 34 Å (um afinamento da ordem de 5 Å, portanto). Tais perturbações são mais significativas no intervalo 400~700 ns, que coincide justamente com o maior enterramento do *cluster* (ver Fig. 3d), onde pelo menos uma molécula apresenta-se em orientação transmembrânica. Com a dispersão das moléculas pela monocamada (700~1000 ns), o *cluster* inicial é desfeito (Fig. 3g), ainda sendo observados pequenos afinamentos locais na espessura posteriormente, mas menos significativos (~3 Å).

Aplicado à simulação 16Curc, o cálculo da espessura bidimensional revela o quão efetiva é a perturbação produzida pela adsorção de um *cluster* de 16 moléculas (Fig. 4.7), sendo observadas regiões com espessura inferior à 30 Å, implicando em afinamentos maiores que 9 Å. Em linha com o observado para 8 moléculas de curcumina, antes da internalização das moléculas (0~200 ns), a espessura ao longo do plano coincide com o verificado na bicamada pura, mas com o avanço do processo de adsorção passam a ser observadas regiões no plano com menor espessura (200~400 ns), evoluindo para uma grande perturbação a partir da completa internalização das moléculas (comparar com a dinâmica mostrada na Fig. 3.4) e o estabelecimento da estrutura transmembrânica (400~4400 ns). Estes resultados de significativo afinamento local da espessura estão em consonância com os obtidos experimentalmente para a interação da curcumina com vesículas DOPC, nas quais foi relatado um afinamento da ordem de 10 Å na espessura das bicamadas (HUNG et al., 2008) e revelam a capacidade da curcumina em modular as propriedades de uma membrana.

Uma vez dissolvido o *cluster* e desfeita a estrutura transmembrânica (4500~6000 ns), ainda são observadas pequenas perturbações na espessura, mas estas são menos significativas (~4 Å), temporárias (mudam de região de uma janela para outra) e dispersas pelo plano (numa mesma janela, podem ser observados afinamentos em mais de uma região), em grande constraste portanto com o verificado quando da existência da estrutura transmembrânica, onde havia uma única e significativa perturbação, localizada essencialmente na mesma região do plano – apesar da análise da espessura bidimensional ser feita considerando as condições periódicas de contorno, o ajuste do *software* plotador para definir as regiões/cores nas bordas

das imagens pode fazer com que a perturbação aparente ter dois centros, embora ele seja único, como fica evidenciado nas janelas em que a região perturbada está mais centralizada).

As flutuações na espessura local explicam a redução da espessura média discutida anteriormente para o período de estabilidade (4500-6000 ns), refletindo o padrão de agregação observado no período (Fig. 3.4b), ou seja, o efeito de *clusters* pequenos (2~4 moléculas) e temporários. Por isso as perturbações são menores e ocorrem dispersas pelo plano: *clusters* pequenos têm uma maior mobilidade, pois além de menores, sua difusão é facilitada por estarem ligados em uma única monocamada, enquanto que a estrutura transmembrânica se ancora por as ambas as interfaces. A análise bidimensional da espessura da bicamada na simulação P16 (Fig. 4.8) mostra que estas mesmas considerações também valem para o sistema em que a estabilidade foi obtida a partir da inserção progressiva de moléculas, com a adsorção de moléculas individuais, evitando assim a prévia formação de *clusters* e reduzindo a perturbação que seu processo de internalização produz na bicamada. Considerando que, por todas as propriedades apresentadas anteriormente, a bicamada da simulação P16 (0~1900 ns) é equivalente à do período de estabilidade da simulação 16Curc (4500~6000 ns), é um resultado esperado que as pequenas perturbações ao longo do plano sejam equivalentes nas duas bicamadas.

Para as réplicas de 16 moléculas de curcumina inseridas aleatoriamente na água (Fig. 4.9), a espessura bidimensional inicialmente é equivalente à da bicamada pura, passando a apresentar flutuações locais com o início do processo de adsorção do aglomerado (16Curc_R1) ou aglomerados (16Curc_R2), e revelando um significativo afinamento local, também superior a 9 Å, quando estabelecida a estrutura transmembrânica. As réplicas reproduzem portanto o mesmo padrão observado na Fig. 4.7, com a diferença de não amostrarem o período de estabilidade, já que este processo leva mais tempo como observado nas Figs. 3.7 e 3.8. Além disso, para 16Curc_R1 é observado um tempo maior para que a perturbação se torne mais efetiva (~700 ns), possivelmente reflexo do tempo necessário para que a estrutura transmembrânica se estabelecesse. Na simulação 16Curc_R2, o efeito do agregado de moléculas de curcumina sobre a bicamada também é observado num tempo de simulação maior (~900 ns), mas neste caso, a formação da estrutura transmembrânica ocorreu a partir da interação de dois *clusters* (de 9 e 7 moléculas) absorvidos um em cada monocamada; entretanto, apesar da dinâmica de formação da estrutura ter sido diferente, uma vez estabelecida, a perturbação que ela produz sobre a bicamada é equivalente à verificada

nas duas simulações em que a adsorção ocorreu a partir de um único grande *cluster* (de 16 ou 15 moléculas).

Figura 4.8 – Espessura bidimensional da bicamada com 16 moléculas de curcumina obtida a partir da inserção progressiva de moléculas (P16). O valor da espessura em cada ponto do plano é indicado através do código de cores da legenda, cuja variação é de 1 Å de uma cor para outra.

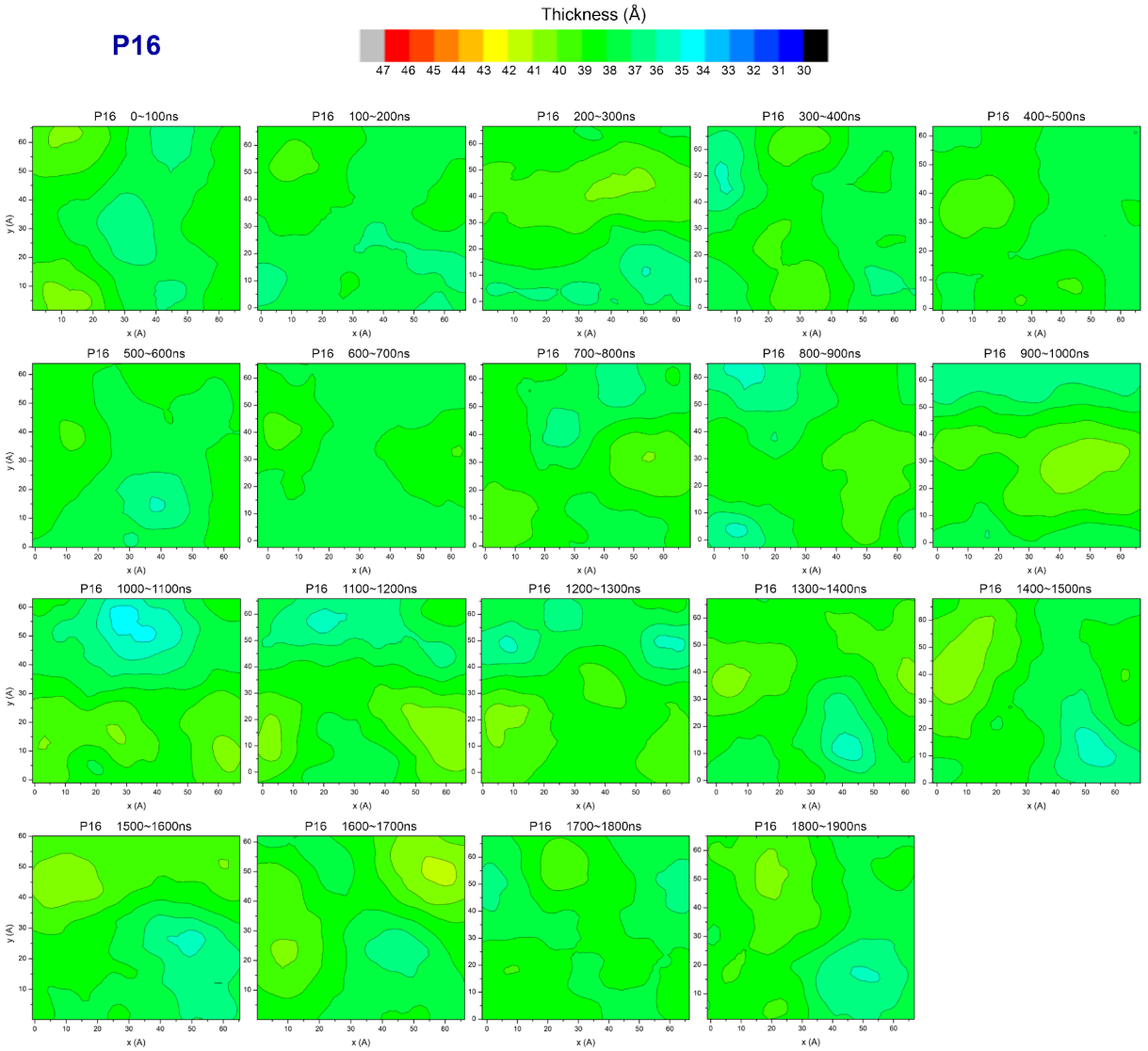


Figura 4.9 – Espessura bidimensional da bicamada nas réplicas com 16 moléculas de curcumina inicialmente inseridas na fase aquosa do sistema. Valores de espessura inferiores à 30 Å são mostrados na cor preta.

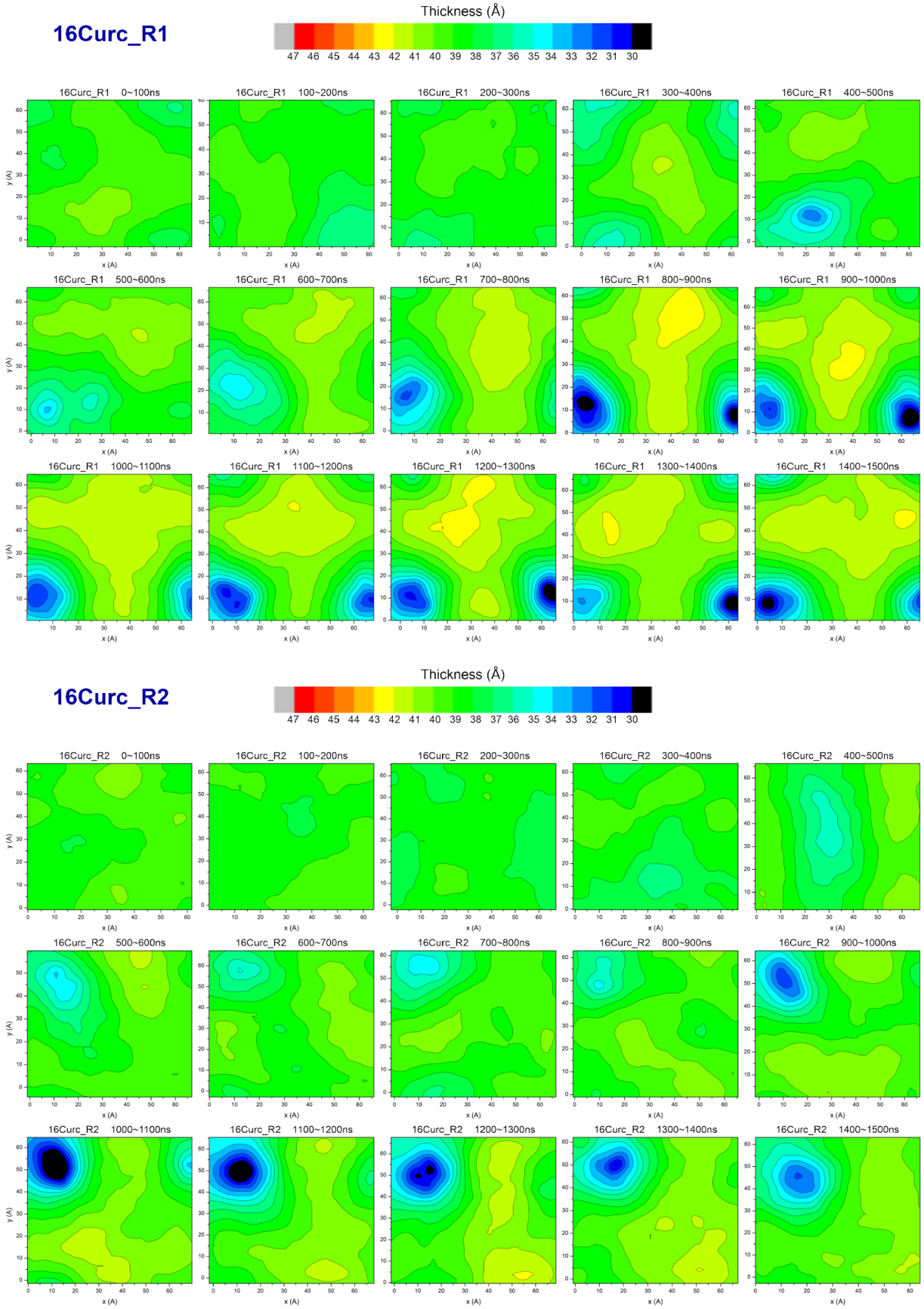
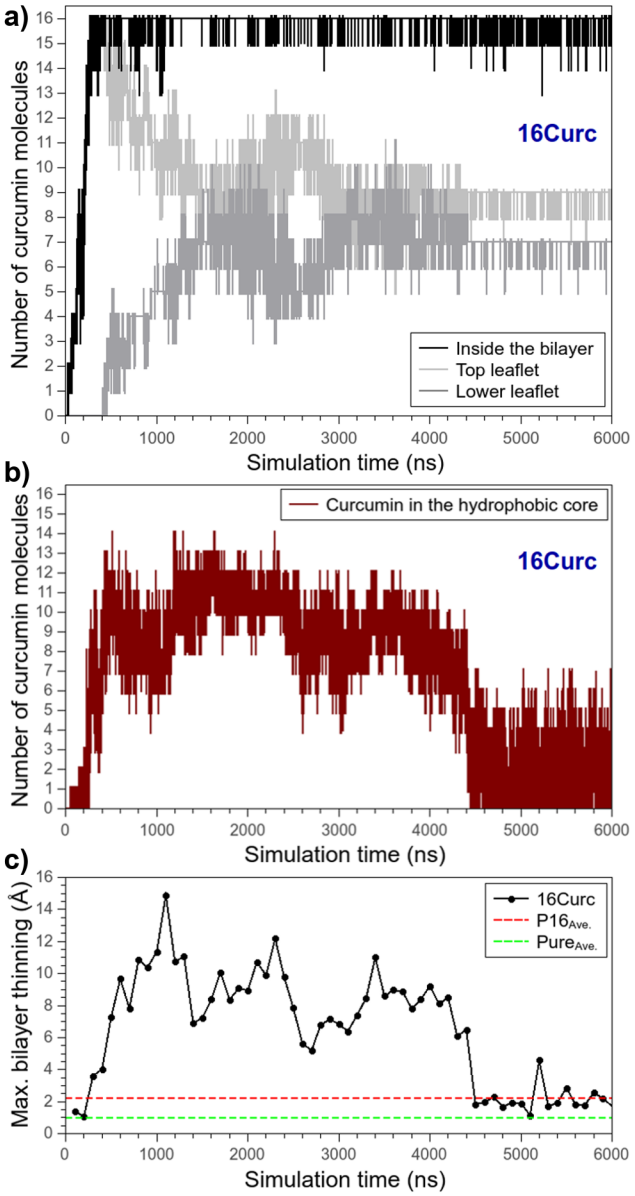


Figura 4.10 – a) Número de moléculas de curcumina no interior da bicamada (em preto), discriminadas se integram a monocamada superior (cinza claro) ou inferior (cinza escuro); b) Número de moléculas de curcumina na região entre ± 9 Å do centro de bicamada; c) Afinamento da bicamada (pontos em preto) no respetivo intervalo de 100 ns (diferença entre a médio da espessura no período e na região da maior perturbação), as linhas tracejadas indicam o afinamento médio calculado na simulação P16 (vermelho) e para a bicamada pura (verde)



Analisando a dinâmica na simulação 16Curc, a contagem do número de moléculas no interior da bicamada é mostrada na Figura 4.10a (linha em preto), onde também é apresentado o número de moléculas nas monocamadas superior (cinza claro) e inferior (cinza escuro). Observa-se que a completa adsorção do *cluster* de 16 moléculas pela monocamada superior

coincide com o início do processo de redistribuição de moléculas para a monocamada inferior (antes disso, a linha em cinza claro coincide com a em preto, pois todas as moléculas de curcumina que estão na bicamada foram internalizadas pela interface superior). Considerando que a partir dos 400 ns todas as moléculas de curcumina estão contidas na bicamada (Fig. 5a), a troca de moléculas entre as monocamadas necessariamente ocorre através da passagem pelo núcleo hidrofóbico da estrutura, isto é, passando pelo centro da bicamada. A contagem de curcumina na região entre ± 9 Å do centro de bicamada (Fig. 4.10b) indica que o avanço de moléculas sobre o núcleo da estrutura é uma condição para que todas as moléculas de curcumina sejam internalizadas – para que a curva em preto na Figura 4.10a continue crescendo e todas as 16 moléculas adsorvam na bicamada, a curva em marrom tende a crescer. Assim, a exposição da curcumina à água faz com que suas moléculas se agreguem e, na presença de uma estrutura lipídica, as moléculas são segregadas para a bicamada, mas ao invés do *cluster* ir perdendo moléculas progressivamente numa deposição contínua de moléculas na estrutura lipídica, é energeticamente mais favorável que todo o agregado primeiro seja internalizado para depois ocorrer a dispersão das moléculas; a interação entre os lipídios componentes entretanto impõem limites à adsorção do grande agregado de moléculas e estas são empurradas para o núcleo hidrofóbico, avançando sobre o centro da estrutura e sobre a monocamada oposta. Os gráficos mostram que enquanto ocorre a dinâmica de interação com os fosfolipídios (400~4400 ns), a maioria das moléculas de curcumina (7~13 moléculas) está no centro da bicamada, e a quantidade de curcumina em cada monocamada oscila até ser atingida aproximadamente a mesma proporção em cada (7/9). Com a dispersão do *cluster* inicial e a estabilização na região do glicerol (4500~6000 ns), a estrutura transmembrânica é desfeita e poucas moléculas de curcumina continuam acessando a região central da bicamada.

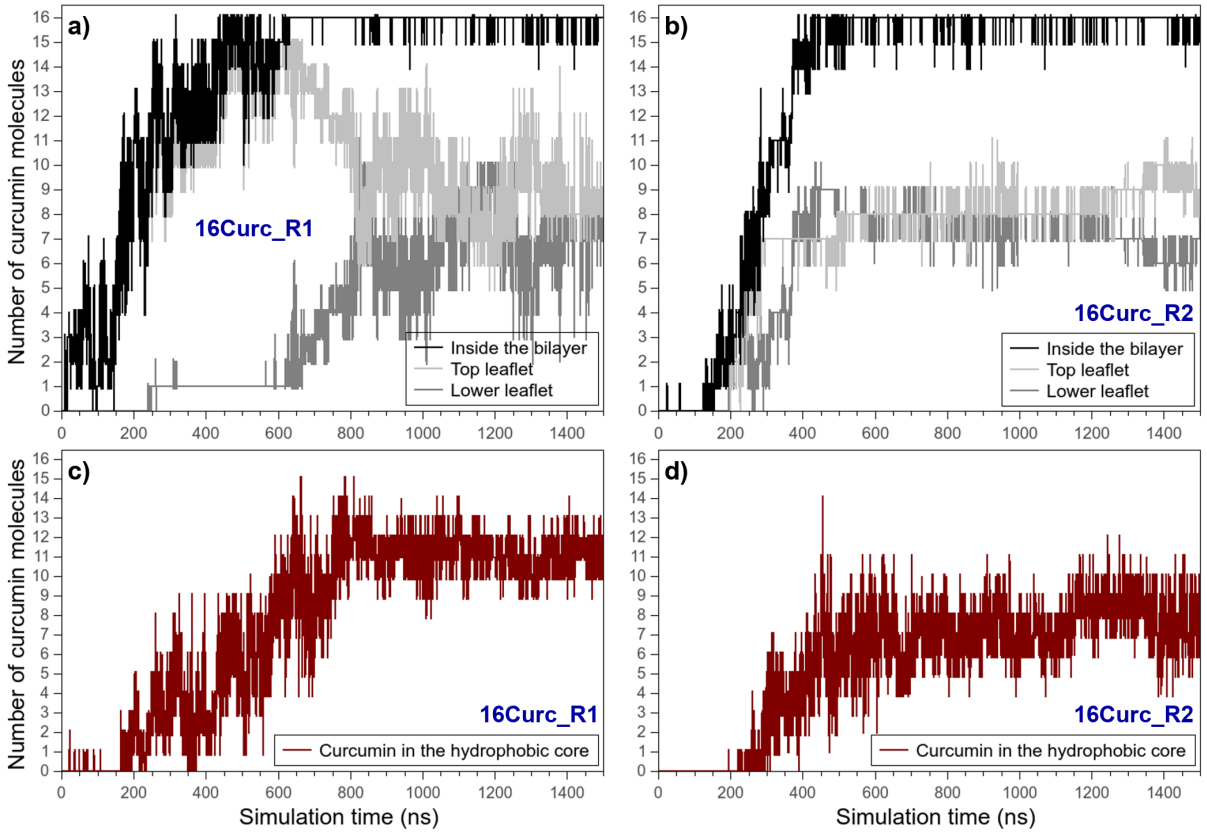
Pelo gráfico da Fig. 4.10c, é possível comparar a dinâmica das moléculas de curcumina adsorvidas e a consequente perturbação na espessura da bicamada. Cada ponto (em preto) mostra o maior afinamento (diferença entre a espessura média no intervalo e o valor na região que apresenta a menor espessura, isto é, a região de maior perturbação) calculado para a simulação 16Curc em intervalos de 100 ns, e sua comparação com o afinamento médio calculado na simulação P16 (linha tracejada em vermelho) e na bicamada pura (linha tracejada em verde). Reproduzindo quantitativamente o padrão observado na Fig. 4.7, antes da adsorção da curcumina, a perturbação na simulação 16Curc é mínima e devido à dinâmica de interação entre os lipídios componentes, apresentando valores equivalentes aos obtidos

para a bicamada pura, cuja perturbação média é 0,95 Å nos 1500 ns de simulação. Com a internalização do *cluster*, a perturbação cresce significativamente, chegando a atingir 15 Å, e mostrando um padrão de variação correspondente ao obtido para o número de moléculas de curcumina no centro da bicamada. No período de estabilidade (4500~6000 ns), a perturbação na bicamada é equivalente ao calculado para a bicamada P16, cujo valor médio nos 1900 ns de simulação é 2,2 Å, pequena quando comparada às variações observadas durante a existência da estrutura transmembrânica, mas ainda assim mais que o dobro da obtido na bicamada pura.

Respeitada a proporção do tempo de simulação, as considerações anteriores podem ser imediatamente aplicadas à réplica 16Curc_R1 (Fig. 4.11), com um grande *cluster* (15 moléculas) mostrando uma dinâmica de interação com a bicamada, e consequente perturbação, equivalente à observada acima. Para a segunda réplica, 16Curc_R2, onde a curcumina estabelece dois *clusters* (7 e 9 moléculas) na fase aquosa e cada um adsorveu por uma interface, a distribuição de moléculas entre as monocamadas é garantida já na internalização (ver Fig. 4.11b; as curvas em cinza claro e escuro crescem juntas), o que, em princípio, poderia dispensar a necessidade de formação da estrutura transmembrânica para redistribuição das moléculas. Por outro lado, o número de moléculas na região central da bicamada (Fig. 4.11d) cresce durante o processo de adsorção dos *clusters*, e como neste caso a perturbação está ocorrendo por ambas as monocamadas, por difusão os dois agregados acabam se unindo no centro, estabelecendo então uma estrutura transmembrânica, num processo possivelmente cooperativo. Observe, pela Fig. 4.9, que a região perturbada na bicamada inicialmente é extensa mas pouco significativa (400~600 ns), e progressivamente é reduzida na área que ocupa, ampliando seu efeito. Comparando com a análise de *clusters* (Fig. 3.7d), verifica-se que é neste intervalo que ocorre a interação entre os dois agregados iniciais, vindo a estabelecerem a estrutura transmembrânica (no período 500~700 ns, o maior *cluster* chega a ter 11 moléculas, mais do que os *clusters* iniciais tinham). A Fig. 3.7d mostra que uma vez internalizados, ambos os *clusters* passam a perder moléculas para a região do glicerol, e a estrutura transmembrânica é formada pelas moléculas de curcumina que ainda integram os *clusters* iniciais; nas outras simulações isto também ocorre, como já discutido, mas nesta réplica é potencializada pois há moléculas se dispersando por ambas as interfaces desde a adsorção, algo que leva milhares de ns para começar a ocorrer na simulação 16Curc (comparando os perfis de densidade, observa-se que para 16Curc_R2 aos 500 ns já estão presentes os dois picos da curcumina na região do glicerol, enquanto que na simulação

16Curc eles só estão definidos essencialmente a partir dos 2500 ns). Analisando a evolução do número de moléculas de curcumina no centro da bicamada (Fig. 4.11d), por outro lado, observa-se uma estabilidade após a formação da estrutura transmembrânica, num patamar inferior ao das outras duas bicamadas (os *clusters* já haviam perdido moléculas antes de ser estabelecida a estrutura transmembrânica), mas revelando o mesmo padrão, o que indica que não necessariamente a dinâmica da curcumina será mais rápida, e que ainda poderão ser necessárias várias centenas de ns para a estrutura no centro da bicamada se desfazer (a perturbação da espessura observada nesta bicamada é tão significativa quanto nas outras duas), apesar da proporção de moléculas de curcumina em cada monocamada já ser aproximadamente equivalente. A redistribuição das moléculas entre as monocamadas é, portanto, uma das consequências da formação da estrutura transmembrânica.

Figura 4.11 – Dinâmica das moléculas de curcumina nas réplicas da simulação 16Curc: a, b) número de moléculas de curcumina no interior da bicamada (em preto), discriminadas se integram a monocamada superior (cinza claro) ou inferior (cinza escuro); c, d) Número de moléculas de curcumina na região entre ± 9 Å do centro de bicamada.



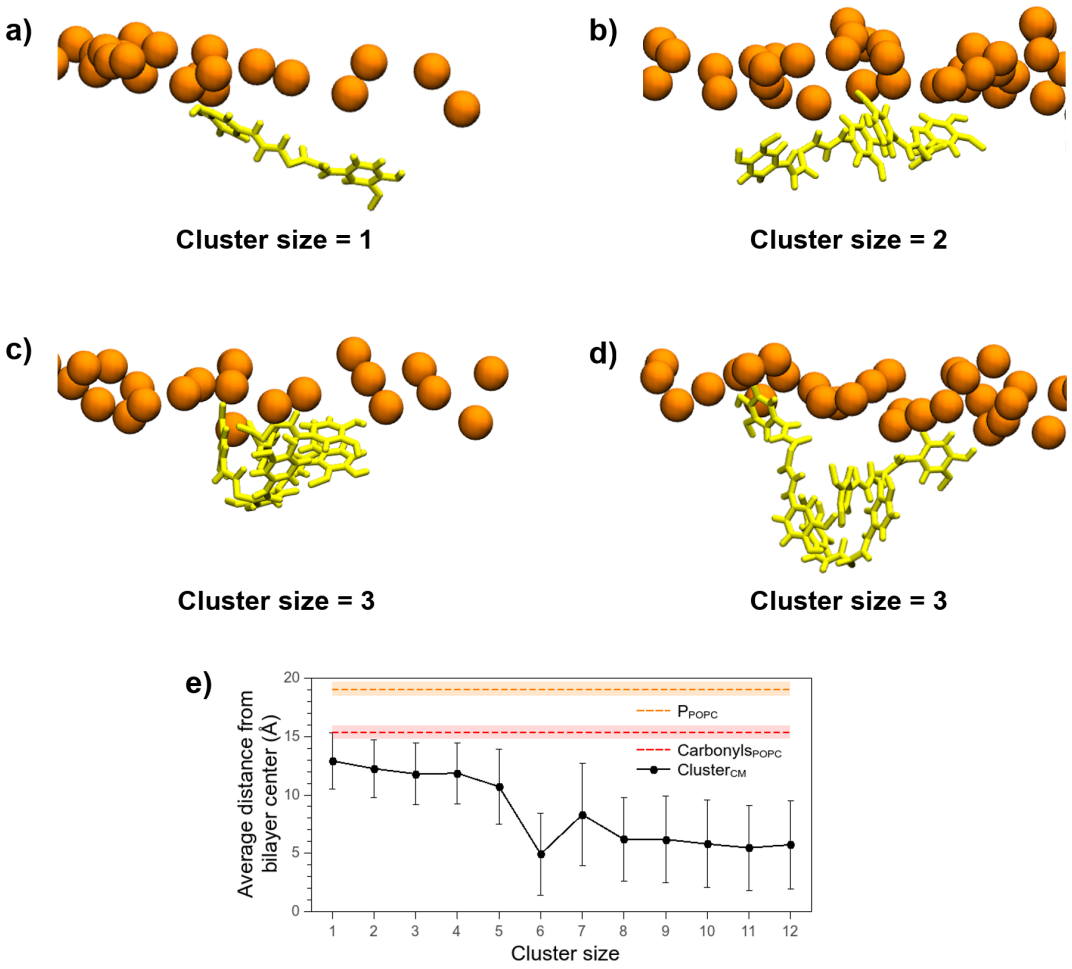
4.2.2 Tamanho do *cluster* e formação da estrutura transmembrânica

Ao serem inseridas na fase aquosa, a ação da água faz com as moléculas de curcumina se agreguem em *clusters*, que são segregados para a bicamada. Dependendo do tamanho destas estruturas, a monocamada por onde adsorveram não é capaz de comportar a quantidade de moléculas, e a curcumina avança sobre o núcleo hidrofóbico, estabelecendo assim uma estrutura transmembrânica que interage com ambas as interfaces da bicamada e define um microdomínio na membrana, uma região com propriedades locais distintas das observadas ao longo do resto da estrutura. A perturbação local na bicamada é, portanto, consequência direta da ação das moléculas de curcumina no centro da estrutura lipídica, além disso, sua ação também produz alterações na fluidez da estrutura lipídica, como o aumento do ordenamento das caudas dos fosfolipídios indicou (Fig. 4.4).

O resultados obtidos da simulação 16Curc, no entanto, mostraram que a estrutura transmembrânica é um estado transiente e com a evolução da dinâmica de interação com lipídios, as moléculas de curcumina tendem a se dispersar pela região do glicerol, o que reduz o tamanho do *cluster* em orientação transmembrânica e acaba por desestruturá-lo. Os resultados obtidos neste estudo indicam que o enterramento da curcumina no núcleo hidrofóbico está fortemente relacionado ao tamanho do *cluster* estabelecido. A Fig. 4.12 ilustra esta questão através alguns recortes de *frames* das simulações: (a) uma molécula de curcumina individual apresenta-se aberta e essencialmente paralela ao plano da bicamada (mostrado através dos átomos de fósforo, em laranja), resultado que vale para todos os sistemas uma vez atingido o equilíbrio; (b) mesmo dispersas pela bicamada, as moléculas de curcumina podem interagir entre si, formando dímeros temporários onde as moléculas ainda mantém a configuração aberta e orientação paralela ao plano; se o *cluster* cresce mais, tal configuração ainda pode se manter (c), mas também passam a ser observados casos em que o *cluster* assume uma estruturação diferente, com moléculas ainda abertas assumindo uma orientação perpendicular à bicamada e se enterrando mais na região hidrofóbica (d). Calculando a posição do centro de massa dos *clusters* ao longo da simulação 16Curc e classificando-os pela quantidade de moléculas no *cluster*, é possível estabelecer uma relação entre seu tamanho e a distância média em relação ao centro da bicamada (seu enterramento). Este resultado é mostrado na Fig. 4.12e e revela que *clusters* de 1 a 4 moléculas, na média, ocupam posições próximas à região das carbonilas (indicada pela região em vermelho no gráfico), mas o enterramento aumenta progressivamente conforme o tamanho do *cluster*

cresce (5, 7 ou 8 moléculas), atingindo um patamar mais próximo do centro da bicamada do que da região das carbonilas para *clusters* maiores (9 a 12 moléculas) – para *clusters* de 6 moléculas, em específico, o ponto foge ao padrão dos demais, possivelmente porque há uma baixa amostragem de *clusters* com esta quantidade de moléculas (menos de 1% do total analisado). Este padrão concorda com os resultados apresentados até aqui, pois durante a existência da estrutura transmembrânica esta consiste essencialmente de um *cluster* grande (Fig. 3.4b e 3.5), cujas moléculas estão próximas ao centro da bicamada (Figs. 4.6 e 4.10b) e portanto produzindo grande perturbação na estrutura lipídica (Figs. 4.4 e 4.7), enquanto que no período de estabilidade, são observados *clusters* pequenos, ainda na região hidrofóbica, mas com pouco enterramento e produzindo apenas pequenas perturbações locais na bicamada.

Figura 4.12 – a) Uma molécula individual de curcumina (em amarelo) estabilizada numa configuração aberta e paralela ao plano da bicamada (representado pelos átomos de fósforo, em laranja). Em *clusters* com duas (b) e três moléculas (c), a curcumina ainda consegue manter a configuração aberta e paralela, mas também são observados agregados em que ela assume uma configuração diferente (d), com algumas moléculas mais enterradas no núcleo hidrofóbico. e) Distância média do centro de massa do *cluster* ao centro da bicamada em função do tamanho do *cluster* para a simulação 16Curc.



O mecanismo de ação da curcumina está, portanto, relacionada à região da bicamada em que se localiza, o que, por sua vez, é consequência do tamanho dos agregados que as moléculas estabelecem. Na simulação 16Curc, foi possível observar tanto a influência de um grande *cluster* sobre a bicamada, com a formação de uma estrutura transmembrânica, e posteriormente sua dissolução e a redistribuição das moléculas entre as monocamadas, quanto o efeito da presença da curcumina no equilíbrio, formando pequenos *clusters* temporários. Na simulação P16, com a inserção progressiva e gradual das moléculas, evitou-se a formação

prévia de um *cluster* na fase aquosa, com as moléculas adsorvendo individualmente e favorecendo a condição de estabilidade. Considerando que a estrutura transmembrânica é um estado transiente e que o padrão de agregação na condição de equilíbrio é de pequenos *clusters* de 1~3 moléculas, seria possível induzir a formação de uma estrutura transmembrânica também utilizando a inserção progressiva de moléculas? A simulação 16Curc mostra como resultado que após uma longa dinâmica o sistema converge para a mesma condição de estabilidade obtida na bicamada P16. Seria possível fazer o caminho inverso, ou seja, partindo de um sistema com as moléculas de curcumina dispersas pela bicamada, induzir a formação de uma estrutura transmembrânica?

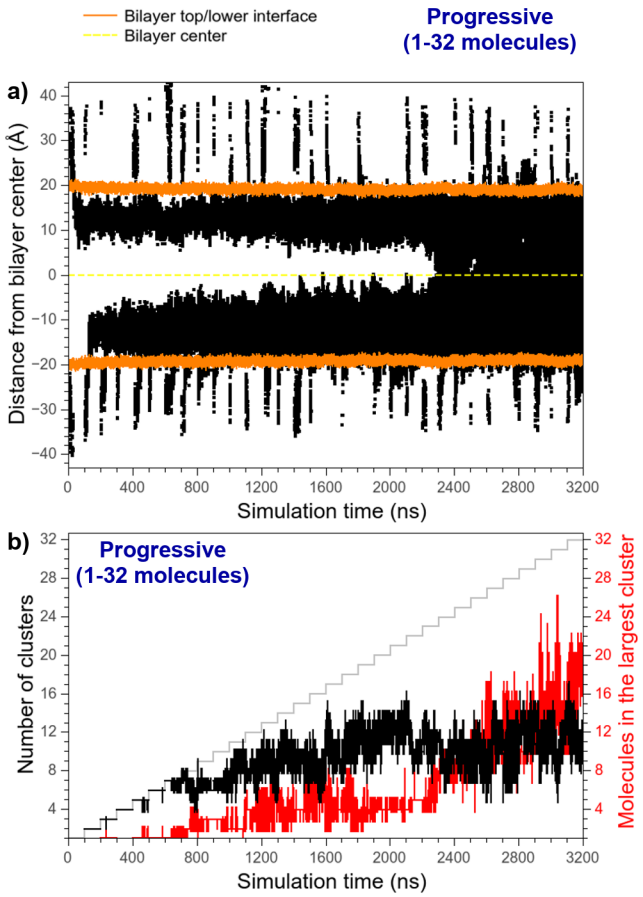
Na inserção progressiva, busca-se evitar que a agregação das moléculas de curcumina ocorra na fase aquosa, algo que também é desejável do ponto de vista experimental de forma a reduzir sua precipitação (LEITE et al., 2018). Neste caso, as moléculas adsorvem individualmente, podendo se internalizar por qualquer das interfaces, permitindo que a curcumina se distribua pelas duas monocamadas e acelerando a obtenção da condição de estabilidade. Foi observado que mesmo quando dispersas pela região do glicerol, as moléculas de curcumina podem interagir entre si e estabelecer *clusters*, mas na estabilidade eles não crescem o suficiente para que haja o enterramento na região hidrofóbica (Fig. 3.11). Uma forma de tirar o sistema do equilíbrio seria inserindo novas moléculas, induzindo a formação de *clusters* maiores, que potencialmente viriam a estabelecer uma estrutura transmembrânica. A Fig. 4.13 apresenta o resultado da inserção progressiva de 32 moléculas de curcumina seguindo o protocolo discutido na Seção 3.2, onde cada 100 ns consiste numa janela em que uma molécula de curcumina adicional foi inserida na fase aquosa – a simulação consiste na continuação do processo mostrado na Fig. 3.11, prosseguindo por mais 16 janelas/moléculas. A projeção em *z* da trajetória do centro de massa de cada molécula (Fig. 4.13a; cada molécula é representada por um ponto em preto), mostra que as moléculas de curcumina continuam a adsorver na bicamada, por ambas as interfaces, progressivamente ampliando sua distribuição em direção ao centro da bicamada (indicado pela linha tracejada em amarelo), até que na 23ª janela (23 moléculas de curcumina) ocorre a formação de uma estrutura transmembrânica, que permanece nas janelas posteriores.

Analisando a dinâmica da formação de *clusters* (Fig. 4.13b) observa-se que inicialmente (até a 7ª ou 8ª janela) cada molécula adsorvida não interage com a demais. A linha em cinza mostra o limite teórico do número de *clusters*, atualizado a cada janela, que é

alcançado se todas as moléculas estiverem isoladas, implicando que o maior *cluster* tem tamanho 1. O aumento da disponibilidade de moléculas dá início ao processo de agregação, mas os *clusters* formados são pequenos (2~4 moléculas), até que a partir da 22ª janela o tamanho do maior *cluster* começa a crescer de forma expressiva, sendo observada a formação da estrutura transmembrânica na 23ª janela. O processo de agregação portanto ocorre (todas as moléculas de curcumina estão no interior da bicamada) pela formação de pequenos *clusters*, que posteriormente se agregam para formar um grande *cluster* que assume uma estruturação transmembrânica – observe que o número de *clusters* (linha em preto) permanece essencialmente estável a partir da 17ª janela em diante, enquanto que o tamanho do maior *cluster* (em vermelho), que oscilava entre 2~6 moléculas desde a 7ª janela, passa a crescer significativamente a partir da 22ª janela, mantendo esta tendência.

O experimento anterior revela que a agregação das moléculas de curcumina também pode ocorrer no interior da estrutura lipídica: aumentando-se a concentração de curcumina na bicamada (razão curcumina/lipídio), as moléculas tendem inicialmente a formar pequenos agregados, mas uma vez ultrapassado o limite de saturação (a quantidade de moléculas que a bicamada comporta na região do glicerol), a curcumina se agrega de forma a estabelecer um microdomínio na membrana, sendo que novas moléculas adsorvidas tendem a integrar tal região. Considerando seu elevado coeficiente de partição, $\sim 10^4$ (LEITE et al., 2018), segregar a curcumina em microdomínios é portanto a forma da bicamada continuar recebendo novas moléculas mas preservando a interação entre os lipídios componentes e a integridade da membrana (a curcumina não é um lipídio e não assume a função de um, justamente por isso é observado o microdomínio). Além disso, como visto nas simulações com 16 moléculas de curcumina inseridas aleatoriamente na fase aquosa, a estrutura transmembrânica permite a redistribuição de moléculas entre as monocamadas, maximizando a quantidade de curcumina que podem se dispersar pela bicamada (região do glicerol).

Figura 4.13 – Inserção progressiva de 32 moléculas de curcumina: a) Projeção em *z* do centro de massa das moléculas de curcumina (pontos em preto), em relação ao centro da bicamada (linha tracejada em amarelo). Os planos definidos pelos átomos de fósforo (linhas em laranja) definem os limites da bicamada, com uma molécula adicional de curcumina sendo inserida a cada 100 ns. A simulação consiste, portanto, de 32 janelas de 100 ns cada, apresentadas lado a lado para facilitar a visualização. b) Evolução temporal do número de *clusters* (linha em preto) e tamanho do maior *cluster* (em vermelho); a linha em cinza indica o limite teórico do número de *clusters* (e também para o tamanho do maior *cluster*), sendo atualizada a cada janela.



As simulações deste estudo mostraram que para sistemas com 1, 2 ou 4 moléculas de curcumina, mesmo se houver prévia agregação na fase aquosa, o tamanho do *cluster* adsorvido não é suficiente para que haja perturbação na bicamada; nos sistemas com 8 moléculas, em que ocorreu a agregação na água, e a razão de moléculas adsorvidas nas monocamadas superior e inferior foi de 7/1 (8Curc) ou 8/0 (8Curc_R1 e 8Curc_R2), é observada a perturbação da bicamada, com algumas moléculas podendo, inclusive, assumir orientação transmembrânica, mas uma única monocamada foi capaz de comportar todas as moléculas de curcumina, sem haver a redistribuição de moléculas entre as monocamadas.

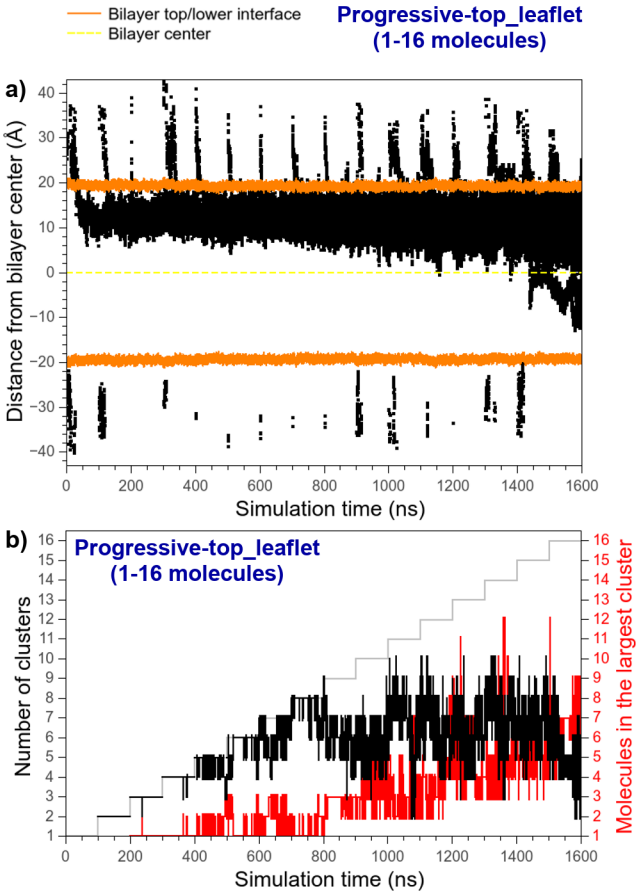
Para 16 moléculas, foi observada a formação de um grande *cluster*, adsorvendo na proporção de 16/0 (16Curc) ou 15/1 (16Curc_R1) moléculas entre as monocamadas, cuja interação com os lipídios estabelece uma estrutura transmembrânica que possibilita a deposição de moléculas na monocamada oposta e que, uma vez alcançada a condição de estabilidade, resulta na redistribuição das moléculas decurcumina entre as monocamadas para uma razão de 9/7 moléculas (16Curc). Noutra réplica, observou-se a formação de dois *clusters*, um adsorvendo por cada monocamada e resultando numa razão inicial de 9/7 (16Curc_R2), o que em princípio já assegura a distribuição de curcumina entre as monocamadas, mas a perturbação simultânea em ambas também leva à formação de uma estrutura transmembrânica.

Utilizando a inserção progressiva, o sistema com 16 moléculas obtido apresenta uma razão de moléculas de curcumina entre as monocamadas de 4/12, número ainda suficiente para a bicamada comportar sem a formação do microdomínio (as simulações 16Curc e P16, no período de estabilidade, são equivalentes, conforme extensa análise realizada anteriormente). Entretanto, ao continuar a inserção de moléculas, ora adsorvendo por uma monocamada ora por outra, na 23ª janela (23 moléculas de curcumina), é obtida a proporção de 8/15 moléculas e ocorre a formação da estrutura transmembrânica. Portanto, quando a agregação ocorre na água, a adsorção de um *cluster* de 15 moléculas é suficiente para que seja observado a formação da estrutura transmembrânica, enquanto que na inserção progressiva, com a agregação ocorrendo entre moléculas já adsorvidas na bicamada, foi necessário a inserção de 23 moléculas, até que uma das monocamadas atingisse também 15 moléculas e ser então observada a formação da estrutura transmembrânica. O fato de na inserção progressiva as moléculas poderem adsorver por ambas as monocamadas dificulta a análise, pois a redistribuição de moléculas entre as monocamadas é suposto ser uma das causas da membrana segregar a curcumina num microdomínio transmembrânico, e neste caso a distribuição está ocorrendo livremente já no processo de adsorção.

Em um novo experimento, 16 moléculas de curcumina foram inseridas progressivamente, mas garantindo-se que todas adsorvessem pela mesma monocamada (a superior). Isto foi realizado construindo-se diversas réplicas para cada nova janela até ser obtida uma em que a molécula adicional adsorvesse pela monocamada superior, sendo então esta selecionada para a continuidade do processo, e as demais descartadas. O protocolo consistiu portanto em aumentar a amostragem de forma a obter o resultado desejado (há

somente duas possibilidades para a adsorção), não sendo aplicado nenhum potencial ou força sobre a molécula para que esta adsorva por uma interface específica A Fig. 4.14 mostra que quando a adsorção ocorre pela mesma monocamada a estrutura transmembrânica começa a ser observada já a partir da 14ª janela. A agregação observada (Fig. 4.14b) é semelhante à obtida na inserção progressiva de 32 moléculas, com as moléculas de curcumina inicialmente adsorvendo e não interagindo entre si (embora todas agora estejam na mesma monocamada), e tendo início o processo de agregação a partir da 6ª ou 7ª janela. O número de *clusters* então passa a oscilar (linha em preto) mas o *clusters* formados são pequenos (linha em vermelho), sendo observados *clusters* maiores a partir da 12ª janela, e moléculas de curcumina avançando sobre a monocamada oposta a partir da 14ª janela.

Figura 4.14 – a) Inserção progressiva de 16 moléculas de curcumina (pontos em preto), todas adsorvendo pela interface superior (ver texto para maiores detalhes). b) Análise da agregação de moléculas, sendo indicado também o limite teórico (linha em cinza) para o número de *cluster* (preto) /tamanho do maior *cluster* (vermelho).



O processo de agregação das moléculas de curcumina ocorre, portanto, tanto na fase aquosa, quanto no interior da bicamada. Considerando que numa vesícula a adsorção se dá pela interface externa, a formação da estrutura transmembrânica pode ocorrer se houver a prévia agregação das moléculas de curcumina no meio aquoso e, caso os *clusters* adsorvidos não tenham tamanho suficiente para se enterrarem no núcleo hidrofóbico, eles podem contribuir para a saturação da interface externa da membrana (ou de uma região desta), e induzir o processo de agregação e posterior formação da estrutura transmembrânica.. Em qualquer dos casos, as moléculas de curcumina começarão a migrar para a monocamada interna, e se a estrutura perder moléculas o suficiente, será desfeita, resultando numa membrana com curcumina dispersa na região do glicerol em ambas as monocamadas. Num sistema real, o número de moléculas de curcumina não é limitado como nas simulações, e o processo se dá de forma dinâmica, com novas moléculas sendo adsorvidas da solução – fenômeno que a inserção progressiva mimetiza melhor do que as simulações em que certo número finito de moléculas (1, 2, 4, 8 ou 16) foram inseridas todas na fase aquosa. Se, no entanto, ocorrer a saturação também da monocamada interior (ou de uma região desta), o processo é invertido e as moléculas de curcumina na bicamada tendem a se agregar, alimentando a estrutura transmembrânica e estabelecendo um microdomínio, que neste caso pode ser estável por um tempo maior (por exemplo, até que as moléculas de curcumina se difundam para outra região da bicamada, possibilitando a dispersão das moléculas do microdomínio e sua desestruturação), potencialmente podendo inclusive comprometer a integridade estrutural da membrana. Este provavelmente é o mecanismo pelo qual a interação da curcumina com membranas de vesículas produz resultados que a localizam tanto dispersa pela bicamada quanto no centro estrutura (BARRY et al., 2009; DUDA; CYGAN; WISNIEWSKA-BECKER, 2020). Apesar da dependência da ação da curcumina sobre a bicamada com a concentração ter sido proposta há algum tempo (ALSOP; DHALIWAL; RHEINSTÄDTER, 2017; INGOLFSSON; KOEPPE; ANDERSEN, 2007), o mecanismo pelo qual esta ocorre ainda não havia sido esclarecido.

4.2.3 Análise da estrutura transmembrânica

A formação da estrutura transmembrânica está relacionada ao tamanho do *cluster* de moléculas de curcumina, e o processo de agregação pode ocorrer tanto na fase aquosa quanto a partir da interação de moléculas já ligadas à bicamada com moléculas de curcumina sendo adsorvidas. A fim de realizar uma análise comparativa da estrutura transmembrânica estabelecida a partir da adsorsão de um grande *cluster* (16Curc) com a estrutura estabelecida a partir da agregação no interior da bicamada, foram desenvolvidas extensões de 500 ns das 24ª e 32ª janelas, sistemas respectivamente com 24 e 32 moléculas de curcumina inseridas progressivamente. As continuações partem, portanto, da configuração final de cada janela, como feito anteriormente na simulação P16. Assim, a configuração da 24ª janela foi utilizada tanto para a construção da 25ª janela quanto para desenvolver a extensão P24. A Fig. 4.15 mostra a distribuição das moléculas de curcumina em relação às monocamadas para as duas extensões: na simulação P24, a estrutura transmembrânica, que havia se formado na 23ª janela, persiste por toda a simulação e a proporção inicial de 16/8 moléculas entre as monocamadas é essencialmente mantida (Fig. 4.15a), estando entre um terço e metade das moléculas de curcumina enterradas no núcleo hidrofóbico (Fig. 4.15c), e, embora haja transição de moléculas entre as monocamadas, não se alcança a equivalência numérica entre as duas interfaces; na simulação P32, que começa apresentando um proporção de 18/14, fica evidente o processo de redistribuição da curcumina entre as duas monocamadas (Fig. 4.15b), com o número de moléculas em cada oscilando em torno de 16 (metade do total), e novamente entre um terço e metade das moléculas na região central da estrutura lipídica (Fig. 4.15d).

Comparando o número de moléculas localizadas no núcleo hidrofóbico (região entre ± 9 Å do centro de bicamada) nas simulações P24 e P32 (Fig. 4.15c,d) observa-se que o aumento na concentração de curcumina implica em mais moléculas segregadas para a estrutura transmembrânica. Uma análise das dimensões do *cluster* transmembrânico em função da quantidade de moléculas (Fig. 4.16) revela que seu crescimento se dá primeiramente em *z*, condizente com o resultado anterior de que o enterramento na bicamada é dependente do tamanho do *cluster* (Fig. 4.12e), enquanto que o raio do *cluster* apresenta um crescimento mais suave, se acentuando quando a estrutura atinge 18 ou mais moléculas. O avanço sobre o núcleo hidrofóbico é bastante acentuado quando o *cluster* apresenta de 4~8 moléculas (as moléculas de curcumina se enterram e avançam sobre a monocamada oposta,

processo semelhante ao observado na simulação 8Curc, embora naquele caso o *cluster*, de tamanho semelhante, tenha sido previamente formado na fase aquosa); a elongação prossegue em *z* (9~18 moléculas), agora com uma taxa de crescimento similar à observada para o raio (é estabelecida a estrutura transmembrânica, com mais moléculas se enterrando, por isso o aumento no raio), até ser atingido o limite definido pela espessura da bicamada, quando então o tamanho em *z* se estabiliza (a partir de 18 moléculas) e o crescimento do raio é acentuado. A estrutura transmembrânica define portanto um microdomínio cuja simetria cilíndrica possui uma assíntota em *z* (a espessura da bicamada). Aparentemente, novas moléculas segregadas para a estrutura contribuirão para o aumento do raio e não de *z*, uma vez que ir além da espessura implicaria em moléculas retornando à fase aquosa (o que temporariamente até pode ocorrer, como mostra a Fig. 4.15b,d; linha em preto), contrariando a tendência da curcumina particionar na bicamada (LEITE et al., 2018).

Figura 4.15 – Número de moléculas de curcumina no interior da bicamada, discriminadas pela monocamada a qual integram, nas simulações P24 (a) e P32 (b); número de moléculas de curcumina na região entre ± 9 Å do centro de bicamada (c.d).

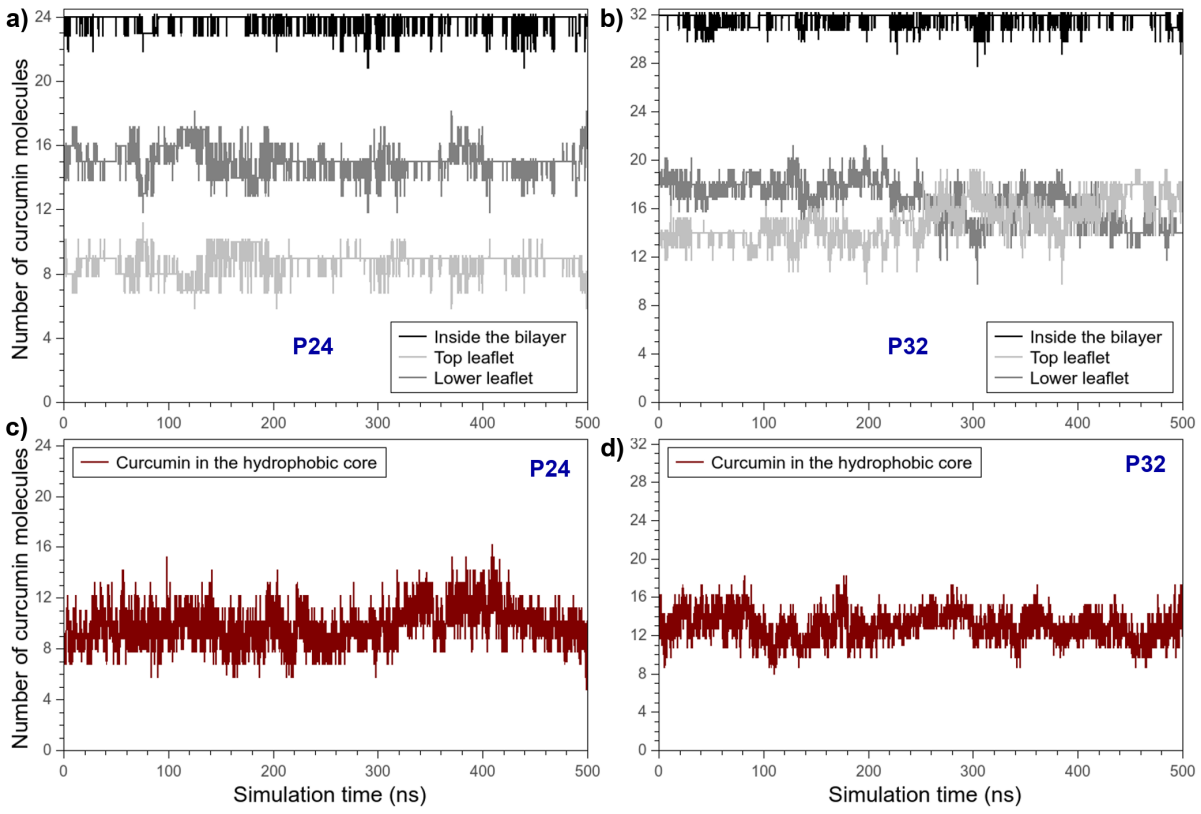


Figura 4.16 – Dimensões do *cluster* em função de seu tamanho (número de moléculas de curcumina): *z* (em cinza claro) indica a elongação em no eixo perpendicular à bicamada, enquanto *R* (cinza escuro) indica seu raio. Os valores apresentados são uma compilação dos dados obtidos nas simulações 16Curc (após a adsorção das moléculas), P24 e P32, todas apresentando um *cluster* em estruturação transmembrânica.

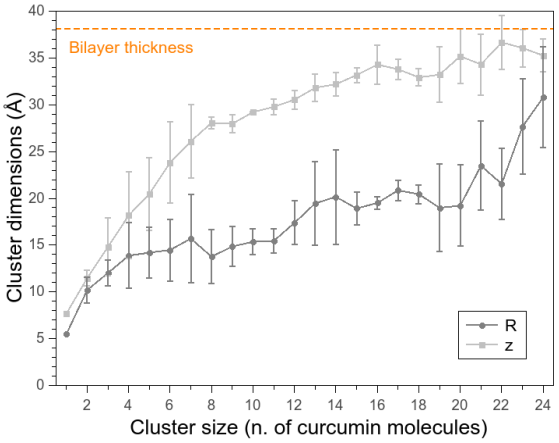
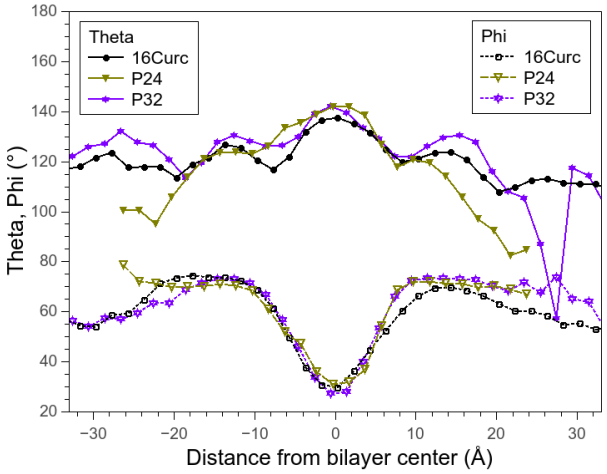


Figura 4.17 – Histograma dos ângulos theta (C_{phenol}-$C_{central}$-C_{phenol}; linhas sólidas) e phi (C_{phenol}-C_{phenol}-$\hat{z}$; linhas tracejadas), indicando respectivamente a abertura e orientação das moléculas de curcumina, em função da região da bicamada em que a molécula se localiza, nas simulações 16Curc, P24 e P32.



Anteriormente, os resultados para a simulação 16Curc mostraram que, no período de existência do *cluster* transmembrânico, é observada uma tendência das moléculas de curcumina assumirem uma orientação perpendicular à bicamada (se orientam em relação ao eixo *z*, como uma molécula de colesterol faria), enquanto que quando dispersas pela bicamada, sua orientação é essencialmente paralela ao plano. Fazendo um histograma da

distância do centro massa de cada molécula em relação ao centro da bicamada e analisando os ângulos theta (abertura da molécula) e phi (orientação em relação ao eixo z), é possível avaliar como a curcumina se estrutura ao longo da bicamada. Pela distribuição obtida, Fig. 4.17, a conformação assumida é sensível à região da bicamada em que as moléculas estão (comparar com os perfis de densidade da Fig. 3.6). Os dados mostram que quanto mais próxima ao centro da bicamada, maior a probabilidade da molécula estar perpendicular ao plano da bicamada (linhas tracejadas) e, considerando que o enterramento das moléculas ocorre na forma de *cluster*, fica demonstrado que no núcleo da estrutura transmembrânica as moléculas apresentam-se abertas (na maior abertura obtida; ver linhas sólidas) e perpendiculares à bicamada, enquanto que na região do glicerol continuam relativamente abertas (~120º), mas menos do que no centro. Na condição de estabilidade, dispersas pela região do glicerol, a conformação assumida ocorre pela necessidade da molécula enterrar seus anéis na região hidrofóbica, mas expondo suas hidroxilas reativas à região hidratada, daí a conformação aberta e paralela ao plano da bicamada; quando integrando a estrutura transmembrânica, a dinâmica é governada pela interação entre os lipídios componentes da membrana, cuja dinâmica para manter a integridade da bicamada impõe uma conformação aberta e perpendicular às moléculas de curcumina; a maior resistência do *cluster* crescer em *R* (Fig. 4.16) é provavelmente consequência da pressão lateral exercida pelos lipídios.

A Fig. 4.17 mostra também que nas bicamadas 16Curc, P24 e P32 as moléculas apresentam-se em conformação equivalente, principalmente em relação à orientação que elas assumem em relação ao eixo *z*, mas também com boa concordância em relação à abertura da moléculas (nas simulações P24 e P32, não há uma boa amostragem de moléculas nas regiões mais externas, pois como o sistema foi obtido a partir da inserção progressiva, as moléculas de curcumina já estavam adsorvidas). A análise da espessura bidimensional (Fig. 4.18) mostra que a ação do *cluster* transmembrânico nas simulações P24 e P32, como esperado, também perturba significativamente a estrutura lipídica, sendo observados afinamentos locais superiores a 9 Å na espessura da bicamada. Os resultados apresentados demonstram portanto que as estruturas transmembrânicas observadas nas simulações 16Curc, P24 e P32 são estruturalmente equivalentes, apesar de terem sido obtidas por métodos diferentes.

Figura 4.18 – Espessura bidimensional da bicamada nas simulações em que 24 ou 32 moléculas de curcumina foram inseridas progressivamente na bicamada (são continuações da 24ª ou 32ª janelas, respectivamente). A espessura em cada ponto é apresentada através do código de cores, sendo que valores de espessura inferiores à 30 Å são mostrados na cor preta.

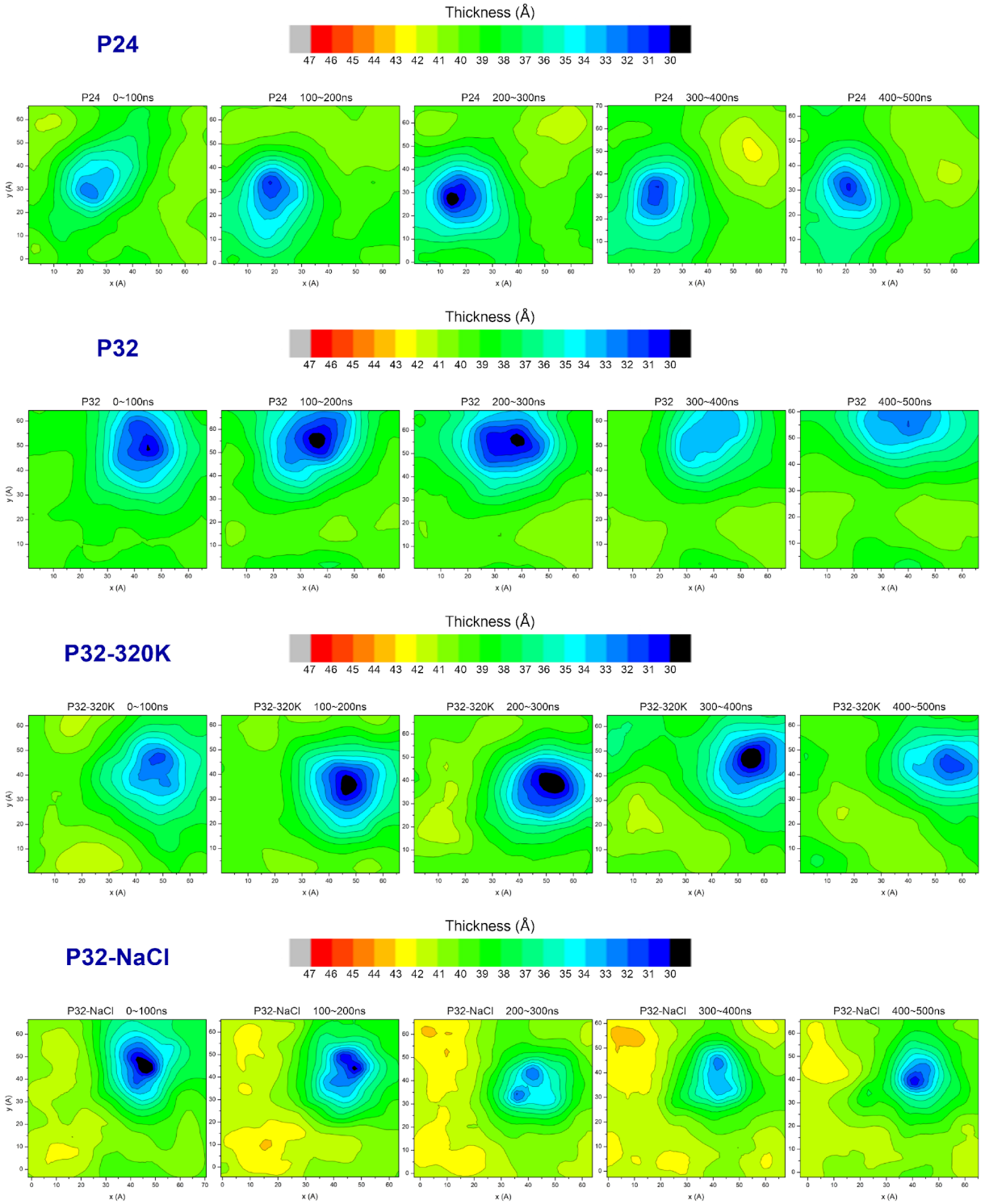
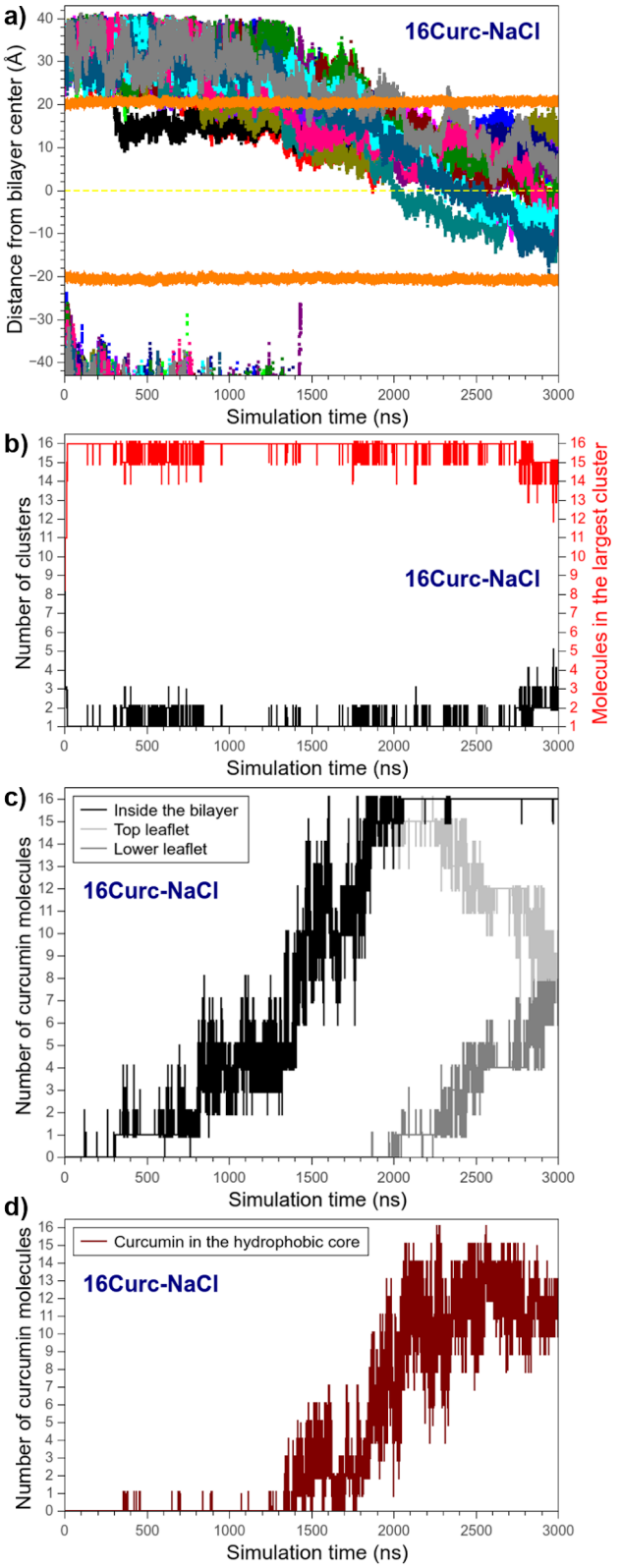


Figura 4.19 – a) Evolução temporal da interação entre as moléculas de curcumina (pontos coloridos) e a bicamada (limites indicados pela linha em laranja); b) Número de *clusters* e tamanho do maior *cluster*; c) Número de moléculas de curcumina adsorvidas e monocamada a qual integram; d) Moléculas de curcumina localizadas no núcleo hidrofóbico da bicamada.



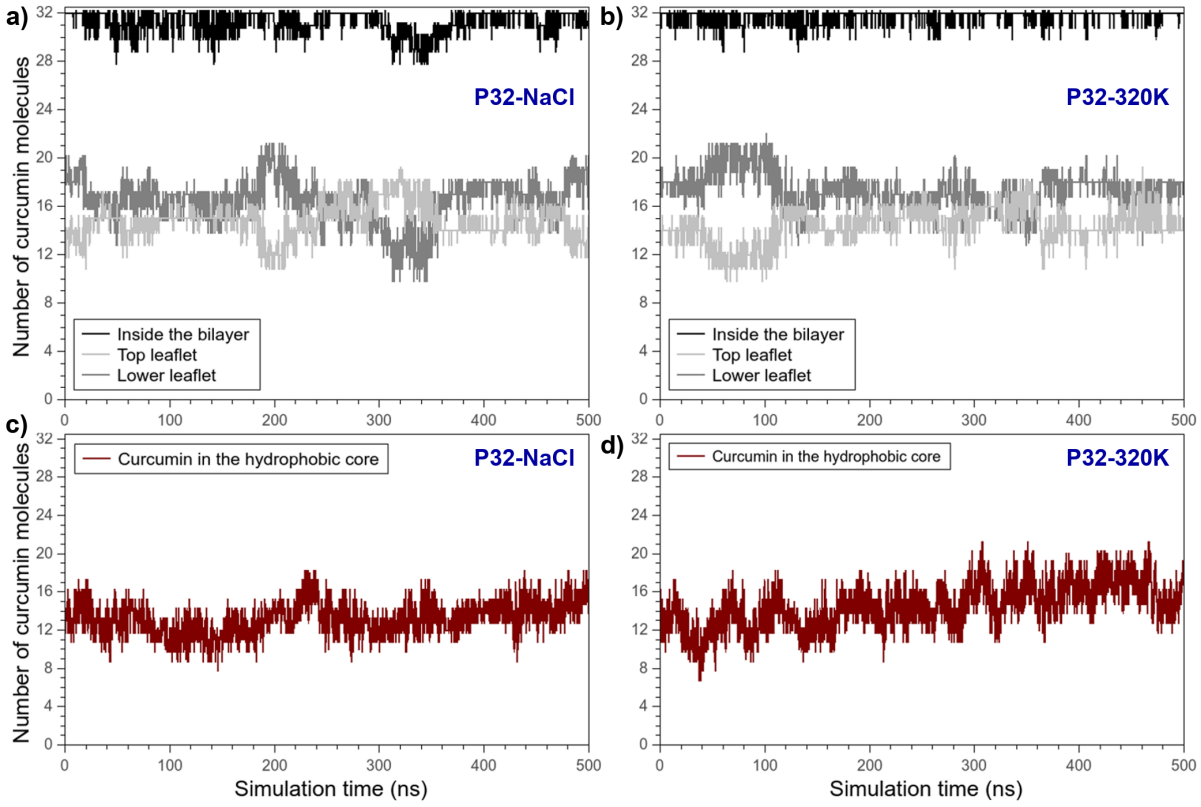
4.2.4 Efeito da presença de sal e aumento da temperatura

Com o objetivo de verificar o efeito da presença de sal suporte no sistema, e avaliar se a ação dos íons modifica a interação da curcumina com a bicamada, foi realizada uma simulação com 16 moléculas de curcumina inseridas aleatoriamente na fase aquosa (16Curc-NaCl), observando o mesmo protocolo da simulação 16Curc, exceto pela adição de 0.15 mol/L de NaCl. A projeção em *z* do centro de massa das moléculas de curcumina é apresentada na Fig. 4.19, com cada molécula sendo identificada por uma cor distinta, assim como a análise da formação de *clusters*. Os resultados mostram que a curcumina estabelece um grande *cluster* na fase aquosa, essencialmente agregando todas as 16 moléculas, o qual adsorve na bicamada pela interface superior. Para que todas as moléculas sejam internalizadas, o *cluster* avança sobre o núcleo hidrofóbico (Fig. 4.19d), estabelecendo uma estrutura transmembrânica, e tendo início processo de dispersão das moléculas pela região do glicerol, com a consequente redução no tamanho do maior (e até então único) *cluster*, e que ao fim do processo resultará na desestruturação do microdomínio e na redistribuição das moléculas entre as monocamadas (como sugere a Fig. 4.19c; comparar com a Fig. 4.10a). O padrão de interação com a bicamada é essencialmente idêntico ao observado nas simulações 16Curc e 16Curc_R1, variando somente na escala de temporal, como no tempo necessário para ser alcançada a completa adsorção das moléculas (~500 ns para 16Curc, ~600 ns para 16Curc_R1 e ~2000 ns 16Curc-NaCl), o que não pode ser necessariamente atribuído à presença dos íons.

Uma possível influência da presença de íons na estrutura transmembrânica, assim como do aumento da temperatura para 320K, foi avaliada a partir de variações da simulação P32, sendo inseridos íons de forma a obter uma concentração de 0.15 mol/L de NaCl (P32-NaCl), ou elevando a temperatura de referência para 320K (P32-320K). A dinâmica da curcumina em relação às monocamadas (Fig. 4.20), em ambos os sistemas, é essencialmente equivalente à observada para a simulação P32 (ver Fig. 4.15). A análise da espessura bidimensional (Fig. 4.18) mostra que nas três bicamadas ainda é observada a perturbação local, com afinamento da espessura. O mesmo procedimento foi aplicado à simulação P16, sendo avaliados um sistema com sal suporte (P16-NaCl) e com temperatura com T_{ref} = 320K (P16-320K), e também não sendo observadas diferenças significativas (resultados não apresentados) em relação à simulação de referência (P16). Pelos resultados obtidos, não foram

observadas alterações significativas na interação da curcumina com a bicamada na presença de sal suporte ou elevando-se a temperatura do sistema em 10 graus.

Figura 4.20 – a,b) Número de moléculas de curcumina no interior da bicamada (em preto), discriminadas pela monocamada a qual integram, superior (em cinza claro) ou inferior (cinza escuro); c,d) Número de moléculas de curcumina localizadas no núcleo hidrofóbico da estrutura lipídica (região entre ± 9 Å do centro de bicamada).



5 EFEITOS SOBRE A PERMEAÇÃO DE MOLÉCULAS DE ÁGUA

Considerando a perturbação que a ação da curcumina produz na bicamada, com efeitos estruturais como o afinamento local da espessura da estrutura lipídica e alterações no parâmetro de ordem das caudas dos fosfolipídios, uma análise importante a ser realizada é avaliar se há alteração na hidratação da estrutura lipídica. Resultados experimentais indicam que a curcumina aumenta a hidratação da bicamada (ALSOP; DHALIWAL; RHEINSTÄDTER, 2017), inclusive no núcleo hidrofóbico (DUDA; CYGAN; WISNIEWSKA-BECKER, 2020), alteração sempre associada ao aumento da fluidez da membrana. A maneira convencional de avaliar a acessibilidade de água ao interior de uma bicamada é comparar a curva de sua distribuição com a de grupos característicos na bicamada em gráficos de perfis de densidade. Observando a Fig. 3.6, que amostra a bicamada antes da adsorção da curcumina (0~500 ns), enquanto estrutura transmembrânica (500~4500 ns) e na condição de moléculas dispersas pela bicamada (4500~6000 ns), não é possível, de forma conclusiva, embora haja um discreto avanço da curva do perfil de água para o interior da bicamada, entre 500~4500 ns, verificar se a ação da curcumina afeta ou não a hidratação da bicamada. Análises de perfis de densidade são baseadas em médias temporais sobre longos períodos de simulação e médias sobre todo o conjunto de moléculas amostrado, dificultando o acompanhamento de eventuais avanços de moléculas de água individuais sobre o núcleo hidrofóbico.

Com o objetivo de analisar a permeabilidade de bicamadas a moléculas de água, desenvolveu-se um método para identificar eventos de permeação ao longo das trajetórias de uma simulação (ver Anexo B). Num evento de permeação, moléculas individuais atravessam do meio externo para o interno, ou vice-versa, passando através da membrana por processos difusivos (AWOONOR-WILLIAMS; ROWLEY, 2016; VENABLE; KRÄMER; PASTOR, 2019). Apesar de em simulações de bicamadas, devido às condições periódicas de contorno, não haver propriamente meio externo ou interno, ocorre de pequenas moléculas atravessarem a estrutura lipídica, em especial moléculas de água, que podem avançar da fase hidratada da bicamada para a região das caudas, eventualmente atingindo o centro da estrutura. Para sair do ambiente energeticamente desfavorável, a molécula pode retornar para a mesma

monocamada de onde partiu, ou continuar avançando e atingir a fase hidratada pela interface oposta. Neste caso, ao voltar ao *bulk* aquoso a molécula terá completado um evento de permeação através da bicamada.

Eventos de permeação também são observados em bicamadas puras, e as propriedades da estrutura lipídica afetam a frequência com que eles ocorrem e o intervalo Δt que a molécula de água leva para completá-lo (CAMILO; RUGGIERO; DE ARAUJO, 2022). O mapeamento dos eventos de permeação de moléculas de água, e como se dá sua distribuição ao longo da simulação, podem indicar perturbações na estrutura da membrana pela ação de diferentes moléculas de interesse (OLIVEIRA et al., 2021), como, por exemplo, a curcumina. A comparação da ocorrência e características dos eventos em diferentes bicamadas reflete alterações na acessibilidade da água em função de diferenças nas propriedades físico-químicas da estrutura, como sua fluidez e espessura. Utilizando o algoritmo apresentado no Anexo B para identificar os eventos de permeação que ocorrem ao longo das simulações, e fazendo um recorte da trajetória da molécula de água durante o evento, pode-se fazer o mapeamento dos eventos de permeação. A Fig. 5.1 apresenta uma comparação dos eventos de permeação na simulação 16Curc (0~1500 ns) e na bicamada pura, evidenciando que no sistema com curcumina os eventos de permeação (cada linha em preto é um evento) são mais frequentes e mais longos, com as moléculas de água permanecendo mais tempo no núcleo hidrofóbico.

Figura 5.1 – Mapeamento dos eventos de permeação (linhas em preto) de moléculas de água na simulação 16Curc e na bicamada pura. Cada linha individual representa um evento, sendo um recorte na trajetória da molécula de água entre o instante (ponto) imediatamente anterior à sua entrada na bicamada e o primeiro instante após ter atravessado a estrutura (as curvas em laranja indicam os limites superior e inferior da bicamada). Somente estão sendo considerados eventos de permeação aqueles em que a molécula entra por uma interface, avança pelo núcleo hidrofóbico (a linha tracejada em amarelo indica o centro da bicamada), e deixa a estrutura pela monocamada oposta.

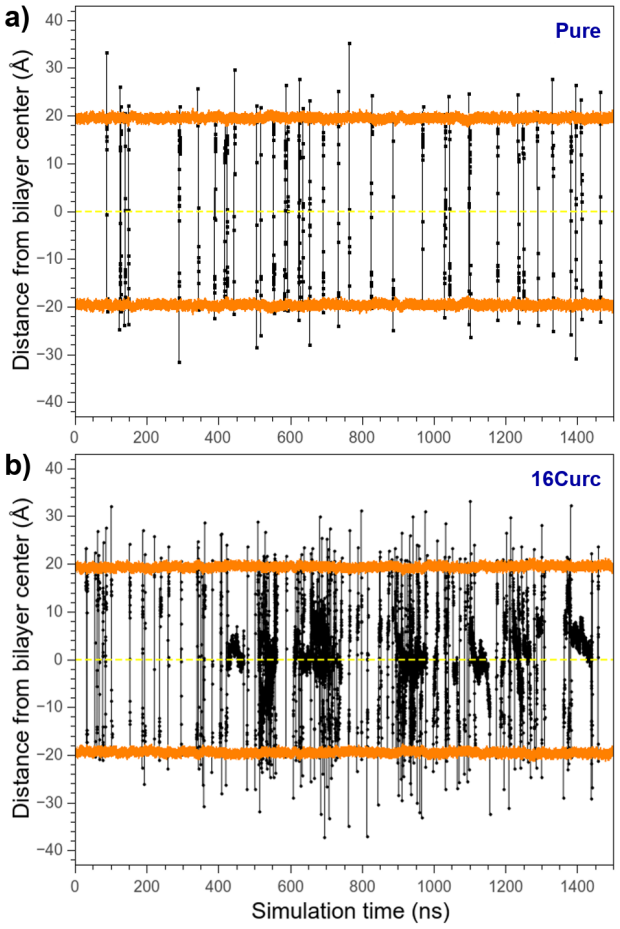


Tabela 5.1. Estatísticas dos eventos de permeação e coeficiente de permeabilidade da bicamada.

Simulação	Número de eventos	Freq. de ocorrência	Duração média - Δt (ns)	Evento mais rápido (ns)	Evento mais longo (ns)	Mediana (ns)	Coeficiente de permeabilidade - P_c (µm/s)
Pure	39	1/38 ns	1,5 ± 0,8	0,6	3,9	1,20	10,2 ± 0,3
16Curc (4500~6000 ns)	89	1/17 ns	1,8 ± 1,3	0,30	15,5	1,44	21,1 ± 3,7
P16	141	1/14 ns	1,8 ± 1,3	0,32	9,1	1,48	26,5 ± 4,8

A Tabela 5.1 apresenta a estatística dos eventos de permeação na bicamada pura (0~1500 ns) e nos dois sistemas com 16 moléculas de curcumina ligadas, no período de estabilidade de ambas, 16Curc (4500~6000 ns) e P16 (0~1900 ns). Como proposto por Orsi e Essex (2011), a partir do número de moléculas de água que espontaneamente atravessam a bicamada durante a simulação, é possível estimar o coeficiente de permeabilidade da bicamada (P_c) utilizando da primeira lei de difusão de Fick:

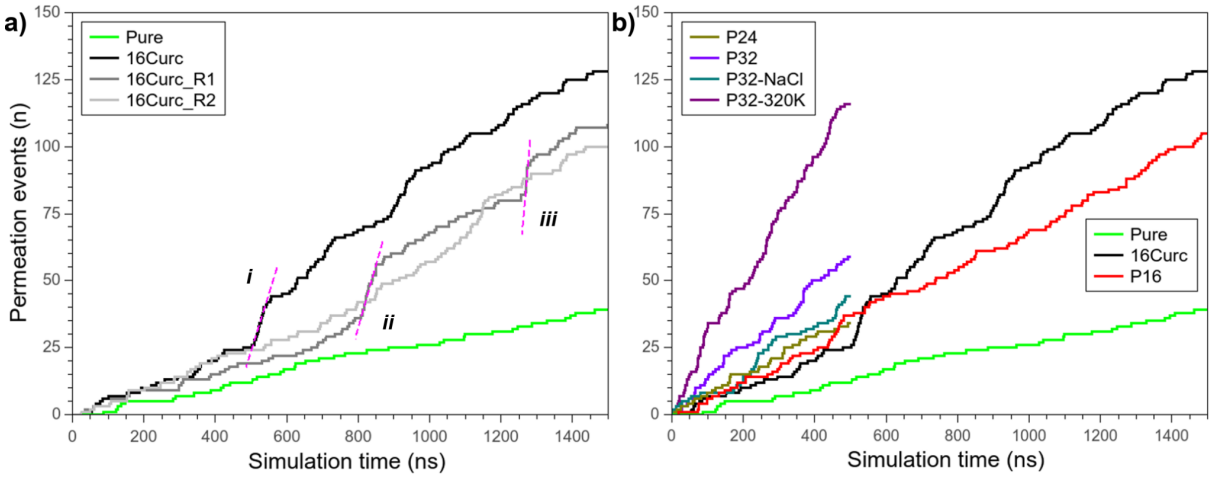
$$P_c = \frac{J}{A.\Delta c} = \frac{\frac{0.5n}{t}}{A.\Delta c} \tag{5.1}$$

onde n é o número de eventos de permeação no tempo de simulação t, A é a área do plano da bicamada ($A = L_x.L_y$, por construção), e $\Delta c = c_{meio\ aquoso} - c_{núcleo\ hidrofóbico}$ é o gradiente de concentração de água. Como a concentração de água no núcleo hidrofóbico pode ser considerada como desprezível, segue que Δc é dado pelo número de moléculas de água por nm^3 da caixa de simulação. Assim, para o modelo SPC, $\Delta c \approx 3,2x10^{28}$, valor obtido a partir da simulação de uma caixa contendo somente moléculas de água.

Pela tabela, a ação da curcumina, na condição adsorvida e dispersa pela bicamada, dobra a permeabilidade da estrutura à água quando comparada com a bicamada pura. Observa-se também uma tendência de aumento na duração do tempo que as moléculas de água levam para completar a passagem, como o mapeamento (Fig. 5.1) havia sugerido. Portanto, em sistemas contendo curcumina, os eventos de permeação são mais frequentes e mais longos, indicando uma maior hidratação da bicamada, provavelmente devido à necessidade de solvatação dos grupos polares da curcumina, estabilizada na região hidrofóbica (interna ao glicerol dos fosfolipídios). Este aumento no coeficiente de permeabilidade é o efeito oposto ao observado na ação do colesterol, que reduz progressivamente a permeabilidade da bicamada conforme sua proporção no sistema aumenta (CAMILO; RUGGIERO; DE ARAUJO, 2022). Considerando que a presença do colesterol resulta na redução da fluidez da bicamada, sendo consequências disto o aumento no ordenamento das caudas dos fosfolipídios e a redução da permeabilidade da estrutura, os resultados imediatamente contrários aqui obtidos para a curcumina demonstram que sua ação produz o aumento da fluidez do sistema, em linha com resultados experimentais

(INGOLFSSON; KOEPPE; ANDERSEN, 2007; ALSOP; DHALIWAL; RHEINSTÄDTER, 2017; LEITE et al., 2018).

Figura 5.2 – Número acumulado de eventos de permeação. a) Comparação entre a bicamada pura e as da simulação 16Curc e suas réplicas. b) Comparação para todas as bicamadas onde é estabelecida uma estrutura transmembrânica.



Os resultados apresentados acima referem-se ao período de estabilidade das simulações com 16 moléculas de curcumina, ou seja, são análises sobre o estado em que as moléculas estão dispersas pela bicamada. O mapeamento dos eventos de permeação (Fig. 5.1b) mostra entretanto que no período de existência da estrutura transmembrânica (500~4500 ns) o aumento na ocorrência de eventos é expressivo, o que faz sentido considerando que a perturbação promovida pela estrutura transmembrânica é significativamente maior (Figs. 4.7 e 4.10). A Fig. 5.2a mostra o número acumulado de eventos de permeação (0~1500 ns) para a simulação 16Curc e suas réplicas, além da bicamada pura; observa-se que o patamar de eventos nos sistemas com curcumina está substancialmente acima do obtido para a bicamada pura. Outro ponto importante é que, em alguns períodos, para um curto intervalo de simulação, ocorrem diversos eventos (destacados na figura por uma linha tracejada), implicando num drástico aumento no coeficiente de permeabilidade (no destaque *i* mostrado na figura, simulação 16Curc, o coeficiente atinge 70 ± 11 μm/s).

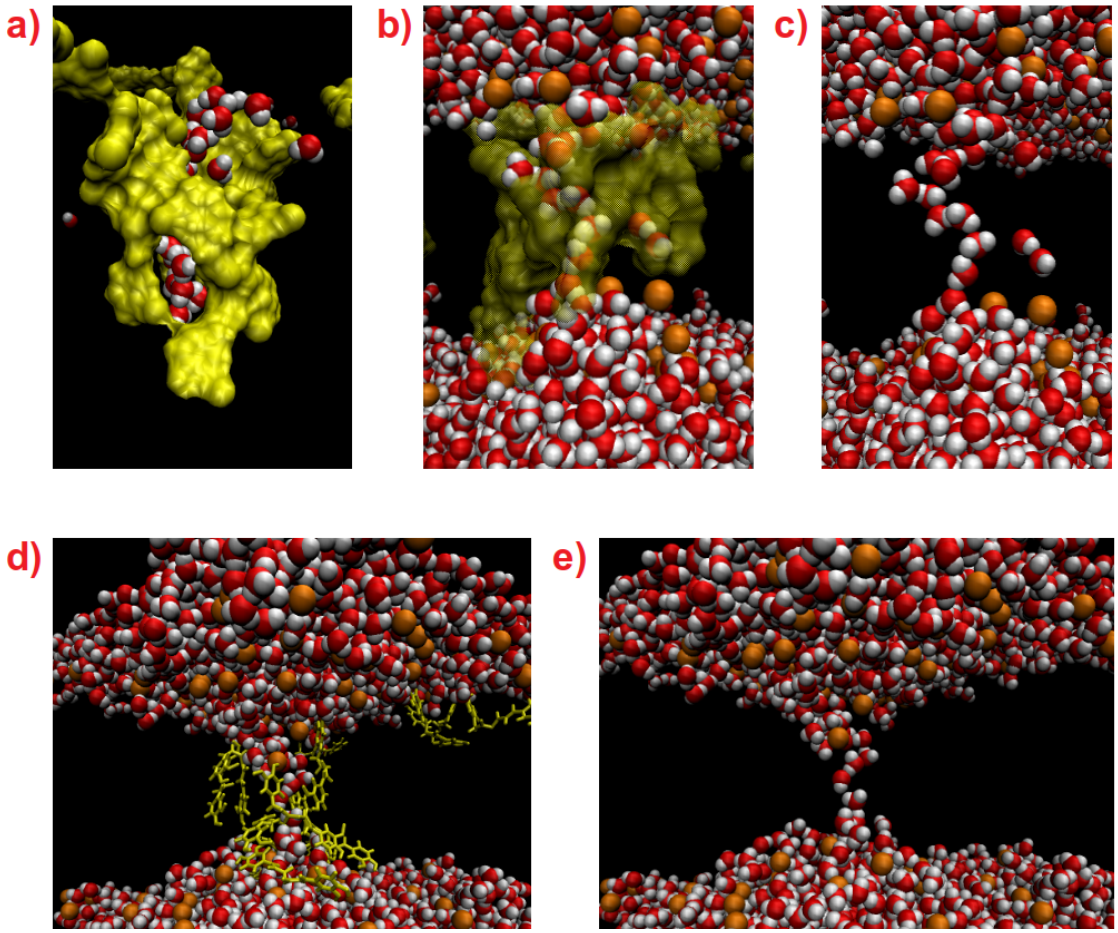
A comparação dos eventos de permeação em todas as bicamadas em que é observada a formação de uma estrutura transmembrânica (Fig. 5.2b) revela que nestas, a ocorrência de

eventos é significativamente maior do que a bicamada pura ou para a da simulação P16, onde as moléculas de curcumina estão dispersas pela estrutura lipídica. O aumento do número de moléculas de curcumina no sistema leva a um progressivo aumento na ocorrência de eventos de permeação, como pode ser observado comparando as curvas das simulações P16, P24 e P32, com destaque para P32-320K. Este aumento progressivo da permeação também é observado, de forma menos significativa, quando comparadas as simulações 1, 2, 4, 8 e 16Curc (resultado não apresentado), evidenciando que o aumento da concentração de curcumina aumenta hidratação da bicamada, com maiores alterações sendo obtidas em sistemas em que é formado um microdomínio formado por moléculas de curcumina.

A visualização da estrutura transmembrânica (Fig. 5.3a) revela que quando as moléculas de curcumina estabelecem o microdomínio há cavidades com moléculas de água integrando a estrutura, ajudando a estabilizar os grupos polares das moléculas de curcumina que estão enterradas no núcleo hidrofóbico. Eventualmente, durante a dinâmica do *cluster*, são abertos nanocanais que favorecem a ocorrência de múltiplos eventos de permeação (Fig. 5.3b-e), como os casos destacados na Fig. 5.2.

Um ponto importante é que nem todas as moléculas de água que estão hidratando a estrutura transmembrânica completarão um evento de permeação, pois no critério utilizado, o evento só é contado quando a molécula entra por uma interface e sai pela interface oposta. Uma hipótese que pode ser levantada é se as moléculas de água se internalizaram junto com o *cluster* de curcumina; neste caso, os intervalos anômalos são fruto da dessolvatação da estrutura transmembrânica? A Fig. 5.1b mostra que não é o caso, pois os eventos de permeação continuamente se iniciam/terminam ao longo da simulação; como no mapeamento a trajetória da molécula de água é mostrada durante todo o intervalo em que ela permanece no interior da bicamada, se a hipótese fosse verdadeira, seria observado um grande número de moléculas entrando, e permanecendo na bicamada por um longo período (eventos de permeação longos de fato existem, e serão discutidos a seguir, mas não tem relação direta com a hipótese considerada), para só depois deixar a bicamada.

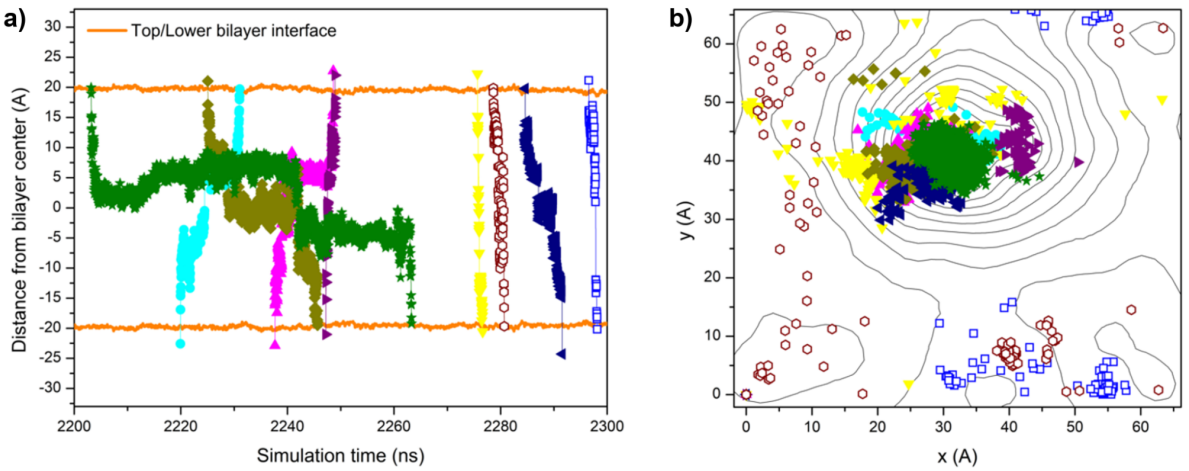
Figura 5.3 – a) Visualização do microdomínio transmembrânico (em amarelo) com moléculas de água (esferas em vermelho e branco) hidratando a estrutura - as moléculas de fosfolipídio foram removidas para facilitar a visualização. As esferas em laranja (átomos de fósforo) indicam os limites das bicamadas. *b*, *c*) *Frame* da simulação 16Curc (com e sem a apresentação das moléculas de curcumina) extraído do intervalo referente ao destaque *i* da Fig. 5.2a. *d*, *e*) *Frame* da simulação 16Curc_R1 (com e sem a apresentação das moléculas de curcumina) extraído do intervalo referente ao destaque *iii* da Fig. 5.2a. A dinâmica das moléculas na estrutura transmembrânica pode levar à abertura de nanocanais, permitindo o fluxo de água pela estrutura.



Os resultados anteriores indicaram uma tendência de aumento na duração dos eventos de permeação nas bicamadas com curcumina, quando comparados com os que ocorrem na bicamada pura. Analisando a trajetória das moléculas de água que completam eventos de permeação num determinado trecho da simulação é possível compreender melhor o motivo. A Fig. 5.4 mostra um intervalo de 100 ns na simulação 16Curc (2200~2300 ns) em que ocorrem 9 eventos de permeação, sendo cada um indicado por uma cor/símbolo diferente na figura. Sobrepondo as coordenadas *x* e *y* das moléculas de água sobre o histograma bidimensional do período de simulação considerado (ver Fig. 4.7), é possível definir quais eventos ocorrem

através da estrutura transmembrânica (7 eventos; marcados por símbolos sólidos), daqueles em que a molécula atravessa a bicamada longe do microdomínio (2 eventos; marcados somente com o contorno dos símbolos). Fica evidente que os eventos que ocorrem pela estrutura transmembrânica tendem a ser significativamente mais longos do que aqueles que acontecem ao longo da bicamada – na bicamada pura, todos os eventos ocorrem espalhados pelo plano *xy*, pois não há uma região de perturbação que os favoreça (resultado não apresentado), por isso eles tendem a ser mais rápidos e com uma maior difusão pelo plano (menos concentrados). Moléculas de água que atravessam pela estrutura transmembrânica estabelecem ligações de hidrogênio com as de curcumina (resultado não apresentado), podendo ficar "presas" no microdomínio, daí o aumento no tempo de permeação, com menor difusão em *xy* (espacialmente localizadas).

Figura 5.4 – a) Mapeamento de eventos num intervalo de 100 ns da simulação 16Curc, sendo observados 9 eventos, com o recorte da trajetória (projeção em *z*) de cada um sendo apresentado por uma cor diferente. b) A projeção das coordenadas *x* e *y* das moléculas durante os eventos de permeação, é apresentada sobre a janela do *heatmap* do respectivo intervalo em que os eventos ocorrem (ver Fig, 4.7), possibilitando a localização dos eventos em relação à posição da estrutura transmembrânica estabelecida pelas moléculas de curcumina (região da perturbação).



A ação da curcumina, portanto, produz um aumento no coeficiente de permeabilidade da bicamada, duplicando seu valor no estado em que suas moléculas estão dispersas pela bicamada. Isto ocorre pois a presença de grupos polares ao longo da molécula do polifenol favorece um maior enterramento de moléculas de água, que eventualmente atravessam toda a estrutura vindo a completar um evento de permeação. Aliado à redução no ordenamento das caudas, este resultado indica que a curcumina aumenta a fluidez da bicamada, mas é insuficiente para explicar a atividade membranolítica relatada. Durante a interação com os lipídios componentes da bicamada, a dinâmica entre as moléculas que compõem a estrutura transmembrânica pode resultar na abertura de nanocanais, pelos quais podem ser estabelecidos poros transientes, como ilustrado pelos resultados apresentados nas Figs. 5.2 e 5.3; aliado ao aumento latente da permeabilidade, este pode ser o mecanismo pelo qual se dá a atividade membranolítica da curcumina.

6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho avaliou-se a interação entre uma bicamada de POPC e diversas quantidades de moléculas de curcumina (razão curcumina/lipídio), por meio de simulações por dinâmica molecular, usando dois protocolos: (1) as moléculas de curcumina (1, 2, 4, 8 ou 16) foram introduzidas aleatória e simultaneamente dispersas na fase aquosa da caixa de simulação e (2) pela inserção progressiva e gradual de 1 até 32 moléculas de curcumina, inseridas individualmente a cada 100 ns, evitando a prévia agregação das moléculas na água. Os resultados mostram que, em ambos os conjuntos de simulações, as moléculas de curcumina sempre adsorvem na bicamada. Em sistemas com poucas moléculas, elas se estabilizam na região das carbonilas, em orientação aproximadamente paralela à superfície da bicamada, em concordância com dados disponíveis na literatura e reproduzindo um modelo de interação do tipo carpete. Quando a concentração de moléculas de curcumina cresce e elas são inseridas simultaneamente na fase aquosa, a curcumina se agrega ainda na fase aquosa e internaliza a bicamada como um *cluster*, avançando sobre o núcleo hidrofóbico. Dependendo do tamanho do *cluster*, a interação com os lipídios resulta na dispersão das moléculas pelas duas monocamadas e sua consequente desestruturação. *Clusters* grandes (~16 moléculas) têm a característica de estabelecerem, ao menos de forma transiente, estruturas transmembrânicas que unem as duas monocamadas.

Os experimentos com inserção progressiva de moléculas de curcumina confirmam os resultados de localização e orientação obtidos no primeiro conjunto de simulações. No caso em que as moléculas de curcumina podem adsorver à bicamada por qualquer uma das monocamadas, ao menos até 16 moléculas de curcumina, não se observa a formação de agregados grandes e, consequentemente, da estrutura transmembrânica, apresentando no período de equilíbrio de ambas as simulações, distribuição compatível com à obtida na simulação equivalente em que as moléculas adsorveram como um *cluster*. Continuando a aumentar progressivamente o número de moléculas de curcumina, observa-se que mesmo a adsorção por ambas as monocamadas conduz à uma distribuição que resulta no crescimento dos *clusters* e à formação da estrutura transmembrânica e, considerando a saturação das monocamadas, estes tendem a ser permanentes ou de duração muito longa. Quando se impõe

que a adsorção da curcumina se dê por uma única monocamada, no entanto, é observada a formação de agregados grandes, já a partir da 13ª ou 14ª molécula inserida, que avançam sobre o núcleo hidrofóbico, estabelecendo a estrutura transmembrânica.

No intervalo de existência das estruturas transmembrânicas, as moléculas de curcumina que avançam sobre o núcleo hidrofóbico, se orientando de forma, aproximadamente, perpendicular à superfície da bicamada, enquanto a maior parte daquelas na região das carbonilas ainda se orientam paralelamente. Outros resultados que emergem dos dados discutidos são os efeitos da concentração da curcumina sobre as características estruturais da bicamada. Observa-se uma variação modesta da espessura média da bicamada quando essa é calculada sobre toda a bicamada (flutuações de ± 2 Å), em relação ao valor obtido numa bicamada POPC pura. Entretanto, verifica-se um considerável afinamento local (maior que 9 Å) quando a estrutura transmembrânica se estabelece.

O parâmetro de ordem avalia a estruturação das caudas dos fosfolipídios, sendo sua modificação associada a alterações na fluidez da bicamada: comparando com a bicamada pura, na fase de equilíbrio (4500 a 6000 ns na simulação 16Curc, e nos 1900 ns da extensão P16), observa-se um aumento no ordenamento do início da cadeia (até o sexto carbono; região em que a curcumina se localiza) e uma diminuição do ordenamento no final da cadeia. Em linha com experimentos que indicam a presença de água no núcleo hidrofóbico de bicamadas contendo curcumina (DUDA; CYGAN; WISNIEWSKA-BECKER, 2020), os resultados aqui apresentados evidenciam um crescimento do número de eventos de permeação de moléculas de água e, consequentemente, do coeficiente de permeabilidade da bicamada, com o aumento do número de moléculas de curcumina. Este crescimento é ainda mais significativo quando a estrutura transmembrânica é formada, podendo ser estabelecidos poros transientes em função da perturbação decorrente da ação da curcumina, e possivelmente consistindo na fonte da atividade membranolítica reportada para curcumina na literatura (LEITE et al., 2018). A redução do parâmetro de ordem e o aumento da permeabilidade da bicamada indicam que perturbação causada pela curcumina aumenta a fluidez da estrutura lipídica, efeito também sugerido por experimentos em vesículas (KOTENKOV et al., 2019; LEITE et al., 2018; ALSOP; DHALIWAL; RHEINSTÄDTER, 2017)

De forma resumida, pode-se afirmar que o processo de agregação das moléculas de curcumina, portanto, ocorre tanto na fase aquosa, quanto no interior da bicamada (em

elevadas concentrações). Considerando que numa vesícula a adsorção se dá pela interface externa, a formação da estrutura transmembrânica pode ocorrer se houver a prévia agregação das moléculas de curcumina no meio aquoso, mas caso os *clusters* adsorvidos não tenham tamanho suficiente para se enterrarem no núcleo hidrofóbico, eles podem contribuir para a saturação da interface externa da membrana, e induzir o processo de agregação e posterior formação da estrutura. Em qualquer dos casos, moléculas de curcumina começarão a ser depositadas na monocamada interna, e se a estrutura transmembrânica perder moléculas o suficiente, será desfeita, resultando numa membrana com curcumina dispersa pela região do glicerol em ambas as monocamadas. Num sistema real, o número de moléculas de curcumina não é limitado como nas simulações, e o processo de interação da curcumina com a membrana se dá de forma dinâmica, com novas moléculas sendo continuamente adsorvidas da solução. Se, no entanto, ocorrer a saturação também da monocamada interior, o processo é invertido e as moléculas de curcumina na bicamada tendem a se agregar, alimentando a estrutura transmembrânica e estabelecendo um microdomínio, que neste caso pode ser estável por longos períodos, com potencial para comprometer a integridade estrutural da membrana. Este provavelmente é o mecanismo pelo qual a interação da curcumina com membranas de vesículas produz resultados que a localizam tanto dispersa pela bicamada quanto no centro da estrutura lipídica, com a formação do microdomínio potencialmente associado à toxicidade da curcumina em altas concentrações (BURGOS‐MORÓN, 2010). Os efeitos da curcumina sobre a bicamada serem dependentes de sua concentração é uma relação já estabelecida na literatura, mas o mecanismo pelo qual ocorre ainda não havia sido elucidado, nem o motivo de alguns autores postularem a ligação da curcumina como sendo dispersa pela bicamada, enquanto outros propõem o enterramento, inclusive com a formação de estrutura transmembrânica, apesar do consenso de que ela age no interior da bicamada/membrana.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, M. J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, 1 set. 2015.

ALLEN, W. J.; LEMKUL, J. A.; BEVAN, D. R. GridMAT-MD: a grid-based membrane analysis tool for use with molecular dynamics. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 12, p. 1952–1958, set. 2009.

ALSOP, R. J.; DHALIWAL, A.; RHEINSTÄDTER, M. C. Curcumin Protects Membranes through a Carpet or Insertion Model Depending on Hydration. **Langmuir**, v. 33, n. 34, p. 8516–8524, 29 ago. 2017.

ANAND, P. et al. Curcumin and cancer: An "old-age" disease with an "age-old" solution. **Cancer Letters**, v. 267, n. 1, p. 133–164, 18 ago. 2008.

AWOONOR-WILLIAMS, E.; ROWLEY, C. N. Molecular simulation of nonfacilitated membrane permeation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, New approaches for bridging computation and experiment on membrane proteins. v. 1858, n. 7, Part B, p. 1672–1687, 1 jul. 2016.

BARRY, J. et al. Determining the Effects of Lipophilic Drugs on Membrane Structure by Solid-State NMR Spectroscopy: The Case of the Antioxidant Curcumin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 12, p. 4490–4498, 1 abr. 2009.

BEEMAN, D. Some multistep methods for use in molecular dynamics calculations. **Journal of Computational Physics** 20(2):130-139, 1976.

BERENDSEN, H. J. C. et al. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. Em: PULLMAN, B. (Ed.). **Intermolecular Forces: Proceedings of the Fourteenth Jerusalem Symposium on Quantum Chemistry and Biochemistry Held in Jerusalem, Israel, April 13–16, 1981**. The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry. Dordrecht: Springer Netherlands, 1981. p. 331–342.

BERENDSEN, H. J. C., J. P. M. POSTAM, A. DINOLA, E J. R HAAK. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **J. Chem. Phys.**, 81:3684-3690, 1984.

BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, v. 91, n. 1, p. 43–56, 2 set. 1995.

BERGER, O.; EDHOLM, O.; JÄHNIG, F. Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. **Biophysical Journal**, v. 72, n. 5, p. 2002–2013, maio 1997.

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. et al. The dark side of curcumin. **International Journal of Cancer**, v. 126, n. 7, p. 1771–1775, 2010.

BUSSI, G., D. DONADIO, E M. PARRINELLO. Canonical sampling through velocity rescaling. **J. Chem. Phys.** 126:14- 101, 2007.

CAMILO, C. R. DE S. [UNESP. **Estudo por dinâmica molecular da ação do colesterol sobre o acoplamento entre as faces de bicamadas fosfolipídicas**. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Universidade Estadual Paulista (UNESP), 138p., 28 abr. 2017.

CAMILO, C. R. DE S.; RUGGIERO, J. R.; DE ARAUJO, A. S. A Method for Detection of Water Permeation Events in Molecular Dynamics Simulations of Lipid Bilayers. **Brazilian Journal of Physics**, v. 52, n. 3, p. 62, 24 fev. 2022.

CAPPONI, S. et al. Interleaflet mixing and coupling in liquid-disordered phospholipid bilayers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1858, n. 2, p. 354–362, 1 fev. 2016.

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.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089–10092, 15 jun. 1993.

DO CANTO, A. M. T. M. et al. Molecular dynamics simulations of T-20 HIV fusion inhibitor interacting with model membranes. **Biophysical Chemistry**, v. 159, n. 2, p. 275–286, 1 dez. 2011.

DUDA, M.; CYGAN, K.; WISNIEWSKA-BECKER, A. Effects of Curcumin on Lipid Membranes: an EPR Spin-label Study. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 78, n. 2, p. 139–147, 1 jun. 2020.

ERLEJMAN, A. G. et al. The Interaction of Flavonoids with Membranes: Potential Determinant of Flavonoid Antioxidant Effects. **Free Radical Research**, v. 38, n. 12, p. 1311–1320, 1 dez. 2004.

ESSMANN, U. et al. A smooth particle mesh Ewald method. **The Journal of Chemical Physics**, v. 103, n. 19, p. 8577–8593, 15 nov. 1995.

GUIXÀ-GONZÁLEZ, R. et al. MEMBPLUGIN: studying membrane complexity in VMD. **Bioinformatics**, v. 30, n. 10, p. 1478–1480, 15 maio 2014.

HAMAGUCHI, T.; ONO, K.; YAMADA, M. REVIEW: Curcumin and Alzheimer's Disease. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 16, n. 5, p. 285–297, 3 set. 2010.

HAZRA, M. K.; ROY, S.; BAGCHI, B. 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. **The Journal of Chemical Physics**, v. 141, n. 18, p. 18C501, 14 nov. 2014.

HESS, B. et al. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463–1472, 1997.

HOOVER, W. G. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. **Physical Review A**, v. 31, n. 3, p. 1695–1697, 1 mar. 1985.

HOCKNEY, R.W., S.P. GOEL, E J. EASTWOOD. Quiet high resolution computer models of a plasma. **J. Comp. Phys.** 14:148-158, 1974.

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. OJAMAË, 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.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1 fev. 1996.

HUNG, W.-C. et al. Membrane-Thinning Effect of Curcumin. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 11, p. 4331–4338, 1 jun. 2008.

HYSLOP, P. A.; MOREL, B.; SAUERHEBER, R. D. Organization and interaction of cholesterol and phosphatidylcholine in model bilayer membranes. **Biochemistry**, v. 29, n. 4, p. 1025–1038, 30 jan. 1990.

INGOLFSSON, H. I.; KOEPPE, R. E.; ANDERSEN, O. S. Curcumin is a Modulator of Bilayer Material Properties. **Biochemistry**, v. 46, n. 36, p. 10384–10391, 1 set. 2007.

JORGENSEN, W. L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, v. 79, n. 2, p. 926–935, 15 jul. 1983.

JORGENSEN, W.L., E J. TIRADO-RIVERS. The OPLS [optimized potentials for liquids simulations] potencial functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and cambrin. **J. Am. Chem. Soc.** 110:1657-1666, 1988.

KOPEĆ, W.; TELENIUS, J.; KHANDELIA, H. Molecular dynamics simulations of the interactions of medicinal plant extracts and drugs with lipid bilayer membranes. **The FEBS Journal**, v. 280, n. 12, p. 2785–2805, 2013.

KOTENKOV, S. A. et al. Effect of Cholesterol and Curcumin on Ordering of DMPC Bilayers. **Applied Magnetic Resonance**, v. 50, n. 1, p. 511–520, 1 mar. 2019.

KOZIARA, K. B. et al. Testing and validation of the Automated Topology Builder (ATB) version 2.0: prediction of hydration free enthalpies. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 28, n. 3, p. 221–233, mar. 2014.

KUČERKA, N.; NIEH, M.-P.; KATSARAS, J. Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1808, n. 11, p. 2761–2771, 1 nov. 2011.

KUNWAR, A. et al. Quantitative cellular uptake, localization and cytotoxicity of curcumin in normal and tumor cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1780, n. 4, p. 673–679, 1 abr. 2008.

LEEKUMJORN, S.; SUM, A. K. Molecular Characterization of Gel and Liquid-Crystalline Structures of Fully Hydrated POPC and POPE Bilayers. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 21, p. 6026–6033, 1 maio 2007.

LEITE, N. B. et al. Cholesterol modulates curcumin partitioning and membrane effects. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1860, n. 11, p. 2320–2328, 1 nov. 2018.

LYU, Y. et al. Characterization of Interactions between Curcumin and Different Types of Lipid Bilayers by Molecular Dynamics Simulation. **The Journal of Physical Chemistry. B**, v. 122, n. 8, p. 2341–2354, 01 2018.

MACDERMAID, C. M. et al. Molecular dynamics simulations of cholesterol-rich membranes using a coarse-grained force field for cyclic alkanes. **The Journal of Chemical Physics**, v. 143, n. 24, p. 243144, 10 dez. 2015.

MAHESHWARI, R. K. et al. Multiple biological activities of curcumin: A short review. **Life Sciences**, NATURECEUTICALS (NATURAL PRODUCTS), NUTRACEUTICALS, HERBAL BOTANICALS, AND PSYCHOACTIVES: DRUG DISCOVERY AND DRUG-DRUG INTERACTIONS. v. 78, n. 18, p. 2081–2087, 27 mar. 2006.

MALDE, A. K. et al. An Automated Force Field Topology Builder (ATB) and Repository: Version 1.0. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 7, n. 12, p. 4026–4037, 13 dez. 2011.

MARRINK, S. J.; DE VRIES, A. H.; TIELEMAN, D. P. Lipids on the move: Simulations of membrane pores, domains, stalks and curves. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, Lipid Interactions, Domain Formation, and Lateral Structure of Membranes. v. 1788, n. 1, p. 149–168, 1 jan. 2009.

MARTÍNEZ, L. **Introdução à simulação por Dinâmica Molecular e aplicações**. Petrópolis: LNCC - V Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos, 2010.

MIYAMOTO, S.; KOLLMAN, P. A. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 952–962, 1992.

MOLUGU, T. R.; BROWN, M. F. Cholesterol-Induced Suppression of Membrane Elastic Fluctuations at the Atomistic Level. **Chemistry and physics of lipids**, v. 199, p. 39–51, set. 2016.

NAMBA, A.M., V.B. DA SILVA, E C.H.T.P. DA DILVA. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármados. **Eclética Quím.** 33(4):13-24, 2008.

NELSON, K. M. et al. The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 5, p. 1620–1637, 09 2017.

NOSÉ, S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. **Molecular Physics**, v. 52, p. 255–268, 1984.

NOSÉ, S.; KLEIN, M. L. Constant pressure molecular dynamics for molecular systems. **Molecular Physics**, v. 50, n. 5, p. 1055–1076, 10 dez. 1983.

OBAIDI, I. et al. Curcumin Sensitizes Kidney Cancer Cells to TRAIL-Induced Apoptosis via ROS Mediated Activation of JNK-CHOP Pathway and Upregulation of DR4. **Biology**, v. 9, n. 5, p. 92, maio 2020.

OLIVEIRA, M. C.; YUSUPOV, M.; BOGAERTS, A.; CORDEIRO, R. M. Lipid Oxidation: Role of Membrane Phase-Separated Domains. **J Chem Inf Model** 61:2857–2868, 2021.

OOSTENBRINK, C. et al. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1656–1676, out. 2004.

ORSI, M.; ESSEX, J. W. The ELBA Force Field for Coarse-Grain Modeling of Lipid Membranes. **PLOS ONE**, v. 6, n. 12, p. e28637, 16 dez. 2011.

PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. **Journal of Applied Physics**, v. 52, n. 12, p. 7182–7190, 1 dez. 1981.

PASCUTTI, P. G. Princípios da Simulação por Dinâmica Molecular. Em: **Métodos Computacionais no Estudo de Macromoléculas Biológicas.** São Paulo: Editora Livraria da Física, 2019, p.15-35.

PHILLIPS, J. C. et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1781–1802, dez. 2005.

PIGGOT, T. J.; PIÑEIRO, Á.; KHALID, S. Molecular Dynamics Simulations of Phosphatidylcholine Membranes: A Comparative Force Field Study. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 8, n. 11, p. 4593–4609, 13 nov. 2012.

POGER, D.; CARON, B.; MARK, A. E. Validating lipid force fields against experimental data: Progress, challenges and perspectives. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -**

Biomembranes, New approaches for bridging computation and experiment on membrane proteins. v. 1858, n. 7, Part B, p. 1556–1565, 1 jul. 2016.

PORASSO, R. D.; LÓPEZ CASCALES, J. J. A criterion to identify the equilibration time in lipid bilayer simulations. **Papers in Physics**, v. 4, n. 040005, out. 2012.

RAND, R. P.; PARSEGIAN, V. A. Hydration forces between phospholipid bilayers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes**, v. 988, n. 3, p. 351–376, 6 dez. 1989.

RAVINDRAN, J.; PRASAD, S.; AGGARWAL, B. B. Curcumin and Cancer Cells: How Many Ways Can Curry Kill Tumor Cells Selectively? **The AAPS Journal**, v. 11, n. 3, p. 495–510, 10 jul. 2009.

REIS, A. et al. Interaction of polyphenols with model membranes: Putative implications to mouthfeel perception. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1862, n. 2, p. 183133, 1 fev. 2020.

SAPAY, N.; TIELEMAN, D. P. Chapter 4 Molecular Dynamics Simulation of Lipid–Protein Interactions. Em: FELLER, S. E. (Ed.). **Current Topics in Membranes**. Computational Modeling of Membrane Bilayers. [s.l.] Academic Press, 2008. v. 60p. 111–130.

SEELIG, J.; WAESPE-SARCEVIC, N. Molecular order in cis and trans unsaturated phospholipd bilayers. **Biochemistry** v. 17, p. 3310-3315, 1978.

SHINODA, W.; OKAZAKI, S. A Voronoi analysis of lipid area fluctuation in a bilayer. **J. Chem. Phys.** v. 109, p. 1517-1521, jul. 1998.

SMABY, J. M. et al. Phosphatidylcholine acyl unsaturation modulates the decrease in interfacial elasticity induced by cholesterol. **Biophysical Journal**, v. 73, n. 3, p. 1492–1505, set. 1997.

STAROK, M. et al. EGFR Inhibition by Curcumin in Cancer Cells: A Dual Mode of Action. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 5, p. 1634–1642, 11 maio 2015.

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.

TEIXEIRA, S. et al. Structure–property studies on the antioxidant activity of flavonoids present in diet. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, n. 8, p. 1099–1108, 15 out. 2005.

THAPA, A. et al. Membrane-Mediated Neuroprotection by Curcumin from Amyloid-β-Peptide-Induced Toxicity. **Langmuir**, v. 29, n. 37, p. 11713–11723, 17 set. 2013.

TIELEMAN, D. P.; BERENDSEN, H. J. A molecular dynamics study of the pores formed by Escherichia coli OmpF porin in a fully hydrated palmitoyloleoylphosphatidylcholine bilayer. **Biophysical Journal**, v. 74, n. 6, p. 2786–2801, jun. 1998.

TIELEMAN, D. P.; MARRINK, S. J.; BERENDSEN, H. J. A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1331, n. 3, p. 235–270, 21 nov. 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.** v. 102, p. 5451-5459, 1995.

VAN GUNSTEREN, W. F., E H. J. C. BERENDSEN. **Gromos-87 manual.** Biomos BV Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands, 1987.

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 GUSTEREN, 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.

VENABLE, R. M.; KRÄMER, A.; PASTOR, R. W. Molecular Dynamics Simulations of Membrane Permeability. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 9, p. 5954–5997, 8 maio 2019.

YANG, J.; MARTÍ, J.; CALERO, C. Pair interactions among ternary DPPC/POPC/cholesterol mixtures in liquid-ordered and liquid-disordered phases. **Soft Matter**, v. 12, n. 20, p. 4557–4561, 18 maio 2016.

YUN, D. G.; LEE, D. G. Antibacterial activity of curcumin via apoptosis-like response in Escherichia coli. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 12, p. 5505–5514, 1 jun. 2016.

ZHAO, W. et al. Atomic-scale structure and electrostatics of anionic palmitoyloleoylphosphatidylglycerol lipid bilayers with Na+ counterions. **Biophysical Journal**, v. 92, n. 4, p. 1114–1124, 15 fev. 2007.

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

ANEXO A - Estrutura e parâmetros de topologia utilizados para a curcumina

; Estrutura da molécula de curcumina na representação de átomos unidos (formatação GRO)

```
Curcumin
 39
  1CURC  C10    1   1.059   2.427   2.249  0.0663  0.3062  0.0225
  1CURC   O1    2   1.193   2.387   2.280 -0.2130 -0.2833  0.4878
  1CURC   C5    3   1.288   2.483   2.299 -0.0169 -0.3365 -0.1933
  1CURC   C2    4   1.272   2.619   2.319  0.6386 -0.2516 -0.2413
  1CURC   H1    5   1.174   2.661   2.295  1.3013  1.1688 -0.6097
  1CURC   C1    6   1.372   2.714   2.338  0.0108  0.3702  0.0080
  1CURC   C4    7   1.345   2.853   2.373 -0.1452  0.1983  0.5822
  1CURC   H3    8   1.419   2.896   2.441 -1.5520  1.8664  1.1350
  1CURC   C7    9   1.247   2.938   2.341  0.1086  0.2502 -0.0773
  1CURC   H5   10   1.170   2.916   2.268 -1.2372  2.6671  0.5342
  1CURC   C3   11   1.501   2.663   2.329 -0.0374  0.4751 -1.6243
  1CURC   H2   12   1.593   2.717   2.351  1.7423 -1.2590 -4.2307
  1CURC   C6   13   1.521   2.527   2.314 -0.3189  0.3162 -0.6545
  1CURC   H4   14   1.624   2.495   2.296 -0.6251 -0.8778 -0.3909
  1CURC   C8   15   1.418   2.435   2.296  0.0625 -0.0922 -0.7727
  1CURC   O2   16   1.431   2.302   2.321  0.1247 -0.0440 -0.5447
  1CURC   H6   17   1.524   2.278   2.349 -1.0348 -2.2491  1.8146
  1CURC   C9   18   1.217   3.058   2.421 -0.5552 -0.3237  0.5522
  1CURC   O3   19   1.210   3.049   2.543 -0.8903 -0.1699  0.5462
  1CURC  C11   20   1.157   3.180   2.351 -0.2120 -0.2626  0.3583
  1CURC  C12   21   1.275   3.266   2.306 -0.2427 -0.2930  0.2185
  1CURC   O4   22   1.381   3.214   2.270 -0.1516 -0.1908  0.3367
  1CURC  C13   23   1.255   3.410   2.288  0.1218 -0.2479  0.1612
  1CURC  H12   24   1.152   3.440   2.307  0.4985  0.0810  1.8615
  1CURC  C14   25   1.349   3.502   2.266 -0.0490 -0.1454 -0.1463
  1CURC  H13   26   1.444   3.466   2.305 -1.0380 -1.2023  1.4167
  1CURC  C15   27   1.358   3.619   2.181  0.0496  0.2861  0.4492
  1CURC  C17   28   1.246   3.672   2.119  0.4898 -0.6123 -1.1635
  1CURC  H15   29   1.156   3.610   2.114  1.2528 -1.7325 -1.2328
  1CURC  C16   30   1.481   3.683   2.173  0.4046 -0.4645 -0.3134
  1CURC  H14   31   1.569   3.642   2.222 -0.7473  0.7907  3.1496
  1CURC  C18   32   1.488   3.808   2.112 -0.0953 -0.1900  0.1715
  1CURC   O5   33   1.594   3.891   2.091 -0.2001 -0.0666  0.1257
  1CURC  C21   34   1.723   3.850   2.138 -0.3958 -0.4419  0.3433
  1CURC  C19   35   1.254   3.797   2.058  0.1205 -0.2887 -0.5593
  1CURC  H16   36   1.164   3.831   2.005 -0.9069 -1.9070  0.0670
  1CURC  C20   37   1.375   3.865   2.056  0.0116 -0.0695  0.0777
  1CURC   O6   38   1.384   3.985   1.991 -0.5309 -0.2185 -0.2817
  1CURC  H17   39   1.473   4.024   2.014 -0.2280 -1.4377  0.7088
   6.60407   6.60407   7.09328
```

; Topologia utilizada para a curcumina (formatação ITP)

```
[ moleculetype ]
; Name   nrexcl
CURC     3

[ atoms ]
;  nr  type  resnr  resid  atom  cgnr  charge    mass    total_charge
    1   CH3    1    CURC    C10   1    0.202  15.0350
    2    OE    1    CURC    O1    1   -0.249  15.9994     ; -0.047
    3     C    1    CURC    C5    2    0.188  12.0110
    4     C    1    CURC    C2    2   -0.260  12.0110
    5    HC    1    CURC    H1    2    0.162   1.0080     ;  0.090
    6     C    1    CURC    C1    3    0.066  12.0110
    7     C    1    CURC    C4    3   -0.004  12.0110
    8    HC    1    CURC    H3    3    0.115   1.0080
    9     C    1    CURC    C7    3   -0.436  12.0110
   10    HC    1    CURC    H5    3    0.172   1.0080     ; -0.087
   11     C    1    CURC    C3    4   -0.219  12.0110
   12    HC    1    CURC    H2    4    0.172   1.0080     ; -0.047
   13     C    1    CURC    C6    5   -0.226  12.0110
   14    HC    1    CURC    H4    5    0.180   1.0080
   15     C    1    CURC    C8    5    0.233  12.0110
   16    OA    1    CURC    O2    5   -0.517  15.9994
   17     H    1    CURC    H6    5    0.403   1.0080     ;  0.073
   18     C    1    CURC    C9    6    0.678  12.0110
   19     O    1    CURC    O3    6   -0.563  15.9994
   20   CH2    1    CURC    C11   6   -0.194  14.0270     ; -0.079
   21     C    1    CURC    C12   7    0.678  12.0110
   22     O    1    CURC    O4    7   -0.563  15.9994
   23     C    1    CURC    C13   7   -0.436  12.0110
   24    HC    1    CURC    H12   7    0.172   1.0080
   25     C    1    CURC    C14   7   -0.004  12.0110
   26    HC    1    CURC    H13   7    0.115   1.0080     ; -0.038
   27     C    1    CURC    C15   8    0.066  12.0110
   28     C    1    CURC    C17   8   -0.219  12.0110
   29    HC    1    CURC    H15   8    0.172   1.0080     ;  0.019
   30     C    1    CURC    C16   9   -0.260  12.0110
   31    HC    1    CURC    H14   9    0.162   1.0080
   32     C    1    CURC    C18   9    0.188  12.0110     ;  0.090
   33    OE    1    CURC    O5    10   -0.249  15.9994
   34   CH3    1    CURC    C21   10   0.202  15.0350     ; -0.047
   35     C    1    CURC    C19   11   -0.226  12.0110
   36    HC    1    CURC    H16   11   0.180   1.0080
   37     C    1    CURC    C20   11   0.233  12.0110
   38    OA    1    CURC    O6    11   -0.517  15.9994
   39     H    1    CURC    H17   11   0.403   1.0080     ;  0.073
; total charge of the molecule:   0.000

[ bonds ]
;  ai   aj  funct   c0        c1
    1    2    2   0.1430   8.1800e+06
    2    3    2   0.1360   1.0200e+07
    3    4    2   0.1390   8.6600e+06
    3   15    2   0.1390   8.6600e+06
    4    5    2   0.1090   1.2300e+07
    4    6    2   0.1390   8.6600e+06
    6    7    2   0.1460   2.7500e+06
    6   11    2   0.1390   8.6600e+06
    7    8    2   0.1090   1.2300e+07
    7    9    2   0.1330   1.1800e+07
```

```
   9   10    2   0.1090   1.2300e+07
   9   18    2   0.1470   8.7100e+06
  11   12    2   0.1090   1.2300e+07
  11   13    2   0.1390   8.6600e+06
  13   14    2   0.1090   1.2300e+07
  13   15    2   0.1390   8.6600e+06
  15   16    2   0.1360   1.0200e+07
  16   17    2   0.1000   1.5700e+07
  18   19    2   0.1230   1.6600e+07
  18   20    2   0.1530   7.1500e+06
  20   21    2   0.1530   7.1500e+06
  21   22    2   0.1230   1.6600e+07
  21   23    2   0.1470   8.7100e+06
  23   24    2   0.1090   1.2300e+07
  23   25    2   0.1330   1.1800e+07
  25   26    2   0.1090   1.2300e+07
  25   27    2   0.1450   1.2900e+07
  27   28    2   0.1390   8.6600e+06
  27   30    2   0.1390   8.6600e+06
  28   29    2   0.1090   1.2300e+07
  28   35    2   0.1390   8.6600e+06
  30   31    2   0.1090   1.2300e+07
  30   32    2   0.1390   8.6600e+06
  32   33    2   0.1360   1.0200e+07
  32   37    2   0.1390   8.6600e+06
  33   34    2   0.1430   8.1800e+06
  35   36    2   0.1090   1.2300e+07
  35   37    2   0.1390   8.6600e+06
  37   38    2   0.1360   1.0200e+07
  38   39    2   0.1000   1.5700e+07

[ pairs ]
;  ai   aj  funct  ;  all 1-4 pairs but the ones excluded in GROMOS itp
   1    4    1
   1   15    1
   3   17    1
   4    8    1
   4    9    1
   6   10    1
   6   18    1
   7   19    1
   7   20    1
   8   10    1
   8   11    1
   8   18    1
   9   11    1
   9   21    1
  10   19    1
  10   20    1
  13   17    1
  18   22    1
  18   23    1
  19   21    1
  20   24    1
  20   25    1
  21   26    1
  21   27    1
  22   24    1
  22   25    1
  23   28    1
```

```
  23   30    1
  24   26    1
  24   27    1
  26   28    1
  26   30    1
  30   34    1
  32   39    1
  34   37    1
  35   39    1

[ angles ]
;  ai   aj   ak  funct   angle     fc
   1    2    3    2    118.00  1330.00
   2    3    4    2    126.00   640.00
   2    3   15    2    115.00   610.00
   4    3   15    2    120.00   560.00
   3    4    5    2    120.00   505.00
   3    4    6    2    120.00   560.00
   5    4    6    2    120.00   505.00
   4    6    7    2    120.00   560.00
   4    6   11    2    120.00   560.00
   7    6   11    2    120.00   560.00
   6    7    8    2    114.00   782.00
   6    7    9    2    132.00   760.00
   8    7    9    2    120.00   505.00
   7    9   10    2    120.00   505.00
   7    9   18    2    120.00   560.00
  10    9   18    2    114.00   782.00
   6   11   12    2    120.00   505.00
   6   11   13    2    120.00   560.00
  12   11   13    2    120.00   505.00
  11   13   14    2    120.00   505.00
  11   13   15    2    120.00   560.00
  14   13   15    2    120.00   505.00
   3   15   13    2    120.00   560.00
   3   15   16    2    121.00   685.00
  13   15   16    2    121.00   685.00
  15   16   17    2    108.53   443.00
   9   18   19    2    121.00   685.00
   9   18   20    2    120.00   560.00
  19   18   20    2    121.00   685.00
  18   20   21    2    111.00   530.00
  20   21   22    2    121.00   685.00
  20   21   23    2    120.00   560.00
  22   21   23    2    121.00   685.00
  21   23   24    2    120.00   505.00
  21   23   25    2    120.00   560.00
  24   23   25    2    120.00   505.00
  23   25   26    2    120.00   505.00
  23   25   27    2    132.00   760.00
  26   25   27    2    120.00   505.00
  25   27   28    2    120.00   560.00
  25   27   30    2    120.00   560.00
  28   27   30    2    120.00   560.00
  27   28   29    2    120.00   505.00
  27   28   35    2    120.00   560.00
  29   28   35    2    120.00   505.00
  27   30   31    2    120.00   505.00
  27   30   32    2    120.00   560.00
  31   30   32    2    120.00   505.00
```

```
  30   32   33    2    126.00   640.00
  30   32   37    2    120.00   560.00
  33   32   37    2    115.00   610.00
  32   33   34    2    118.00  1330.00
  28   35   36    2    120.00   505.00
  28   35   37    2    120.00   560.00
  36   35   37    2    120.00   505.00
  32   37   35    2    120.00   560.00
  32   37   38    2    121.00   685.00
  35   37   38    2    121.00   685.00
  37   38   39    2    108.53   443.00

[ dihedrals ]
; GROMOS improper dihedrals
;  ai   aj   ak   al  funct   angle     fc
   6    4    3   15    2      0.00   167.36
   4    3   15   13    2      0.00   167.36
   3   15   13   11    2      0.00   167.36
  15   13   11    6    2      0.00   167.36
  13   11    6    4    2      0.00   167.36
  11    6    4    3    2      0.00   167.36
  27   28   35   37    2      0.00   167.36
  28   35   37   32    2      0.00   167.36
  35   37   32   30    2      0.00   167.36
  37   32   30   27    2      0.00   167.36
  32   30   27   28    2      0.00   167.36
  30   27   28   35    2      0.00   167.36
   6    4    7   11    2      0.00   167.36
   4    3    5    6    2      0.00   167.36
  11    6   12   13    2      0.00   167.36
   7    6    8    9    2      0.00   167.36
   3    2    4   15    2      0.00   167.36
  13   11   14   15    2      0.00   167.36
   9    7   10   18    2      0.00   167.36
  15    3   13   16    2      0.00   167.36
  18    9   19   20    2      0.00   167.36
  21   20   22   23    2      0.00   167.36
  23   21   24   25    2      0.00   167.36
  25   23   26   27    2      0.00   167.36
  27   25   28   30    2      0.00   167.36
  30   27   31   32    2      0.00   167.36
  28   27   29   35    2      0.00   167.36
  32   30   33   37    2      0.00   167.36
  35   28   36   37    2      0.00   167.36
  37   32   35   38    2      0.00   167.36

[ dihedrals ]
;  ai   aj   ak   al  funct    ph0      cp     mult
   1    2    3    4    1    180.00    24.00    2
   4    6    7    9    1    180.00     5.86    2
   6    7    9   18    1    180.00     5.86    2
   7    9   18   20    1    180.00     5.86    2
   3   15   16   17    1    180.00    16.70    2
   9   18   20   21    1    180.00     1.00    6
  18   20   21   23    1      0.00     1.00    6
  20   21   23   25    1    180.00     5.86    2
  21   23   25   27    1    180.00     5.86    2
  23   25   27   30    1    180.00     5.86    2
  30   32   33   34    1    180.00    24.00    2
  32   37   38   39    1    180.00    16.70    2
```

```
[ exclusions ]
;  ai   aj  funct  ;  GROMOS 1-4 exclusions
   2    5
   2    6
   2   13
   2   16
   3    7
   3   11
   3   14
   4   12
   4   13
   4   16
   5    7
   5   11
   5   15
   6   14
   6   15
   7   12
   7   13
  11   16
  12   14
  12   15
  14   16
  25   29
  25   31
  25   32
  25   35
  27   33
  27   36
  27   37
  28   31
  28   32
  28   38
  29   30
  29   36
  29   37
  30   35
  30   38
  31   33
  31   37
  32   36
  33   35
  33   38
  36   38
```

ANEXO B - *A method for detection of water permeation events in Molecular dynamics simulations of lipid bilayers*

Brazilian Journal of Physics (2022) 52:62
https://doi.org/10.1007/s13538-022-01071-1

GENERAL AND APPLIED PHYSICS

A Method for Detection of Water Permeation Events in Molecular Dynamics Simulations of Lipid Bilayers

Carlos Roberto de Souza Camilo[1] · José Roberto Ruggiero[1] · Alexandre Suman de Araujo[1]

Received: 2 August 2021 / Accepted: 3 February 2022
© The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Física 2022

Abstract
The cell membrane is one of the most important structures of life. Understanding its functioning is essential for several human knowledge areas, mainly how it controls the efflux of substances between the cytoplasm and the environment. Being a complex structure, composed of several classes of compounds such as lipids, proteins, and sugars, a convenient way to mimic it is through a phospholipid bilayer. Molecular dynamics (MD) simulations of lipid bilayers in solution are the main computational approach to model the cell membrane. The characterization of permeation events through the bilayer provides information about the lipid interaction, and the effects of proteins and other molecules over the bilayer permeability. Due to the fast dynamics, the identification of small molecules permeation can poorly be done in traditional analyzes, such as density profiles. In this work, we present a method to detect water molecules permeation events through the lipid bilayer, characterizing its crossing time and trajectory. By splitting the simulation box into well-defined regions, the method distinguishes the passage of molecules through the bilayer from artifacts produced by crossing molecules through the simulation box edges when using periodic boundary conditions. The method provides an additional tool to analyze equilibrium MD membrane simulations and its computational implementation can be applied to common trajectory files.

Keywords Water permeation · Molecular dynamics · Phospholipid bilayers · Cholesterol

1 Introduction

Computational simulations of biological systems by molecular dynamics provide the time evolution at atomic or molecular resolution levels. Analysis of the system and its components can contribute with information about the interrelationship between them and the mechanisms of molecular action [1]. Bilayers simulations mimic the basic features of biological membranes and have been used to obtain valuable information on lipids interactions and structure. From the trajectories, it is possible to understand how the lipid composition and proportion [2–4], as soon as their interaction with drugs, small ions, or other biological interest molecules [5–7], affects the bilayer structural properties. Particularly noteworthy are the interactions of water molecules with lipids because they induce the formation and stabilize the bilayer structure [8, 9].

Biological membranes are structures that compartmentalize environments in the cells separating the cytosol from the extracellular environment. In organelles, they provide a distinct biochemical domain from that in the cellular environment [10]. Although its primary structural function is to act as a barrier between interior and exterior, the cellular activity demands that the membranes are selectively permeable, presenting exchange mechanisms for molecules between the cytosol and the extracellular environment, usually through processes mediated by proteins integrated to the membrane structure. However, the passage of small molecules through lipid membranes is verified experimentally [11] and in computational simulations [12, 13], even in the absence of proteins. The two main mechanisms proposed to explain the permeation of ions or small molecules through membranes are the passage through a transient pore established by local disturbances such as solvated ions or the passage directly through the membrane by diffusive processes as observed for H_2O, O_2, and CO_2 molecules [14]. The non-facilitated permeation of small molecules is associated with their solubility in the aqueous phase. If the molecule does not establish strong interactions with water, there is a significant probability that its partition coefficient favors the

✉ Carlos Roberto de Souza Camilo
carlos.rs.camilo@unesp.br

[1] Department of Physics, IBILCE, São Paulo State University (UNESP), Rua Cristóvão Colombo, 2265, São José do Rio Preto, SP CEP 15054-000, Brazil

Published online: 24 February 2022

interaction with the membrane. Once inside it, interaction with lipids may eventually result in the permeation through membrane [15]. The structure of a membrane presents, in addition to the hydrophobic core defined by the acyl chains, two hydrated interface regions defined by the polar lipid headgroups, which can induce the nonfacilitated permeation also of small hydrophilic molecules.

In the literature, the usual way to obtain characteristic properties for diffusive phenomena using computational simulations, such as the permeability coefficient, follows the modifications proposed by Marrink and Berendsen [16] on the homogeneous solubility-diffusion model of Finkelstein [17]. They require enhanced sampling techniques, such as umbrella sampling [18], adaptive biasing force [19], or metadynamics [20, 21], to get the free energy landscape as function of a reaction coordinate. Nevertheless, with the increasing of computational power, both the direct observation [22] and quantitative characterization in terms of the number of events have been discussed [13, 23]. The characterization of such events, mainly their frequency of occurrence and duration, can provide relevant information about how the lipid composition of the bilayer affects the permeation of a solute, or if the interaction of a target molecule with the membrane, like a drug, can favor the leakage of water and other molecules. However, the number of water molecules in the simulated system (typically several dozens for each lipid molecule) and the number of simulation frames make it impossible to check and study permeation events using conventional analysis such as density profiles. Besides, even when it is possible to check the presence of water molecules inside the bilayer, density profiles are time averages and are not suitable to find whether these molecules have completed the passage through the structure, or they have returned to the water bulk through the same leaflet they had entered.

The identification of permeation events requires the analysis of the time evolution of each water molecule position relative to the bilayer, frame by frame, and the application of an algorithm that calculates whether the molecules that entered the bilayer completed or not the passage through it. Furthermore, statistically, any water molecule can enter the lipid structure at some point at the simulation. In this work, we present a simple method to analyze water permeation events from bilayer simulations trajectories, and the computational tool to perform it is freely available on https://github.com/crobertocamilo/MD-permeation. The extension of the method to other solute molecules is straightforward. Its application to the simulation of a bilayer in aqueous phase, for instance, reveals how many permeation events occurred, which molecules were involved, and their time map. The method can also be applied to bilayer containing integrated proteins or other molecules, providing information about their influence on bilayer permeation during the simulation, which is important to verify hydrated pore formation. To demonstrate the applicability of the method, we present and compare the results of pure POPC (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*), POPE (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine*), and POPG (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol*) bilayer simulations produced in two different MD simulations packages, using two different force fields and distinct molecular models for water. The choice of the two sets has a secondary objective of comparing the effects of different water molecules representation on the water permeation events. Applied to simulations of mixed POPC/Cholesterol (Chol.) bilayers at different concentrations (POPC:Chol. 100:0, 80:20, and 60:40), the method reveals a gradual reduction in the water molecule permeation with increasing cholesterol concentration.

2 Theory and Methods

2.1 Computational Details

The application of the method presented in the next sections requires a molecular dynamics trajectory of the system under study. We use two different sets of MD packages and force fields to generate trajectories, as described below.

The first set of simulations was produced with the GROMACS 2018.8 package [24, 25], using the united atoms GROMOS96 53A6 force field [26], modified with the Berger parameters [27] for lipid molecules representation, denoted as GG. The structure and topology used for the POPC and POPE molecules are distributed by Tieleman [28]; for POPG, they are created by Zhao et al. [29], while for the cholesterol molecules, they are the same used by Höltje et al. [30]. The SPC model [31] was used for the water molecules representation. In the POPG bilayer simulation formed by anionic molecules, Na^+ counterions were added to ensure the neutrality of the system. The standard parameters of the force field were used for both water and Na^+. The rectangular simulation boxes, around $60\times60\times85$ Å, containing a bilayer with 130 lipids (65 per monolayer) and approximately 4600 water molecules (about 35 per lipid molecule), were built using the facilities of the GROMACS package. All the simulation boxes were submitted to a 10 ns period of equilibration and then to a 1500 ns period of production dynamics, performed with an integration step of 2 fs, and the trajectories being recorded every 10 ps.

Three-dimensional periodic boundary conditions were applied to all the simulation boxes. Non-bonded interactions were treated using the PME algorithm [32] for long-range electrostatic interactions and a 12 Å cutoff radius for short-range interactions. The LINCS algorithm [33] was used to control the lengths of atomic bonds in molecules, and the SETTLE algorithm [34] used to preserve the geometry of water molecules. The simulations were developed in the NPT ensemble, with a reference temperature of 310 K,

controlled through the Nosé-Hoover thermostat [35, 36], with coupling for two independent groups (water/ions and lipids), and a reference pressure of 1 bar (0.987 atm) ensured by the Parrinello-Rahman barostat [37, 38], with semi-isotropic coupling (with the bilayer plane xy coupled, but independent z). The reference value for the system temperature is above the phase transition temperature of all studied bilayers [39, 40], ensuring that the analyzed events occur with the bilayers in the liquid-crystalline phase.

The second set of simulations was carried out with the NAMD 2.13 software package [41] using the all-atoms CHARMM36 force field [42], termed as NC. The rectangular simulation boxes, with about $63 \times 63 \times 82$ Å, containing the initial structure of the simulation, were built using the CHARMM-GUI Membrane Builder module [43], following the same pattern as in the first set, i.e., bilayers with 130 lipids and approximately 4600 water molecules, here represented by the TIP3P water model [44, 45]. These simulations also ran for a 10 ns equilibration period followed by a production dynamics of 1200 ns. The timestep of 2 fs was used to integrate the dynamical equations, recording the trajectories each 10 ps. Periodic boundary conditions and the nonbonded interaction were treated exactly as in the first set of simulations. The reference temperature and pressure, 310 K and 1 bar, were controlled using Langevin dynamics and the Nosé-Hoover-Langevin barostat [46, 47], respectively. The RATTLE algorithm [48] was used to restrict covalent bonds with hydrogen atoms and the SETTLE algorithm to preserve the geometry of water molecules.

2.2 Permeation: a Method for Event Analysis

In this work, we present a simple application method for identifying permeation events of molecules (e.g., H_2O or O_2) in an MD bilayer simulation. The method consists of analyzing the position of the solute molecule relative to the bilayer and characterizing permeation events. Its application to all solute or solvent molecules provides the mapping of all permeation events that occur during a simulation. Here it will be applied for water molecules.

Before we describe the method, let us follow the z coordinate of a chosen water molecule throughout the simulation of a phospholipid bilayer of POPC in an aqueous medium, shown in Fig. 1a. The water molecule diffuses on the aqueous phase and eventually enters the hydrated phase of the bilayer, which is defined by the averaged z coordinate of the phosphate groups center of mass at each instant of the simulation. Note that dozens of occurrences are observed. They vary in duration and depth, i.e., how long the molecule remains inside the structure and how much the molecule enters the lipid phase towards the bilayer center (dashed line). Around the instant 280 ns, one particular event draws attention (the 4378 water molecule): The molecule enters the bilayer from the lower interface and advances through the center of the structure and, after a few ns, leaves the bilayer by the top interface. Details of this interval using a line representation for the movement between two registered instants are shown in Fig. 1b, where the trajectory of the tracked water molecule reveals the specific position and time of its passage through the lipid structure. In an analogy with the biological system, the molecule would have gone from the cytosol to the extracellular environment, or vice versa, crossing the cell membrane. Therefore, we have documented a permeation event of a water molecule through a bilayer, in a process that occurs by nonfacilitated diffusion, i.e., during the dynamic of an equilibrium simulation, without including any explicit inducing potential or gradient of chemical potential.

The usual way of analyzing the distribution of a chemical group or molecule across the simulation box is by calculating its density profile along the axis perpendicular to the bilayer (typically, the z-axis) [9, 29, 49, 50]. From Fig. 1c, however, no permeation event can be identified from the water density profile. Even when applied to the specific water residue (Fig. 1d), which we have identified above as a permeation event, the obtained distribution provides only a tiny indication that the molecule was inside the bilayer during the analyzed interval. Nevertheless, it is not possible to follow the temporal evolution of the phenomenon. Questions such as whether the molecule indeed passes through the structure, or advances to the center but returns, cannot be answered using density profiles analysis. Therefore, even if it was applied individually to each water molecule in the simulation box, density profiles cannot detect permeation events. If an event consists of just a few points in the trajectory (short time duration), information about their occurrence can hardly be obtained by visual inspection of density profile graphics or using software to visualize the trajectory of the molecules. In this way, it is evident that such events require an individual analysis for each molecule of interest, so it is convenient to use some specific analysis method for that purpose.

The structure of a bilayer defines, along the axis perpendicular to its plane (z-axis), regions with significantly different physical properties (see Fig. 2a):

- Region I is the upper aqueous phase, where other polar molecules may also be dissolved.
- Region II is the solvated region of the bilayer, comprising the phospholipids headgroups and glycerol groups.
- Region III comprises the acyl tails of phospholipids, a highly hydrophobic core where the presence of polar molecules is ordinarily negligible, the center of the bilayer, and the acyl tails region of the opposite monolayer.
- Regions IV and V are the same as regions II and I, respectively, at the opposite monolayer.

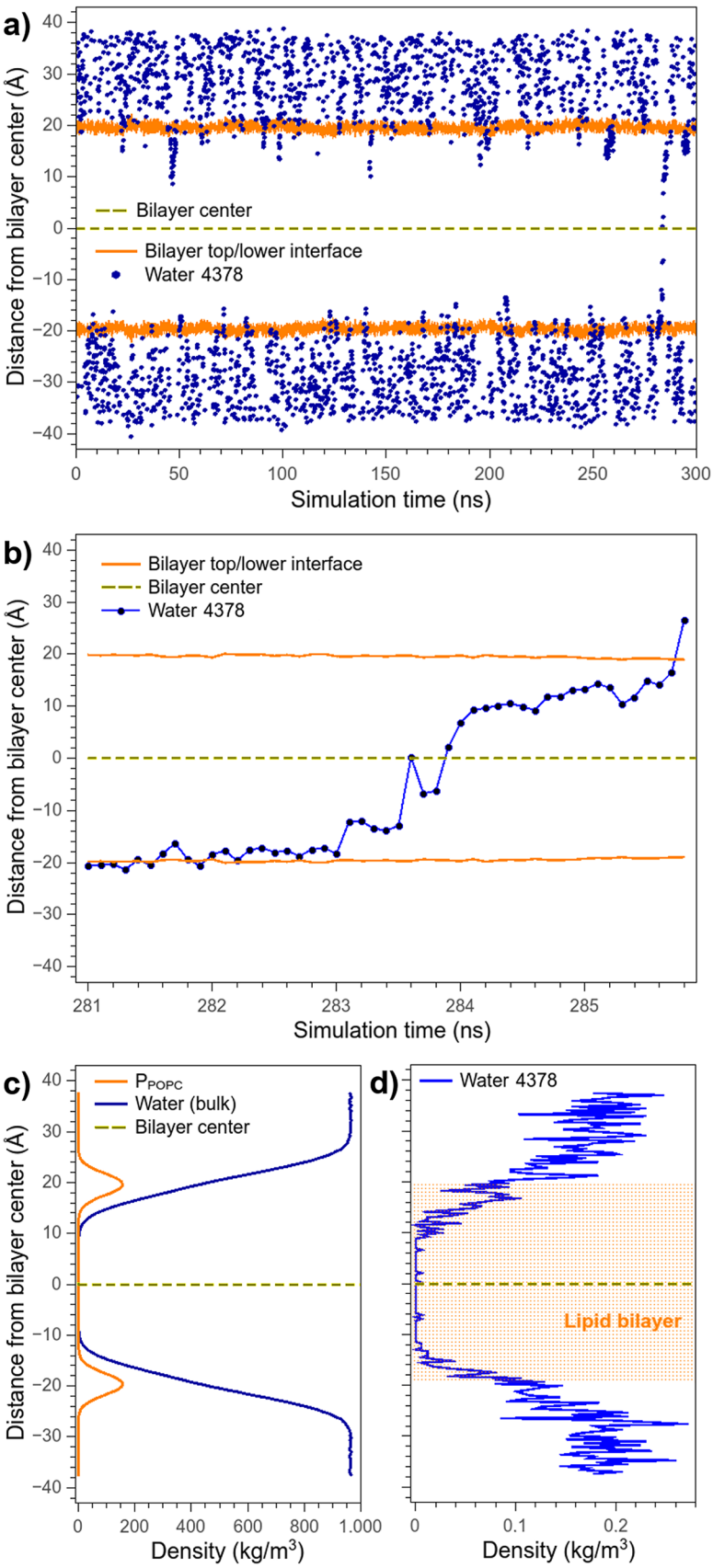


Fig. 1 **a**) Temporal evolution of the z-coordinate of a specific water molecule (dots) in a simulation box containing a POPC bilayer in the aqueous phase. The upper and lower limits of the bilayer are the average z coordinates of the phospholipids P atoms at each instant of the simulation. The geometric center of the lipid structure is shown as dashed lines. **b**) A highlight of a water molecule permeation event occurring at 281 to 286 ns time interval of **a**); here, a line connects the dots. **c**) Density profile for the P atoms of the POPC molecules and all water molecules in the simulation box, normalized relative to the bilayer center. There is no evidence of water inside the bilayer hydrophobic core. **d**) Individual density profile of the 4378 water molecule analyzed in **a**) and **b**)—the tiny peaks in the central region reveal that the molecule was inside the bilayer, but the information is not enough to characterize the event highlighted in **b**)

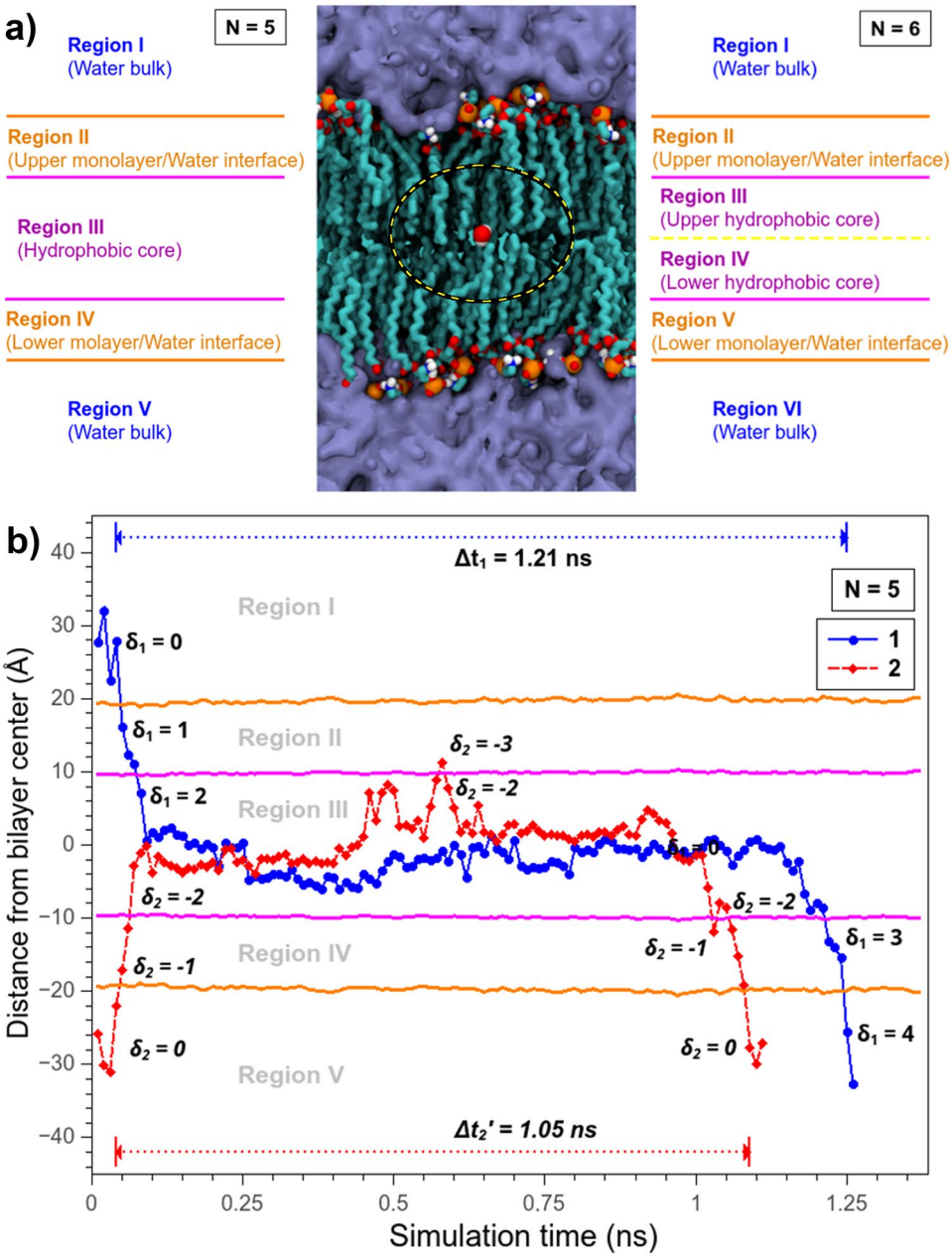


Fig. 2 **a**) Example of segmentation of a simulation box in five and six regions. The surface represents the aqueous phase, the larger spheres represent the P atoms of the phospholipid headgroups, and the apolar tails are presented as licorice. An individual water molecule, located in the bilayer center, is highlighted by a dashed circle. **b**) Examples of a permeation event (circles) successfully completed and another one in which, although the molecule advances over the center of the bilayer, it ends up returning and leaving the structure for the same monolayer it had entered (diamonds), not completing a passage so. The indication of regions follows the $N=5$ pattern defined in **a**), and the accumulated score value δ of each molecule is highlighted when their region change

Different authors segment the bilayer in regions according to their objectives, and systems studied [15, 16]. In any case, a permeation event consists of a molecule gradually advancing through all the bilayer regions. To complete a passage, the molecule must enter by one monolayer and exit on the other. In this work, movements in which the molecule enter and exit through the same monolayer, different from other reference [22, 51], are not considered a permeation event. Here, we divide the bilayer into the five regions described above, but the method presented below can be generalized for an arbitrary number of regions.

A way to analyze permeation events is to segment the bilayer into different regions in z and follow the temporal evolution of each solute molecule in these regions. Using the segmentation in five regions shown in Fig. 2a, for instance, when going from Region I to Region II (transition I → II), the molecule will have left the aqueous phase and entered the upper interface region of the bilayer. If it goes further into the structure, the molecule will reach the hydrophobic core (Region III), but if it returns to the water bulk, it will be again in Region I, without having completed a passage. As seen earlier, events in which the molecule enters and remains in the bilayer for some simulation time, but then leaves the structure by the same interface it had entered, are frequent (Fig. 1a).

To follow the evolution of the i-th molecule trajectory relative to the bilayer, we can define a quantity $T_i(t)$ that measures the number of region borders transpassed by the particle between two consecutive instants, t and $t+\Delta t$. Let

Table 1 Transition values for N = 5 regions

R (t+Δt) \ R (t)	I	II	III	IV	N
I	0	1	2	3	0
II	-1	0	1	2	3
III	-2	-1	0	1	2
IV	-3	-2	-1	0	1
N	0	-3	-2	-1	0

$R_i(t)$ be a label defining the region where the particle is located at the instant t. If in the instant $t+\Delta t$, the particle remains in the same region, $T_i(t)$ should be zero, and different from zero in other cases.

Let us introduce, for a five regions segmentation, as shown in Fig. 2a, the transition matrix $M(R_i(t+\Delta t),R_i(t))$ defined on Table 1.

The element of M corresponding to the movement between t and $t+\Delta t$ will give the value of $T_i(t)$. Note that this matrix permits to follow the motion direction because positive values correspond to transition from upper to lower monolayer while the negatives for movements in the opposite direction.

Due to the periodic boundary conditions applied to MD simulations, Regions I and V constitute the water bulk, and the molecules transact from one to another through the simulation box images. So considering them as distinct regions is just an artifact of the method, and therefore transitions like $I \rightarrow V$ or $V \rightarrow I$ must be disregarded. Transitions with values 2 and 3 ($T = \pm 2$ or $T = \pm 3$) imply that from one analyzed instant to another, the molecule *jumps* one or two entire regions, respectively, crossing two or three borders. For example, the molecule was in the upper aqueous phase, and in the next instant, it is in the center of the bilayer, performing a $I \rightarrow III$ transition. This type of transition is directly associated with the accuracy of the analyzed trajectory (see Fig. 3). For water molecules, trajectories recorded at least each 25 ps timeframe were necessary to eliminate the types-2 or 3 *jumps* occurrences. For lower precision recorded trajectories or a higher segmentation of the bilayer, type-2 or greater *jumps* can occur, and the proper permeation event characterization requires an individual graphical analysis, as exemplified in Fig. 3.

In a typical permeation event, the molecule progressively advances from one region to another until the passage is complete. Therefore, in addition to monitoring the evolution of the molecule position between consecutive instants, it is necessary to verify when a set of transitions characterizes a permeation event. Considering a segmented box in N regions, we will have a permeation event when

$$\delta_i = \Sigma T_i = \pm(N-1) \quad (1)$$

For $N = 5$, a permeation event occurs when a score of 4 is reached (the molecule left Region I and reached Region V by crossing the bilayer) or -4 (starts at Region V and reach Region I). Figure 2b shows two situations, one where a permeation event occurs (circles) and another in which, despite accessing the center of the bilayer, the molecule returns to the bulk water by the same interface, not completing a permeation event (diamonds). Once the molecule score has reached the criterion defined above, the event must be registered and imposed $\delta = 0$, since the molecule having completed the passage is again in the aqueous phase.

Some care must be taken at the beginning of an analysis. For all molecules located at Regions I or V, δ_i is set 0. The δ value of molecules initially in Regions II to IV is ignored until the molecules reach Regions I or V, unless one provides this information from a previous analysis.

The number N of regions depends on the system being analyzed, mainly considering their physical meaning and the studied interest molecule. To evaluate water permeation events in pure bilayers, $N = 5$ is adequate, as shown in the following applications. On the other hand, if one wants to know how many water molecules reach a given region of the bilayer, its center for example, without being a permeation event, $N = 6$ can be adopted considering the bilayer center as a new region boundary (Fig. 2a). In this case, for $\delta = \pm 5$, we would have the permeation events completed. Denoting n the total number of permeation events, and n' the number of events for which water molecules reach the center of the bilayer for the first time (δ reaches ± 3) during its journey inside the bilayer. Then, (n' - n) will provide the number of events in which the permeation is incomplete, that is, events where the molecule reached the center, returned, and left the bilayer by the same interface. However, it is essential to highlight the compromise between the number of regions N and the recorded trajectory timeframe. Increasing N means a decrease in the thickness of the layers defining the different regions, and the frequency of occurrence of *jumps* requiring special treatment will grow. Therefore, increases in N need to be compensated by decreasing the timeframe of the analyzed trajectory.

Phospholipid bilayers may show local fluctuations in thickness for several reasons. For example, the interactions with a peptide, or other molecules, can produce a local thinning of the bilayer [6, 52]. A bilayer composed of different types of lipids can also produce fluctuations in the bilayer thickness due to the size of the tails or the number of unsaturations [53]. Although the definition of regions is made from averages on the position of specific groups (phosphate, carbonyl, etc.), a permeation event implies that the molecule enters by an interface, passes

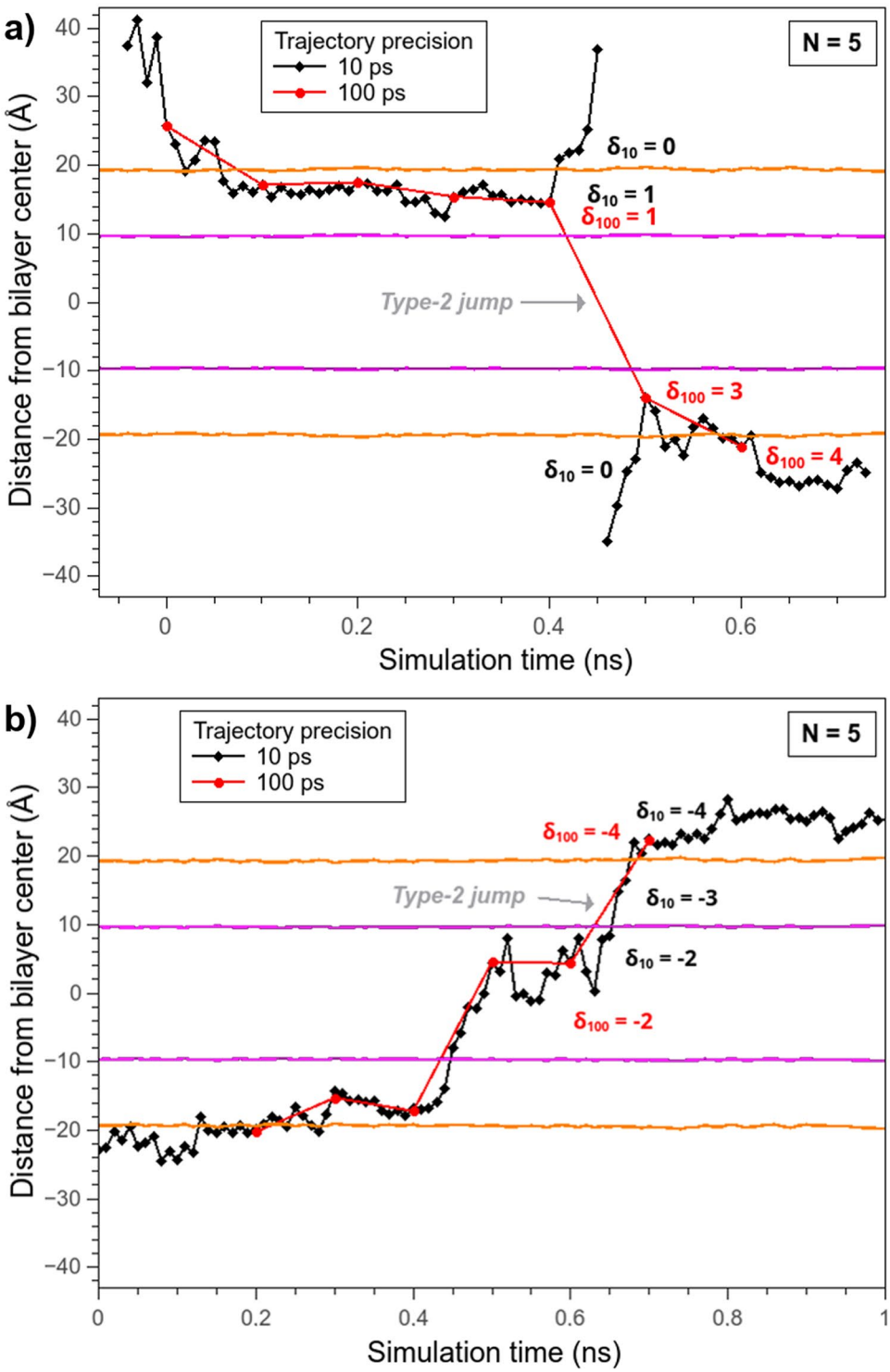


Fig. 3 Influence of trajectory accuracy over permeation events detection. In both situations, the same trajectory is analyzed with record precision of 100 ps (circles) and 10 ps (diamonds). **a**) Accepting the type-2 *jump* for a 100 ps precision trajectory leads to the register of a false-positive event since the more detailed 10 ps record reveals instead the molecule left the bilayer, crossed the aqueous phase through the box edges, and entered the bilayer again by the opposite monolayer. **b**) Although a type-2 *jump* to 100 ps precision occurs, the 10 ps detailed trajectory shows that the molecule indeed performs a permeation event

through the structure, and exits by the other interface. In this way, the proposed method can also be applied to bilayers with local deformations analyzing the time evolution of z coordinate as a function of x and y. So, correlating these points and the number of events, one can indicate if the deformation facilitates or promotes the increase of permeation events.

3 Results and Discussion

3.1 Permeation of Water Molecules in Pure and Mixed Bilayers

Biological membranes are composed of several types of lipids and other molecules forming a system whose size

makes it very complicated to study directly through computer simulations [54, 55]. On the other hand, phospholipid bilayers are systems that have structural properties of cell membranes, but on an adequate scale to a computational approach [56]. A pure bilayer is a model membrane composed of a single type of phospholipid. This simplified system is normally used as the starting point for tests or validations. Simplifying the system is also a strategy used in experimental techniques with films or micelles formed by a single lipid type [57]. Once successfully applied in the pure system, the bilayer composition can be progressively changed to a system formed by more types of lipids, or by the insertion of other molecules of interest. This gradual increase in complexity leads to a more realistic representation of the studied system [58].

In MD simulations, the system molecules are modeled according to the parameters of a force field. The GROMOS96-Berger and CHARMM36 force fields provide representations that have been widely used in bilayer simulations [59] (see Computational Details section). To demonstrate the applicability of the presented method, we performed simulations of pure POPC, POPE, and POPG bilayers, some of the main phospholipids components of membranes in eukaryotic and prokaryotic cells [10].

The application of the method to the simulations (see Fig. 4) reveals the occurrence of permeation events in all studied bilayers and that they are distributed throughout the simulation time. The graphs show the cumulative number of permeation events for the both set of simulations. A good correlation is observed in the results obtained in the two sets of simulations for the three pure bilayers. For example, in the POPC bilayers (Fig. 4a), a permeation event occurs, on average, every 38 ns of simulation (1/38 ns) for GG and 37 ns (1/37 ns) for NC. In the POPE bilayers (Fig. 4b), the average frequencies are 1/88 ns in GG and 1/75 ns for NC. And, in the POPG anionic bilayers (Fig. 4c), the simulations show equivalent results but with a smaller number of events, 1/150 ns for GG and 1/92 ns for NC. These results confirm the expected equivalence between the two different sets of simulations, and that the proposed method works properly for both of them.

The next step was evaluating the method at binary systems containing two types of lipids. Eukaryotic membranes are cholesterol rich, and its presence brings major modifications to the membrane properties, mainly reducing fluidity and increasing the lipid package (smaller area per lipid) and the thickness of the hydrophobic core [60, 61]. Starting from a pure system (POPC:Chol. 100:0) and gradually increasing the proportion of Chol. molecules (80:20 and 60:40), it is a clear proportional reduction in the number of water molecule permeation events. This effect is observed for both sets of simulations (Fig. 3d for GG and Fig. 3e for NC) with

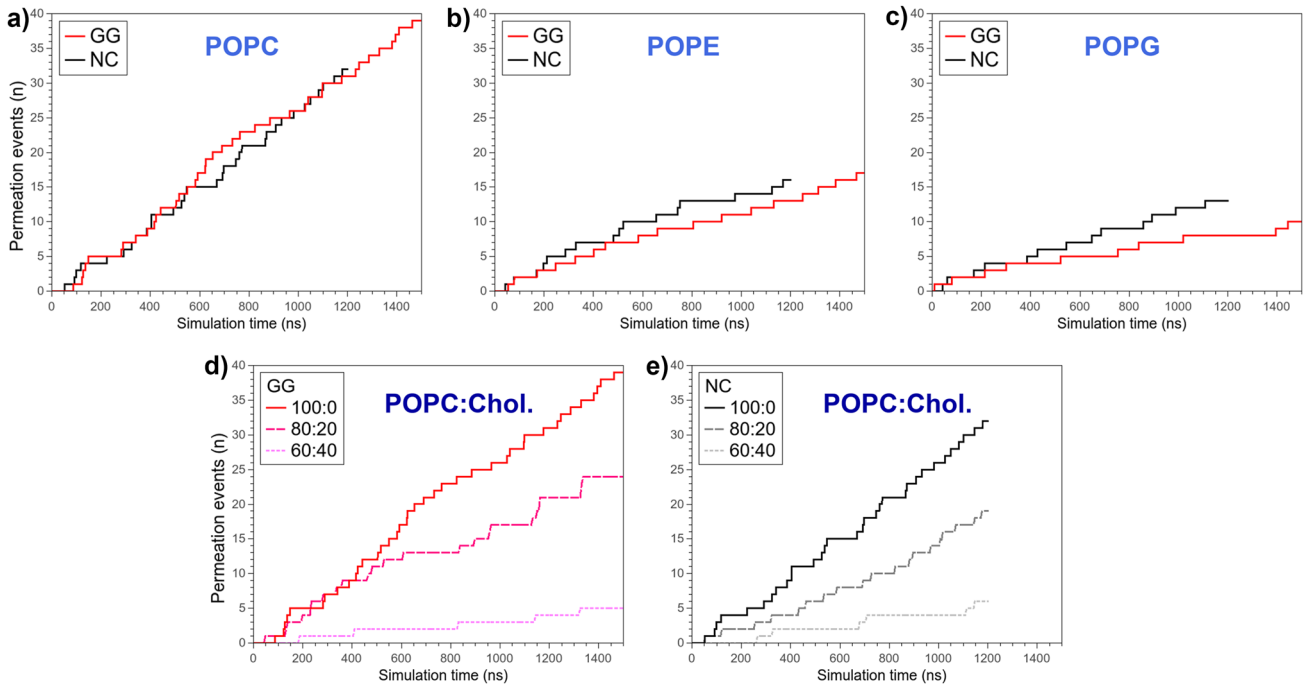


Fig. 4 The cumulative number of permeation events in pure POPC **a**), POPE **b**), and POPG **c**) bilayers, simulated with different force fields and simulation packages: GROMACS/GROMOS96 (GG) and NAMD/CHARMM36 (NC). Comparison of the number of permeation events in bilayers with different concentrations of cholesterol, POPC:Chol. 100:0 (darkest line), 80:20, and 60:40 (lightest line) obtained with GROMACS/GROMOS96 **d**) and NAMD/CHARMM36 **e**)

a good agreement between them. While for GG, the average frequency of a permeation event drops from 1/38 ns for pure bilayer (100:0) to 1/62 ns in the bilayer containing 20% Chol. (80:20) and 1/300 ns in 40% Chol. (60:40), for the NC simulations, these numbers are 1/37 ns (100: 0), 1/63 ns (80:40), and 1/200 ns (60:40).

The results indicate that Chol. has an inhibitory effect on water permeation. They point the same qualitative findings of Hub et al. [62] that, using statistical sampling simulations, show an increase in the transfer free energy barrier of water molecules through a bilayer containing cholesterol molecules. Also, Jedlovszky and Mezei [63] show a shift outwards the membrane due to the enlargement of the free energy barrier with the increasing of cholesterol content. These changes in the bilayer thermodynamics reduce the water solubility at the hydrophobic core, thicker, and denser and consequently decrease the probability of a water molecule reaches the center of the structure.

Using a different condition to evaluate the accessibility of water molecules to the bilayer interior in microsecond-length scale equilibrium simulations, Hong et al. [22] also report a reduction in the number of events with Chol. insertion. Using the VMD [64], the authors considered a permeation event every water molecule that could be located at some instant in a central region of ± 9 Å from the bilayer center, without following its temporal evolution. While for a pure POPC bilayer, they obtained one event every 17 ns, in a system containing 33% Chol., the average dropped to 1/114 ns, that is, a 6.7 times reduction in the frequency of events, which can be correlated with the reduction we obtained to 20% Chol. (1.6 times GG or 1.7 times NC) and 40% Chol. (7.8 times GG and 5.3 times NC). However, some care must be taken to establish direct comparisons between the number of permeation events obtained here with those reported by the authors, since the criteria used to define an event are different. Imposing a less restrictive condition to compute permeation events, that the water molecules reach the center of the bilayer, measured as *n*' in the data of Table 2, we still obtained similar factors for reduction of the frequencies pointed above. The results reveal that around half of the water molecules cross the bilayer center and half arrive until the center but return to the bulk by the same monolayer. In Table 2, *n* and ΔT measure the number and the average duration of complete permeation events, respectively, while *n*' and ΔT' measure the same quantities for all the events in which the water molecule reaches the bilayer center. The data indicate that once in the bilayer center, the probability of the molecule completing the crossing by the opposite monolayer, or returning through the same one it had entered, is statistically equivalent. This result is consistent with the free energy profiles obtained through enhanced sampling simulations for pure bilayers with small curvatures, which show that the center of the hydrophobic core as a local minimum between two symmetrical peaks [65, 66].

The results show that the number of permeation events decreases, for pure bilayers, following the same trend as the area per lipid (also showed in Table 2), i.e., POPC → POPE ≈ POPG. The same happens to the bilayers with cholesterol. As proposed by Orsi and Essex [51], it

Table 2 Bilayer properties and comparison between the number of molecules that reach the center of the bilayer (*n'*) with those that complete permeation events (*n*). The time intervals (Δt and Δt') are the total simulation time the molecule remains within the structure and the permeability coefficients were estimated from Eq. (2)

Set	System		Simulation time (ns)	Area per lipid (Å^2)	Bilayer thickness - $d_{P\text{-}P}$ (Å)	Reach the center of the bilayer (|δ|=3)[a]		Permeation events (|δ|=5)[a]		Permeability coefficient
						n'	Δt' (ns)	*n*	Δt (ns)	*P* (μm/s)
GG	POPC: Chol	100:0	1500	65.4 ± 1.2	39.1 ± 0.6	85	1.3 ± 0.7	39	1.5 ± 0.8	10.17 ± 0.03
		80:20	1500	53.0 ± 0.9	44.6 ± 0.8	44	2.4 ± 1.9	24	2.6 ± 2.9	7.65 ± 0.01
		60:40	1500	45.6 ± 0.6	46.0 ± 0.5	7	3.8 ± 2.4	5	4.2 ± 2.8	1.86 ± 0.01
	POPE		1500	56.1 ± 0.7	45.5 ± 0.5	31	2.9 ± 3.1	17	3.3 ± 2.6	5.61 ± 0.18
	POPG		1500	54.7 ± 1.3	45.4 ± 0.8	18	11.2 ± 15.0[b]	10	17.2 ± 20.3[b]	3.40 ± 0.09
NC	POPC: Chol	100:0	1200	65.9 ± 0.2	39.3 ± 0.7	61	1.6 ± 0.9	32	1.3 ± 0.7	9.69 ± 0.01
		80:20	1200	56.1 ± 0.1	42.1 ± 0.2	35	2.1 ± 2.3	19	1.9 ± 2.0	7.29 ± 0.01
		60:40	1200	45.4 ± 0.1	45.1 ± 0.3	11	3.1 ± 2.1	6	3.3 ± 2.5	2.43 ± 0.01
	POPE		1200	58.1 ± 0.1	44.0 ± 0.3	34	2.8 ± 2.4	16	2.4 ± 2.1	5.66 ± 0.01
	POPG		1200	61.1 ± 0.1	40.3 ± 0.2	28	7.5 ± 8.2	13	7.9 ± 10.5	4.84 ± 0.01

[a]An $N=6$ regions segmentation was used to obtain these data

[b]For POPG systems, the statistics is more sensitive to the long-duration permeation events because of the interaction of the water molecule with the Na^+ ions inside the bilayer. An example is shown in the Fig. S1 in Supplementary material for details

is possible to estimate the permeability coefficient P from the number of molecules that spontaneously cross a bilayer during a simulation by using the first Fick's diffusion law:

$$P = \frac{J}{A.\Delta c} = \frac{0.5n/t}{A.\Delta c} \quad (2)$$

where n is the number of permeation events at simulation time t, A is the area of the bilayer plane (A_{xy} by construction), and $\Delta c = c_{\text{water_bulk}} - c_{\text{hydrophobic_core}}$ is the water concentration gradient. Since the water concentration in the hydrophobic core is negligible ($c_{\text{hydrophobic_core}} = 0$), Δc is given by the number of water molecules per nm^3 for the water model used at the reference simulation temperature. The permeability coefficients obtained for the simulations are shown in Table 2. The values indicate, as expected, the reduction of water permeability with the increase in cholesterol concentration and show a good correspondence with that recently obtained for POPC:Chol. 90:10 vesicles, $P = 15.7 \pm 5.5$ μm/s [67], and qualitatively reproduce the trend reported by Lande et al. [68] for POPC vesicles with different concentrations of cholesterol, 72 ± 18 μm/s (100:0) to 13 ± 5 μm/s (60:40). The POPE and POPG bilayers showed lower permeability than POPC, reflecting the greater lipid packaging due to the interaction between the phospholipids headgroups. In systems with low event sampling, longer simulations should be used to improve the statistics. However, the results in the Table 2 show that even some hundreds nanoseconds simulations can provide qualitative insight on the number and duration of permeation events and, consequently, into the effect of a certain molecule on the bilayer, like cholesterol. Finally, as expected for equilibrium MD simulations, we observed an approximately equal number of permeation events in both directions.

4 Conclusion

The passage of small molecules through membranes by diffusive processes is a phenomenon that can also be studied by MD simulations. Even in simulations without a chemical potential gradient or osmotic pressure, permeation events can occur. In this work, a simple method to identify the occurrence of molecule permeation events in lipid bilayers was presented. The method provided the mapping of all permeation events during the simulation, when applied to MD trajectories for lipid bilayers in aqueous solutions.

To illustrate the method, we presented water permeation investigation in pure bilayer simulations carried out using different force fields and simulation packages. The results obtained indicate an equivalence between these setups. Applied to the mixed POPC:Chol. bilayers, the method shows that the increase in cholesterol concentration gradually reduces the occurrence of water molecule permeation events. From these data, it is possible to make statistical analyzes of the frequency of event occurrence and their duration intervals and to estimate the permeability coefficient that qualitatively reproduced experimental data.

In bilayers disturbed by the action of a drug or membrane protein, for example, the distribution analysis of events throughout the simulation time can provide clues about the interaction dynamics between bilayer and drug. By analyzing the x and y coordinates of the water molecules during permeation (see Fig. S2 in the Supplementary material for an example), it is possible to evaluate whether and how the disturbances favor the leakage of water. In this way, recently, the tool proposed here to perform this analysis was used to study the effects of nitro-oxidation of lipids on the permeability of membranes performed by Oliveira et al. [69] and to evaluate the permeation effects on phase-separated domains induced by lipid oxidation [70].

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1007/s13538-022-01071-1.

Acknowledgements We would like to thank to Pedro G. Pascutti for the motivation.

Author Contribution CRSC performed all simulations and analysis. The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding The authors acknowledge financial support from São Paulo Research Foundation-FAPESP (ASA FAPESP grant #2010/18169–3. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001. This research was supported by resources supplied by the Center for Scientific Computing (NCC/GridUNESP) of the São Paulo State University (UNESP), the "Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho em São Paulo" (CENAPAD-SP), and also for the National Laboratory for Scientific Computing (LNCC/MCTI, Brazil) for providing HPC resources of the SDumont supercomputer.

Data Availability The.tpr files to reproduce the MD simulations reported in this paper are also deposited in the Github repository. All of the data are available upon request.

Code Availability The method presented in this work is implemented as a computational tool available on https://github.com/crobertocamilo/MD-permeation, along with instructions, and the input and output files of an application example.

Declarations

Conflict of Interest The authors declare no competing interests.

References

1. J. Gumbart, A. Aksimentiev, E. Tajkhorshid, Y. Wang, K. Schulten, Molecular dynamics simulations of proteins in lipid bilayers. Curr. Opin. Struct. Biol. **15**, 423–431 (2005). https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.07.007
2. D.P. Tieleman, S.J. Marrink, H.J. Berendsen, A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems. Biochim. Biophys. Acta. **1331**, 235–270 (1997). https://doi.org/10.1016/s0304-4157(97)00008-7
3. S.J. Marrink, A.H. de Vries, D.P. Tieleman, Lipids on the move: simulations of membrane pores, domains, stalks and curves. Biochim. Biophys. Acta Biomembr. **1788**, 149–168 (2009). https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.006
4. S. Moradi, A. Nowroozi, M. Shahlaei, Shedding light on the structural properties of lipid bilayers using molecular dynamics simulation: a review study. RSC Adv. **9**, 4644–4658 (2019). https://doi.org/10.1039/C8RA08441F
5. S.S. Deol, P.J. Bond, C. Domene, M.S.P. Sansom, Lipid-protein interactions of integral membrane proteins: a comparative simulation study. Biophys. J . **87**, 3737–3749 (2004). https://doi.org/10.1529/biophysj.104.048397
6. W. Kopeć, J. Telenius, H. Khandelia, Molecular dynamics simulations of the interactions of medicinal plant extracts and drugs with lipid bilayer membranes. FEBS J. **280**, 2785–2805 (2013). https://doi.org/10.1111/febs.12286
7. J.P. Ulmschneider, M.B. Ulmschneider, Molecular dynamics simulations are redefining our view of peptides interacting with biological membranes. Acc. Chem. Res. **51**, 1106–1116 (2018). https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00613
8. J.D. Nickels, J. Katsaras, Water and Lipid Bilayers, in *Membrane hydration: the role of water in the structure and function of biological membranes*. ed. by E.A. Disalvo (Springer International Publishing, Cham, 2015), pp. 45–67
9. M. Pasenkiewicz-Gierula, K. Baczynski, M. Markiewicz, K. Murzyn, Computer modelling studies of the bilayer/water interface. Biochim. Biophys. Acta Biomembr. **1858**, 2305–2321 (2016). https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.01.024
10. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Water, *in Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. The Compartmentalization of Cells, (Garland Science, New York, 2002), pp. 583-615. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26907/
11. A. Finkelstein, Water and nonelectrolyte permeability of lipid bilayer membranes. J. Gen. Physiol. **68**, 127–135 (1976). https://doi.org/10.1085/jgp.68.2.127
12. M. Orsi, W.E. Sanderson, J.W. Essex, Permeability of small molecules through a lipid bilayer: a multiscale simulation study. J. Phys. Chem. B **113**, 12019–12029 (2009). https://doi.org/10.1021/jp903248s
13. R.M. Venable, A. Krämer, R.W. Pastor, Molecular dynamics simulations of membrane permeability. Chem Rev **119**, 5954–5997 (2019). https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00486
14. A.G. Volkov, S. Paula, D.W. Deamer, Two mechanisms of permeation of small neutral molecules and hydrated ions across phospholipid bilayers. Bioelectrochem. Bioenerg. **42**, 153–160 (1997). https://doi.org/10.1016/S0302-4598(96)05097-0
15. E. Awoonor-Williams, C.N. Rowley, Molecular simulation of nonfacilitated membrane permeation. Biochim. Biophys. Acta Biomembr. **1858**, 1672–1687 (2016). https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.12.014
16. S.-J. Marrink, H.J.C. Berendsen, Simulation of water transport through a lipid membrane. J. Phys. Chem. **98**, 4155–4168 (1994). https://doi.org/10.1021/j100066a040
17. A. Cass, A. Finkelstein, Water permeability of thin lipid membranes. J. Gen. Physiol. **50**, 1765–1784 (1967). https://doi.org/10.1085/jgp.50.6.1765
18. J. Kästner, Umbrella sampling. WIREs Computational Molecular. Science **1**, 932–942 (2011). https://doi.org/10.1002/wcms.66
19. E. Darve, A. Pohorille, Calculating free energies using average force. J. Chem. Phys. **115**, 9169–9183 (2001). https://doi.org/10.1063/1.1410978
20. A. Laio, M. Parrinello, Escaping free-energy minima. PNAS **99**, 12562–12566 (2002). https://doi.org/10.1073/pnas.202427399
21. O. Valsson, P. Tiwary, M. Parrinello, Enhancing important fluctuations: rare events and metadynamics from a conceptual viewpoint. Annu. Rev. Phys. Chem. **67**, 159–184 (2016). https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-040215-112229
22. C. Hong, D.P. Tieleman, Y. Wang, Microsecond molecular dynamics simulations of lipid mixing. Langmuir **30**, 11993–12001 (2014). https://doi.org/10.1021/la502363b
23. A. Krämer, A. Ghysels, E. Wang, R.M. Venable, J.B. Klauda, B.R. Brooks, R.W. Pastor, Membrane permeability of small molecules from unbiased molecular dynamics simulations. J. Chem. Phys. **153**, 124107 (2020). https://doi.org/10.1063/5.0013429
24. H.J.C. Berendsen, D. van der Spoel, R. van Drunen, GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. Comput. Phys. Commun. **91**, 43–56 (1995). https://doi.org/10.1016/0010-4655(95)00042-E
25. M.J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J.C. Smith, B. Hess, E. Lindahl, GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. SoftwareX **1–2**, 19–25 (2015). https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001
26. C. Oostenbrink, A. Villa, A.E. Mark, W.F. van Gunsteren, A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. J. Comput. Chem. **25**, 1656–1676 (2004). https://doi.org/10.1002/jcc.20090
27. O. Berger, O. Edholm, 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). https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78845-3
28. D.P. Tieleman, H.J. Berendsen, A molecular dynamics study of the pores formed by Escherichia coli OmpF porin in a fully hydrated palmitoyloleoylphosphatidylcholine bilayer. Biophys. J. **74**, 2786–2801 (1998). https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77986-X
29. W. Zhao, T. Róg, A.A. Gurtovenko, I. Vattulainen, M. Karttunen, Atomic-scale structure and electrostatics of anionic palmitoyloleoylphosphatidylglycerol lipid bilayers with Na+ counterions. Biophys. J. **92**, 1114–1124 (2007). https://doi.org/10.1529/biophysj.106.086272
30. M. Höltje, T. Förster, B. Brandt, T. Engels, W. von Rybinski, H.D. Höltje, Molecular dynamics simulations of stratum corneum lipid models: fatty acids and cholesterol. Biochim. Biophys. Acta **1511**, 156–167 (2001). https://doi.org/10.1016/s0005-2736(01)00270-x
31. H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren, J. Hermans, in *Intermolecular Forces: Proceedings of the Fourteenth Jerusalem Symposium on Quantum Chemistry and Biochemistry Held in Jerusalem, Israel, April 13–16*, ed. by B. Pullman. Interaction models for water in relation to protein hydration, (Springer Netherlands, Dordrecht, 1981), pp. 331–342
32. T. Darden, D. York, L. Pedersen, Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. J. Chem. Phys. **98**, 10089–10092 (1993). https://doi.org/10.1063/1.464397
33. B. Hess, H. Bekker, H.J.C. Berendsen, J.G.E.M. Fraaije, LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. J. Comput. Chem. **18**, 1463–1472 (1997). https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12%3c1463::AID-JCC4%3e3.0.CO;2-H

34. S. Miyamoto, P.A. Kollman, Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. J. Comput. Chem. **13**, 952–962 (1992). https://doi.org/10.1002/jcc.540130805
35. S. Nosé, A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. Mol. Phys. **52**, 255–268 (1984). https://doi.org/10.1080/00268978400101201
36. W.G. Hoover, Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions. Phys. Rev. A **31**, 1695–1697 (1985). https://doi.org/10.1103/PhysRevA.31.1695
37. M. Parrinello, A. Rahman, Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method. J. Appl. Phys. **52**, 7182–7190 (1981). https://doi.org/10.1063/1.328693
38. S. Nosé, M.L. Klein, Constant pressure molecular dynamics for molecular systems. Mol. Phys. **50**, 1055–1076 (1983). https://doi.org/10.1080/00268978300102851
39. K.K. Halling, B. Ramstedt, J.H. Nyström, J.P. Slotte, T.K.M. Nyholm, Cholesterol interactions with fluid-phase phospholipids: effect on the lateral organization of the bilayer. Biophys. J. **95**, 3861–3871 (2008). https://doi.org/10.1529/biophysj.108.133744
40. S. Leekumjorn, A.K. Sum, Molecular characterization of gel and liquid-crystalline structures of fully hydrated POPC and POPE bilayers. J. Phys. Chem. B **111**, 6026–6033 (2007). https://doi.org/10.1021/jp0686339
41. J.B. Klauda, R.M. Venable, J.A. Freites, J.W. O'Connor, D.J. Tobias, C. Mondragon-Ramirez, I. Vorobyov, A.D. MacKerell, R.W. Pastor, Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: validation on six lipid types. J. Phys. Chem. B **114**, 7830–7843 (2010). https://doi.org/10.1021/jp101759q
42. J.C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R.D. Skeel, L. Kalé, K. Schulten, Scalable molecular dynamics with NAMD. J. Comput. Chem. **26**, 1781–1802 (2005). https://doi.org/10.1002/jcc.20289
43. S. Jo, J.B. Lim, J.B. Klauda, W. Im, CHARMM-GUI membrane builder for mixed bilayers and its application to yeast membranes. Biophys. J. **97**, 50–58 (2009). https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.04.013
44. W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, M.L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. J. Chem. Phys. **79**, 926–935 (1983). https://doi.org/10.1063/1.445869
45. S.R. Durell, B.R. Brooks, A. Ben-Naim, Solvent-induced forces between two hydrophilic groups. J. Phys. Chem. **98**, 2198–2202 (1994). https://doi.org/10.1021/j100059a038
46. G.J. Martyna, D.J. Tobias, M.L. Klein, Constant pressure molecular dynamics algorithms. J. Chem. Phys. **101**, 4177–4189 (1994). https://doi.org/10.1063/1.467468
47. S.E. Feller, Y. Zhang, R.W. Pastor, B.R. Brooks, Constant pressure molecular dynamics simulation: the Langevin piston method. J. Chem. Phys. **103**, 4613–4621 (1995). https://doi.org/10.1063/1.470648
48. H.C. Andersen, Rattle: A "velocity" version of the shake algorithm for molecular dynamics calculations. J. Comput. Phys. **52**, 24–34 (1983). https://doi.org/10.1016/0021-9991(83)90014-1
49. J.J. Lopez Cascales, A. Garro, R.D. Porasso, R.D. Enriz, The dynamic action mechanism of small cationic antimicrobial peptides. Phys. Chem. Chem. Phys. **16**, 21694–21705 (2014). https://doi.org/10.1039/c4cp02537g
50. R.J. Alsop, A. Dhaliwal, M.C. Rheinstädter, Curcumin protects membranes through a carpet or insertion model depending on hydration. Langmuir **33**, 8516–8524 (2017). https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01562
51. M. Orsi, J.W. Essex, The ELBA force field for coarse-grain modeling of lipid membranes. PLoS ONE **6**, e28637 (2011). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028637
52. W.-C. Hung, F.-Y. Chen, C.-C. Lee, Y. Sun, M.-T. Lee, H.W. Huang, Membrane-thinning effect of curcumin. Biophys. J. **94**, 4331–4338 (2008). https://doi.org/10.1529/biophysj.107.126888
53. W.F.D. Bennett, D.P. Tieleman, Computer simulations of lipid membrane domains. Biochim. Biophys. Acta Biomembr. **1828**, 1765–1776 (2013). https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.03.004
54. G. van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson, Membrane lipids: where they are and how they behave. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. **9**, 112–124 (2008). https://doi.org/10.1038/nrm2330
55. R.M. Epand, Introduction to membrane lipids, in *Methods in Membrane Lipids*. ed. by D.M. Owen (Springer, New York, NY, 2015), pp. 1–6
56. S. Baoukina, D.P. Tieleman, Computer simulations of phase separation in lipid bilayers and monolayers. Methods Mol. Biol. **1232**, 307–322 (2015). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1752-5_21
57. I. Czolkos, A. Jesorka, O. Orwar, Molecular phospholipid films on solid supports. Soft. Matter. **7**, 4562–4576 (2011). https://doi.org/10.1039/C0SM01212B
58. G. Enkavi, M. Javanainen, W. Kulig, T. Róg, I. Vattulainen, Multiscale simulations of biological membranes: the challenge to understand biological phenomena in a living substance. Chem. Rev. **119**, 5607–5774 (2019). https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00538
59. N. Sapay, D.P. Tieleman, Chapter 4 molecular dynamics simulation of lipid–protein interactions, in *Current Topics in Membranes*. ed. by S.E. Feller (Academic Press, 2008), pp. 111–130
60. S.A. Pandit, S.-W. Chiu, E. Jakobsson, A. Grama, H.L. Scott, Cholesterol surrogates: a comparison of cholesterol and 16:0 ceramide in POPC bilayers. Biophys. J. **92**, 920–927 (2007). https://doi.org/10.1529/biophysj.106.095034
61. A. Khajeh, H. Modarress, The influence of cholesterol on interactions and dynamics of ibuprofen in a lipid bilayer. Biochim. Biophys. Acta Biomembr. **1838**, 2431–2438 (2014). https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.05.029
62. J.S. Hub, F.K. Winkler, M. Merrick, B.L. de Groot, Potentials of mean force and permeabilities for carbon dioxide, ammonia, and water flux across a rhesus protein channel and lipid membranes. J. Am. Chem. Soc. **132**, 13251–13263 (2010). https://doi.org/10.1021/ja102133x
63. P. Jedlovszky, M. Mezei, Effect of cholesterol on the properties of phospholipid membranes. 2. Free Energy Profile of Small Molecules. J. Phys. Chem. B **107**, 5322–5332 (2015). https://doi.org/10.1021/jp021951x
64. W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: visual molecular dynamics. J. Mol. Graph. **14**, 33–38 (1996). https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5
65. D. Bemporad, C. Luttmann, J.W. Essex, Computer simulation of small molecule permeation across a lipid bilayer: dependence on bilayer properties and solute volume, size, and cross-sectional area. Biophys. J. **87**, 1–13 (2004). https://doi.org/10.1529/biophysj.103.030601
66. B.B. Issack, G.H. Peslherbe, Effects of cholesterol on the thermodynamics and kinetics of passive transport of water through lipid membranes. J. Phys. Chem. B **119**, 9391–9400 (2015). https://doi.org/10.1021/jp510497r
67. T. Bhatia, T. Robinson, R. Dimova, Membrane permeability to water measured by microfluidic trapping of giant vesicles. Soft. Matter. **16**, 7359–7369 (2020). https://doi.org/10.1039/D0SM00155D
68. M.B. Lande, J.M. Donovan, M.L. Zeidel, The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons. J. Gen. Physiol. **106**, 67–84 (1995). https://doi.org/10.1085/jgp.106.1.67
69. M.C. Oliveira, M. Yusupov, A. Bogaerts, R.M. Cordeiro, How do nitrated lipids affect the properties of phospholipid membranes? Arch. Biochem. Biophys. **695**, 108548 (2020). https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108548

70. M.C. Oliveira, M. Yusupov, A. Bogaerts, R.M. Cordeiro, Lipid oxidation: role of membrane phase-separated domains. J. Chem. Inf. Model. **61**, 2857–2868 (2021). https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00104

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.